

کنفرانس جامع تکنیک ایمونوهیستوشیمی

DR. Sareh Etemad
MD.AP.CP



مقدمه و اهمیت ایمونوهیستوشیمی

ایمونوهیستوشیمی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های تشخیصی در پاتولوژی
است که بر اساس

واکنش اختصاصی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی

(Antigen-Antibody Reaction)

عمل می‌کند.

این روش امکان شناسایی و آشکارسازی ویژگی‌های اختصاصی بافت‌ها را
در سطح سلولی و

بافتی با ریاچنت‌های نشاندار و قابل مشاهده فراهم می‌کند. نحوه توزیع و
محل آنتی‌ژن را در داخل سلول و بافت را آشکار می‌کند.

و نقش کلیدی در تشخیص، طبقه‌بندی، تعیین پیش‌آگهی و

انتخاب درمان بیماران دارد.

بر اساس گایدلاین‌های معتبر مثل،

WHO و College of American Pathologists (CAP)

جزء جدایی‌ناپذیر تشخیص تومورهای بدخیم و بسیاری از بیماری‌های

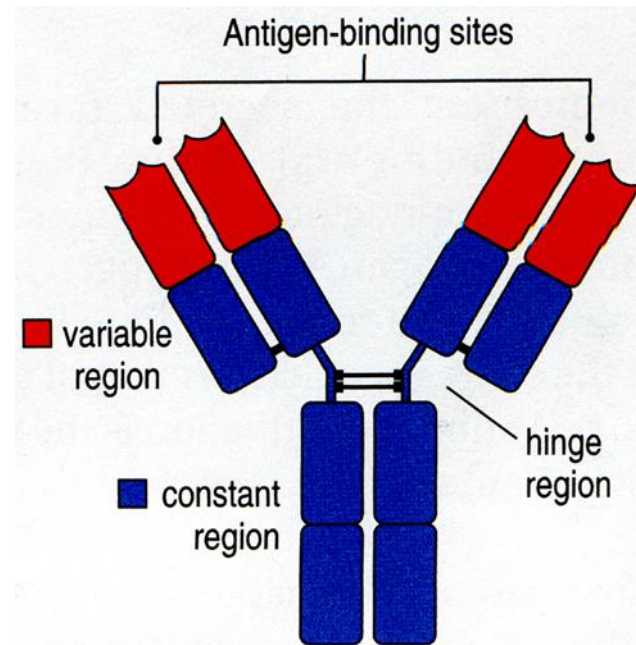
غیرنئوپلاستیک است

مفاهیم پایه: آنتی ژن و آنتی بادی

آنتی ژن (Antigen): مولکولی، اغلب پروتئینی، که در بافت یا سلول وجود دارد و قابلیت اتصال اختصاصی به آنتی بادی را دارد.

محل اتصال آنتی بادی به آنتی ژن اپی توپ (**Epitope**) نامیده می شود.

آنتی بادی (Antibody): پروتئینی از خانواده ایمونوگلوبولین ها که به طور اختصاصی به اپی توپ آنتی ژن متصل می شود.



انواع آنتی بادی

-مونوکلونال (Monoclonal)

: از گونه های هیبریدی موش و خرگوش تهیه میشود .

اختصاصیت بالا، تکرارپذیری مناسب، توصیه شده در گایدلاین های CAP
والبته احتمال منفی کاذب بالاتر

-پلی کلونال: (Polyclonal) از گونه های مختلف به دست می آید مخلوطی از آنتی بادی
های مختلف بر علیه یک آنتی ژنند .

حساسیت بالاتر،

اما احتمال Cross-reactivity بیشتر و مثبت کاذب بیشتر

در IHC تعادل بین حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) اهمیت حیاتی دارد.

روش های

ایمونوهیستوشیمی

مستقیم :

آنتی بادی اولیه خودش لیبل دارد

(مثلا HRP) و مستقیم به آنتی ژن

می چسبد .

-سریع

-حساسیت پایین

Direct Method

Labeled Antibody

Tissue Antigen



روش های ایمونوهیستوشیمی

غیر مستقیم :

آنتی بادی اولیه از طرفی به آنتی ژن
و از طرفی به آنتی بادی ثانویه لیبل
دار می چسبد .

- سیگنال قویتر و حساسیت بیشتر

- رایج ترین روش

- کمی زمانبرتر

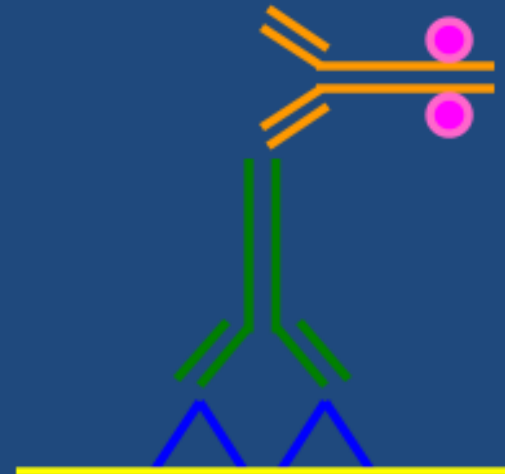
- کاربردی برای اغلب مارکرها
روتین پاتولوژی

