

## **2.1 IMMUNHISTOCHEMIE**

H.P. Dinges, H. Denk, A. Reiner, F.G. Würtz

### **A. EINLEITUNG**

### **B. STRUKTURQUALITÄT**

### **C. INDIKATIONEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE**

### **D. FIXIERUNG**

### **E. STEIGERUNG DER ANTIGENITÄT (ANTIGEN-RETRIEVAL)**

1. Protease - Vorbehandlung
2. Hitzevorbehandlung

### **F. ANTIKÖRPERPRÄPARATIONEN**

### **G. IMMUNFÄRBUNG**

1. Methoden
2. Kontrollen
  - a) Positivkontrollen
  - b) Negativkontrollen
  - c) Lagerung von Kontrollschnitten
  - d) Hintergrundanfärbung
  - e) Antigen-Standards

### **H. BEFUNDERSTELLUNG**

1. Interpretation
2. Befundbericht

### **J. EXTERNE QUALITÄTSSICHERUNG**

1. Allgemeines
2. Ringversuche

### **K. IMMUNZYTOCHEMIE IN DER ZYTOLOGIE**

1. Probenauswahl
2. Fixierung
3. Lagerung
4. Antigen-Retrieval und Immunreaktion
5. Zellblocktechnik
6. Kontrollen
7. Interpretation, Befunderstellung und Grenzen der Immunzytochemie

### **L. IMMUNFLUORESZENZ**

### **M. CHECKLISTE** zur Qualitätssicherung im immunhistochemischen Labor

### **LITERATUR**

## A. EINLEITUNG

Immunhistochemische Untersuchungen sind wichtige unterstützende Maßnahmen in der histopathologischen Diagnostik. Nach wie vor dominiert aber die Morphologie auf Basis konventioneller histologischer Kriterien und Färbungen (Denk, Taylor et al., O'Leary et al.). Seit etwa einem Jahrzehnt dienen semiquantitativ ermittelte immunhistochemische Befunde auch als direkte Grundlage für therapeutische Entscheidungen (Antihormontherapie und/oder Chemotherapie nach Ermittlung des Steroidrezeptorgehaltes, Chemotherapie und/oder Therapie mit Antikörpern nach Ermittlung der Her2neu-Onkoprotein-Expression beim Mammakarzinom). Seit den 80er Jahren bestehen Bestrebungen zur Standardisierung der Immunhistochemie: Biological Stain Commission (BSC), U.S. Food und Drug Administration (FDA), College of American Pathologists (CAP), Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology (ADASP), American Society of Clinical Pathology (ASCP), International Academy of Pathology (IAP), National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) und andere.

Trotz dieser umfänglichen Bemühungen gibt es immer noch keine zufriedenstellenden Standards (Seidal et al, O'Leary). Die in diesem Positionspapier enthaltenen Empfehlungen sollen einen Minimalstandard definieren, der in regelmäßigen Abständen den internationalen Qualitätserfordernissen anzupassen ist.

## B. STRUKTURQUALITÄT

### 1. RÄUMLICHKEITEN

Die Laborräume für die Immunhistochemie (IHC), die Immunzytochemie (ICC) und die Immunfluoreszenz (IF) haben den behördlichen Auflagen zu entsprechen. Der Raum für die IF muss eine Möglichkeit zur Verdunkelung besitzen. Die Arbeitsplätze zur Durchführung immunhistochemischer Reaktionen sollen geräumig, hell und nach Möglichkeit klimatisiert sein.

### 2. GERÄTE

Die verwendeten Geräte müssen für den professionellen Einsatz geeignet sein (CE-Zertifizierung) und ihr Betrieb muss den behördlichen Auflagen entsprechen. Folgende Mindestausstattung wird vorgeschlagen: Zentrifuge, Mikrotome, Analysenwaage, Mikrowellenherd (700 - 800 Watt), Brutschrank, Wärmeplatte, Kühlgeräte (Kühlschränke, Tiefkühltruhe für -70° C), Dampfdrucktopf, Wasserbad, pH-Meter, Inkubationskammern, Cryocut, mit flüssigem Stickstoff füllbare Gewebebehälter und Transport-Dewars, entsprechende Mikroskopausstattung (eventuell Fluoreszenzmikroskop), diverse Laborkleingeräte. Die angeführten Geräte können auch über mehrere Laborbereiche eines Institutes verteilt sein.

Automatische Immunostainer sind für kleinere IHC-Labors derzeit nicht unbedingt notwendig. Die ausschließliche Verwendung von automatischen Immunostainern ist aber nicht zu empfehlen, da praktische Erfahrung im manuellen Betrieb die Voraussetzung für ein tieferes Verständnis der Probleme bei immunhistochemischen Reaktionen darstellt.

### 3. PERSONAL

Zur Aufrechterhaltung einer entsprechenden Verarbeitungs- und Befundungsqualität ist qualifiziertes Personal notwendig. Das medizinisch-technische Personal sollte über eine langjährige Erfahrung verfügen, die Immunhistochemie kontinuierlich und nach Möglichkeit hauptamtlich betreiben und durch ständiges Training auf dem Stand des Wissens bleiben. Auch für das ärztliche Personal ist praktische Erfahrung im technischen Bereich Voraussetzung für ein tieferes Problemverständnis. Für die qualifizierte Befundung immunhistochemischer Schnittpräparate ist ein Facharzt mit langjähriger Erfahrung in der Routinediagnostik unter Einbeziehung der IHC Voraussetzung.

## C. INDIKATIONEN

Die Indikationsstellung für eine immunhistochemische Untersuchung im diagnostischen Bereich erfolgt durch den Pathologen. Im Folgenden ist eine Auswahl differentialdiagnostischer Problembereiche angeführt, die oft eine Unterstützung durch die Immunhistochemie notwendig machen (ohne Anspruch auf Vollständigkeit):

- undifferenzierte großzellige Malignome: z. B. großzellige Karzinome, epitheloidzellige Melanome, großzellige Lymphome, Keimzelltumoren, epitheloide Sarkome etc.
- undifferenzierte oder niedrig differenzierte kleinrundzellige Malignome des Kindes- und Erwachsenenalters: Tumoren der PNET- Ewing Gruppe, blastomatöse Tumoren (Neuroblastom, Medulloblastom, Hepatoblastom, Pulmoblastom, Wilms-Tumor etc.), Lymphome, neuroendokrine Tumoren, desmoplastischer kleinrundzelliger Tumor etc.
- spindelzellige Tumoren: Sarkome, Melanome, undifferenzierte Karzinome etc.
- Zuordnung von Metastasen oder von Tumoren unklaren Ursprungs zu einem bestimmten Ausgangsgewebe (Prostata, Lunge, Niere etc.).
- Erkennung von Mikrometastasen ( "Sentinel-Lymphknoten" )  
-Diagnostik und Typisierung maligner Lymphome und anderer hämatologischer Neoplasien, niedrig differenzierter Weichteiltumoren, niedrig differenzierter Tumoren des Zentralnervensystems etc.
- Differentialdiagnose Mesotheliom versus Adenokarzinom.
- Nachweis infektiöser Agentien oder deren Produkte.
- Nachweis prognostisch (therapeutisch) relevanter Substanzen (Proliferationsmarker, Onkoproteine, Rezeptoren etc.)
- Erfassung intraduktaler Neoplasien bei epithelialen Tumoren und deren Abgrenzung gegenüber atypischer Hyperplasie (z. B. Mamma, Prostata).

