



**Imunocitoquímica:  
o que há de novo**

**Amadeu Borges Ferro**




- MSc, BMedSc (Honours)
- Diretor da Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa










**1. Introdução**

- A imunocitoquímica (ICQ) é uma técnica de uso generalizado em citopatologia<sup>1</sup>, podendo ser utilizada em amostras de citologia aspirativa e esfregativa<sup>2</sup>
- As amostras citológicas, muitas vezes são as únicas disponíveis e a ICQ pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico e sugerir o prognóstico<sup>3</sup>
- Existe correlação entre a imunomarcagem em amostras de citologia e amostras histológicas para marcadores não nucleares<sup>4,5</sup>








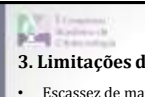

**2. Colheita e processamento de amostras citológicas**

- Citologia aspirativa
- Esfregaço
- Citocentrifugação (Cytospin™)
- Citologia em meio líquido (ThinPrep™)
- Citobloco
  - Fixação
  - Processamento
  - Imunomarcagem









	ICQ	ISH
CA / Esfregaço / citocentrifugação	✓	✓
Papanicolaou	✓	✓
May-Grünwald Giemsa	✗	?
Citologia em meio líquido	✓	?
Citobloco	✓	✓



**3. Limitações da ICQ em amostra citológica**

- Escassez de material<sup>4</sup>
- Presença de fundo que pode interferir com a interpretação<sup>6</sup>, mais evidente em aglomerados tridimensionais de células<sup>7</sup>
- Padrões de marcação membranar podem ser de difícil interpretação e/ou classificação<sup>7</sup>

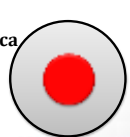








**3. Limitações da ICQ em amostra citológica**

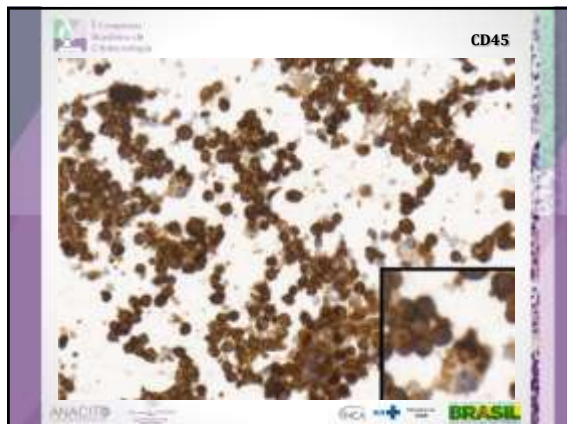
amostra citológica



amostra histológica





### 3. Limitações da ICQ em amostra citológica

- Falta de padronização das diferentes metodologias de fixação, conservação e processamento<sup>3,8</sup>
- Controle de qualidade interno e externo
- Utilização de controlos positivo e negativo no mesmo tipo de material a analisar<sup>4,6</sup>

### 4. Fixação

- A escolha do fixador é da maior importância para o resultado da ICQ<sup>2</sup>
- Preservação morfológica e antigénica<sup>9</sup>
- Diversidade de fixadores utilizados (não aditivos: etanol, metanol, acetona; aditivos: formaldeído)<sup>2</sup>

**Principais escolhas**

- Citocentrifugação - fixador pré/pós-processamento ou secagem ao ar
- Citologia Aspirativa e esfregaço - fixador ou secagem ao ar
- Meio líquido - fixador pré-processamento

### Pontos fortes de alguns fixadores


- Secagem ao ar melhora a aderência das células à lâmina e minimiza a perda celular durante a técnica ICQ<sup>10</sup>
- Acetona apresenta excelente preservação da imunoreatividade<sup>9</sup>
- Formaldeído apresenta excelentes resultados em marcadores nucleares e membranares<sup>2</sup>

**Recuperação antigénica (RA)**

- Usada sempre que se recorre a fixadores aditivos<sup>2</sup>
- Permite resultados satisfatórios em amostras fixadas com fixadores não aditivos<sup>6</sup>
- Pode ser menos agressiva quando as amostras não são fixadas em formaldeído<sup>3</sup>

