

IMMUNOISTOCHIMICA

*TECNICA CHE USA GLI ANTICORPI PER LOCALIZZARE
GLI ANTIGENI NEI TESSUTI*

GLI SCOPI POSSONO ESSERE:

A) RICERCA

B) ATTIVITA' CLINICA

-DIAGNOSI

-PROGNOSI

-TERAPIA

ANTIGENI

ANTIGENE: ogni molecola che ha la capacità di generare una risposta anticorpale (proteine, carboidrati, ma anche gruppi post-traduzionali aggiunti alle proteine,.....)

DETERMINANTE ANTIGENICO o EPITOPE: ogni singola parte di una molecola che genera una risposta anticorpale

ANTIGENICITA': capacità di reagire con un anticorpo specifico

PERDITA DELL'ANTIGENICITA':

- AUTOLISI

- FISSAZIONE:
 - denaturazione delle proteine
 - perdita legami H (cambia stereochimica proteina)
 - perdita o rilocalizzazione degli epitopi

- INCLUSIONE: -alterazione degli epitopi per calore

ANTICORPI

Valutare il tipo di anticorpo e l'animale in cui è stato sviluppato:

-POLICLONALE

-MONOCLONALE

AFFINITA': la forza con cui un anticorpo si lega al suo specifico antigene.

$$\text{Costante di affinità } K = \frac{[Ab \ Ag]}{[Ab] [Ag]}$$

MARCATORI (label – reporter)

Per evidenziare la localizzazione degli antigeni che si sono legati all'anticorpo specifico è necessario un sistema di rilevazione colorato o fluorescente.

<u>COMPOSTI FLUORESCENTI:</u>	ECCITAZIONE	EMISSIONE
<i>Isotiocianato di fluoresceina</i>	<i>490 nm</i>	<i>525 nm</i>
<i>Isotiocianato di tetrametilrodamina</i>	<i>530 nm</i>	<i>580 nm</i>

-I preparati non sono permanenti, non possono essere disidratati.

COMPOSTI COLORATI:

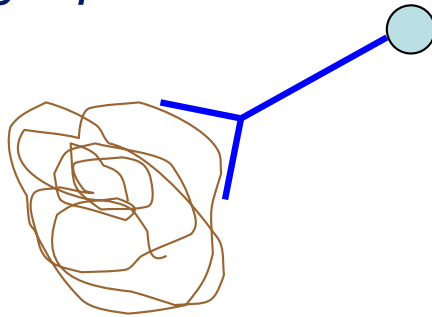
Perossidasi: glicoproteina di 40 Kd con un gruppo eme.

Forma precipitati insolubili di color bruno scuro in presenza di diaminobenzidina –DAB (cromogeno) ed H₂O₂.

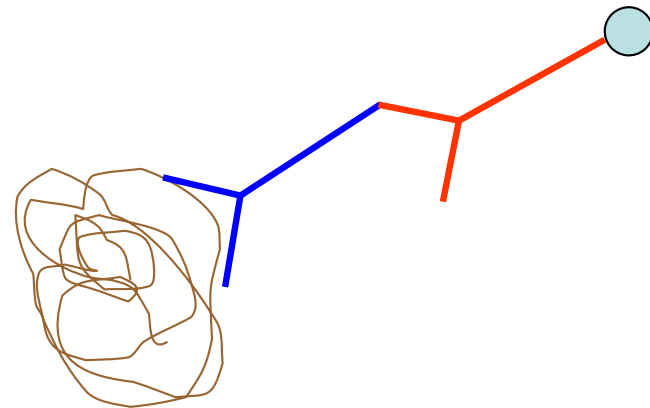
Fosfatasi alcalina: usa come substrato il naftolo e come cromogeno il fast red

METODI DI RICONOSCIMENTO IHC - 1

METODO DIRETTO: enzima tracciante legato all'Ig con legami covalenti-poco usato (ogni primario coniugato con enzima)