Konkrete Indikationen für klinischerseits gewünschte immunhistochemische Untersuchungen betreffen in erster Linie den Nachweis unmittelbar therapeutisch relevanter Substanzen, wie z. B. von Hormonrezeptoren (Steroidrezeptoren), Onkoproteinen (Her2neu), CD 117 etc. Oft wird hier eine semiquantitative Bestimmung von Hormonrezeptorproteinen oder Onkoproteinen als zusätzliche Herausforderung für die Standardisierung gewünscht.

## D. FIXIERUNG DES GEWEBES FÜR IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Optimale Strukturhaltung durch Fixierung und Erhaltung der Antigenität schließen sich oft aus. Beste Antigenerhaltung zeigt unfixiertes Material (Gefrierschnitt), während Fixierung und Einbettung des Gewebes die antigenen Determinanten blockieren (reversibler Zustand) oder zerstören (irreversibler Zustand) können. Für die diagnostische Anwendung immunhistochemischer Methoden in der Praxis ist aber zumeist die Verwendung konventionell fixierten und eingebetteten Materials Voraussetzung (Denk). 10 %ige neutral gepufferte wässrige Formaldehydlösung (ca. 4 %iges Formalin) ist in der Routinepathologie gut eingeführt und ergibt auch eine gute Antigenerhaltung. Grundvoraussetzung für eine optimale Fixierung ist ein möglichst rascher Beginn der Fixierung mit kurzen Ischämiezeiten des Gewebes. Die Ischämiezeit sollte bekannt sein bzw. aus den Aufzeichnungen des Labors rekonstruierbar sein (Dokumentation der Ischämiezeit und Fixierungsdauer). Bei besonders empfindlichen Gewebearten und/oder anspruchsvollen Fragestellungen (z. B. Lymphknoten bei Verdacht auf malignes Lymphom) ist eine Bearbeitung des Gewebes im Zuge eines organisierten Schnellschnittdienstes (intraoperativer Gefrierschnittdienst) empfehlenswert. Bei der Fixierung spielen Art des Fixierungsmittels, Konzentration und Menge, pH, Osmolarität, Temperatur und Fixierungsdauer eine Rolle. Hohe Temperaturen bei der Paraffineinbettung können die Antigenität beeinträchtigen, daher ist die Verwendung von Paraffin mit niedrigem Schmelzpunkt vorzuziehen (Denk, O'Leary). Bei der Entkalkung sind für immunhistochemische Fragestellungen schonende Methoden (EDTA-Entkalkung) zur Antigenerhaltung zu wählen (Dokumentation der Entkalkungsdauer).

Zum Zwecke einer gleichmäßigen Antigen-Erhaltung sollten folgende Parameter in einem Laborprotokoll festgehalten und ständig überwacht werden (O'Leary, Taylor):

- 1. Fixiermittel:** Standard ist 10 %ige neutral gepufferte Formaldehydlösung; eventuell Schäfer'sches Fixans, Bouin'sche Lösung für Spezialfälle.
- 2. Fixierdauer:** Mindestens 8 Stunden, höchstens 48 Stunden. Die genaue Fixierungsdauer sollte für jede Gewebeprobe bzw. Antigen rekonstruierbar sein. Bei heiklen Geweben (z. B. Beckenkammstanzen) sind Fixierungsmodus und Fixierungsdauer genau zu überwachen.
- 3. Temperatur:** In der Regel Zimmertemperatur.
- 4. Einbettung:** geschieht über Automaten. Eine optimale Entwässerung ist erforderlich.

**5. Gewebeaufarbeitung:** Bei kompaktem Gewebe ist auf eine stets gleichbleibende Dicke der zu fixierenden Gewebssproben zu achten (3 - 5 mm). Je zell- und kernreicher ein Gewebe ist, desto langsamer ist die Diffusion des Fixans. Lymphknoten, Milz, Lymphomgewebe soll (nach möglichst kurzer Ischämiezeit) dünn lamelliert (3 mm) werden. Die Gewebescheiben dann z. B. auf trockenes Filterpapier legen und fixieren, damit die Schnittfläche auch im fixierten Zustand plan bleibt.

Für immunhistochemische Untersuchungen ist die Anfertigung dünner Gewebsschnitte (2 - 4 µm) in der Regel zu präferieren.

**6. Trocknen der Schnittpräparate und Entparaffinierung:** Die Schnitte werden am besten über Nacht getrocknet. Die Temperatur beim Trocknungsvorgang sollte 60°C auf keinen Fall überschreiten. Auf komplette Entparaffinierung ist zu achten.

## E. STEIGERUNG DER ANTIGENITÄT (ANTIGENRETRIEVAL)

Für in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebssproben ist in den meisten Fällen eine Gewebevorbehandlung zur Sensitivitätssteigerung bzw. Demaskierung von durch die Fixation veränderten Antigenen in den Gewebeschnitten unerlässlich. Die am meisten verbreiteten Methoden sind:

1. Proteasevorbehandlung
2. Hitzebehandlung

### 1. PROTEASEVORBEHANDLUNG:

Die Proteasewirkung beruht auf der Spaltung von Proteinquervernetzungen. Auch können dadurch blockierende Proteine entfernt werden. Die Proteolysezeit korreliert häufig mit der Fixierungsdauer, weshalb eine exakte Fixierung Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist. Zur Anwendung gelangen verschiedene Proteasen wie Pronase, Trypsin, Papain, Pepsin oder ProteinaseK. Enzymkonzentration, Einwirkungsdauer und Eigenschaften des nachzuweisenden Antigens müssen aufeinander abgestimmt werden. Viele Labors bevorzugen bestimmte Enzyme, mit deren Wirkung das Labor vertraut ist. Bei inadäquater Verwendung von Proteasen kann es aber auch zur Verminderung der Immunreaktivität und zu einer oft beträchtlichen Gewebeschädigung kommen. Sofern nicht Empfehlungen des Antikörper-Produzenten vorliegen, sind bei Austestungen vor allem Variationen in der Konzentration und der Einwirkungsdauer des Enzyms bei optimalem pH zu berücksichtigen.

### 2. HITZEBEHANDLUNG:

Verschiedene Erwärmungsmethoden in Puffer wie Autoklavieren, Erhitzen im Dampfdrucktopf, im Wasserbad, Heißdampf- oder Mikrowellenbehandlung werden eingesetzt. Bei Einsatz eines neuen Antikörpers sind Vorversuche zur Entwicklung optimaler Protokolle unerlässlich. Nach Empfehlung von Shi et al sollten die

Reaktionsbedingungen bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Temperaturen erprobt werden.

**Tab. 1: Empfohlene Testanordnung zur Erprobung eines optimalen Antigen-Retrieval Protokolles.**

<b>Tris-HCl Puffer</b>	<b>pH 1-2</b>	<b>pH 7-8</b>	<b>pH 10-11</b>
Sehr hohe Temp. (120°C) kurzzeitig 3-5 min., Drucktopf	Schnitt 1	Schnitt 4	Schnitt 7
hohe Temp. (100°C) 10 min., Mikrowelle	Schnitt 2	Schnitt 5	Schnitt 8
mittelhohe Temp. (90°C) 30 min., Wasserbad	Schnitt 3	Schnitt 6	Schnitt 9

Bei der Darstellung von Kern- oder Zytoplasma-assoziierten Antigenen ergeben im allgemeinen höhere Temperaturen bei mittleren und hohen pH-Werten die besten Ergebnisse. Der Molarität der Puffer scheint keine wesentliche Bedeutung zuzukommen. Am gebräuchlichsten sind TRIS-HCl, Phosphat-, Acetat-, Zitrat- und EDTA-Puffer.