Two-Step Indirect Method

Secondary Antibody

Primary Antibody

Tissue Antigen



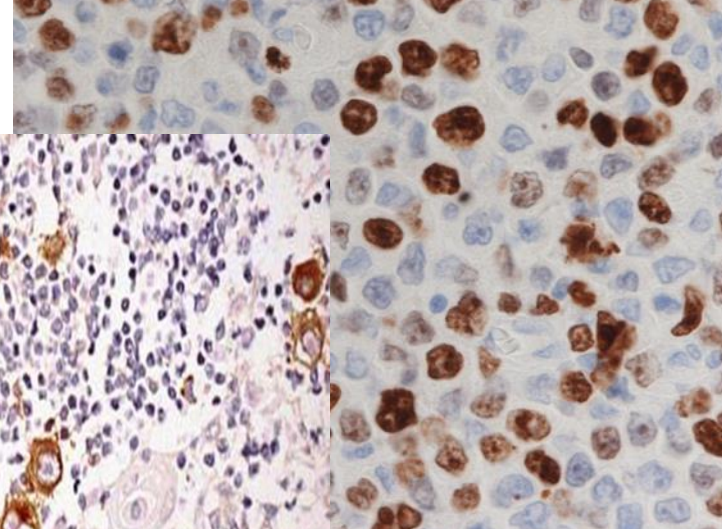
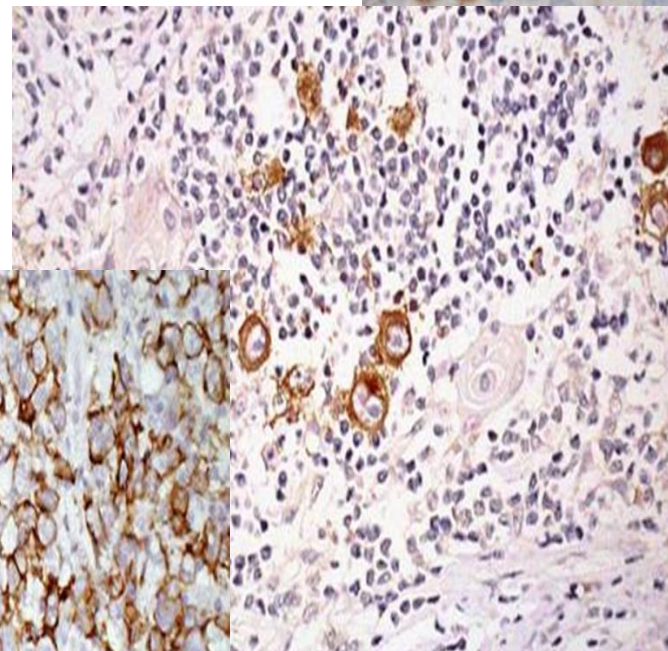
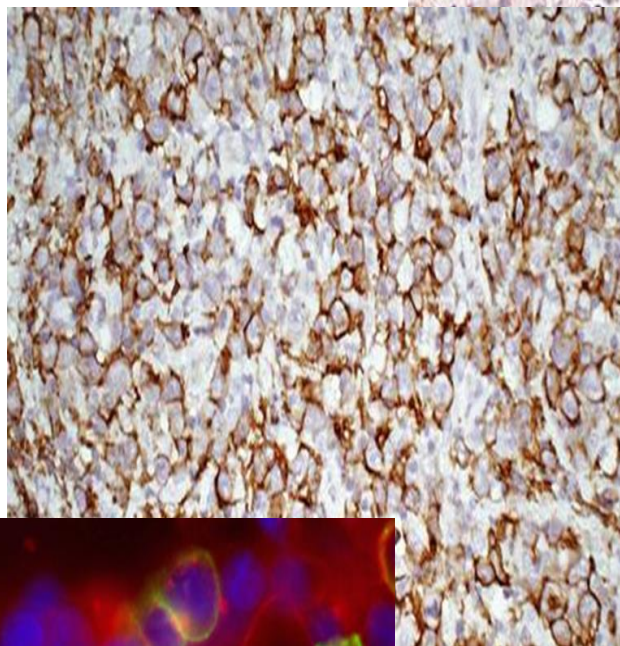
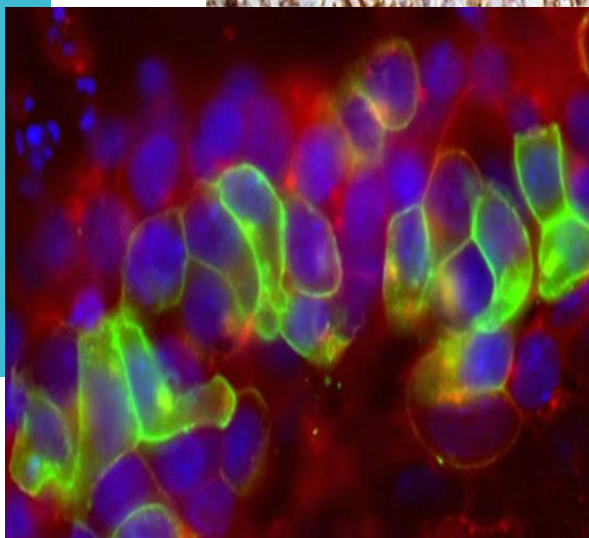
روش های ایمونوهیستوشیمی

یک روش تقویتی
(amplified)
بر پایه یک کمپلکس
آنزیمی (پراکسیداز_آنتی
پراکسیداز) است

PAP Method (peroxidase anti-peroxidase method)



چه آنتی ژن های سلولی مورد شناسایی قرار می گیرند ؟



- هسته ای
- سیتوپلاسمی
- غشایی
- لیپیدها
- پروتئینها

• کاربردهای بالینی IHC بر

اساس NCCN و ASCO-CAP، شامل موارد زیر است:

1- تشخیص افتراقی تومورها (Differential Diagnosis)

2- تعیین منشأ تومورهای poorly differentiated

3- بیومارکرهای پیش‌آگهی (Prognostic markers) مانند Ki-67

4- بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده پاسخ به درمان: (Predictive markers)

ER ، PR ، HER2 در سرطان پستان

PD-L1 در تومورهای مختلف

5- انتخاب بیماران برای درمان‌های هدفمند (Targeted Therapy) و ایمونوتراپی

Immunohistochemistry assays may use

cells on slides



Cells grown, spun into a pellet, frozen or paraffin embedded and sectioned



Cells grown as a monolayer

OR use tissue sections that are frozen or paraffin embedded



Sections from tissues contain many different kinds of cells
as well as extra-cellular matrix components

- **مرحله پیش آنالیتیک**
:(Pre-analytical Phase)

بر اساس CAP، بیش از 60٪ خطاهای IHC در مرحله پیش آنالیتیک رخ می دهد.

1- فیکسسیون (Fixation):

فیکساتیو استاندارد

10% Neutral Buffered Formalin

زمان توصیه شده 6 تا 48 ساعت بسته به نوع بافت

فیکسسیون نامناسب و طولانی باعث کاهش یا از بین رفتن آنتی ژن می شود.

2-پروسسینگ و پاراتین گذاری:

دهیدراسیون، کلیرینگ و نفوذ پاراتین باید استاندارد و یکنواخت باشد.

3- انتخاب بلاک نماینده:

بلاکی با بیشترین سلول توموری و کمترین نکروز و با ملاحظات مثل حضور المانهای شاهد (کنترل) داخلی انتخاب می شود.