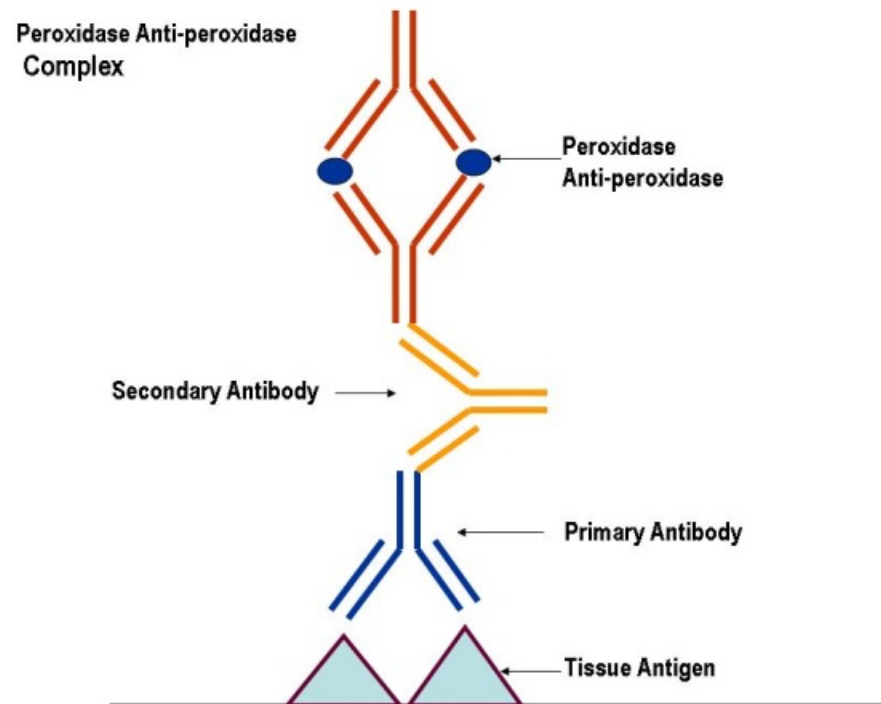


METODO INDIRETTO: impiego di 2 Ab da speci animali ≠. Primario specifico per l'antigene da ricercare, secondario coniugato con il tracciante enzimatico. L'Ab secondario è diretto contro le Ig dell'Ab primario.



METODI DI RICONOSCIMENTO IHC - 2

PAP – PEROSSIDASI ANTIPEROSSIDASI- metodo del ponte- traccianti sono o la perossidasi o la fosfatasi alcalina. Il complesso immune si ottiene attraverso la generazione di Ig anti-enzima nella stessa specie animale da cui originano gli Ab primari. Gli Ab -enzima sono fatti reagire in dosi adeguate con le molecole enzimatiche ottenendo un complesso immune nel quale vi sono 2 o 3 molecole di enzima racchiuse nei complessi Fab di 2 Ig.



