

Az Egészségügyi Minisztérium módszertani levele Immunistokémiai és immuncitokémiai módszerek alkalmazása a patológiában

Készítette: Az Országos Pathologiai Intézet és a Pathologus Szakmai Kollégium

1. Az immunhistokémia/citokémia definíciója

Egyes speciális immunkémiai eljárások alkalmazása hisztológiai (immunhistokémia), vagy citológiai (immuncitokémia) preparátumokban a patológia nélkülözhetetlen diagnosztikus és kutató módszere. Az immunhistokémia/citokémia lényege strukturális, vagy funkcionális fehérje, glikoprotein, vagy komplex szénhidrát molekulák kimutatása a sejtekben, vagy az extracelluláris térben a sejtek és szövetek jellemzése céljából.

Az immunhistokémia/citokémia végrehajtható natív citológiai, gyorsfagyasztott, vagy rutinszerűen rögzített és paraffinba, vagy műgyantába ágyazott preparátumon is.

A modern immunhistokémia/citokémia a molekuláris biológia eredményeit a klasszikus morfológia erényeivel ötvözi, és így a molekuláris patológia módszerei közé is besorolható.

Az immunhistokémia/citokémia reakciók végrehajtására vonatkozó személyi és tárgyi feltételeket a hatályos minimumfeltételek szabályozzák.

2. Az immunhistokémia/citokémia reakciók végrehajtására vonatkozó gyakorlati szempontok

2.1 Mintagyűjtés és mintakezelés: Az optimális immunhistokémia/citokémia eljárás a megfelelő mintagyűjtés és kezeléssel kezdődik. Fontos, hogy a mintavételt megelőzően a patológus és a mintavevő konzultáljon, mert csak így érhető el a legmegfelelőbb mintakezelés (fixálás, gyorsfagyasztás). Amennyiben a formalinfixálásra kerül sor, fontos, hogy a vizsgálati anyag azonnal kerüljön a fixáló szerbe! Ajánlatos a gyorsabb és teljesebb fixálás érdekében a preparátumra való rámetés. Sajnos a mindennapos gyakorlat szerint nem orvos, hanem a műtői segédszemélyzet viseli gondját a patológiai vizsgálatra szánt szöveteknek, mely növeli a hibalehetőségeket (pl. tömény kézfertőtlenítőben való fixálás).

2.2 Rögzítés: Egységes ajánlás nehezen adható, az intézmények eltérő gyakorlatából adódó különbségek jelentősek. A standard fixálás során 10% „formalin”-t (formaldehiddel telített víz 1:9-hez hígított oldata) alkalmazhatunk enyhén savastól (pl. csapvizet formalin) a fiziológiás sóval készült oldaton keresztül a neutrális pufferezt formalin (NPF). Általános szabályként említhető, hogy a fixáló szer penetrációját a savas pH elősegítheti, de hátrányos egyes speciális vizsgálatok esetén. Az ajánlott fixáló szer a 10%-os NPF, az ajánlható időtartama 24 óra, de ez nagyban függ a minta nagyságától (pl. endoszkópos biopsziák esetén 4-6 óra elegendő lehet).

Megjegyzés: A formaldehid normál körülmények között gáznemű anyag. A biológiai célokra használt formalin azonban folyadék, amit a formaldehid gáz vízben történő elnyelésével (oldásával) lehet előállítani. Formalinnak tehát a formaldehid vizes oldatát nevezzük. A vízben a normál fizikokémiai feltételek között maximálisan 40%-nyi formaldehidet lehet oldani, azaz a formaldehiddel telített víz maximálisan 40%-os formaldehidnek, azaz a 100%-os formalin 40%-os formaldehidnek felel meg.