تکنیک ایمونوهیستوشیمی

• مرحله آنالیتیک (Analytical Phase):

1. برش‌گیری از بلوک بافت مورد نظر :

ضخامت استاندارد: 2-4 میکرون

2- Deparaffinization و Rehydration

حذف کامل وکس پارافین برای دسترسی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن ضروری است.

دپارافینه با فور 100 درجه وگزیلول به عنوان حلال آلی انجام میشود .

رهیدراتاسیون با قرار گیری تدریجی بافت در الکلهای با غلظت نزولی (70-80-95-100%) انجام می شود و آب از الکل به بافت منتقل میشود . شیب غلظت تدریجی مانع شوک اسمزی و آسیب بافت می شود .

ایجاد محیط هیدروفیل برای واکنش آنتی ژن -آنتی بادی ضروری است.

تکنیک ایمونوهیستوشیمی

3- آنتی ژن رتریوال: (Retrieval):

در فیکساسیون با فرمالین پیوندهای متقاطع (CROSS-LINKS) ایجاد میشود که باعث پنهان شدن اپی توپ های آنتی ژنی می گردد و واکنش با آنتی بادی را مختل می کند .

آنتی ژن رتریوال باعث شکسته شدن این پیوندها و بازارایی ساختار فضایی پروتئینها و آشکار شدن اپی توپها میشود .

در نتیجه حساسیت و شدت رنگ آمیزی IHC افزایش می یابد.

دو روش :

آنزیمی

حرارتی

تکنیک

ایمونوهیستوشیمی :
مرحله بازیابی

مرحله بازیابی

-آنزیمی (EIER):

- فقط در مورد آنتی ژنهای خاص و حساس به حرارت و بافتهای قدیمی
- احتمال اوردایجسشن

-حرارتی: (HIER)رایجترین روش :

- مناسب اغلب آنتی ژنها به ویژه هسته ای و ممبرانوس
- یکنواخت و قابل تکرار
- محدودیت:**باعث جدا شدن بافت از روی اسلاید یا اورتریوال باعث ایجاد

BACKGROUND

- رتریوال رقیق شده و در بن ماری جوش به مدت 30 دقیقه
- سرد شدن لام ها به مدت 30 دقیقه در درمای اتاق و شستشو با آب مقطر

BLOCKING

BLOCKING-4

10 دقیقه محلول پراکسیداز روی لام قرار میگیرد و بعد

استفاده از بافر Citrate یا

EDTA یا آب مقطر برای شستشو استفاده می شود .

در این مرحله محلول پر اکسیداز ، آنزیم پراکسیداز اندوژن را غیرفعال می کند تا مانع ایجاد مثبت کاذب شود بدون اینکه تاثیر منفی بر آنتی ژن هدف داشته باشد .

وظیفه بافر هم ایجاد محیط با PH مناسب برای واکنش است.

ادامه تکنیک ایمونو هیستوشیمی : مارکر گذاری

5- اینکوباسیون آنتی بادی اولیه / مارکر

غلظت، دما و زمان باید استاندارد سازی شود.
(معمولا 2 ساعت) و بعد شستشو با آب مقطر

ادامه تکنیک
ایمونوهیستوشیمی
:
آشکارسازی

- 6-آنتی بادی ثانویه و آشکارسازی (Detection System)

- اتصال آنتی ژن - آنتی بادی به سیگنال قابل مشاهده تبدیل می شود .
- آنتی بادی ثانویه که به آنزیم متصل است به آنتی بادی اولیه متصل میشود.

روش **Polymer-based** توصیه شده ترین سیستم بر اساس CAP

معمولا دو مرحله 30 دقیقه ای

با محلول اول (آمپلی فایر) : تقویت سیگنال آنتی بادی با ایجاد چندین محل اتصال برای آنتی بادی ثانویه

و دوم محلول پلی مر HRP :

به صورت پلیمری متصل به چند مولکول آنتی بادی متصل به آنزیم باعث تقویت سیگنال و یکنواختی رنگ میشود .

ادامه تکنیک ایمونوهیستوشیمی: کروموژن

7- کروموژن: (Chromogen)

(دی آمینوبنزیدین DAB)

شایع‌ترین کروموژن با رنگ قهوه‌ای است.

HRP را اکسید می‌کند و رسوب قهوه‌ای نامحلول در محل آنتی ژن ایجاد می‌کند.

کوتاه در حد 5 دقیقه

یک قطره کروموژن و یک سی سی بافر/سپس شستشو

تکنیک ایمونوهیستوشیمی کروموژن

6- کروموژن: (Chromogen)

(دی آمینوبنزیدین DAB)

شایع‌ترین کروموژن با رنگ قهوه‌ای است. HRP را اکسید می‌کند و رسوب قهوه‌ای نامحلول در محل اتصال آنتی ژن - آنتی بادی ایجاد می‌کند

کوتاه در حد 5 دقیقه / یک قطره کروموژن و یک سی سی بافر/سپس شستشو

ادامه تکنیک ایمونوهیستوشیمی

Counterstain -8

هماتوکسیلین برای مشاهده مورفولوژی هسته‌ای و
ایجاد توازن رنگ بین آنتی ژن قهوه ای کروموژن و بافت زمینه انجام می گیرد .
حدود دو دقیقه
سپس شستشو
آبگیری با شیب صعودی الکل جهت آمادگی بافت برای چسبیدن به لامل
و سپس مونته کردن لام ها

کنترل کیفی در ایمنووهیستوشیمی

(Quality Control)

کنترل کیفی

جزء الزامات CAP و بقیه گایدلاین هاست .

کنترل‌های خارجی : بافت استاندارد ثابت و شناخته شده که همراه با هر ران به کار می رود

کنترل مثبت: (Positive Control)

بافتی که بیان آنتی ژن در آن قطعی است. مثبت شدنش نشان دهنده عملکرد صحیح واکنش است

کنترل منفی: (Negative Control)

با حذف آنتی بادی اولیه انجام می شود و background و غیراختصاصی بودن رنگ را بررسی می کند .

کنترل داخلی: (Internal Control)

سلول‌ها و المانهای طبیعی موجود در همان اسلاید که بیان آنتی ژن دارند .