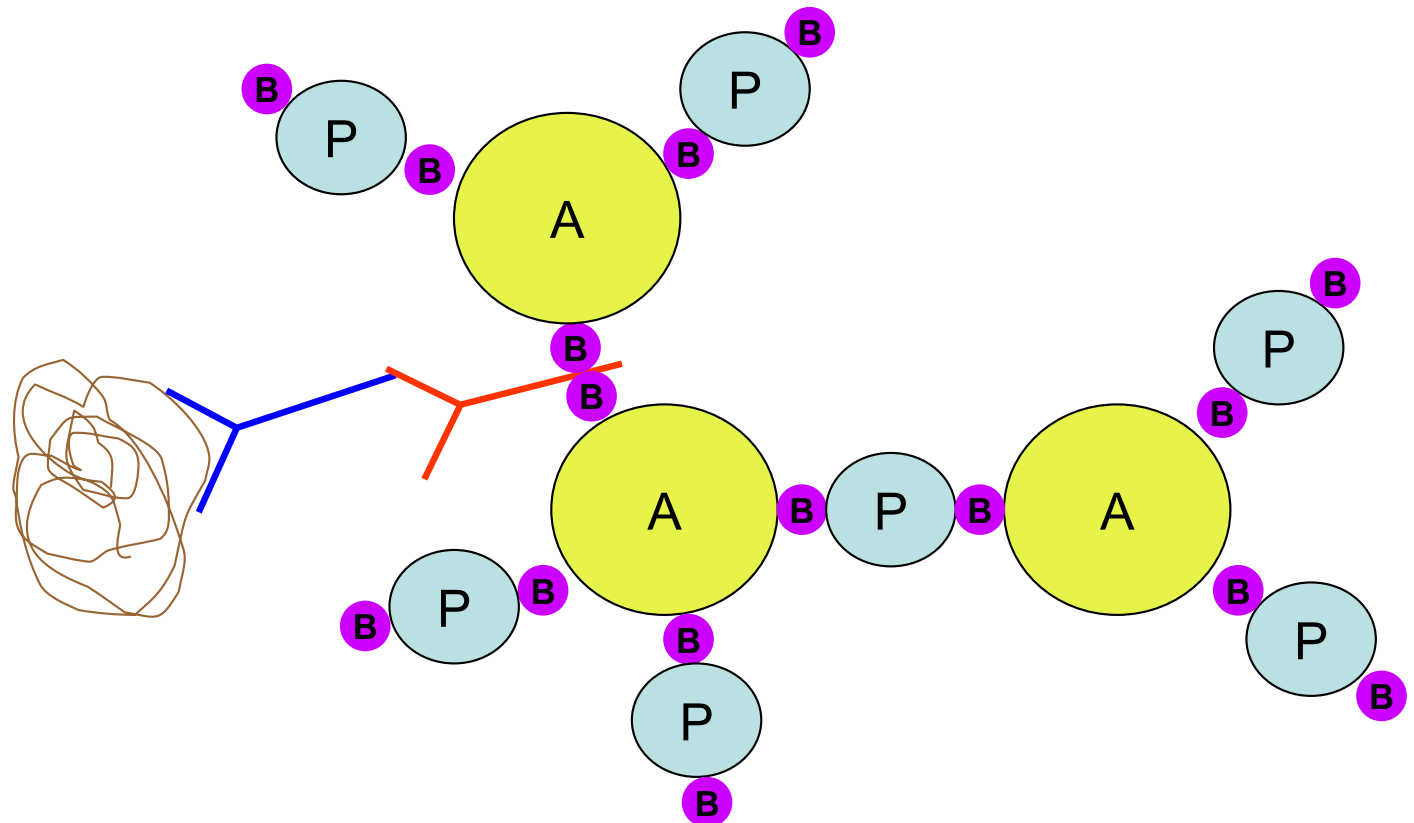
METODI DI RICONOSCIMENTO IHC - 3

ABC - AVIDINA – BIOTINA – PEROSSIDASI: Avidin-Biotin complex

Ab primario diretto contro l'antigene

Ab secondario coniugato con la biotina

La biotina si lega ad un complesso preformato costituito da un reticolo di avidina-biotina ed enzima

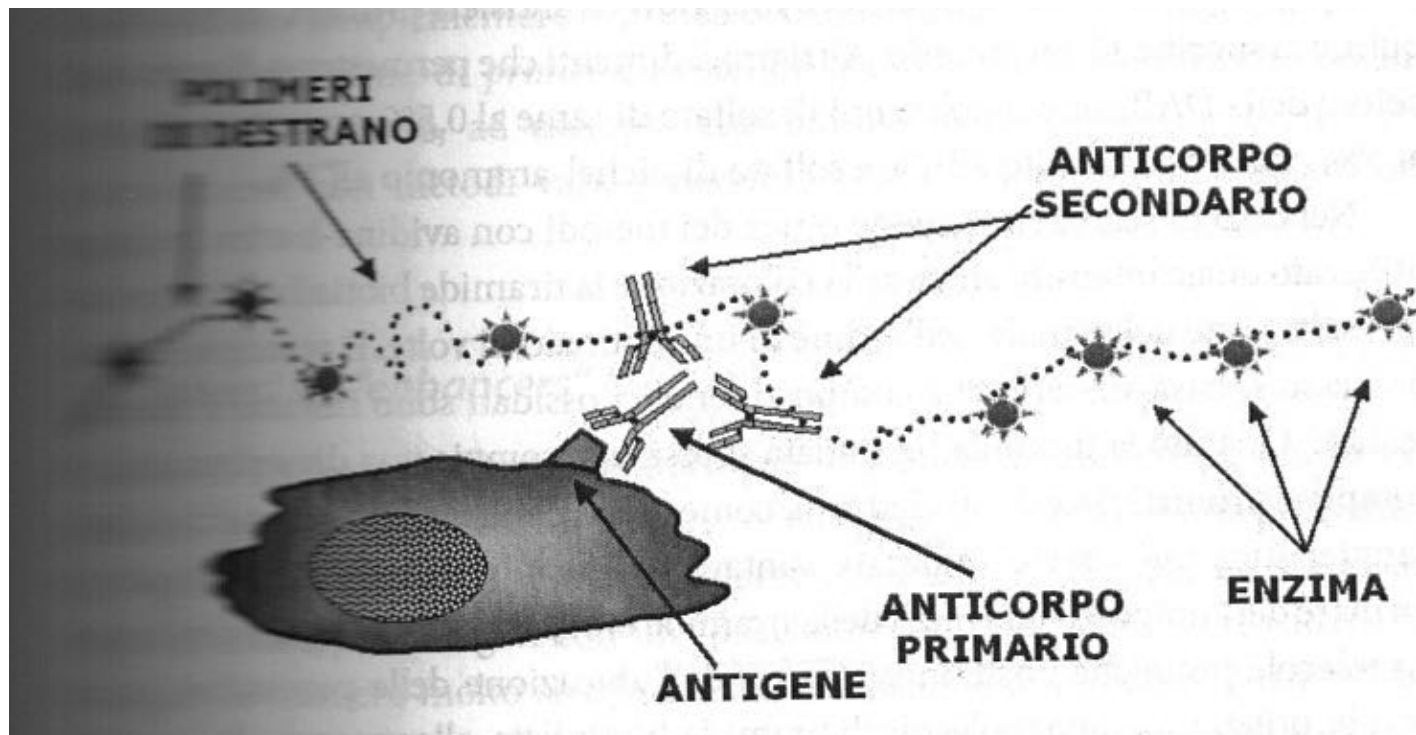


METODI DI RICONOSCIMENTO IHC - 4

EPTS-Enhanced polymer two steps

Ab primario diretto contro l'antigene

Ab secondario lega il polimero (destrano catena corta)



SENSIBILITA' ED EFFICIENZA

SENSIBILITA': la sensibilità di un sistema di rilevazione si riferisce alla minima concentrazione di antigene rilevabile e dipende:

- Natura dell'antigene:*** possibilità di determinanti antigenici multipli
- Accessibilità dell'antigene:*** es. necessità di tripsinizzare o usare il forno microonde
- Metodo di rilevazione:*** diretta, indiretta, PAP, ABC

EFFICIENZA DELL'ANTICORPO: minima quantità di anticorpo necessaria per rilevare l'antigene.