A szövetfixálást befolyásoló tényezők:

I. Fixálási előtti paraméterek

1. Konstans faktorok
 - A. Anesztézia fajtája
 - B. Anesztézia időtartama
 - C. A szövet anoxiás károsodása
2. Változó faktorok
 - A. Prefixációs idő

II: Paraméterek a fixálás közben

1. A fixáló szer tulajdonságai
 - A. Hatásmechanizmus
 - B. Szöveti penetráció
2. Fixálási kondíciók
 - A. Hőmérséklet
 - B. Fixálás időtartama
 - C. PH
 - D. Ozmolaritás
 - E. Koncentráció
 - F. Minta nagysága
 - G. Fixáló szer térfogata

III: Post-fixációs paraméterek

1. Beágyazás
 - A. Víztelenítés határfoka
 - B. Beágyazás hőfoka
 - C. Paraffin minősége
 - D. Egyéb kondíciók (vákuumos/nem vákuumos)
2. Tárolási paraméterek
 - A. Időtartam
 - B. Hőmérséklet
 - C. Tárolási feltételek
3. Milyen alkotóelem kerül vizsgálatra
 - A. Fehérjék
 - B. Enzimek
 - C. Lipidek
 - D. Nukleinsavak
 - E. Mucopolysaccharidok
 - F. Biogén aminok
 - G. Glikogén

A fixáló szer és fixálásra kerülő szövet térfogatának az aránya legalább 10:1-hez legyen, míg a fixálandó minta maximum 5 mm vastag legyen.

Fontos tendenciaként említhető, hogy az eltérő fixálási feltételekből adódó különbségeket a hő indukálta antigén feltárás részben kiegyenlítheti. A fixálás elősegíthető melegítéssel, vagy mikrohullámú besugárással, ezzel kapcsolatban azonban nincs kellő tapasztalat, és tömeges vizsgálatok esetén nehezen standardizálhatóak. Az alternatív fixálási procedúrák rutin diagnosztikai alkalmazásával kapcsolatban nincs kellő tapasztalat.

2.3 Beágyazás: Ahogy az ideális hisztomorfológiai feldolgozás alapja a kifogástalan víztelenítés és paraffinba ágyazás, úgy az immunhisztokémiai vizsgálat is ennek a függvénye. A megfelelően beágyazott szövet megfelelő (nem túl meleg helyen történő) tárolás esetén korlátlan ideig alkalmas a legtöbb immunhisztokémiai reakció elvégzésére. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a paraffin metszet formájában történő (akár 1-2 hetes) tárolás során bizonyos antigének (pl. ösztrogén receptor) detektálhatósága csökkenhet.

2.4 A megfelelő minta kiválasztása: Több rendelkezésre álló minta esetén az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz felhasználásra kerülő gondos kiválasztása szükséges, amennyiben a preparátum a kóros részletek mellett normális szövetet is tartalmaz, amely belső kontrollként is szolgálhat egyes immunreakciók esetén.

2.5 Metszés és metszetragasztás: A megfelelően karbantartott mikrotóm, és megfelelő mikrotóm kés/penge használata alapvető. Az itt is felléphető, az immunhisztokémiai metódust (is) zavaró technikai hibák a rutin hisztotechnológia minőségi hibáiból erednek. A metszetek tapadását 3-amino-propil-trietoxi-szilán („APES”) előkezelt tárgylemezek biztosítják a legmegfelelőbbben. Ezek készíthetők házilag, vagy beszerezhetők a kereskedelemben. A minőségi standard könnyebben biztosítható, ha professzionálisan készült tárgylemezek kerülnek felhasználásra. A metszetek tapadását elősegítheti a víz gondos eltávolítása a metszet alól (szívópapíros leitatás, hajszárítózás). Az APES csak hő aktiválás (minimum 3 óra 55-58 °C-on) után fejtheti ki a maximális hatását.

2.6 Antigén feltárás: A formaldehid alapú szöveti rögzítés során a fehérjék természetes konformációját többnyire irreverzibilisen megváltoztató keresztkötések létesülnek, amely révén az antigén determinánsok (epitópok) az antitestek számára hozzáférhetetlenné válhatnak. Az antigén (epitóp) feltárás célja, hogy az antigén determinánsokat felszabadítsuk, a számunkra fontos epitópokat hozzáférhetővé tegyük úgy, hogy közben a szöveti finomszerkezet nem sérüljön lényegesen.