### 5. Preservação das amostras citológicas em lâmina

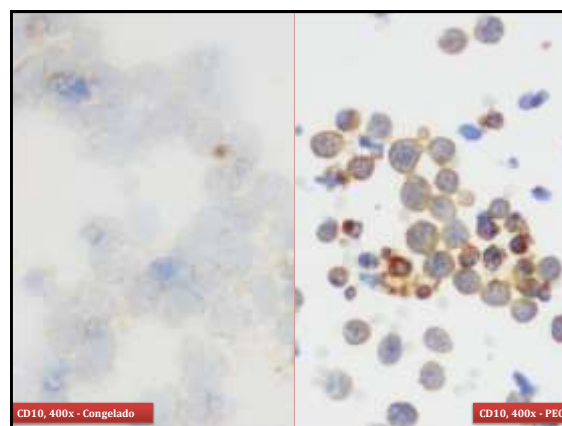
- Polietilenoglicol (PEG) vs congelação

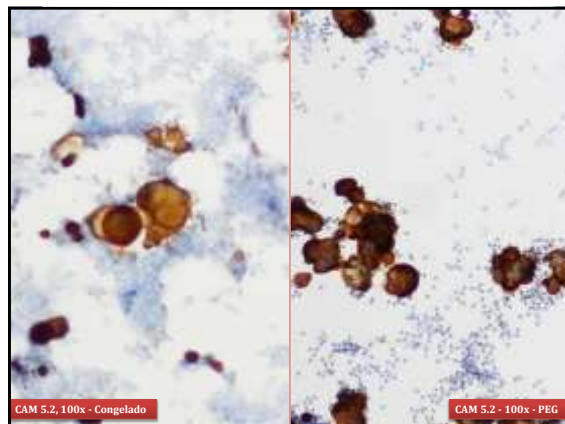
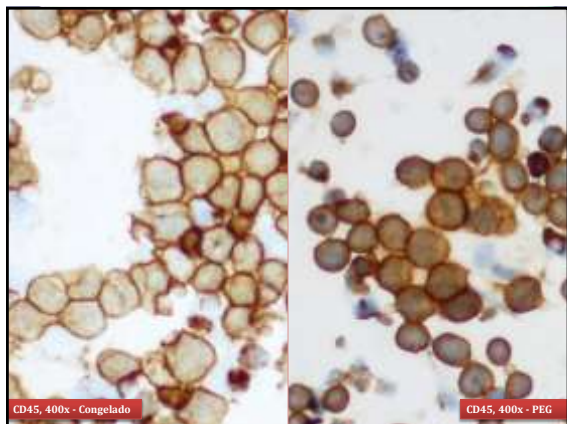


**Imunocitoquímica em Citologia**  
 Método consistente de alta produtividade para facilitar a preservação de amostras

**Use of alcohol fixed cytospins protected by 10% polyethylene glycol in immunocytology external quality assurance.**

ANACIT, ICA, and BRASIL logos are visible at the bottom.





**6. Métodos de pós-fixação**

Immunocytochemistry in Europe: results of the European Federation of Cytology Societies (EFCS) inquiry

V. Schmitt<sup>1</sup>, B. Cochard-Priebe<sup>1</sup>, M. Farnoch<sup>1</sup>, R. Davidson<sup>2</sup>, A. Bond<sup>3</sup> and P. Vally<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Medical Faculty of Bonn, Institute and Center of Molecular Pathology and Immunology, University of Bonn, Bonn, Germany; <sup>2</sup>Department of Pathology and Cytopathology, Loughborough Hospital, Loughborough Park 3, Leic. France; <sup>3</sup>Section on Pathological Microbiology, Institute of Health, Food, and Environment, <sup>4</sup>Department of Pathology, Hematology and Medical and Family Medicine, University of São Paulo, São Paulo, <sup>5</sup>Department of Pathology, Hospital Maggiore, Bologna, Italy and <sup>6</sup>Department of Pathology, Institute of Cancerology, Geneva, France, <sup>7</sup>Medical, France