SPECIFICITA`

SPECIFICITA`: immunoreattività solo con l'antigene specifico

NON SPECIFICITA` IMMUNOLOGICA:

- Omologie di sequenza in proteine diverse
- Antigeni in parte simili (es. glicoproteine, gruppi fosforilati, solfatati, ecc...)
- Contaminazione con altri anticorpi (antigene usato per immunizzare non puro, autoanticorpi, anticorpi contro agenti infettanti)

NON SPECIFICITA` NON IMMUNOLOGICA:

- Legami aspecifici dell'anticorpo primario**
- Zone di necrosi, margini del tessuto, connettivo (proteine fibrose)**
- Attività perossidasi simile (eritrociti, neutrofili...)
- Biotina endogena (rene, pancreas, fegato)
- Legami aspecifici di perossidasi ed avidina (glicoproteine)

Fixation and tissue processing

Under-fixation with formalin

Over-fixation with formalin

Alcohol fixation

Mercury-based fixatives (B5, Zenkers)

Dehydration, non-polar solvents and paraffin embedding

Decalcification by 10% formic acid or 5% nitric acid

Reduced immunostaining in central areas of sections

Non-specific binding of antibodies by free-aldehyde group

Most of CD and some growth factor peptides are poorly reactive

CD4, CD5, CD10, CD23, (CD30) loose immunoreactivity

Possible change on the conformation of some antigens

Decreased antigenicity on many antigens, particularly CD markers

Protease (PIER) and heat-induced epitope retrieval (HIER)

PIER at incorrect pH and/or temperature

PIER with strong enzymatic digestion

HIER at pH 3.0–6.0

HIER on biotin-rich tissues (e.g. mitochondrion-rich cells)

HIER by zinc sulphate, citrate (pH 6) and TRIS (pH 9) buffer solutions

Antigens not retrieved (masked)

Potential destruction of antigens

Decrease in staining of Ki67 (Mib1) and ER

Unmasking of endogenous biotin

Non-specific staining of nuclear proteins

Endogenous enzymes (peroxidase)

Absence of endogenous enzyme inhibition

Strong endogenous enzyme inhibition

Non-specific background staining

Destruction of some antigens (i.e. CD4)

Avidin–biotin system

High ionic attraction of avidin

Binding of avidin to endogenous biotin

Non-immune binding to nucleic acids, phospholipids and glycosamin

Strong background and false positive staining of liver, lung, spleen, tissue, mammary gland, kidney, brain, gestational and post-partum endometrial cells, myelin and mast cells

Primary antibody

Improper reaction buffer

Hydrophobicity, polymerisation and aggregation of immunoglobulins

Interaction with protein polar groups in tissue sections

Protein–antibody complement-mediated binding

Attraction of the Fc fragment to basic groups of collagen fibres

Binding of immunoglobulins to the cellular Fc receptors^{19 108}

High concentrations of antibodies

Bacterial contamination of antibodies

Background staining or absence of antigen binding

High background staining

High background staining

High background staining

Non-specific staining

Non-specific staining

Background staining or absence of antigen binding (prozone phenon

Antibody agglutination

Detection system

Incorrect pH of the reaction buffer

Ionic charges of the polymers

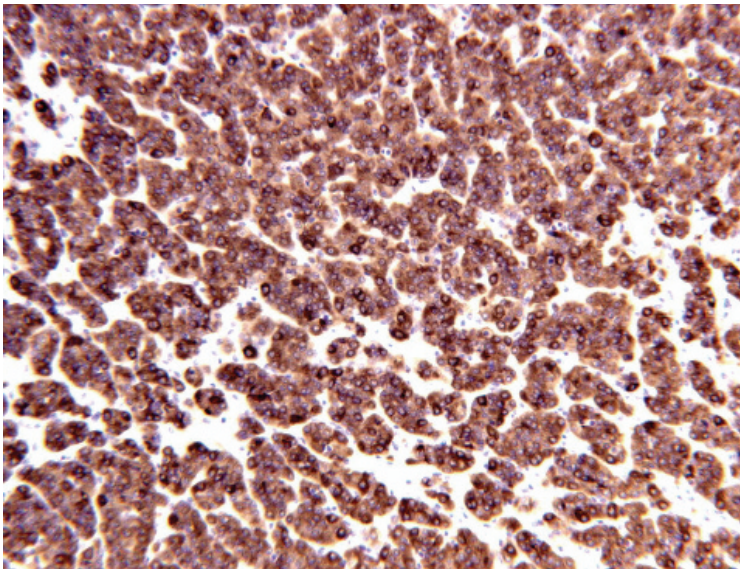
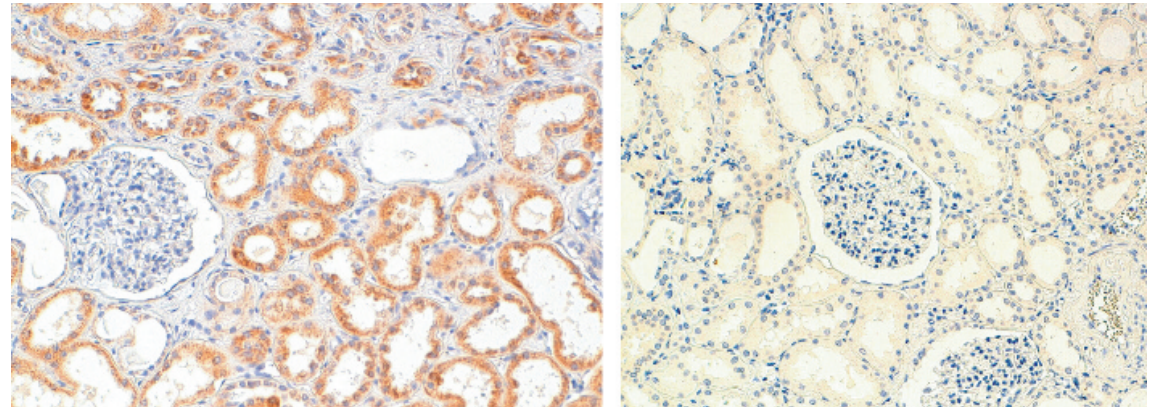
Spontaneous agglutinations of the antisera