Epitóp az antigén molekulának az a minimális molekuláris struktúrája - gyakran csupán csak egy kisebb része az antigén determinánsnak - amely az antitest (specifikus) antigén kötő helyével először reagálni fog. A paratóp egy adott antitest epitópjához hasonló struktúra, mely a nem ideális reakció feltételek esetén zavaró keresztreakcióhoz vezethet.

Az antigén feltárás standardizálása elkerülhetetlen. A következő paraméterek standardizálása szükséges: antigén feltáró oldat összetétele, vegyhatása, hőmérséklete, feltárás ideje, a melegítés módja. A mikrohullámú sütő és konvencionális kukta a leggyakrabban alkalmazott melegítő eszközök, de a végleges módszert minden laboratóriumnak magának kell kidolgoznia a helyi felszerelésnek, szövettani technikának, tapasztalatnak és igényeknek megfelelően.

2.7 Immunhisztokémiai/citokémiai eljárás gyorsfagyasztott metszeten, vagy citológiai preparátumon: A szövetek fagyasztásánál a folyékony nitrogénes gyorsfagyasztás ajánlható. A fagyasztásra kerülő szövet nagysága maximum 5 mm³ legyen. Az előkészítés és rögzítésre vonatkozó univerzális ajánlás nem adható, a laboratóriumok saját protokolljukat az ismert eljárások tesztelése révén dolgozhatják ki. A fagyasztott metszetek/citológiai preparátumok esetén glicerin-zselatinos, vagy APES kezelt tárgylemezek használata kedvező lehet. A morfológiai megőrződés és a megtartott antigenitás érdekében rögzítésre általában az 5-10 perces (szobahőmérsékletű, vagy hideg – -20°C –) acetone fixálás és (legalább néhány óras) szobahőn szárítás kombinációja a legeredményesebb, de bizonyos, főleg nukleáris antigének (pl. ösztrogén receptor) speciális fixálást igényelhetnek. Ilyen lehet például a rövid NBF fixálás, vagy a fixálás etanol bázisú rögzítőszerben.

2.8 Blokkolás: Amennyiben a jelölő enzim tormagyökér peroxidáz, akkor szükség van az endogén peroxidáz aktivitás blokkolására. A legegyszerűbb módszer, ha a deparaffinált metszeteket 0,5-1,5% hidrogén-peroxidot tartalmazó metanolba helyezzük 5-15 percig. A módszer elsősorban a vörösvértetek hemoglobin tartalmának pszeudoperoxidáz aktivitásából eredő zavaró barna reakcióját szünteti meg.

Az antitest molekuláknak a nem a cél antigénhez történő ionos, vagy Fc receptoron keresztüli kötése jelentősen ronthatja a reakciók minőségét, ezért a primer antitesttel végzett

inkubálás előtt ezeknek a nem specifikus fehérjekötéseknek a blokkolására van szükség. A nem specifikus kötőhelyek telítésére 10-20%-os non-immun szérumos kezelést alkalmazhatunk.

A (strept)avidin-biotin kötésen alapuló jelölőrendszerek alkalmazása esetén zavaró terméket okozhat az endogén biotin tartalom, különösen a máj és a vese esetében. Ennek blokkolására számos próbálkozás történt, viszonylag szerény eredménnyel. Amennyiben el kívánjuk ezt kerülni, akkor a biotinos rendszerek helyett a polimer alapú jelölőrendszerekhez folyamodhatunk.

2.9 Primer antitestek és inkubálási feltételek: A primer (fajlagos) antitestek monoklonális („monovalens”), vagy poliklonálisak („polivalens”) lehetnek. A monoklonális antitest egyetlen antigén determináns szekvenciához, vagy konformációhoz kötődik. A monoklonális antitesteket antigén-aktivált B-sejtek és myeloma sejtek fúziójából kialakuló monoklonális hibridoma sejtvonalak segítségével termelik. Egy ilyen „klón” (és az általa termelt antitest elnevezése) a kifejlesztő laboratóriumban szokásos kódok alapján történhet (pl. BerH2: 'Berlin'-'Hodgkin'-2). A monoklonális antitestek legtöbbször egér sejtekből származnak, de ismereteseek patkány, illetve újabban nyúl monoklonális antitestek is. A monoklonális antitestek alkalmazásra kerülhetnek ascites (hasúrbe oltott hibridoma) folyadék, hibrodoma szövetkultúra tápfolyadék („felülűszója”), vagy tisztított immunglobulin formájában.