: External Quality Assurance

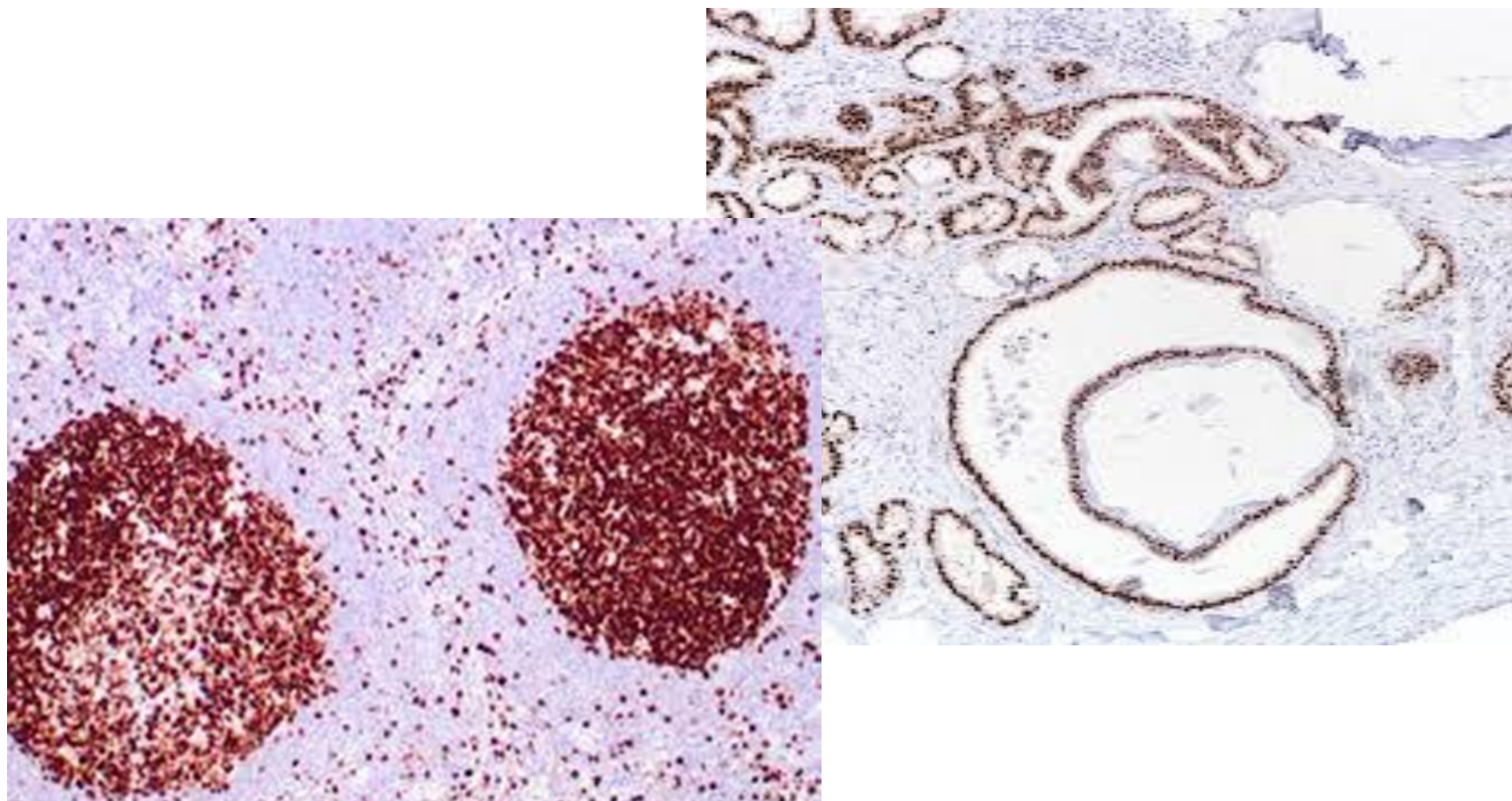
شرکت در برنامه‌هایی مانند UK NEQAS برای پایش عملکرد آزمایشگاه در دنیا رایج است.

انواع کنترل مثبت برای مارکرها

- هسته ای :

- Ki67 : سلولهای زونا پرولیفرای طحال یا گره لنفاوی

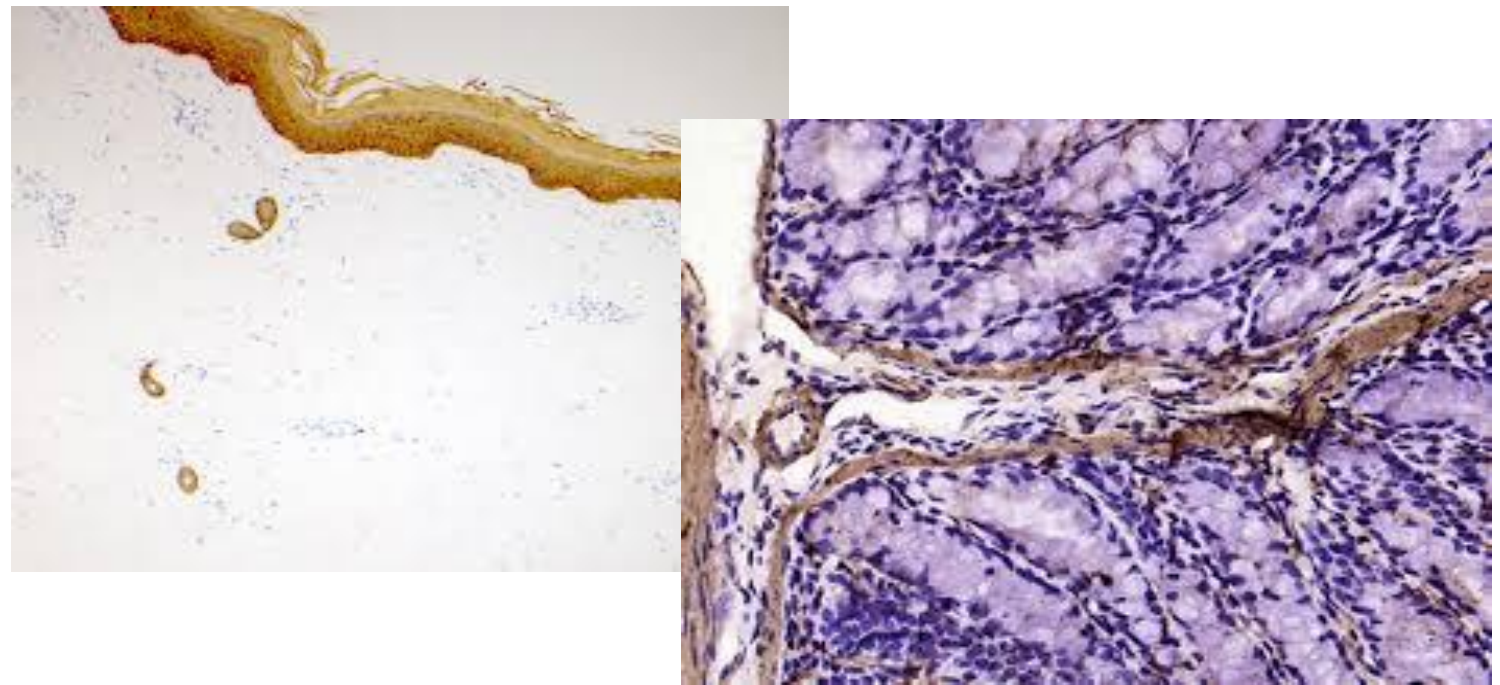
- ER/ PR : پستان طبیعی یا کارسینوم اندومتر