The variability in material and fixatives is, in our opinion, a major factor preventing standardization of some procedures using the technique.<sup>3</sup>

**6. Métodos de pós-fixação**

**6. Métodos de pós-fixação**

**Imunocitoquímica em ThinPrep®:**  
**Comparação de Diferentes**  
**Métodos de Pós-fixação**

Catarina Barata<sup>1</sup>, Marli Anágua<sup>1</sup>, Amadeu Ferro<sup>1</sup> e Rúben Roque<sup>1,2</sup>

1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa  
 2 - Instituto Português de Oncologia de Lisboa

**6. Métodos de pós-fixação**

**Seleção dos Casos: 26 Secreções Brônquicas**

- Negativas para lesões neoplásicas
- Armazenadas em PreservCyt®
- Colhidas, no máximo, 3 semanas antes do início do processamento

### 6. Métodos de pós-fixação

**Métodos de Pós-Fixação**

Etanol 95% 10min
Acetona 10min
Formaldeído 0,039% 120min + Etanol 95% 10min

### 6. Métodos de pós-fixação

- Melhores Resultados**
  - Formaldeído a 0,039% 120min seguido de Etanol a 95% 10min



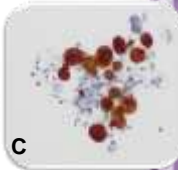




Figura 1 - A: CK (clones AE1/AE3) (400x). B: CK 8/18 (100x). C: Vimentina (400x).

### 6. Métodos de pós-fixação

- Piores Resultados**
  - Etanol a 95% 10min








Figura 2 - A: CK (clones AE1/AE3) (400x). B: CK 8/18 (100x). C: Vimentina (100x).

**FOSFATASE ALCLINA**

**Resumo:**

**Objetivos:**

**Metodologia:**

**Resultados:**

**Conclusão:**



### 7. Padronização: manual ou automatizado


Protocolo Manual<sup>11</sup>

- Elevado número de passos aumenta a possibilidade de erro
- Método longo, exigente a nível de recursos humanos
- Qualidade de imunomarcação com menor probabilidade de ser constante

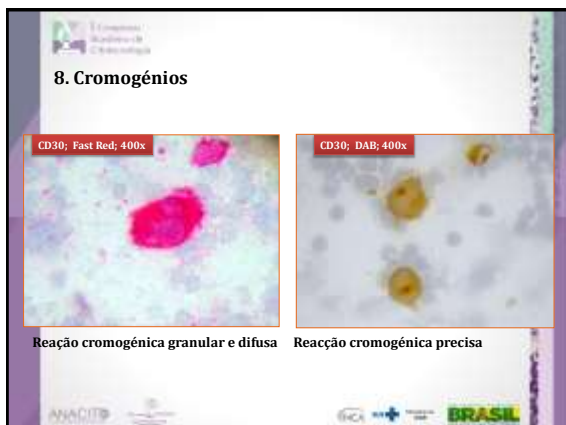
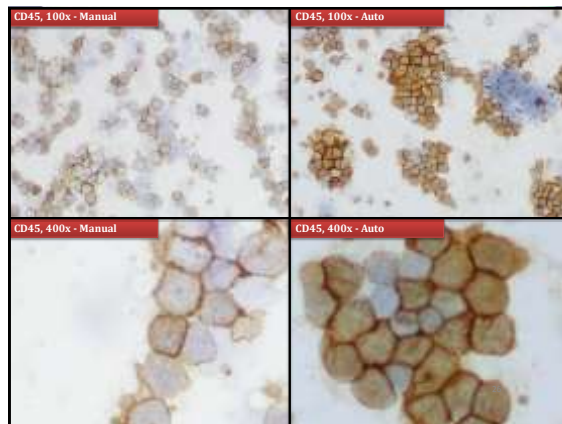
Automatização<sup>11</sup>

- Padronização de procedimentos
- Menor vulnerabilidade ao fator humano
- Menor tempo de resposta
- Qualidade de imunomarcação com maior probabilidade de ser constante