A poliklonális antitestek immunizálás után nyert teljes, vagy tisztított szérumot jelentenek, és legtöbbször több/számos antigén determinánshoz kötődnek ugyanabban az időben. A poliklonális antitesteket leginkább nyúlban és kecskében termelik, de alkalmazásra kerülhetnek birka, tengeri malac, szamár, ló antiszérumok is.

A primer antitestek hígításának a meghatározása a felhasználó laboratóriumok felelőssége, amelyhez azonban hasznos információval szolgálhat az antitesttel csomagolásában található, vagy az interneten elérhető adatlap. Durva megközelítésként az átlagos monoklonális antitestek felülűszó formájában néhány tízszer, ascites formájában néhány százszor, míg a poliklonális antitestek akár néhány ezerszer, néhány tízezerszer is hígíthatók. Mindez azonban jelentősen különbözhet a tisztított antitestek esetén. Ha szükséges hígítási kísérlettel kell beállítani az ideális hígítást, mely figyelembe veszi az inkubálási időt, az inkubálási hőmérsékletet és a jelölő rendszer érzékenységet is. Titrálásra lehet szükség minden ismert antitest új csomagjának megnyitása kapcsán is. Az antitest hígításához egyszerű neutrális (foszfát, vagy Tris-HCL) pufferelt fiziológiás sóoldat is használható, de a specificitást növelheti, ha a jelölőrendszerrel nem keresztreagáló 10-20%-os non-immun szérumos pufferoldatot alkalmazunk. Ilyen hígító oldatok a kereskedelemben is kaphatók.

A primer antitesttel történő inkubálási időre vonatkozóan nem lehet határozott ajánlást nyújtani. A leggyakrabban 40-60 perces inkubálási időt alkalmazhatunk, de gyors (pl. intaroperatív) diagnózis esetén akár 10 perc is elég lehet, amihez azonban az antitestek hígítását megfelelően módosítani kell. Egyes antitestek gazdaságosabb hígításához vezethet az elnyújtott inkubálás (pl. éjszakán át), ilyen esetekben azonban nedves kamrát kell alkalmaznunk, hogy elkerülhessük a beszáradást. Az inkubálás általában szobahőmérsékleten történik, de célszerű a laboratórium hőmérsékletét temperálni, hogy elkerülhessük az időjárás változásaival kapcsolatos ingadozást.

2.10 A primer antitest kötődés kimutatása: Az immunhisztokémiai/citokémiai reakció lehet direkt, vagy indirekt. A direkt reakció esetén a vizualizálást elősegítő enzimmal, vagy fluorokrómmal közvetlenül konjugált antitest kerül felhasználásra. Az indirekt immunreakció során a jelöletlen primer antitest kötődését a primer antitest elleni enzim, vagy fluorokróm-jelölt, jelöletlen, vagy biotinnel konjugált második antitestten keresztül mutatjuk ki.

Alkalmazásra kerültek olyan polimer komplexek is, amelyek tartalmazzák a második antitestet és nagyszámú enzimet is.

Jelző rendszerek és kromogének:

- enzim: tormaperoxidáz (DAB, AEC), alkalikus foszfatáz (Naphthol-AS-Bi-foszfát/hexazoltált fukszin, vagy Fast red, BCIP/NBT, stb.)

- fémkolloid: kolloid arany/+ezüst

- fluorokrómok: FITC, TRITC, AMCA, Cy5, stb

A hígításokra és inkubálási időkre vonatkozóan utalunk a reagensek használati utasítására.

2.11 Magfestés és fedés: A preparátumok magfestését úgy kell megválasztani, hogy az jelentősen eltérjen az enzimreakció színétől. A peroxidáz alapú rendszerekhez, illetve piros terméket adó alkalikus foszfatáz jelölés esetén általában hematoxylin alkalmazható. Egyes reakció termékek (pl. AEC, Fast red TR) szerves oldószerben oldódnak, ezért ezeket vizes közegből kell fedni (pl. glicerin-zselatinnal).

