

## **Metoda: Imunohistochemické barvení na přístroji BenchMark Ultra - Ventana**

Jaroslava Králová, ZL2

Školitel: RNDr. Jakub Gajdoš

**Princip:** Imunohistochemické barvení (IHC) je využíváno k rutinní nebo pokročilé diagnostice v patologii. Jde o způsob prokázání přítomnosti antigenu ve tkáni a to pomocí monoklonální nebo polyklonální značené protilátky. Při imunohistochemické reakci se využívají specifické primární protilátky identifikující antigeny, na které se navážou. Tuto vazbu protilátky na antigen se snažíme dále zviditelnit a to pomocí nepřímé metody detekce za použití sekundárních protilátek, které se vážou na primární protilátky a jsou značeny enzymem. Po té je celý komplex vizualizován pomocí substrátu z peroxidu vodíku a 3,3-diamidobenzidin tetrachlorid chromogenu. V místě vazby protilátky s antigenem vznikne hnědá sraženina a to je to, co lékař potřebuje vidět pod mikroskopem.

**Postup:** Postup barvení v přístroji BMK Ultra je stejný jako u ručního imunohistologického barvení. Do přístroje vložíme potřebné reagentie a skla, dále si vše zpracuje sám. Parafínové bloky krájíme na řezy o tloušťce 1-2 mikrometry. Řezy natahujeme na speciální skla značky TOMO, která jsou pokryta adhezivní vrstvou. Před samotným barvením BMK Ultra je důležité, aby řezy byly pořádně vyschlé. Suší se 1 hodinu v termostatu při 60 °C nebo 5 min v mikrovlnné troubě pro ušetření času. Nejprve jsou řezy deparafinizovány v xylenu a následně hydratovány v řadě roztoků se sestupnou etanolovou řadou. Následuje oplach v destilované vodě a poté dojde k aplikaci imunochemie. Na řezech dojde k odmaskování zablokovaných epitopů, pro lepší navázání protilátky. Všechny reakce probíhají pod vrstvou oleje, který slouží jako ochranná atmosféra. Dále probíhá trávení a blokáda endogenní peroxidázy, inkubace v neimunním séru, následuje inkubace v primární protilátce a v sekundární protilátce. Poté je použito chromogenní činidlo k vyvolání, následuje kontrastování a dobarvení preparátů Gillovým hematoxylinem. Následujícím krokem je odvodnění ve vzestupné řadě alkoholů a projasnění. Nakonec dojde k montování řezů.

**Uplatnění metody:** IHC, jak jsem již výše uvedla, je hlavně používána k rutinní nebo pokročilé diagnostice na oddělení patologie. IHC je využívána ke specifickému průkazu látek v preparátech, objasnění distribuce prokazovaných látek, schopných účastnit se reakce jako antigeny. U řady chorob je IHC v diagnostice nezastupitelná. Pomocí BMK Ultra lze zvýšit a urychlit efektivitu práce a to díky informacím o každém cyklu, které se průběžně aktualizují a zobrazují na monitoru počítače. Snadno a rychle tedy zjistíte, kdy jsou sklíčka hotova, takže můžete okamžitě vyřizovat požadavky patologů a jste připraveni ke vložení nových vzorků, jakmile se uvolní zásobníky sklíček. Díky imunohistochemickému vyšetření je lékař schopen velmi přesně určit diagnózu pacienta a nasadit příslušnou léčbu. V případě positivity některé vysoce specifické protilátky, lékař může naordinovat u pacienta cílený lék, který je určen pro vyskytující se formu nádoru a nezatěžovat tak, organismus nemocného lékem obecným.

**Úskalí metody:** Při používání této metody nedochází často k problémům. Pokud problém nastane, jedná se o poruchu přístroje (chyba detekčního systému, chyba vyhřívací jednotky nebo zkrat v barvicí jednotce). Případně se může jednat o chybu laboranta (náhodně přehozené pufry a reakční roztoky, vytištěný špatný štítek). Odstranění chyb v přístroji a případné poruchy, řeší s laboratoří specializovaný servis firmy Roche.

**Přístrojové vybavení:** Systém BenchMark Ultra (BMK Ultra) se skládá z barvicího zařízení, počítače s instalovaným systémovým softwarem, počítačového monitoru s plochou obrazovkou, tiskárny štítků, paměťového média připojovaného k portu USB, myše, sondy registrace produktu a ze tří kanystrů. Barvicí přístroj obsahuje zásobníky sklíček, systém k dávkování reagensů, velkoobjemové reagensie a odpadní nádoby. Je řízen softwarem Ventana System Software (VSS).

**Odběr a transport:** V přístroji BMK Ultra se zpracovává tkáň, která byla zpracována normální formol-parafínovou cestou jako běžný histologický preparát. Jedná se tedy o běžné biopsie, které jsou přijaty na oddělení histologie. Odebraný materiál by měl být dopraven do laboratoře v co nejkratším čase, v nativním nebo částečně fixovaném stavu.

Laborant dbá na to, aby na každém skle pod štítkem s čárovým kódem byla natažena pozitivní tkáňová kontrola, která se barví společně s bioptickým vzorkem. Kontrola slouží lékaři, který se může podívat, jak vypadá jasná pozitivita a zda vůbec reakce proběhla. Následně pozitivitu imunohistochemického barvení hledá ve vyšetřované tkáni.