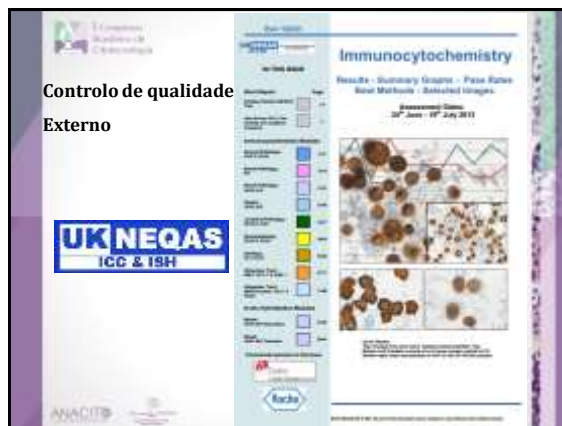
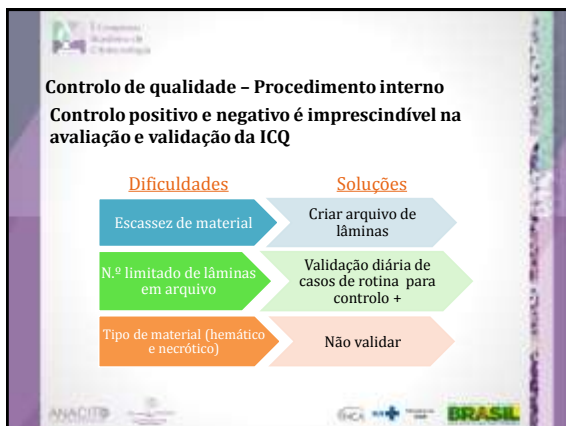
### 7. Padronização: manual ou automatizado



1. Preparação da amostra
2. Pós-fixação
3. Recuperação antigénica
4. Inibição da Peroxidase endógena
5. Colocação em soro primário
6. Colocação do soro secundário (polímero)
7. Colocação do polímero - HRP
8. Revelação com solução de DAB
9. Contraste com hematoxilina de Mayer/Gill
10. Desidratar, clarificar e montar



- ### 9. Controlo de qualidade
- #### Procedimento Interno (diário)
- Observação de todos os controlos e casos ao microscópio
  - Marcação específica, marcação inespecífica e fundo
  - Correlação com o perfil ICQ obtido em CB ou em Histologia para o mesmo caso
  - Maior dificuldade na interpretação dos resultados -> tipo de material; experiência dos observadores; trabalho de equipa
- #### Procedimento Externo (regular)
- UKNEQAS



### Controlo de qualidade - Externo

### Informação detalhada

#### The Cytology Module Run 102

**Test Results and Success Rate**

Test/Assessment	Test Method	Result Method
Antigen Assessment	Cytoscan	SLAT
These Results are Valid	Mixing of slides with cytoscan and cell line from lymphocyte antibodies	Mixing of slides with cytoscan and cell line from lymphocyte antibodies
Number of Registered Participants	76	
Number of Participants This Run	71 (92%)	

#### Cytology Run: 102

Detection	Cytokeratin (CK)		HER2	
	N	%	N	%
AS PER KIT	2	30	3	0
BioGenex HER2 (H1000)	1	100	1	100
BioGenex E6 Polymer (CD 30-0400)	1	100	1	100
Dako RealVista FLEX (K800010)	2	100	2	30
Dako RealVista FLEX+ (K800012)	8	100	7	88
Dako EnVision HER2/NEU (K1201)	0	0	1	0
Dako EnVision HER2/neu (K800007)	2	100	2	30
Dako REAL (K1000)	1	0	0	0
LeicaVision UltraVista LP HER2 (70-121-02)	1	100	1	100
Leica Bond Intense 9 Detection (30000)	0	0	1	100
Leica Bond Polymer Refine (30000)	19	75	19	84
NOT APPLICABLE	1	0	1	100
Other	2	30	2	100
Power Vision (P10000) HER2	1	0	1	100
Vector Elite ABC kit (PK-7300)	1	0	1	0
Ventana Fluor eXpress (760-00)	6	100	4	75
Ventana OptiView Kit (760-100)	4	75	4	100
Ventana UltraView Kit (760-000)	15	33	15	73