انواع کنترل مثبت برای مارکرها

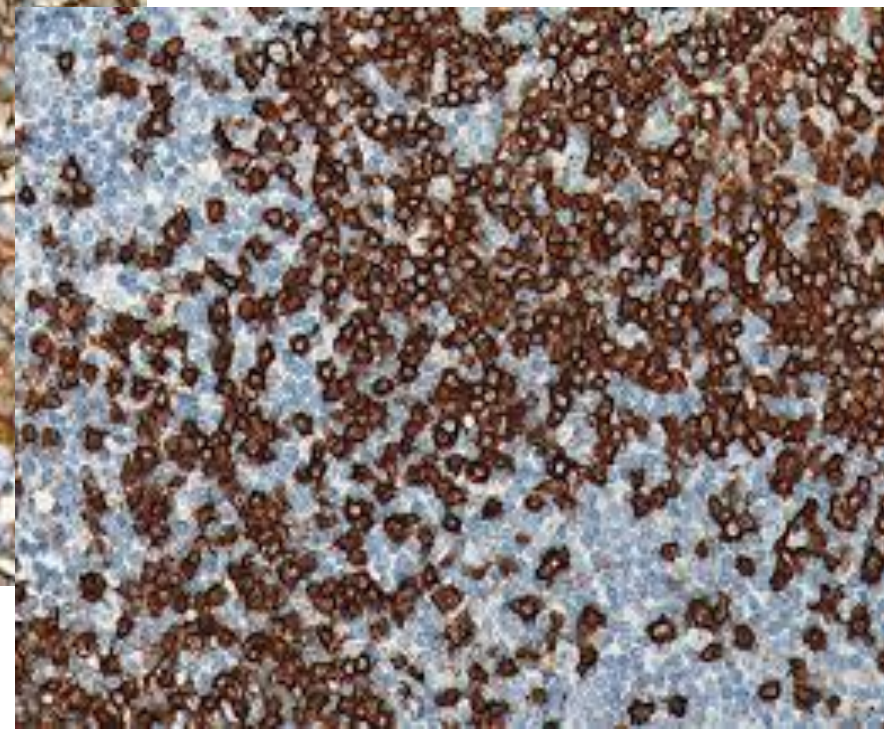
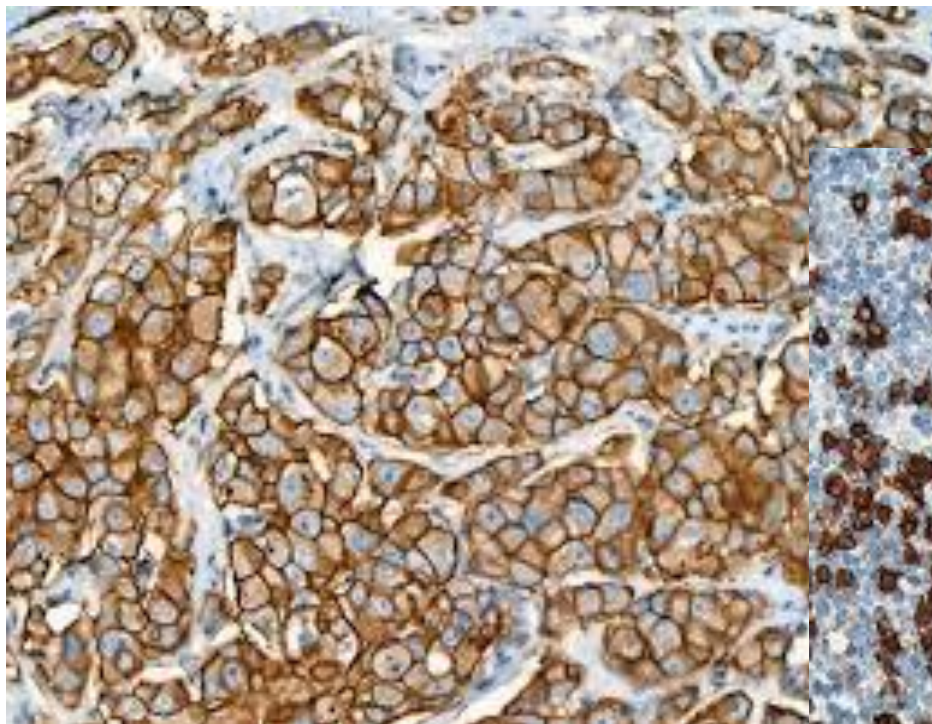
- **سیتوپلاسمیک :**

- CK در اپی تلیوم کولون یا پوست و ...
- SMA در ماهیچه ی صاف روده و رحم



انواع کنترل مثبت برای مارکرها

- غشایی (ممبرانوس)
- HER2: در کارسینوم پستان یا معده ای که
HER2 مثبت باشد
- CD 20: سلولهای B در گره لنفی