Bei der Mikrowellenbehandlung ist eine exakte Standardisierung schwierig, sollte aber angestrebt werden: konstantes Puffervolumen, konstante möglichst hohe Energieleistung (700 - 800 Watt), gleichmäßige Behandlungsdauer, gleiche Anzahl der Schnitte (evtl. Leerschnitte einfügen) pro Untersuchung und pro Küvette und gleicher Stellplatz. Mikrowellenbehandlungen erfolgen oft abgestuft (z. B. 3 x 5 Min.), die optimalen Reaktionsbedingungen müssen ausgetestet werden. Seit kurzer Zeit sind am Markt speziell für die Histologie/Immunhistochemie entwickelte „Histoprozessoren“ mit integrierter Mikrowellentechnik am Markt erhältlich – solche Geräte erleichtern die Standardisierung wesentlich. Für die Behandlung im Drucktopf sind Einwirkungszeiten von 2 bis 4 Min. ausreichend, ein Autoklavieren bei 120° C erfolgt meist über 10 - 30 Min., während ein Erhitzen im Wasserbad einen Zeitaufwand von 20 - 40 Min. und ein Erhitzen im Wasserdampf einen von 40 - 75 Min. erfordert. Durch geeignete Methoden muss eine feste Haftung der Schnittpräparate am Objektträger sichergestellt werden (Silanisieren etc.). Eine Austestung der optimalen Bedingungen sollte immer an mehreren Geweben mit erfahrungsgemäß positiv reagierenden und auch negativ reagierenden Strukturen erfolgen. Hierfür bietet sich die in letzter Zeit entwickelte Tissue-Micro-Array-Technologie an, die auch für die Austestung unterschiedlich fixierter Gewebe in einem Reaktionsgang geeignet ist.

## **F. ANTIKÖRPER**

Die Zahl der polyklonalen und monoklonalen Antikörper (Ak), die bei immunhistochemischen Reaktionen zur Anwendung gelangen, ist heute kaum mehr übersehbar und steigt weiter an. Es gibt in Österreich keine verbindlichen Regulative für den Einsatz von Ak in der Immunhistochemie. In den USA müssen Reagenzien für den diagnostischen Einsatz durch die FDA freigegeben werden (510/k Premarket Notification, Premarket Approval). Sinn dieser Bestimmung ist es,

eine Unterscheidung hinsichtlich der Eignung der Ak für die Immunhistochemie, Durchflusszytometrie und für serologische Assays zu treffen. Dies betrifft auch ein und dieselbe Ak-Präparation beim Einsatz für verschiedene diagnostische Immunreaktionen. Es wurde daher vorgeschlagen, eine separate Liste der für Immunhistochemie geeigneten Antikörper zu erstellen. In den USA wurde 1998 ein nationales Referenzlaboratorium für die Immunhistochemie gegründet, das PhenoPath-Laboratorium ([www.phenopath.com](http://www.phenopath.com)). In dem "Clinical Reference Manual" dieses Labors sind alle Antigene und deren Verwendbarkeit für diagnostische Fragestellungen angeführt. Für die wichtigsten differentialdiagnostischen Fragestellungen werden übersichtliche Zusammenstellungen von zu bestimmenden Antigenen empfohlen. Auch bietet sich dieses Labor für Konsultationen bei allen mit dem Antigen-Nachweis und mit Antikörper-Präparationen zusammenhängenden Fragestellungen an und steht auch (auf Antrag und gegen Bezahlung) für praktische Erprobungen und Überprüfungen zur Verfügung.

Der Einsatz der primären Ak in immunhistochemischen Labors erfolgt zumeist in Verbindung mit hochempfindlichen immunenzymatischen Methoden - meistens Ak-Enzym-Brückenmethoden. Der primäre Ak wird hierbei unverändert (nicht konjugiert) eingesetzt, wobei in einer weiteren Reaktion ein vorgefertigter Ak-Enzym-Komplex über einen Brücken-Ak an den primären Ak gebunden wird. Um gleichmäßige gute Ergebnisse zu erreichen, sind dabei folgende Grundsätze zu beachten:

- i) Der Brücken-Ak muss mit dem primären Ak und mit dem Ak-Enzym-Komplex reagieren können.
- ii) Eine zu hohe Konzentration des primären Ak kann zu einer weitgehenden oder kompletten Absättigung des Brücken-Ak führen und dadurch eine negative Reaktion bewirken. Hohe Verdünnungen des primären Ak (bis über 1:10.000) führen daher häufig zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse. Das Verhältnis zwischen Zahl der Epitope und der Ak-Menge soll einander entsprechen, um ein (negatives) Prozonephänomen zu vermeiden.
- iii) Es sollen nur für immunhistochemische Untersuchungen erprobte und freigegebene Ak verwendet werden, wobei zwischen Paraffin-gängigen und nur im Gefrierschnitt erprobten Ak zu unterscheiden ist.
- iv) Die von der Erzeugerfirma angegebene Ablaufzeit ist strikt zu beachten, dies gilt auch für die Lagerungsvorschriften (nicht alle Ak-Präparationen eignen sich zum Einfrieren!). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte unbedingt vermieden werden.
- v) Die Vorgaben 1 - 4 sind auch bei Immunostainern mit halboffenem System zu beachten.



## G. IMMUNFÄRBUNG

### 1. METHODEN

Eine große Auswahl von immunhistochemischen Reaktionen, Amplifikationsmethoden und Substratreaktionen zur Visualisierung steht zur Verfügung und es ist unwahrscheinlich, dass sich eine einzige Standardmethode in nächster Zeit etabliert (Übersicht siehe Denk, O'Leary, Dabbs). Die Sensitivität eines Antigen-Nachweises kann sich bei Variationen von in Verwendung stehenden Protokollen dramatisch ändern. Generell ist eine Tendenz zum Einsatz von immer sensitiveren Methoden des Antigen-Nachweises zu bemerken. Jedes Laboratorium sollte über exakte Protokolle der verwendeten Methoden verfügen, am besten zusammengefasst in einem Manual. Die Verwendung kontrollierter Reagenzien und Kits (Chargenbezeichnung, Ablaufdatum) nach den Angaben des Herstellers ist zu bevorzugen. Die Verwendung von Automaten zur Durchführung immunhistochemischer Reaktionen fördert die Standardisierung der Methodik und wird auch bei mikroskopisch-morphologisch auszuwertenden Labormethoden auf DNA-RNA-Ebene (in situ Hybridisierung, FISH) in zunehmendem Maße gefordert.

### 2. KONTROLLEN

Entsprechende Kontrollen sind für die Erzielung verlässlicher Ergebnisse und deren Interpretation unverzichtbar. Unterschieden wird zwischen positiven und negativen Kontrollen (extern und intern) (O'Leary, Dabbs).