#### Cytology Run: 102

Automation	Cytokeratin (CK)		HER2	
	N	%	N	%
BioGenex Gene5t HER2	1	100	1	100
BioGenex OptiView	1	100	1	100
Dako Autostainer	1	100	0	0
Dako Autostainer Link 48	7	86	7	57
Dako Autostainer plus	2	100	2	100
Dako Autostainer Plus Link	3	100	4	75
LeicaVision Autostainer	1	100	1	100
Leica Bond Max	13	77	13	60
Leica Bond S	0	0	1	100
Leica Bond III	9	78	9	89
Meca (Manual)	3	33	3	33
Ventana Benchmark	4	50	3	67
Ventana Benchmark ULTRA	8	50	8	88
Ventana Benchmark ST	18	67	18	81

#### Cytology Run: 102

Chromogen	Cytokeratin (CK)		HER2	
	N	%	N	%
AS PER KIT	4	50	4	25
BioGenex DAB (D0400)	1	100	1	100
BioGenex Liquid DAB (BK101-00)	1	100	1	100
Dako SAB Liquid (D3400)	1	100	1	100
Dako EnVision Plus kit	0	0	1	100
Dako FLEX DAB	10	100	9	75
Dako REAL EnVision K107 DAB	0	0	1	0
Dako REAL K1000 Alkaline phosphatase 1	1	0	0	0
Leica Bond Polymer Refine kit (30000)	21	76	20	80
Other	5	60	6	83
Repro DAB (D4100)	1	100	1	0
Repro DAB (D400)	2	50	2	100
Ventana SAB	4	75	3	100
Ventana Intar	4	75	3	33
Ventana UltraView DAB	16	66	16	67

### Controlo de qualidade - Externo

### Informação detalhada

**BEST METHODS - Gold Standard Antibody**  
A selection from just a few of the best methods employed by participants

**Cytokeratin (CK) - Method 1**  
Participant used: 100 (AK 9630) Max and 100 (Bioss) slide using the method.

**Primary Antibody:** Dako AC15 (AE3) Dilution: 1:200

**Automation:** Leica Bond Max

**Reagent:** Leica Bond Polymer Refine kit

**Run Buffer:** Bond Power Buffer (B1000)

**MSB:** None

**MSM:** NOT APPLICABLE

**Developer:** Leica Bond Polymer Refine kit (30000)

**Dilution:** Leica Bond Polymer Refine (30000)

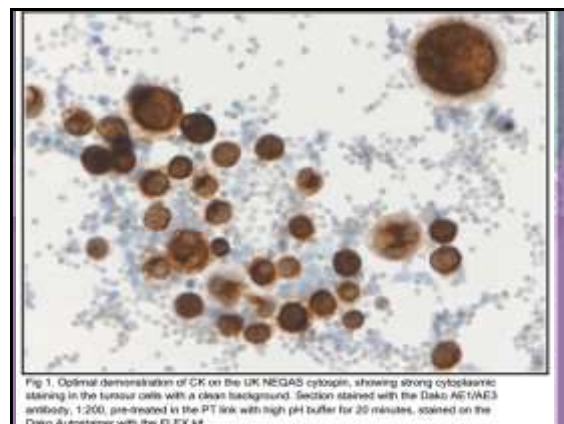


Fig 1. Optimal demonstration of CK on the UK NEGAS cytosin, showing strong cytoplasmic staining in the tumour cells with a clean background. Section stained with the Dako AC15/AE3 antibody, 1:200, pre-treated in the PT link with high pH buffer for 20 minutes, stained on the Dako Autostainer with the FLEX kit.