Absence of staining

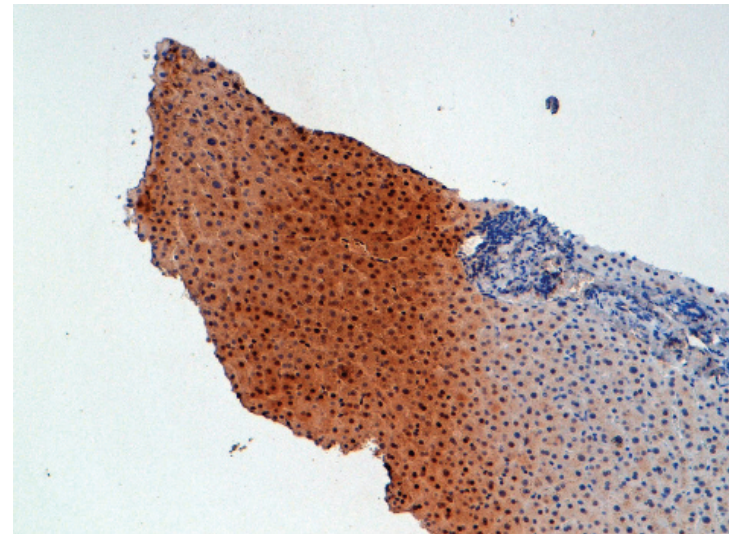
Background staining

Absence of staining

Renal tubules, rich in endogenous biotin, bind avidin, which results in a strong cytoplasmic staining (A). A blocking procedure prevents such spurious staining (B).



Renal oncocytoma. Neoplastic cells are rich in mitochondria. Endogenous biotin (the coenzyme of oxidative enzymes) is retrieved following the HIER procedure, thus causing spurious staining when using avidin-based immunohistochemical methods.



The free edge of histological sections can show non-specific uptake of immunohistochemical staining reagents.

J Clin Pathol 2008;61:1184–1192.
doi:10.1136/jcp.2007.047720

TECNICA IMMUNOISTOCHIMICA

- TAGLIO DELLE SEZIONI*
- ADESIONE DELLE SEZIONI SUL VETRINO***
- DEPARAFFINIZZAZIONE*
- IDRATAZIONE*
- PROCEDURE PER AUMENTARE L'ESPOSIZIONE DELL'ANTIGENE***
- BLOCCO DELLE REAZIONI E COLORAZIONI NON SPECIFICHE***
- INCUBAZIONE CON L'ANTICORPO PRIMARIO***
- INCUBAZIONE CON L'ANTICORPO SECONDARIO***
- COMPLESSO AVIDINA – BIOTINA – PEROSSIDASI***
- REAZIONE CROMOGENA***
- CONTROCOLORAZIONE***
- DISIDRATAZIONE*
- DIAFANIZZAZIONE*
- MONTAGGIO*

ADESIONE DELLE SEZIONI ISTOLOGICHE AL VETRINO PORTA-OGGETTI

- SGRASSATURA DEI VETRINI:** *i vetrini vengono immersi in alcool – acetone 1:1 e poi lasciati asciugare all'aria.*
- POLI-L-LISINA (ad alto peso molecolare):** *si immergono i vetrini in una soluzione al 0,01% per 5 min, lavati in acqua e lasciati asciugare.*
- ALBUMINA:** *un bianco d'uovo + 1ml di NH_4OH concentrato in 500 ml di acqua, per 10 min con agitatore > filtrazione*
 - vetrini immersi per 1 min*
 - asciugati a 60°C ON*
- SILICONIZZAZIONE:** *immergere i vetrini in una soluzione al 2% di 3-amino-propoil-silano in acetone*
 - risciacquare 2 volte in acetone*
 - risciacquare 2 volte in acqua*
- TAGLIO DELLE SEZIONI ED ADESIONE SUL VETRINO:** *le sezioni deposte sui vetrini portaoggetti devono rimanere in una stufa per 30 – 60 min a 56-60°C, oppure a temperature più basse per tempi più lunghi.*