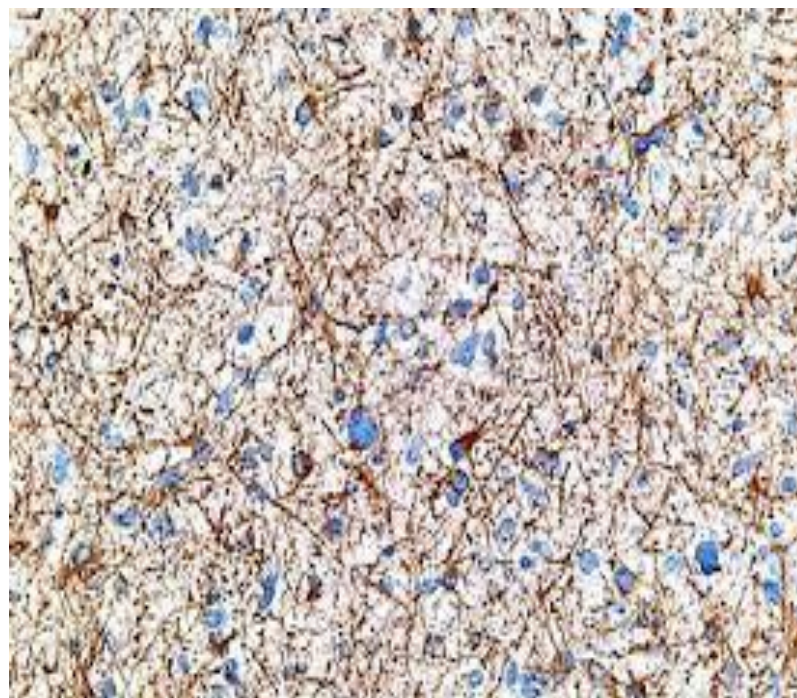
انواع کنترل
مثبت برای
مارکرها

• اندوتلیال / واسکولار :

• اندوتلیوم عروق : Cd31 , CD34, Factor VIII



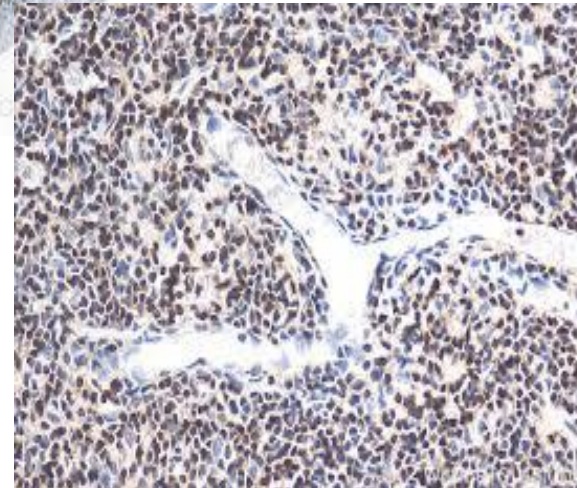
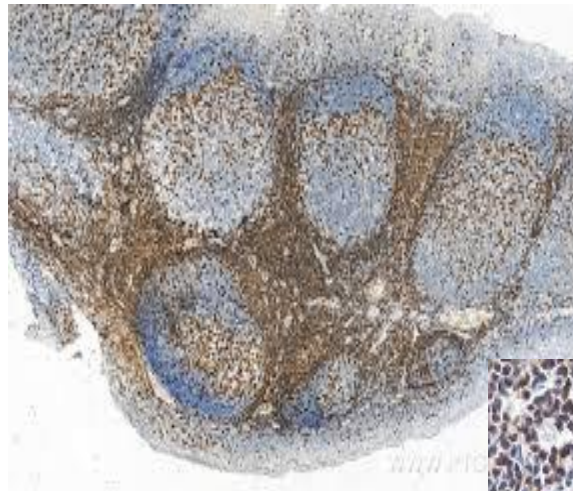
انواع کنترل مثبت برای مارکرها



- نورال / گلیال :
- GFAP : مغز یا نخاع طبیعی

انواع کنترل مثبت برای مارکرها

- هماتوپویتیک / لنفوئید
- CD3 لنفوسیت های T در گره لنفی
- CD45 لنفوسیت ها

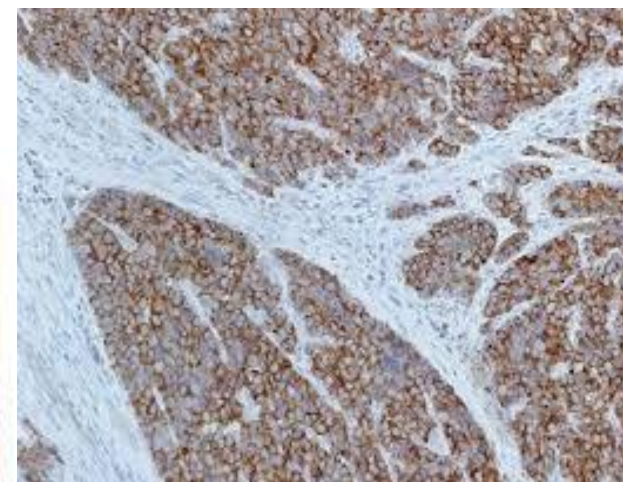
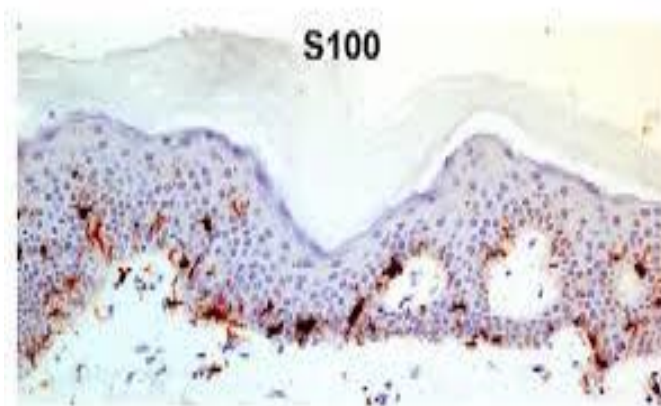


انواع کنترل مثبت برای مارکرها

Special /Rare

S100 : سلولهای ملانوسیت یا اعصاب محیطی

: Chromogranin / Synaptophysin
پانکراس یا تومور نورواندوکراین



الگوریتم QC

طبق CAP

- 1- اسلایدهای کنترل مثبت و منفی تهیه شود
- 2- ران کاری IHC طبق SOP انجام شود
- 3- کیفیت رنگ آمیزی کنترل ها بررسی شود :
- کنترل مثبت رنگ درست و لوکالیزه گرفته باشد.
- کنترل منفی هیچ رنگی نداشته یا با حداقل background باشد.
- 4- اسلایدهای بیماران ارزیابی شود
- اگر کنترل ها قابل قبولست نتایج بیماران هم معتبر است
- اگر کنترل مشکلدارست باید تکرار با اصلاح تکنیک را مدنظر قرار دهیم
- 5- ثبت QC برای هر ران جز الزامات حرفه ای است .
- SOP استاندارد و به روز برای هر آنتی بادی ضروری است .