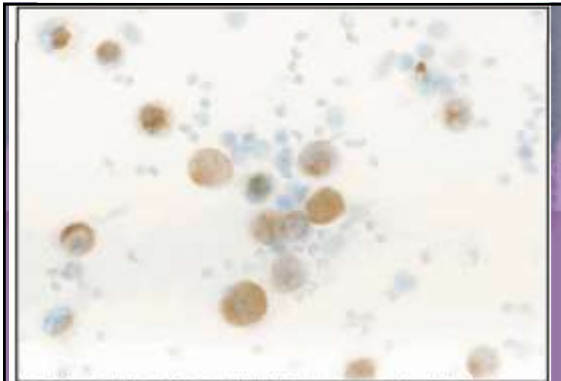


Fig 3. Sub-optimal staining of CK on the UK NEGAS cytospin (compare to figs 1&2). Although the expected cells are demonstrated, the staining is very weak. Section stained with the Dako MNF116 antibody, 1:500, on the Leica Bondmax, with CD1 antigen retrieval.

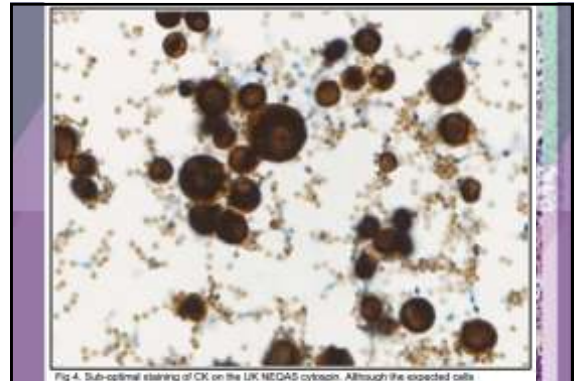


Fig 4. Sub-optimal staining of CK on the UK NEGAS cytospin. Although the expected cells have stained, there is also inappropriate, non-specific staining of the red blood cells due to insufficient endogenous peroxidase blocking. Section stained with the Dako MNF117 antibody, no pre-treatment on the Ventana Benchmark XT, and detection with the UltraView kit.

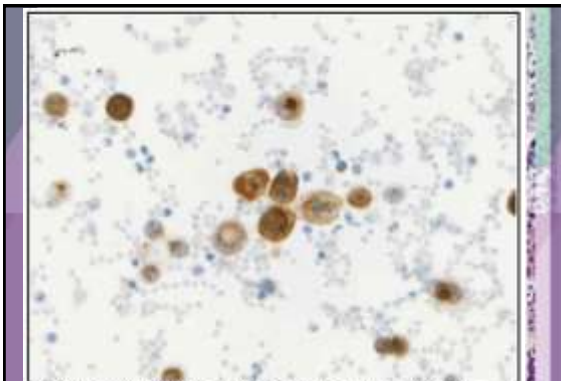


Fig 5. Poor demonstration of CK on the UK NEGAS cytospin. The staining is weak and patchy throughout the section. Stained with the CAM 5.2 antibody, 1:500, no pre-treatment on the Leica Bond II.

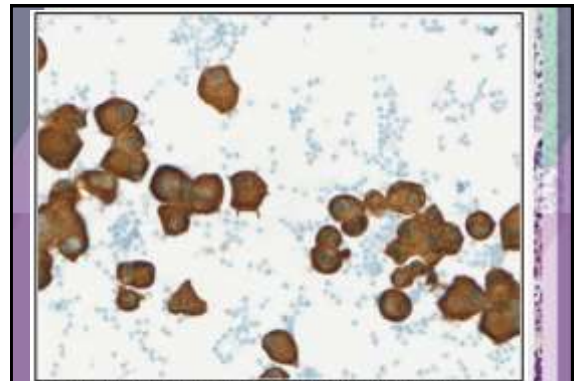


Fig 6. Excellent example of an in-house control for CK. The cytopin from an abdominal melanosis shows strong specific staining, with an optimal level of nuclear counter-stain and a clean background. Stained with the Dako MNF116 clone, 1:2000, on a Ventana Benchmark.