DEPARAFFINIZZAZIONE - IDRATAZIONE

DEPARAFFINIZZAZIONE:

- 3 – 4 volte in xilene per 4 min*
- 1 volta in alcool assoluto*

BLOCCO DELLA PEROSSIDASI ENDOGENA(facoltativo):

- 0.5% di H₂O₂ in metanolo per 30 min*

IDRATAZIONE:

- 2 volte alcool assoluto per 4 min*
- 2 volte alcool 95% per 4 min*
- 2 volte acqua per 4 min*
- 1 volta tampone per 10 min*

RIRISTINO ANTIGENICITA`

- L'estensione dello smascheramento antigenico indotto dalla formalina è direttamente proporzionale alla durata della fissazione dei camponi.*
- La modificazione stereochimica dell'antigene dovuta a fenomeni di reticolazione della formalina fa sì che il sito antigenico sia presente nella sua struttura primaria, ma nascosto.*

AUMENTO DELL'ESPOSIZIONE DELL'ANTIGENE 1

TRIPSINIZZAZIONE:

*-Trypsina 0.1% in Tris-HCl pH 7.8 con 0.15 CaCl₂ per 15 min
(fino a 2 ore)*

DIGESTIONE CON DNAsi:

-DNAsi I 5 mg/ml in Tris-HCl pH 7.4 con MgSO₄ 0.01M per 15-30 min.

Dopo la digestione con enzimi i vetrini vanno risciacquati estensivamente in tampone

AUMENTO DELL'ESPOSIZIONE DELL'ANTIGENE 2

TECNOLOGIA DELLE MICROONDE: si sono usati i forni a microonde inizialmente in istologia per accelerare la diffusione dei reagenti nei tessuti. Si è potuto così vedere che non si provocano evidenti alterazioni morfologiche. L'energia dei forni microonde non è sufficiente infatti a rompere i legami covalenti ed i ponti idrogeno.

Il riscaldamento dovuto alle microonde è legato all'eccitazione di molecole polari o cariche. Sostanze non polari come la maggior parte delle plastiche e la paraffina non sono influenzate dalle microonde.

L'utilizzazione del microonde in immunoistochimica è iniziata nel 1991 con un lavoro di Shi che ha messo in evidenza la possibilità di evidenziare meglio gli antigeni (**ANTIGEN RETRIVAL - AR**):

- Si immergono i vetrini in tampone citrato 10mM.
- La procedura può essere consigliata dal produttore nel caso di anticorpi per la diagnostica (monoclonali).
- Una tecnica consigliata è quella di ripetere la procedura più volte a pH diversi (pH 1.0, pH 6.0, pH 10.0) a 90-100°C per 5-10 min.

BLOCCO DELLE REAZIONI E COLORAZIONI NON SPECIFICHE

-LE SEZIONI NON DEVONO MAI ESSERE LASCIATE ASCIUGARE: *uso della camera umida*

-BLOCCO DEI LEGAMI ASPECIFICI DELLE IMMUNOGLOBULINE:

-10 min BSA 1% in PBS (si può aumentare fino al 5%)

-10 min con siero dello stesso tipo dell'anticorpo secondario

-10 min con immunoglobuline purificate dello stesso tipo di animale dell'anticorpo secondario

La incubazione con BSA 1% va sempre eseguita prima dell'anticorpo primario ed alla fine viene eliminato l'eccesso, ma non si risciacqua il vetrino.

-BLOCCO DEI LEGAMI ASPECIFICI DELLE GLICOPROTEINE (facoltativo): *per esempio la perossidasi può colorare debolmente i nuclei.*

-Incubazione con una soluzione al 5% di latte in polvere completamente sgrassato per 10 min (BLOTTO).

-ELIMINAZIONE DEI LEGAMI NON SPECIFICI CON I LAVAGGI:

-Ad ogni lavaggio possono essere aggiunti al tampone 0.1% di detergenti (Triton X-100 o Tween 20) oppure NaCl 0.5M.

-BLOCCO DEI GRUPPI ALDEIDICI DEI FISSATIVI:

- Sodio boro-idruro 0.1 mg/ml per 10 min.

