

OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA PROTOKOLOV ZA DOLOČANJE HORMONSKIH RECEPTORJEV RAKA DOJK NA CITOLOŠKIH VZORCIH NA BARVALCU DAKO OMNIS V RUTINSKEM CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU

Simona Miceska, Tina Germšek, Teja Knafelj, Anamarija Kuhar, Veronika Kloboves Prevodnik

Onkološki inštitut Ljubljana Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tgermse@onko-i.si

Rak dojk je najpogostejši rak pri ženskah v razvitem svetu, ki je ozdravljiv ob zgodnjem odkritju. Večina tumorjev bolnic izraža estrogenske (ER) in/ali progesteronske receptorje (PR), ki sta ključna označevalca za določitev hormonskega statusa in načrtovanje ustreznega zdravljenja. Status hormonskih receptorjev določamo na histoloških vzorcih z imunohistokemično (IHK) metodo ter na citoloških z imunocitokemično (ICK) metodo. Za imunocitokemično določanje hormonskih receptorev uporabljamo različne imunocitokemične barvalce. Pred uvdebo novih barvalcev (avtomatiziranih platform) v rutinsko diagnostiko je nujno potrebno optimizirati in validirati protokole barvanja.

p22

Namen raziskave je bil optimizirati in validirati ICK protokole za določanje ER in PR na citoloških vzorcih na novi avtomatizirani platformi Dako Omnis (Agilent), ki jo uvajamo v rutinsko diagnostiko na Oddelku za citopatologijo, s protitelesi proti ER (klon 6F11, Leica Biosystems) in proti PR (klon 16+SAN27, Leica Biosystems), ki ju že uporabljamo v rutinski diagnostiki na platformi BenchMark Ultra (Ventana, Roche Diagnostic).

V raziskavi smo uporabili ostanke citoloških vzorcev bolnic s primarnim ali razširjenim rakom dojk, odvzetih za rutinsko določanje hormonskih receptorjev, ki bi jih po zaključeni diagnostični obdelavi sicer zavrgli. Iz ostankov vzorca smo naknadno pripravili citospine za ICK barvanje na platformi Dako Omnis. Hkrati smo iz laboratorijskega informacijskega sistema pridobili rezultate o rutinskem ICK določanju izražanja ER in PR na platformi BenchMark Ultra: delež tumorskih celic, ki so izražale ER in PR ter podatke o starosti posameznega vzorca. V raziskavi smo najprej testirali več različnih ICK protokolov na Dako Omnis z različnimi pogoji predobdelave celic, inkubacije protitelesa in ojačanja signala reakcije s komercialno dostopnim ojačevalcem (Mouse Linker, Agilent), da bi ugotovili s katerim protokolom dobimo rezultate, ki so primerljivi z rezultati referenčnega, rutinskega ICK barvanja na platformi BenchMark Ultra. Testirali smo naslednje protokole: (1) brez predobdelave celic, (2) predobdelavo z nizkim pH pri 65 °C, (3) predobdelavo z nizkim pH pri 97 °C, (4) predobdelavo z visokim pH pri 65 °C ter (5) predobdelavo z visokim pH pri 97 °C. Vse protokole (1–5) smo kombinirali z 20- oziroma 40-minutno inkubacijo protitelesa, brez in z dodatkom ojačevalca reakcije. Nato smo najbolj optimalni ICK protokol validirali na dodatnih 20 vzorcih.

Med vsemi preizkušenimi testnimi ICK protokoli so bili rezultati barvanja za ER in PR najbolj optimalni s protokolom z 20 minutno inkubacijo primarnega protitelesa, s predobdelavo pri nizkem pH in temperaturi 97 °C ob dodatku komercialnega ojačevalca reakcije. Izbrani protokol smo uspešno validirali na 20 vzorcih, saj so rezultati pokazali visoko ujemanje z rezultati/deleži referenčnih ICK in IHK barvanj za ER in PR na citoloških in histoloških vzorcih (Cronbach $\alpha > 0,8$). Zaključili smo, da je ICK določanje hormonskih receptorjev na platformi Dako Omnis je primerno za implementacijo v rutinsko citopatološko diagnostiko na Onkološkem inštitutu Ljubljana.