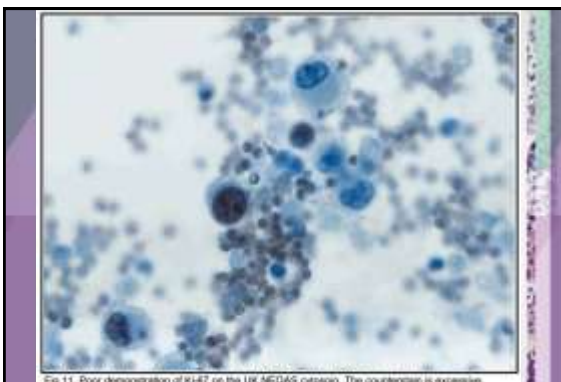


Fig 11. Poor demonstration of Ki-67 on the UK NEGAS cytospin. The counterstain is excessive, making it difficult to read the positive nuclear staining. Section stained with the Dako MS-1 antibody, 1:25, pre-treated in the water bath at 90°C for 60 minutes, and stained manually with the Vector Elite detection kit.

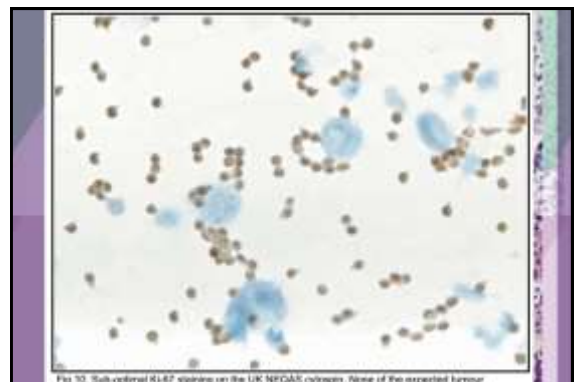
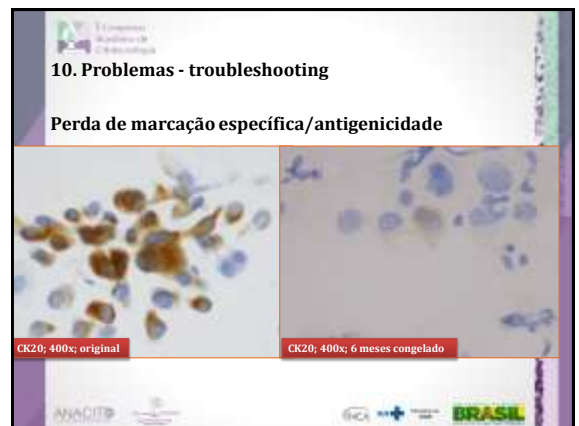
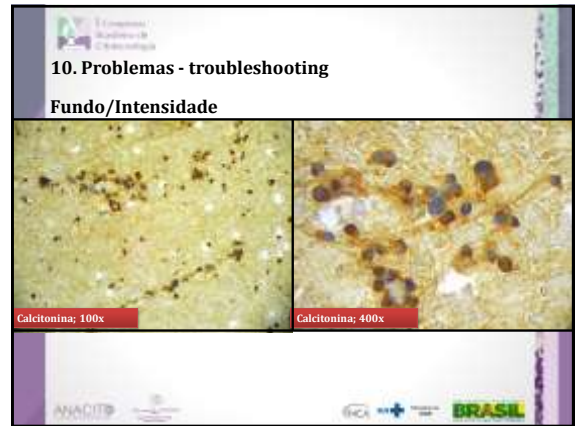
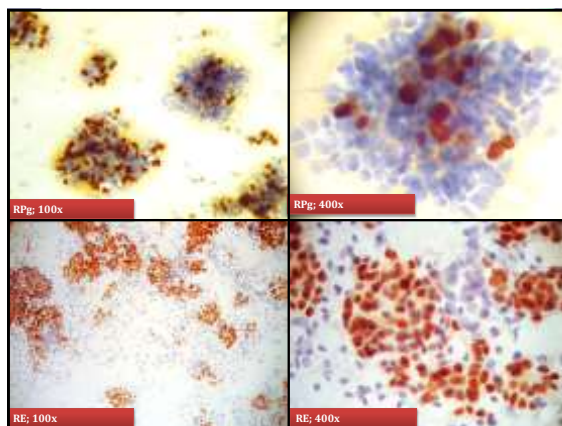
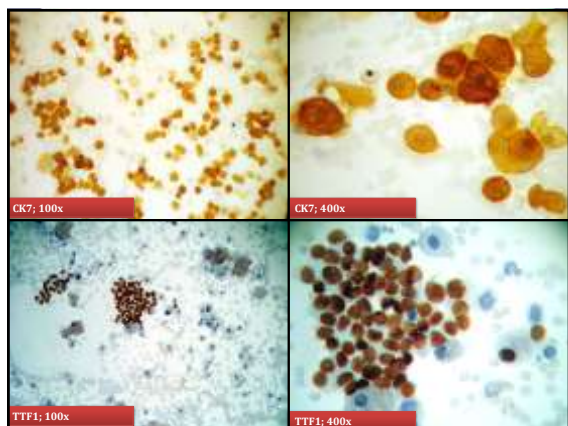