**a) Positivkontrollen:** Idealerweise sollte eine *externe* Positivkontrolle (Kontrollschnitt) eine Immunreaktivität mit stark reagierenden und schwach reagierenden antigenen Strukturen aufweisen. Ansonsten sind schwach reagierende Kontrollepitope stark reagierenden vorzuziehen, um Probleme bei der Durchführung der Immun-Assays zu erkennen. Für diese Zwecke eignen sich "Mehrgewebsblöcke" unter Verwendung verschiedenster Gewebe mit oder ohne Einbeziehung von Tumoren. Etwa zwei Drittel aller derzeit diagnostisch relevanten Antigene finden sich in Schnitten gut erhaltener Appendices. Wertvoll für den Einsatz von optimalen Positiv- und Negativkontrollen ist die Adaptation der kürzlich entwickelten Tissue-Micro-Array-Technologie unter Verwendung speziell zusammengestellter Raster aus Gewebsstanzzylindern (Wang et al). Letzteres Verfahren ermöglicht auch die gleichzeitige Testung verschiedener Fixierungsbedingungen mit genau bekannten Ischämie- und Fixationszeiten.

*Externe* Positivkontrollen können auf verschiedene Weise mitgeführt werden: entweder getrennt vom Testschnitt auf einem eigenen Objektträger oder gemeinsam mit dem Testschnitt auf demselben Objektträger. Für letzteres Verfahren bieten sich kleine Gewebeproben (z. B. Appendix-Querschnitte) und Tissue-Micro-Arrays an, die auf silanisierte oder auf andere Art gut haftfähig gemachte Objektträger bereits vor dem Aufbringen des Testschnittes aufgebracht wurden. Hierbei ist auf eine Standardisierung der Beschriftung der Objektträger zu achten, um Verwechslungen und Fehlinterpretationen zu vermeiden. Zur Überwachung erprobter immunhistochemischer Reaktionen genügt das Mitführen eines Objektträgers mit Kontrollschnitt pro manuellem oder automatischem Färbevorgang. Für alle heiklen

Interpretationen ist jedoch die Mitführung eines geeigneten Kontrollschnittes auf dem Test-Objektträger vorzuziehen.

*Interne* Positivkontrollen finden sich vor allem bei weit verbreiteten Antigenen (z. B. Vimentin, LCA etc.) schon im Testschnitt. Für eine gute interne Kontrolle empfiehlt sich die Auswahl eines geeigneten Gewebeblockes (etwa Tumorgewebe und Normalgewebe auf einem Block: bei einem epidermalen Hauttumor z.B. Miterfassung unveränderter Haut zur Austestung eines Keratinprofils). Das gleichzeitige Mitführen *externer* und *interner* Positivkontrollen erlaubt eine optimale Interpretation der Reaktionsergebnisse.

**b) Negativkontrolle:** Diese inkludiert eine Spezifitätskontrolle der Immunreaktion durch Weglassen eines unverzichtbaren Reaktionsschrittes wie z. B. Ersatz des spezifischen primären Ak durch einen unspezifischen nicht reagierenden Ak des gleichen Isotyps. Für Testzwecke empfiehlt sich auch die Verwendung eines mit dem entsprechenden Antigen präabsorbierten Ak, sofern geeignete Antigen-Präparationen vorhanden sind. Bei bereits bekannten Reaktionsbedingungen ist statt dessen die Verwendung verschiedener nicht reagibler Substanzen (PBS, fetales Kälberserum etc.) vertretbar; auch kann bei eindeutigen Reaktionsbedingungen auf die Mitführung einer Negativkontrolle verzichtet werden.

Beim Austesten eines neuen Ak sind externe und interne Negativkontrollen unverzichtbar.

Unter einer Negativkontrolle am Gewebe versteht man das Fehlen einer Reaktion aller zellulären und nicht-zellulären Gewebsanteile mit fehlender Antigenität in einem Kontrollschnitt (= externe Negativkontrolle) oder im Testschnitt (= interne Negativkontrolle): z. B. negative Reaktion der Epidermis bei Vimentin-Nachweis.

**Tab. 2: Immunhistochemie-Kontrollen (nach O’Leary et al)**

Kontrolle	Ziel-Gewebe	getestete Reaktion	getestete Reaktivität
Vim-Kontrolle	Vim im mesenchymalen Gewebe des Patienten	Fixierung	Fixation: Verlust der Vim-Immunreaktion durch Überfixierung
Positivkontrolle des Ziel-Ag	Gewebestrukturen oder Zellen, die das Ziel-Ag enthalten	Spezifitäten der Ag-Ak-Reaktion des prim. Ak mit dem Ziel-Ag	Reaktivität des prim. Ak
Negativkontrolle des Ziel-Ag	Gewebestrukturen oder Zellen, die das Ziel-Ag nicht enthalten	Kreuz-Reaktionen des prim. Ak	Reaktivität des prim. Ak
Unspezifische Reagenzien-Kontrolle	Dasselbe Gewebe wie für den Test mit dem prim. Ak	Ermittlung der unspezifischen Hintergrundfärbung in Proben vom Patienten, Positiv- und Negativ-Kontrolle, Vim-Kontrolle	unspezifisches Bindungsverhalten der Test-Reagenzien zum Test-Gewebe
Interne Kontrolle der Probe vom Patienten	Serien-Schnitte von der Patientenprobe	Fixierungs-, Weiterbearbeitungs und/oder Lagerungseffekte an der Testprobe im Vergleich zu Kontrollschnitten	Reaktivität des prim. Ak

Abk.: Vim = Vimentin; Ag = Antigen; Ak = Antikörper

Vimentin-Kontrolle: Diese eignet sich auch vorzüglich zur Erkennung einer Antigen-Zerstörung durch Überfixation (v5-Epitop ist sehr empfindlich gegen Überfixierung).

**c) Lagerung von Kontrollschnitten und -blöcken:** Bei der Herstellung von lagerbaren Kontrollschnitten ist zu beachten, dass Licht- und Luftexposition ungeschützten Gewebes nach einiger Zeit zu einer abgeschwächten Immunreaktion führen kann. Reparaffinierung der Oberfläche der Schnittpräparate durch Wärmeeinwirkung und Lagerung im Dunklen (Schachteln) oder in einem sauerstofffreien Milieu (CO<sub>2</sub>-Gas) sind anzuraten. Kontrollblöcke sollten stets nach dem Anschneiden mit Paraffin versiegelt werden.

**d) Hintergrund(Background)-Anfärbung:** Unspezifische Hintergrundanfärbungen vermindern den Kontrast der spezifischen Reaktion und beeinträchtigen die Interpretierbarkeit und Sensitivität der Methode. Als Ursache kommen in Frage: zu hohe Antikörperkonzentrationen, Antigendiffusionen in die Umgebung (bei löslichen Antigenen) und schlecht entparaffinierte Schnitte (Denk). Weitere Ursachen: zu lange Inkubation mit dem Ak oder dem Chromogen, unzureichende Spülungen, unspezifische Bindungen der sekundären Ak.

**e) Antigen-Standards:** Nach wie vor ist die Entwicklung geeigneter Referenzstandards in der Immunhistochemie ein ungelöstes Problem. Die Herstellung von Zellblöcken aus Zellsuspensionen mit einem definierten Gehalt an Antigenen (Quickgel) oder die Konstruktion artifiziellen Gewebes in der Form von Antigen-Matrix-Modellen in Verbindung mit der Tissue-Micro-Array-Technologie könnte einen Lösungsansatz bringen. Im Hercept®Test der Fa. Dako werden Zellen von Zellkulturen mit unterschiedlicher Reaktionsintensität zu Kontrollzwecken mitgeführt, doch reichen diese Kontrollen nicht für alle Reaktionsansätze eines Kits aus. Rhodes et al empfehlen für die semiquantitative Bestimmung von Her2neu formalinfixierte, mit Paraffin vorbehandelte Zelllinien-Standards als Qualitätskontrolle.