اشکالات و خطاهای شایع

• اشکالات و خطاهای شایع (Troubleshooting)

1. رنگ آمیزی ضعیف:

- فیکساسیون نامناسب و طولانی
- آنتی ژن ریتریوال ناکافی

2. رنگ آمیزی غیر اختصاصی:

- - غلظت بالای آنتی بادی
- Blocking ناکافی

3- Background بالا:

- شست و شوی ناکافی
- سیستم آشکار سازی نامناسب

مشکل	نما	علت شایع	راهکار / رفع
Weak / no staining	سیگنال کم یا غیر فعال	- اپی توپ پنهان (cross-link) - آنتی بادی اولیه ضعیف/ غیر فعال - زمان کوتاه انکوباسیون	- Antigen retrieval مناسب - بررسی آنتی بادی - افزایش زمان یا غلظت آنتی بادی
High background / non-specific	رنگ پراکنده و خارج از محل آنتی ژن	- پراکسیداز اندوژن فعال - اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی - شستشوی ناقص	- Peroxidase / Protein block - شستشو کافی با بافر - کاهش غلظت آنتی بادی
Patchy / uneven staining	رنگ ناهمگن در بافت	- خشک شدن بافت - نفوذ ناکافی محلولها	- مرطوب نگه داشتن اسلاید - استفاده از جار
Edge artifact	رنگ شدید در حاشیه برش	- تجمع کروموزن در لبه ها - شستشو ناکافی	- شستشوی کامل - اجتناب از خشک شدن لبه ها
Tissue detachment / loss	برش جدا شده از لام	- Fixation ضعیف - گرما یا انکوباسیون طولانی - Poor adhesion	- استفاده از اسلایدهای با بار الکتریکی مثبت - زمان و دمای مناسب

Post-analysis

- IHC مرحله بعد از پایان رنگ آمیزی
- بررسی درستی تکنیک قبل از تفسیر تشخیصی
- نقش مهم تکنسین

– اولین سؤال آیا رنگ قابل اعتماد است؟

- کنترل مثبت رنگ گرفته؟

- کنترل منفی بدون رنگ است؟

- بافت سالم مانده؟

اگر ✕ → نتیجه غیرقابل گزارش

– بررسی کنترل‌ها

- کنترل مثبت:

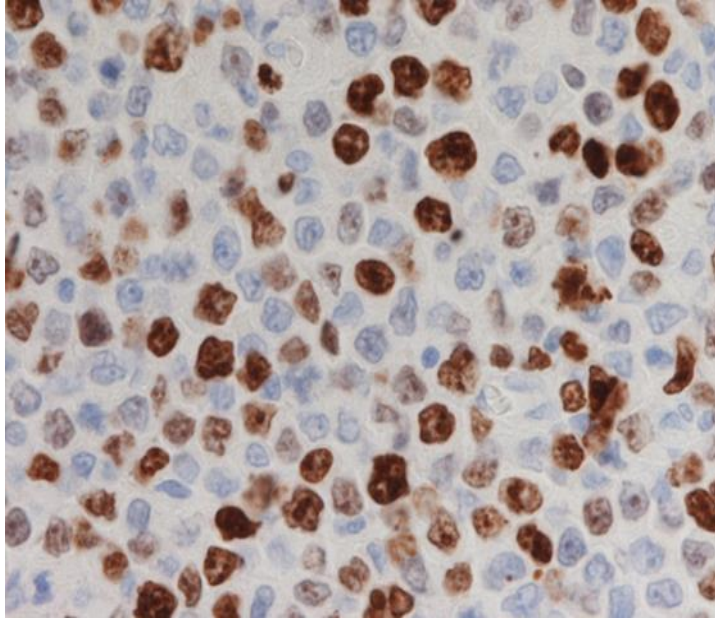
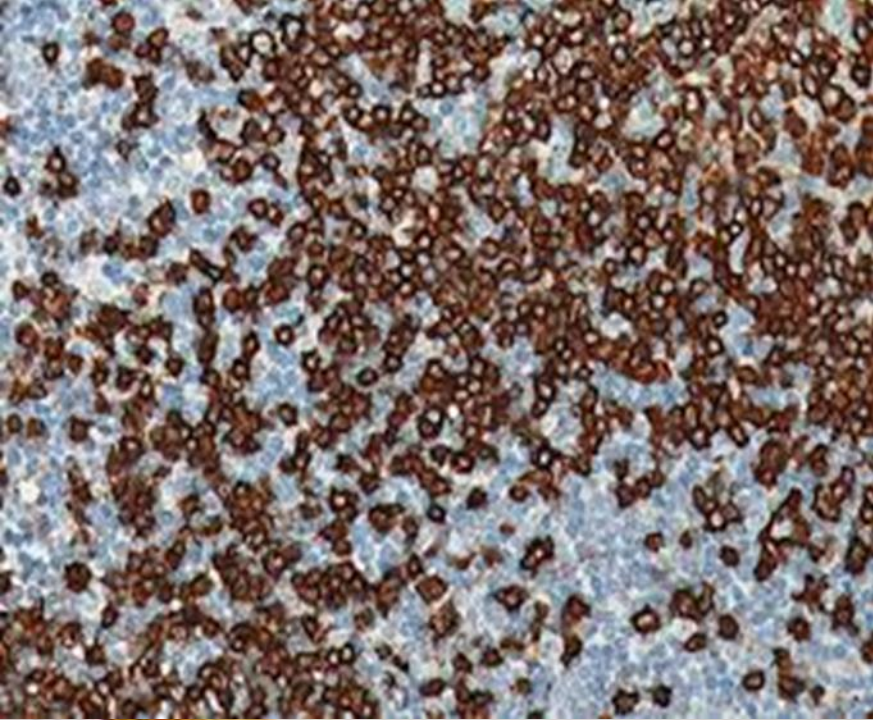
- محل درست؟