Fig 10. Sub-optimal Ki-67 staining on the UK NEGAS cytospin. None of the expected tumour cells are demonstrated, there is only non-specific, inappropriate staining of the red blood cells. Section stained with the Ventana 30-9 pre-diluted antibody, no pre-treatment on the Ventana XT with UltraView detection kit.





## Resumo

- Fixação
- Conservação
- Pós-Fixação
- Automatização
- Controlo de qualidade

## Agradecimentos:

- Prof. Rúben Roque
- Prof. Mário Matos
- Dr. José Ruivo

## Referências bibliográficas

1. Koss LG, Melamed MR, eds. *Koss' Diagnostic Cytology And its Histopathologic Bases 2 vol set. 5ª ed.* Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol.* 2011;22(4):215-229. doi:10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x.
3. Schmitt F, Cochard-Prielet B, Teetsch M, Davidson B, Bondi A, Vielh P. Immunocytochemistry in Europe: results of the European Federation of Cytology Societies (EFCs) inquiry. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol.* 2011;22(4):238-242. doi:10.1111/j.1365-2303.2011.00885.x.
4. Colasacco C, Mount S, Lehman G. Documentation of immunocytochemistry controls in the cytopathologic literature: a meta-analysis of 160 journal articles. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(4):245-250. doi:10.1002/dc.21370.
5. Gong Y, Sun X, Michael CW, Attal S, Williamson BA, Bedrosian CWM. Immunocytochemistry of serous effusion specimens: a comparison of ThinPrep vs cell block. *Diagn Cytopathol.* 2003;28(1):1-5. doi:10.1002/dc.10219.
6. Shi S-K, Shi Y, Taylor CK. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2011;59(1):13-32. doi:10.1369/jhc.2010.957191.
7. Fetsch PA, Simsir A, Brosky K, Abati A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 2002;26(1):61-66.
8. Kirbis IS, Maxwell P, Flezar MS, Miller K, Ibrahim M. External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol.* 2011;22(4):230-237. doi:10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x.
9. Dako. *Immunohistochemical staining methods. 5ª edição.* (Kumar G, Rudbeck L, eds.). Carpinteria: Dako; 2009.
10. Leong AS-Y, Suthipintawong C, Vinyuvat S. Immunostaining of Cytologic Preparations: A Review of Technical Problems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 1999;7(3).
11. Moreau A, Le Néel T, Joubert M, Truchaud A, Labosse C. Approach to automation in immunohistochemistry. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1998;278(2):177-184.
12. Suthipintawong C, Leong AS, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol.* 1996;15(2):167-174. doi:10.1002/(SICI)1097-0339(199608)15:2<167::AID-DC173.0.CO;2-4.
13. Torlakovic EE, Riddell R, Banerjee D, et al. Canadian Association of Pathologists—Association canadienne des pathologistes National Standards Committee/Immunohistochemistry Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(3):354-365. doi:10.1309/AJCPDY2XMF4HWK.

## Imunocitoquímica: o que há de novo

Amadeu Borges Ferro

amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