## H. BEFUNDERSTELLUNG

### 1. INTERPRETATION

Die Interpretation von immunhistochemischen Färbungen sollte auf Basis der histologischen Verteilung der angefärbten Strukturen, der ungefähren Anzahl positiv gefärbter Zellen, der Färbeintensität und - soweit sinnvoll - unter Anwendung von Cut-off-Levels erfolgen. Die angeführten Parameter sollten klar definiert und reproduzierbar sein und auf validen Publikationen beruhen. Eine nachvollziehbare, präzise quantitative Immunhistochemie erfordert den Einsatz von Kontrollmaterial mit einer definierten Menge eines Ziel-Antigens, nach Möglichkeit in Verbindung mit automatisierten Bildanalyse-Verfahren (Seidal et al).

### 2. BEFUNDBERICHT

Die Interpretation der immunhistochemischen Resultate und deren Bedeutung im Kontext differentialdiagnostischer Überlegungen sind im Befundbericht festzuhalten. In Anlehnung an eine Empfehlung der ADASP sollte der immunhistochemische Befundbericht folgendermaßen aufgebaut sein:

- i) Der immunhistochemische Befund sollte nicht getrennt erfolgen, sondern in den patho-histologischen Gesamtbefund integriert sein. Wo dies nicht sinnvoll ist, kann der immunhistochemische Befund als Anhang zum histopathologischen Befundbericht formuliert werden.
- ii) Daten zur Identität der verwendeten Gewebeproben sind nach Möglichkeit anzuführen.
- iii) Sofern es sich nicht um eine Standardsituation handelt, ist die Art und Behandlung der analysierten Gewebeprobe anzuführen (z.B. Knochengewebe nach Entkalkung – Entkalkungsmodus).
- iv) Alle durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen sind anzuführen. Insbesondere sind alle verwendeten primären Ak anzuführen und – wenn erforderlich - näher zu charakterisieren (z.B. „CEA-polyklonal“ oder „CEA-monoklonal“ bei gezielter Verwendung unterschiedlicher Ak).
- v) Für jede immunhistochemische Färbung sind die Ergebnisse, sowohl positive wie auch negative, zu berichten. Das Reaktionsmuster und das Verhalten der Kontrollen sind festzuhalten, sofern dies für die Interpretation der immunhistochemischen Reaktion von Bedeutung ist und das Befundergebnis davon abhängt.

- vi) Im Allgemeinen verhalten sich immunhistochemische Reaktionen nicht stöchiometrisch. Quantitative Ergebnisse sollten nur dann explizit festgehalten werden, wenn validierte Systeme ein solches Vorgehen rechtfertigen (z.B. semiquantitative Erfassung der Steroidrezeptoren-Expression und des Her2neu-Onkoproteins an Proben von Mammakarzinomen). Für semiquantitative Auswertungen empfiehlt sich die Verwendung von Textbausteinen.
- vii) Fixierung und Antigen-Retrieval-Methode: Eine detaillierte Angabe ist dann empfehlenswert, wenn Abweichungen von der üblichen Vorgangsweise (z. B. keine Fixierung in neutral gepuffertem Formalin) vorliegen. Fixierung und Antigen-Retrieval-Methodik sollten nach schriftlich festgelegten Standard-Protokollen erfolgen und nachvollziehbar sein.

## J. EXTERNE QUALITÄTSSICHERUNG IN DER IMMUN-HISTOCHEMIE

### 1. ALLGEMEINES

Externe Maßnahmen zur Qualitätssicherung fußen auf drei Standbeinen:

- i) ständige Fortbildung (Literaturstudium, Kongresse, Workshops etc.)
- ii) externe Tauglichkeitstestungen (proficiency testing)
- iii) Laboratoriums-Inspektions-Programme

In den USA erfolgt die Akkreditierung von immunhistochemischen Labors durch das College of American Pathologists (CAP), von dem ein Zertifikationsprogramm ausgearbeitet wurde. Dieses fordert die Erstellung eines Manuals für die Immunhistochemie, in dem alle vorhandenen methodischen und technischen Möglichkeiten angeführt sind und ein Überwachungsprogramm festgehalten ist (z. B. Lagerungsbedingungen für Reagenzien, Überwachung der Puffer-Lösungen, vorgeschriebene Kontrollen für jeden einzelnen Antikörper, Evaluierungsvorschriften für neue Antikörper, Überwachungsprogramme für IHC-Färbeautomaten, tägliche Qualitätskontrollen der immunhistochemischen Färbungen etc.). Das CAP leitet auch ein immunhistochemisches Testprogramm (proficiency testing program), in dem die teilnehmenden Labors zwei- bis dreimal im Jahr Schnitte von zu testenden Fällen mit entsprechenden Instruktionen über durchzuführende Färbungen und Kontrollen erhalten. Jedes teilnehmende Labor erhält eine detaillierte Kritik. Ein ähnliches Programm gibt es auch in Großbritannien, das National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry (UK - NEQAS). Solche Testprogramme haben durch die beschränkte Verfügbarkeit und durch die Variabilität der Immunreaktionen innerhalb des Gewebes eine limitierte Aussagekraft. Die Schaffung artifiziellen Gewebes bzw. von Zellsuspensionen kultivierter Zellen mit definierten Eigenschaften unter Einbeziehung der Tissue-Micro-Array-Technologie könnte für die Zukunft einen Lösungsansatz darstellen.

## 2. RINGVERSUCHE DER ÖGP

Die ÖGP hat unter der Leitung von Frau Prof. Dr. A. Reiner ein externes Qualitätssicherungsprogramm aufgebaut, das in seinen Grundzügen dem "proficiency-testing-program" der CAP und dem NEQAS-Programm entspricht (Regitnig et al).

Die durchgeführten Ringversuche bezogen sich auf den semiquantitativen Nachweis von Steroidrezeptoren und des Her2neu-Onkoproteins bei Mammakarzinomen und beinhalteten einerseits einen technisch-methodischen und andererseits einen interpretativ-diagnostischen Teil. Die teilnehmenden Labors erhielten gefärbte und ungefärbte Schnittpräparate. An den gefärbten Schnittpräparaten sollte jedes teilnehmende Labor eine semiquantitative Auswertung nach vorgegebenen Richtlinien mit Erstellung eines immunreaktiven Scores vornehmen. Die ungefärbten Schnittpräparate stammten von denselben Paraffinblöcken wie die gefärbten und sollten nach den Gepflogenheiten des jeweiligen Labors gefärbt werden, zum Nachweis des Östrogen- und Progesteron-rezeptorproteins und des Her2neu Onkoproteins und zur Quantifizierung dieser Antigene. Die Ergebnisse der ersten Versuche zeigten zwar eine gute Übereinstimmung bei der globalen Erfassung des Steroidrezeptors im Tumorgewebe, aber auch die erwartete Interobserver-Variabilität. Weitere Versuche dieser Art sind vorgesehen, um einerseits die methodischen Vorgaben einzuengen bzw. genauer zu definieren und andererseits die Auswertungskriterien besser zu definieren und zwischen den Labors anzugleichen.

Erfreulicherweise haben an den ersten Ringversuchen nahezu alle immunhistochemischen Labors der österreichischen Institute für Pathologie teilgenommen.