2.12 Kontrollok: Az immunhisztokémiai reakciók végrehajtásának feltétele a megfelelő pozitív és negatív kontroll beiktatása. A pozitív kontroll a specifikus antitestkötődés megtörténtét hivatott bizonyítani. Pozitív kontrollként a vizsgált metszeten belüli várhatóan pozitív struktúra („belső kontroll”), vagy egy másik, párhuzamosan festett metszeten lévő ismert pozitívitas („külső kontroll”) egyaránt szolgálhat. A belső kontroll az ideálisabb, ilyen azonban nem mindig áll a rendelkezésünkre. A külső kontroll esetén fontos megjegyezni, hogy a paraffin metszet formájában történő (akár 1-2 hetes) tárolás során bizonyos antigének (pl. ösztrogén receptor) detektálhatósága csökkenhet. Hasznos módszer lehet a szöveti multiblokk technika alkalmazása, amely gazdaságos megoldást nyújt a külső kontroll szövetek biztosítása területén.

A negatív kontroll a primer antitest kihagyásával, vagy más immun-, vagy non-immunszérummal történő helyettesítésével végrehajtott reakció beiktatását jelenti, döntően a jelölő rendszer nem specifikus kötődésének a kizárása érdekében.

2.12 Automatizálás: Az automatizálás igénye elsősorban a standardizáláshoz kapcsolódik, és csak másodsorban szolgálhatja a kapacitásbővítést. Az automatizálás tervezésekor a megfelelő automata kiválasztásakor a minőségügyi szempontok mellett a költséghatékonysági értékelés is elkerülhetetlen, a hosszú távú sikeres működés érdekében. A zárt rendszerek magas reprodukálhatósági mutatóját és a nyitott rendszerek potenciálisan alacsonyabb működtetési költségeit egyaránt érdemes figyelembe venni. A készüléket előállító cég előírásainak követése egyenletesen magas színvonalat biztosíthat, melytől való eltérés csak megfelelő tapasztalat birtokában ajánlatos.

3. Az immunhisztokémiai reakciók értékelése és alkalmazásának főbb területei

3.1 Az immunhisztokémiai reakciók értékelése: Egy adott szövet immunmorfológiai értékelése a szükséges vizsgálatok kiválasztásával kezdődik. A kiválasztás a céldiagnózisra épül, de a céldiagnózis alapján felmerülő differenciál diagnosztikus lehetőségek tesztjét is jelentheti. Így a negatív eredménnyel járó immunreakciók relatív aránya a vizsgáló tapasztalatát is tükrözhetik („csak jó kérdésre lehet jó választ adni”). Az immunhisztokémiai reakciók csak megalapozott hisztopatológiai tudás esetén hasznosulhatnak a patológiai diagnosztikában. Csak kellően jellemzett antitest alkalmazható diagnosztikus célokra és csak tudományosan megalapozott eredmény fogadható el. Mindezek figyelembe vétele a leletező elsődleges felelőssége.

A vizsgálónak alapvetően ismernie kell az általa használt antitestek indikációs területét, antigén specificitását, szenzitivitását, lehetséges keresztreakcióit és diagnosztikus specificitását, mert csak így biztosítható megfelelően a biztonságos alkalmazás. Megfelelő tapasztalattal kell rendelkeznie az ál pozitív, vagy az álnegatív reakció termékek felismerésére.

Amennyiben egy laboratórium nem rendelkezik az adott elváltozás értékeléséhez szükséges kellő tapasztalattal, vagy reagenssel, akkor konzultációs vizsgálatot kell kezdeményezni, amelynek szervezésében a beteg érdekeinek a legteljesebb figyelembe vétele a legfőbb vezérlő elv.

A hagyományos hisztomorfológiai vizsgálattal kellően nem jellemezhető daganatok esetében minden elvárható módszert alkalmazni kell, a minél teljesebb diagnózis elérése érdekében.