- شدت قابل قبول؟

- کنترل منفی:

- عدم رنگ اختصاصی

- رنگ در کنترل‌ها = اعتبار تست



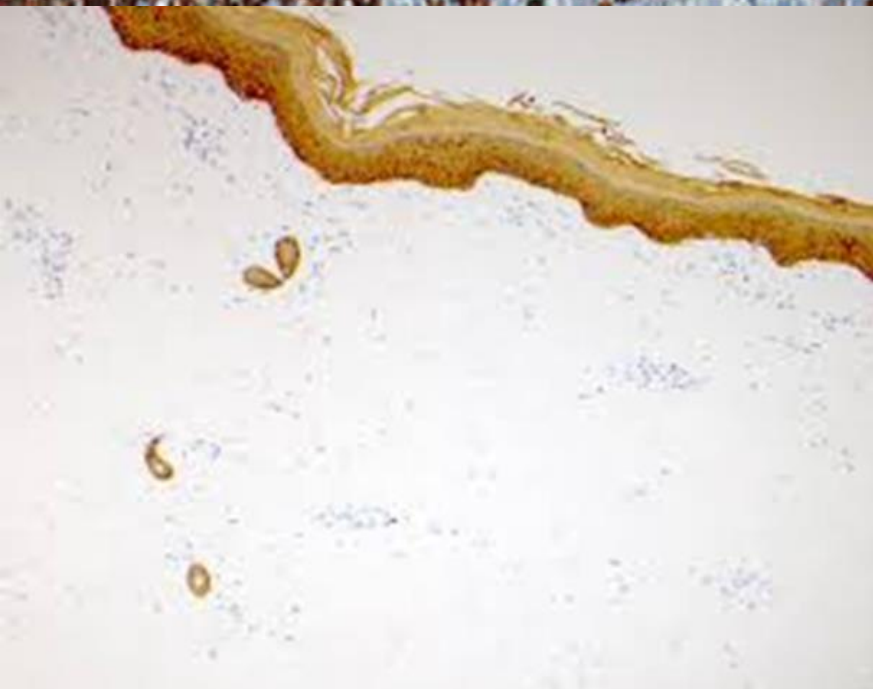
– محل رنگ آمیزی
(Localization)

• Nuclear) → ER, PR, Ki-67 هسته‌ای

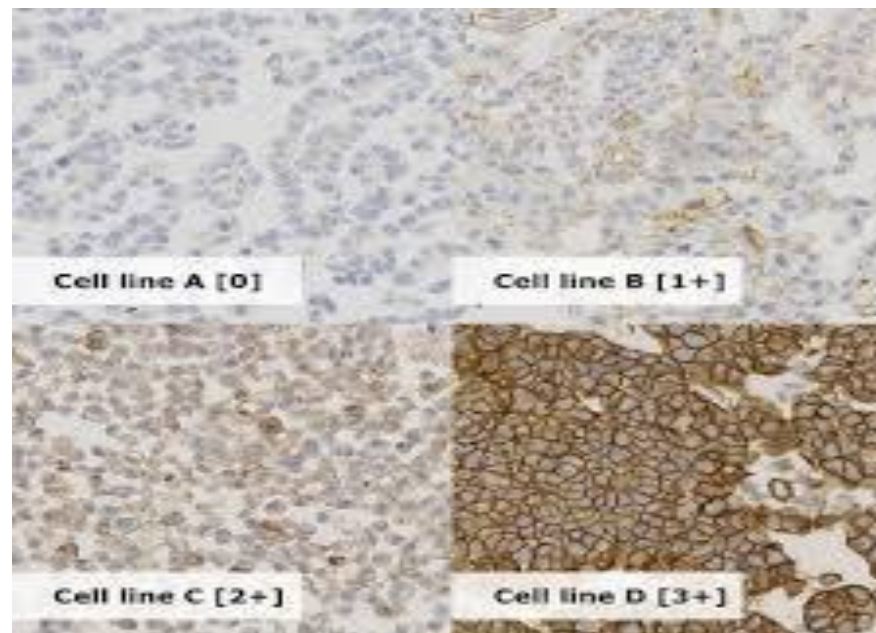
• Cytoplasmic) → CK, Vimentin سیتوپلاسمی

• Membranous) → HER2, CD20 غشایی

! رنگ در محل غلط = خطای تکنیکی



شدت رنگ



• 0 = بدون رنگ

• +1 = ضعیف

• +2 = متوسط

• +3 = قوی

تکنسین: شدت را توصیف می‌کند، تشخیص با پاتولوژیست است

الگوی رنگ آمیزی

- Diffuse → اکثر سلول‌ها
- Focal → بخشی از سلول‌ها
- Patchy → نامنظم

الگوی غیرمنتظره → بررسی مجدد تکنیک

Background و آرتیفکت

• background زیاد → blocking نا کافی

• رسوب دانه ای → شستشوی نا کافی

• رنگ هسته غیر واقعی → over-counterstain

– مقایسه با H&E

IHC باید با مورفولوژی H&E همخوانی داشته باشد

• رنگ در سلول اشتباه = مشکوک به artifact

چه زمانی اسلاید رد می‌شود؟

- کنترل مثبت منفی شده
 - بافت جدا شده
 - رنگ غیر اختصاصی شدید
 - شدید background
- IHC → نیاز به تکرار

نقش تکنسین در تفسیر

- تضمین کیفیت رنگ

- گزارش مشکلات تکنیکی

- آماده‌سازی اسلاید قابل اعتماد برای پاتولوژیست

Post-analysis = تضمین اعتبار نتیجه IHC

جمع‌بندی و پیام‌های کلیدی

جمع‌بندی و پیام‌های کلیدی

بر اساس CLSI، مستندسازی و Validation منظم بهترین راه پیشگیری از خطاهاست.
ایمونوهایستوشیمی پلی بین مورفولوژی و درمان هدفمند است.

اجرای صحیح تکنیک، کنترل کیفی دقیق و تفسیر آگاهانه بر اساس گایدلاین‌ها، نقش مستقیم در کیفیت تشخیص و درمان بیمار دارد.