Wünschenswert ist eine Institutionalisierung dieses Programmes mit dem Fernziel einer ständigen Qualitätsüberwachung aller Institute im öffentlichen Gesundheitsdienst.

## K. IMMUNZYTOCHEMIE IN DER ZYTOLOGIE

### 1. PROBENAUSWAHL UND INDIKATIONEN FÜR DIE IMMUNZYTOCHEMIE (ICC)

Für immunzytochemische Untersuchungen kommen unterschiedliche zytologische Zellpräparationen in Frage, wie exfoliative Zellpräparate, Ergussflüssigkeit, Abklatsche, Feinnadelaspirate etc. Die Weiterverarbeitung im Routinebetrieb erfolgt einerseits nach Lufttrocknung und andererseits nach Fixierung in zumeist alkoholischer Lösung. In Flüssigkeit suspendiertes zytologisches Material kann als Zytozentrifugen- oder als Zellblock-Präparation weiterverarbeitet werden.

Eine Indikationsstellung für immunzytochemische Untersuchungen kann in der Regel erst nach morphologischer Beurteilung der MGG- oder Pap-gefärbten Präparate erfolgen und es muss sichergestellt sein, dass die in Frage kommenden Zellen auch in der immunzytochemisch untersuchten Zellpräparation vorhanden sind, eine entsprechend gute Erhaltung der Zellstrukturen vorausgesetzt.

## 2. FIXIERUNG

Voraussetzung für immunzytochemische Untersuchungen sind gut erhaltene Zellen auf einem Objektträger, möglichst nicht zu stark überlagert durch Blut und Eiweiß mit erhaltener Antigenität der in Frage kommenden Zellkomponenten. Eine Fixierung in alkoholischer Lösung soll an noch feuchten und nicht angetrockneten Zytopräparaten erfolgen, da bei nicht feucht fixierten bzw. teilweise angetrockneten Präparaten vor allem falsch-positive Ergebnisse zu befürchten sind. Luftgetrocknete Präparate müssen unmittelbar vor Durchführung der ICC fixiert werden. Die präferierten Fixative variieren: kaltes Aceton, 95 %iger Alkohol, alkoholhaltige Sprayfixative (Merckofix® etc.), Formalin-hältige Lösungen, Glutaraldehyd in niedriger Konzentration etc. Leong et al empfehlen eine initiale Fixierung in 0,1 %iger Formalin-Kochsalz-Lösung, gefolgt von einer 10 minütigen Fixierung in 95 %igem Alkohol. Nach unseren Erfahrungen (Dinges et al 1989) bringt eine Fixierung in Formalin die beste Antigenerhaltung, doch ist die Erhaltung der Morphologie bei höher konzentrierten Formaldehydlösungen schlecht. Es gibt keine generelle Empfehlung für die Fixierung zytologischer Präparate (wie etwa die Formalinfixierung in der Histopathologie) und es muss daher auf die entsprechende Literatur verwiesen werden (Dabbs, Dinges et al 1989). Wichtig ist die Kenntnis des Antigenverlustes für diverse Epitope bei Alkoholfixierung wie z. B. des S100-Proteins, um falsch-negative Interpretationen zu vermeiden.

## 3. LAGERUNG

Luftgetrocknete Zytopräparate können bis zu einer Woche ohne wesentlichen Verlust der Immunreaktivität gelagert und nach Rehydrierung in normaler Kochsalzlösung (optimale Rehydratationszeit: weniger als 1 Minute) und daran unmittelbar anschließender Fixierung immungefärbt werden (Dabbs). Eine Lagerung bei -70 Grad Celsius (luftgetrocknet oder fixiert) erhält die Immunreaktivität für mindestens 1 Monat. Nach unseren Erfahrungen eignen sich Zytopräparate auch für eine Lagerung in flüssigen Medien wie Sucrose-MgCl<sub>2</sub>-Glycerol-Lösung (Dinges et al 1989) oder in kommerziell erhältlichen Stabilisatoren (Cytolyt®, PreservCyt® u. a.) über eine Zeit von mindestens 1 bis 2 Monaten. Für Forschungszwecke oder Lagerung auf unbeschränkte Zeit empfehlen wir die Cryo-Präservierung zytologischer Proben (Dinges, 1992).

## 4. ANTIGEN-RETRIEVAL UND IMMUNREAKTION

Antigen-Retrieval-Prozeduren und Immunfärbetechniken unterscheiden sich nicht von den immunhistochemischen Methoden. Wichtig ist aber, dass nach der Fixierung und dem Beginn der Immunreaktion während keinem der zahlreichen Schritte der Immunreaktion bis zum Abschluss derselben eine Austrocknung der Präparate erfolgt, da ansonsten mit falsch positiven oder falsch negativen Immunreaktionen gerechnet werden muss.

## 5. ZELLBLOCKTECHNIK

Die Anfertigung von Zellblöcken aus dem Sediment von Zellsuspensionen (z. B. Plasma-Clots) ist eine hervorragende und empfehlenswerte Alternative für die Immunfärbung zytologischer Präparate (Abstrich, Abklatsch etc.). Von Zellblöcken kann eine große Zahl von Schnittpräparaten (mehr als 100 Schnitte) gewonnen werden, die nach den Standardvorgaben für die IHC aufgearbeitet werden. Auch gibt es keine Lagerungsprobleme und es können jederzeit nachträgliche Untersuchungen vorgenommen werden.

## 6. KONTROLLEN

Mit jeder Probe sollte eine positive und eine negative Kontrolle mitlaufen, idealerweise in Form einer zytologischen Präparation, da histologische Kontrollschnitte andere Artefakte aufweisen und daher weniger geeignet sind. Auch aus Gründen einer optimalen Kontrolle empfiehlt sich daher die Verwendung von Zellblöcken, da mit dieser Technik eine weitgehende Angleichung an die Histologie sichergestellt wird.

## 7. INTERPRETATION, BEFUNDERSTELLUNG UND GRENZEN DER IMMUNZYTOCHEMIE

Analog zur Histopathologie erfolgt auch in der Zytologie die Interpretation von immunzytochemischen Ergebnissen auf morphologischer Basis in Korrelation mit der Klinik und sollte in gleicher Weise wie beim histopathologischen Befund am besten direkt in den Befundbericht eingearbeitet werden (siehe entsprechendes Kapitel). In der Zytologie ist eine erhöhte Aufmerksamkeit bezüglich falsch-positiver und falsch-negativer Immunreaktionen notwendig, da die Gründe für Falsch-Reaktionen der ICC im Vergleich zur IHC variieren. So ist die Identifikation der Ziel-Zellen an ICC-Präparaten oft äußerst problematisch, z. B. bei der Abgrenzung von reaktiven gegenüber neoplastischen Zellen. Schlecht erhaltene oder geschädigte Zellen reagieren oft falsch positiv. In der folgenden Tabelle sind die häufigsten Gründe für falsch positive und falsch negative Ergebnisse in der ICC zusammengestellt (nach Dabbs, Dinges et al 1989).



