

IMPLEMENTACIJA VEČBARVNEGA KRIO- IMUNOFLUORESCENTNEGA BARVANJA CITOSPINOV V RUTINSKEM CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU

Simona Miceska ¹, Živa Ledinek ^{2,3}, Sebastian C. Bhakdi ^{4,5}, Veronika Kloboves Prevodnik ^{1,3}

¹ Oddelek za citopatologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Slovenija

² Oddelek za patologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Slovenija

⁴ X-ZELL Biotech Pte Ltd., Singapur

⁵ Oddelek za patobiologijo, Fakulteta za naravoslovje, Univerza Mahidol, Bangkok, *Tajska*

Elektronski naslov: ziva.ledinek@gmail.com

Večbarvno krio-imunofluorescentno barvanje citospinov s platformo X-ZELL omogoča hkratno določanje do 8 označevalcev na enem preparatu, kar pomembno prispeva k reševanju težav s katerimi se srečujemo v imunocitkemiji (ICK), kjer na enem preparatu praviloma lahko določimo le en označevalce. Za določitev osmih označevalcev tako potrebujemo 8 preparatov, ki pa jih iz vzorcev, ki vsebujejo malo celic, ne moremo pripraviti. Protokol priprave in fiksacije vzorcev za večbarvno krio-imunofluorescentno barvanje s platformo X-ZELL se razlikuje od rutinskih metod, ki jih uporabljamo za ICK barvanja v rutinskem citopatološkem laboratoriju. V pilotni študiji smo želeli preveriti, ali rutinsko pripravljene citospini omogočajo zanesljivo večbarvno krio-imunofluorescentno barvanje s platformo X-ZELL.

p24

Za testiranje smo vzpostavili mini-večbarvni (4-barvni) panel za limfomske označevalce (CD45/CD3/CD20/DAPI) in mini-panel za karcinomske označevalce (EpCAM/CK7/CK20/DAPI). V analizo smo vključili vzorce, odvzete z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo (ABTI) in izlive, pri katerih je bila citopatološka diagnoza že zaključena in bi jih sicer po izdaji izvida zavrgli. Iz vzorcev smo pripravili citospine in primerjali dve metodi priprave: 1) s komercialnim X-ZELL protokolom (X-ZELL stekla, Cytofuge/citocentrifuga, krio-fiksacija in krio-barvanje) ter 2) s klasično metodo s Superfrost Plus stekli (Epredia), Shendon citocentrifugo in metanolno fiksacijo na 4 °C, ki ji je sledila krio-fiksacija in krio-barvanje po X-ZELL protokolu. Kot kontrolo smo uporabili citospine pobarvane z ICK metodo. Ocenili smo delež pozitivnih celic za vsak tarčni označevalce, ohranjenost celične morfologije ter prisotnost ozadja. Rezultate smo podali opisno.

V analizo smo vključili deset primerov: 7 ABTI (5 limfomskih, 2 reaktivna vzorca) za testiranje mini-limfomskega panela in 2 ABTI ter 1 izliv (adenokarcinomi) za testiranje mini-karcinomskega panela. Pri ocenjevanju deležev celic razlik med X-ZELL in rutinsko pripravljenimi citospini nismo zaznali (razen pri CD20 pozitivnih celicah v enem vzorcu), rezultati so bili primerljivi tudi s kontrolnimi citospini pobarvani po metodi ICK. X-ZELL citospini so imeli bolj ohranjeno celično morfologijo in intenzivnejše barvanje tarčnih celic brez ozadja, medtem ko so rutinsko pripravljene citospini imeli nekoliko šibkejšo intenziteto barvanja, zlasti pri šibkih fluorokromih, kot je CD20-APC. Pri mini-karcinomskem panelu smo pri ABTI vzorcih opazili močno barvanje citoplazemskih označevalcev (CK7), medtem ko so membranski označevalci (EpCAM) imeli malce šibkejšo intenziteto barvanja, precej v primerih, ko morfologija celic ni bila ohranjena. V vzorcih izlivov je bila ne glede na uporabljeno metodo morfologija celic ohranjena, barvanje pa močno.

Naši rezultati kažejo, da lahko platformo X-ZELL uporabimo tudi na rutinsko pripravljenih citospinih, zlasti pri vzorcih izlivov. Pri ABTI vzorcih lahko rezultate izboljšamo, morda z uporabo X-ZELL stekel, ledeno hladnega metanola in izogibanjem šibkim fluorokromom za kritične označevalce, kar bi lahko povečalo kakovost in zanesljivost barvanja.