INCUBAZIONE ANTICORPO PRIMARIO

- Scegliere la diluizione dell'anticorpo primario, già riportata se si tratta di un anticorpo per la diagnostica, se no diluzioni es. 1:50, 1:100, 1:500 (policlonale)*
- L' anticorpo va diluito in tampone con 0.1% di BSA*
- L'incubazione può essere eseguita a r.t. in camera umida per 30-60 min, oppure a 4°C con anticorpo più diluito o.n.*

LAVAGGIO

- 10 min in tampone (con eventualmente 0,1% di detergente)*

INCUBAZIONE ANTICORPO SECONDARIO BIOTINILATO

- 30 min r.t. diluito secondo le istruzioni del produttore in tampone con 0.1% BSA*

LAVAGGIO

- 10 min in tampone (con eventualmente 0,1% di detergente)*

COMPLESSO AVIDINA-BIOTINA-PEROSSIDASI

-Mescolare in parti uguali, secondo le istruzioni del produttore, parti uguali di soluzione contenente avidina e di quella con la perossidasi biotinilata almeno 30 min prima dell'uso.

-Incubare per 60 min

LAVAGGIO

-10 min in tampone

REAZIONE CROMOGENA

-Diluire 30X in PB la sol. stock di DAB (5mg/ml), conservata a -20°C

-Aggiungere 2 gtt di H₂O₂ (100µl) al 30% per 100 ml di soluzione DAB

-Sviluppare per 5-15 min

-Lavare per 5min in acqua corrente

-Acqua distillata

CONTROCOLORAZIONE

- Ematossilina di Mayer per 3 min (tempi ridotti o ematossilina diluita per positività nucleari)*
- Acqua corrente per 5 min*

DISIDRATAZIONE

- Alcool 95% 1X per 4 min*
- Alcool 100% 2X per 4 min*

DIAFANIZZAZIONE

- Xilene 2X per 4 min*

MONTAGGIO

CONTROLLI

DIAGNOSTICA

- Controlli positivi*
- Controlli interni*

RICERCA

- Controlli negativi*
- Controllo logico*

Test del pre-assorbimento

Uso:

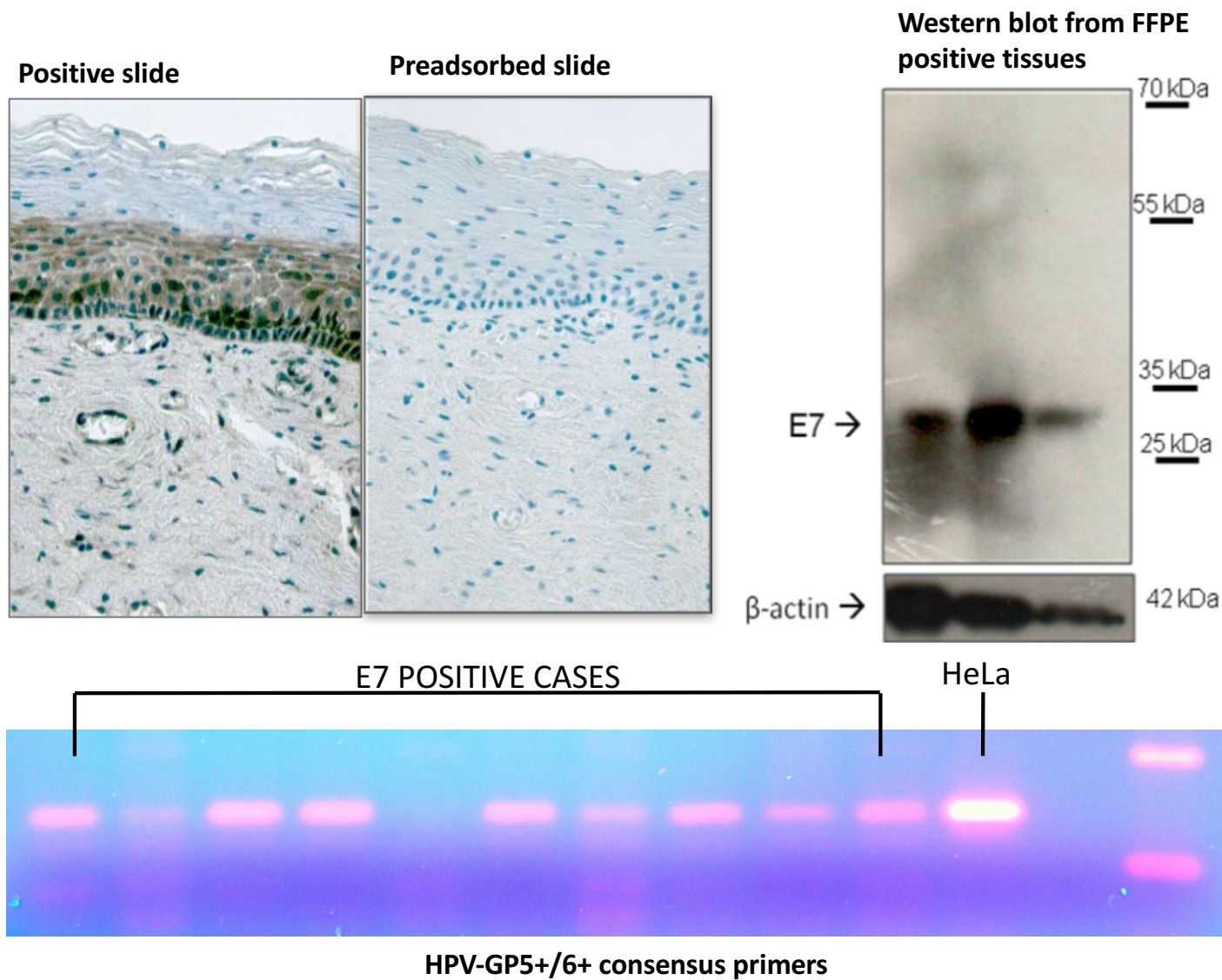
-per saggiare la specificità dell'anticorpo