**Tab. 3: Ursachen für falsch positive und falsch negative Ergebnisse in der Immunzytochemie**

falsch positive Reaktion	falsch negative Reaktion
unspezifische Ak-Bindung	ungeeignetes Antigen-Retrieval
Ak-Kreuzreaktivität	Fehlen der Ziel-Zellen
Fehlinterpretation von Zellen	zu geringe Antigen-Expression
Insuffiziente Peroxidase oder Biotin-blockierung	zu geringe Ak-Konzentration
nekrotische Zellen	schlechte Antigenerhaltung (durch Fixierung)
Austrocknungsartefakte	Denaturierung des Antigens (durch Fixierung)
ungeeignete Fixierung	Austrocknungsartefakte
Antigen-Diffusion	Entfärbungsprozeduren
zu hohe AK-Konzentration	

## L. IMMUNFLUORESZENZ

### 1. ANWENDUNG DER IMMUNFLUORESZENZ (IF)

a) Technik zum Nachweis von abgelagerten Immunkomplexen im Gewebe z. B. an Gefrierschnitten von z. B. Haut- oder Nierenbiopsien (meist direkte IF).

b) Technik zum Nachweis von zirkulierenden Autoantikörper im Serum (meist indirekte IF).

### 2. FLUORESZENZMIKROSKOP

Für die Routine: Auflicht-Mikroskop, 100 W Lampe, apochromatische Objektive, an verwendetes Fluorochrom angepasste Erreger- und Sperrfilterwürfel mit Interferenz-Reflexionsteilerspiegel. Durch schmalbandige Anregung und eingeeengte Emission (z. B. bei FITC durch Bandpaß, 485/20 in Kombination mit BP 520-560) lassen sich die Autofluoreszenz und eine unspezifische Konjugatanlagerung deutlich vermindern.

### 3. MATERIALIEN

Konjugate (definierte F/P-Ratio, chromatographisch gereinigt, F(ab)<sub>2</sub> gegen IgG, A, M, C3 (präabsorbiert bei Verwendung von Affennieren); Basischemikalien für den Puffer (konzentrierte Pufferlösung selbst herstellen und portioniert einfrieren); Fluoreszenz-Eindeckmedium.

a) Substrate für die direkte IF: frisches Biopsat (aus Haut, Niere, Lunge, etc) soll in einem mit NaCl-angefeuchteten Tupfer eingewickelt überbracht werden. Salt Splitting Skin zur Unterscheidung von bullösem Pemphigoid und Epidermolysis bullosa acquisita.

b) Substrate für die indirekte IF: i) gekaufte Objektträger mit 4-12 Auftragsstellen, welche definierte Zellkulturen oder Gewebeschnitte enthalten und ii) selbst hergestellte Substrate: Kombigewebsschnitte von Maus, Ratte oder Affe (Leber und Niere von Magenwand umgeben); dazu die unbedingt notwendigen, gekauften und eigenen Positiv-Kontrollen (Patientenseren) sowie eine nach allen Richtungen ausgetestete Negativ-Kontrolle (Serum eines jungen Gesunden).

#### 4. VORSCHLAG FÜR EINSETZBARE SUBSTRATE UND DIE NACHWEISBAREN ANTIGENE ZUM NACHWEIS VON ZIRKULIERENDEN AK IM SERUM

Im Allgemeinen gilt: organunabhängige Autoantikörper sind auf Ratten- oder Mausegewebe und organabhängige auf Affen- oder humanem Gewebe zu suchen.

Substrat	Gewebs-schnitt/ Zellkultur	Spezies	Antigene	Screening-Titer	IG
Hep2	K	Mensch	Kern, Mitochondrien, Actin, Golgi A., Ribosomen, Keratin, Spindel A	altersabh. 40,80,160	G
Crithidia luciliae	K	Protozoon	DS-DNA	20	G
Alkoholfix.-Granulocyten	K	Mensch	p-, c-, x-ANCA, Kern	40	G
Formolfix.-Granulocyten	K	Mensch	p-, c-ANCA	40	G
Methanolfix.-Granulocyten	K	Mensch	c-, x-ANCA, Kern	40	G
Niere	G	Affe	Glomeruläre Basalmembran (GBM)	2,5	G
Niere	G	Maus	Retikulin, Mitochondrien, LKM, F-Aktin, GBM, Kern	40	G, A
Leber	G	Maus	Kern, Lebermikrosomen, LKM, Mitochondrien, Retikulin, Kernmembran	40	G, A
Leber	Imprint	Affe	Leberzellmembran, Kern	10	G
Leber	G	Affe	Gallengangsepithel, Kernmembranporen	10	G
Magen	G	Maus	Parietalzellen, Mitochondrien, Kern, glatte Muskulatur (Aktin)	40	G
Skelettmuskel	G	Affe	Querstreifung, homogen	10	G
Herzmuskel	G	Affe (Maus)	Querstreifung, homogen	10	G
Schilddrüse	G	Affe	Mikrosomen, Thyreoglobulin	10	G
Nebenniere	G	Affe	NN-Rindeneithel	10	G
Speicheldrüse-Parotis	G	Affe	Ausführungsgangepithel	10	G
Oesophagus	G	Affe	Plattenepithel-basalmembran,-interzellulärsubstanz	10	G
Oesophagus unteres Drittel	G	Affe	Endomysium	10	G

## 5. STANDARDISIERUNG DER TECHNIK

Diese erfolgt durch Schachbrett-Titrationsen mit titrierbaren käuflichen Positivkontrollen (z. B. ANA titratable). Zu jedem definierten Substrat sollten eine bis zum Endpunkt titrierte Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (Serum von Gesundem) mitgeführt werden. Substrat-Objektträger werden mit verschiedenen Positivkontrollen versehen und 1 - 2 Monate im Kühlschrank (bei 4°-8°C) gelagert, damit Fluoreszenzmuster mit aktuellen Befunden verglichen werden können.

## 6. ERSTMALIGES SCREENING VON PATIENTENSEREN

Screening-Empfehlung: Hep2, Leber-Magen-Niere (Maus), ev. auch A- und F-Granulozyten. Primärverdünnungen: mind. 2 (z.B.: 1:10, 1:40) oder eine Verdünnung auf verschiedenen Substraten wegen des Prozonophänomens.

## 7. EXTERNE QUALITÄTSSICHERUNG

Die Teilnahme an Ringversuchen (z. B. von der ÖQUASTA, 1090 Wien, Währingerstr. 10) wird empfohlen. Objektträger mit IF-Reaktion sollen mindestens 1 Monat, positive Seren ein Jahr aufgehoben werden. Alle käuflichen Positivkontrollen mit spezifischem Fluoreszenzmuster sollten auf den verwendeten Substraten ausgetestet und diese Objektträger (2 Monate haltbar) zu Vergleichszwecken in die tägliche Fluoreszenzmikroskopie einbezogen werden. Bei positiven Seren empfiehlt es sich, nach ELISA-Untersuchung das Muster der indirekten Immunfluoreszenz mit dem ELISA-Ergebnis zu vergleichen.

## M. CHECKLISTEN ZUR QUALITÄTSSICHERUNG IM IMMUNHISTO(ZYTO)CHEMISCHEN LABOR

Die im Folgenden präsentierten Checklisten sind als Orientierungshilfe und nicht als Anwendungsbeispiele gedacht, eventuell bieten sie sich als Grundlage für ein Labor-Manual an. Auf Basis dieser Checklisten sollten schriftliche Aufzeichnungen geführt werden, z.B. eine Liste der verwendeten Antikörper, Protokolle der ausgetesteten Antigen-Retrieval-Verfahren, eine Zusammenstellung der Methoden und Kontrollen etc.