3.2 Az immunhisztokémiai diagnosztika a patológiában: Immunhisztokémiai diagnosztikai algoritmus nyújtása nem lehet célja ennek a módszertani levélnek. A modern kézi és szakkönyvek kimerítő, az itteni kereteket messze meghaladó részletességgel tartalmazznak ilyen sémákat és ajánlásokat.

3.3 Főbb alkalmazási területek a patológiában: Az immunhisztokémiai analízis alkalmas a gyulladásos infiltrátumok, a vesebetegségek, a degeneratív betegségek jellemzésére, fertőző ágensek kimutatására. Nélkülözhetetlen eszköz a daganatpatológiában, ahol (a teljesség igénye nélkül) a következő célokat szolgálhatja:

- Primer és secunder daganatok hisztogenezisének minél teljesebb meghatározása
- A daganatok jellegzetes antigén profiljának a meghatározása
- Daganatok molekuláris hátterének a jellemzése
- A prognosztikus/prediktív faktorok kimutatása
- Daganat invázió jellemzése

4. Biztonsági rendszabályok az immunhisztokémiai laboratóriumokban

A legalapvetőbb biztonsági előírások szem előtt tartása elengedhetetlen az immunhisztokémiai laboratóriumokban. A natív és gyors fagyasztott preparátumok, natív testüregi folyadékok kezelése kapcsán a jelentős fertőzésveszély áll fenn (A fertőzésveszély kezelésével külön módszertani levél foglalkozik). Egyéb munkavédelmi, tűzvédelmi, toxikológiai és környezetvédelmi előírások követése is elengedhetetlen. Ide tartoznak a biztonságos munkafeltételek biztosítása (pl. védőruha, védőkesztyű, megfelelő elszívás stb.), a tűz és robbanás veszélyes oldószerek kezelésének az előírása, a különösen mérgező anyagok (pl. nárium-azid) kezelésének rendkívül gondos követése, a carcinogén anyagok gondos kezelése, a veszélyes szilárd és folyékony hulladék gondos gyűjtése. Mindezekről külön törvényi előírások és módszertani ajánlások rendelkeznek.

6. Minőségbiztosítás az immunhisztokémiában

Az immunhisztokémiai reakciók esetében 3 fő szempont kell követni: 1. Specificitás. 2. Szenzitivitás. 3. Reprodukálhatóság. A megfelelő, elvárható és gondos alkalmazás a vizsgálatok érzékenységének, várható műtermékeinek, fals reakciónak és korlátainak az ismeretét feltételezi. Az optimális klinikai alkalmazás alapkövetelménye, hogy a vizsgálatok reprodukálhatóak legyenek a mindennapos gyakorlatban, illetve a különböző laboratóriumokban („inter- and intralaboratory reproducibility”).

A belső minőségellenőrzés során, amelynek része a kontroll reakció rendszeres alkalmazása, a reagensek, munkaoldatok, stb. rendszeres ellenőrzése, a módszertan megbízhatóságát kívánjuk biztosítani. Ezek az eljárások a napi gyakorlat az elkerülhetetlen és szabályozott részét kell képezniük. Az ellenőrzés nemcsak az immunhisztokémiai laboratóriumban folyó munkafolyamatokra kell, hogy kiterjedjen, hanem egyéb, az immunhisztokémia eredményét döntően befolyásoló tényezőkre is, így például egyes kiterjedten jelenlevő antigének kimutatása (pl. vimentin) a hisztotechnológia minőségi indikátoraként is szolgálhatnak.

A külső minőségbiztosítási rendszerek ugyanakkor a független bírálat segítségével járulnak hozzá a laboratóriumok szakmai színvonalának biztosításához, ahogy ezt a QualiCont Kht. patológiai programja is nyújtja. Az külső minőségbiztosítás és az akkreditáció legalapvetőbb feltétele, hogy a rendszerben feladatot vállaló szereplők teljesítsék először a megkövetelt feltételeket, és egyiknek sem lehet célja az érintett szereplők közötti különbségtétel. A minőségügyi rendszerekben való részvétel minden laboratórium szakmai felelőssége.

A módszertani levél érvényessége: 2008. december 31.