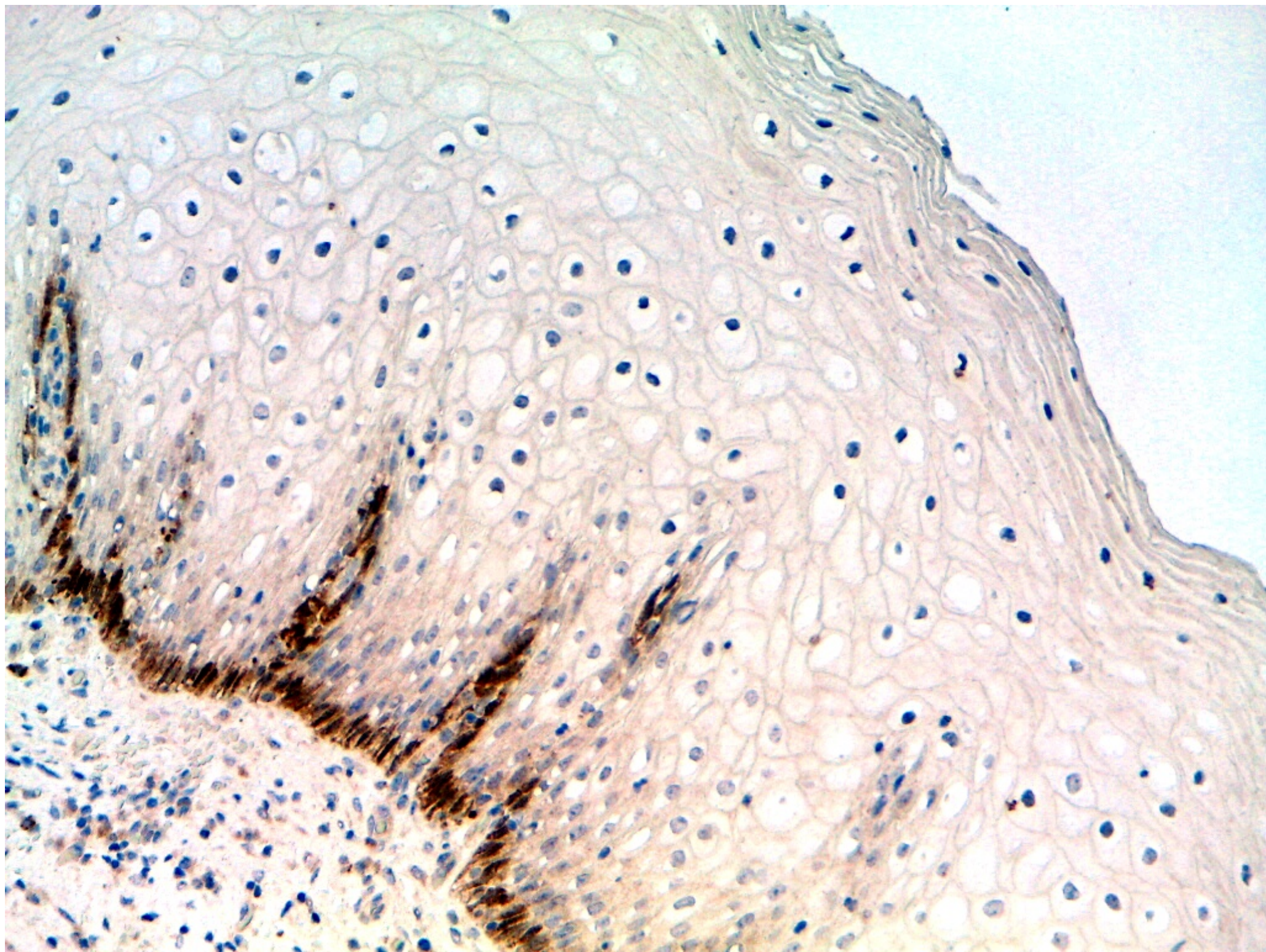
Come si fa:

Si blocca l'Ab utilizzando il peptide usato per la sua generazione.

In soluzione si incuba l'Ab primario con il suo antigene specifico prima di effettuare l'incubazione del reagente sul preparato da immunocolorare.

MAb against HPV E7 protein





Altri controlli

Omissione dell'Ab primario

Si incuba con la soluzione di diluizione o PB senza Ab.

Consente di valutare il background dato dal sistema di rilevazione.

Meglio sostituire l'Ab primario con siero non immune della stessa specie e isotipo dell'Ab primario.