**Checkliste zur Qualitätssicherung im immunhistochemischen Labor**

**A: Methodische Kontrollen**

Indikation für die immunhistochemische Untersuchung \_\_\_\_\_

Gewebsproben (Blockbezeichnung): \_\_\_\_\_

Fixierung: neutral gepuffertes Formalin bei Raumtemp.

andere Fixierung: \_\_\_\_\_

Dauer der Fixierung: 8 - 24 h

24 - 48 h

> 48 h

**Antigen-Retrieval-Methoden:**

Protease: Typ \_\_\_\_\_

Konz.: \_\_\_\_\_

Dauer der Einwirkung: \_\_\_\_\_

Hitzebehandlung: Mikrowelle Watt: \_\_\_\_\_

Drucktopf

Autoklav

Wasserbad

andere Methode \_\_\_\_\_

Einwirkungsdauer \_\_\_\_\_ min

\_\_\_\_\_ min

\_\_\_\_\_ min

(Stammlösung):

Puffer: Zitrat, pH: \_\_\_\_\_

Phosphat, pH \_\_\_\_\_

EDTA, pH \_\_\_\_\_

TRIS-HCl pH: \_\_\_\_\_

andere AR - Methode \_\_\_\_\_

(Gebrauchslösung):

Puffer: \_\_\_\_\_

**Antikörper:** Spezifität für: \_\_\_\_\_

Klon: \_\_\_\_\_

Bezeichnung: \_\_\_\_\_

Konzentration: \_\_\_\_\_

**Methodik:** ABC-P  
 ABC-AP Verstärkungsreaktion:  
 Immunostainer: halboffen geschlossen  
 andere: \_\_\_\_\_

**Kontrolle:** Positivkontrolle: am Testschnitt  
 getrennt vom Testschnitt  
 interne Kontrolle  
 andere Methode

Negativkontrolle an Kontrollschnitt ja nein

Negativkontrolle an Testprobe nach

Weglassen des prim. AK ja nein

interne Negativkontrolle ja nein

**Checkliste zur Qualitätssicherung im immunhistochemischen Labor**

**B: Kontrollen im Laborbereich**

- Fixierlösung:** 1.) neutral gepuffertes Formalin  
 Herstellung:  
 pH-Kontrolle: wöchentlich 2 x
- 2.) Schäfer'sches Fixans  
 Herstellung:  
 maximale Verwendungsdauer: 2 Wochen  
 Farbindikator: rot (ungerade Woche)  
 blau (gerade Woche)
- 3.) Andere Fixative:

**Antikörper:**  
 Bei 4°C - 8°C gelagerte AK:  
 aus AK-Konzentraten hergestellte Verdünnungen:  
 Bei - 20 °C portioniert gelagerte AK:  
 Ablaufkontrollen: monatlich

**Immun-Assays:**  
 LSAB \_\_\_\_\_; Ablaufkontrolle: mo  
 andere: \_\_\_\_\_; Ablaufkontrolle:

**Substrat-Reagenzien:** \_\_\_\_\_

**Automatischer Immunostainer:**  
 Ventana  
 Dako  
 andere

**Puffer:** (Stammlösung):  
 Puffer: Zitrat, pH:  
 Phosphat, pH  
 EDTA, pH  
 TRIS-HCl pH:  
 andere AR - Methode \_\_\_\_\_

(Gebrauchslösung):  
 Puffer:








**Kontrollschnitte:**

Appendix:	erzeugt am: _____	Lagerung:	Block Nr.
Multi-Gewebe-Block:	erzeugt am: _____	Lagerung:	Block Nr.
Zyklin D1-Kontrolle:	erzeugt am: _____	Lagerung:	Block Nr.
NPM-Alk-Kontrolle:	erzeugt am: _____	Lagerung:	Block Nr.
weitere Kontrollen:	_____		
	_____		

Standardfixierung (bis 24 h)  
 andere Fixierungsdauer \_\_\_\_\_  
 anderer Fixiermodus                      nein                      ja

**LITERATUR**

- 📖 Denk H: Spezielle Untersuchungsmethoden in der diagnostischen Pathologie: In H. Remmele: Pathologie. 1. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg - New York. 1999.
- 📖 Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N: Techniques of Immunohistochemistry. In D.J. Dabbs: Diagnostic Immunohistochemistry. Verlag Churchill-Livingstone; New York, Edinburgh, London, Philadelphia 2002.
- 📖 Dabbs DJ: Immunocytology. In Dabbs DJ: Diagnostic Immunocytochemistry. Verlag Churchill-Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia 2002.
- 📖 Taylor C R: An Exaltation of Experts: Concerted Efforts in the Standardization of Immunohistochemistry. Appl. Immunohistochem. 1: 232-243, 1993.
- 📖 O'Leary TJ: Standardization in Immunohistochemistry. Appl. Immunohistochem. 9:3-8, 2001.
- 📖 Seidal T, Balaton AJ, Battifora H: Interpretation and Quantification of Immunostains. Am. J. Surg. Pathol. 25:1204-1207, 2001.
- 📖 Regitnig P, Reiner A, Dinges H P, Höfler G, Müller-Holzner E, Lax S, Obrist P, Rudas M, Quehenberger F: Quality Assurance for Detection of Estrogen and Progesteron Receptors by Immunohistochemistry in Austrian Pathology Laboratories. Virchows Archiv (im Druck)
- 📖 Wang H, Wang H, Zhang W, Fuller GN: Tissue Microarrays: Application in Neuropathology Research, Diagnosis and Education. Brain Pathol. 12:95-107, 2002.
- 📖 Dinges HP, Wirnsberger G, Höfler H: Immunocytochemistry in Cytology. Comparative Evaluation of Different Techniques. Anat. Quant. Cytol. Histol. 11:22-32, 1989.
- 📖 Dinges HP, Schmid C, Zatloukal K, Mair S, Preissegger KH, Redl H: Cryopreservation of Cytological Specimens for Immunocytochemistry. Path. Re. Pract. 188:714-721, 1992.
- 📖 O' Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD et al: Quality assurance for immunocytochemistry. Approved Guideline. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999.
- 📖 Banks PM: Incorporation of immunostaining of cytologic preparations: A review of technical problems. Appl. Immunohistochem. 7: 214-200, 1999.

-  Leong A-Y, Suthipintawong C, Vinyuvat S: Immunostaining of cytologic preparations:  
A review of technical problems. Appl. Immunohistochem. 7: 214-200, 1999.
-  Rhodes A, Jasani B, Coururier J, McKinley MJ, Morgan JM, Dodson AR, Navabi H, Miller KD, Balaton AJ: A Formalin-Fixed, Paraffin-Processed Cell Line Standard for Quality Control of Immunohistochemical Assay of Her-2 neu Expression in Breast Cancer. Am. J. Clin. Path. 117:81-89, 2002.
-  Storck Wulf B: Immunfluoreszenzfibel; Grundlagen und neue Anwendungen in der klinischen Immunologie. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin. Wien, 1977 (2. Auflage).
-  Bentner Ernst H, Chorzelski Tadeusz P, Kumar Vijay: Immunopathology of the skin (third edition). Verlag: John Wiley & sons. 1987.
-  Ueki H, Yaoita H: Herausgeber: Laaff H, Wieners S: Dermato-Immunhistochemie. Atlas und Handbuch für Klinik und Praxis; Verlag: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 1991
-  Cohen LM, Skopicki DK, Harrist TJ, Clarkjn WH: Non infections Vesiculo bullous and Vesiculopustular Diseases.
-  Elder David, Elenitsas R, Jaworksy C, Johnson B: In Lever's Histopathology of the Skin. Verlag: Lippincott-Raven, 1997.