

FASI DELL'IMMUNOISTOCHEMICA

Sparaffinatura (xylolo) e reidratazione
(serie decrescente di alcoli)

Inibizione degli enzimi endogeni

Smascheramento antigenico

Saturazione dei siti
di legame aspecifici

Ab primario

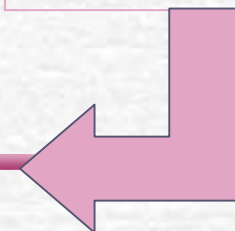
Ab secondario

Complesso rivelatore

Substrato cromogeno

Colorazione di contrasto

Disidratazione (serie
crescente di alcoli) e
montaggio



INIBIZIONE DEGLI ENZIMI ENDOGENI

Perossidasi endogena:

- Localizzata principalmente nei leucociti e negli eritrociti (presente anche in fegato, milza, utero, gh.lacrimali, mucosa intestinale, polmone)

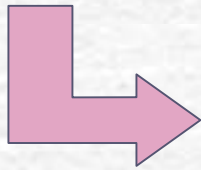
Metodi di inibizione della perossidasi endogena:

- perossido di idrogeno 3%
- metanolo e perossido di idrogeno (0.3%)

Metodi di inibizione della PA endogena:

- Levamisolo (**NON** inibisce la PA placentale e intestinale...bisogna usare acido acetico 1% anche se può distruggere alcuni Ags)

...perossido di idrogeno 3%...

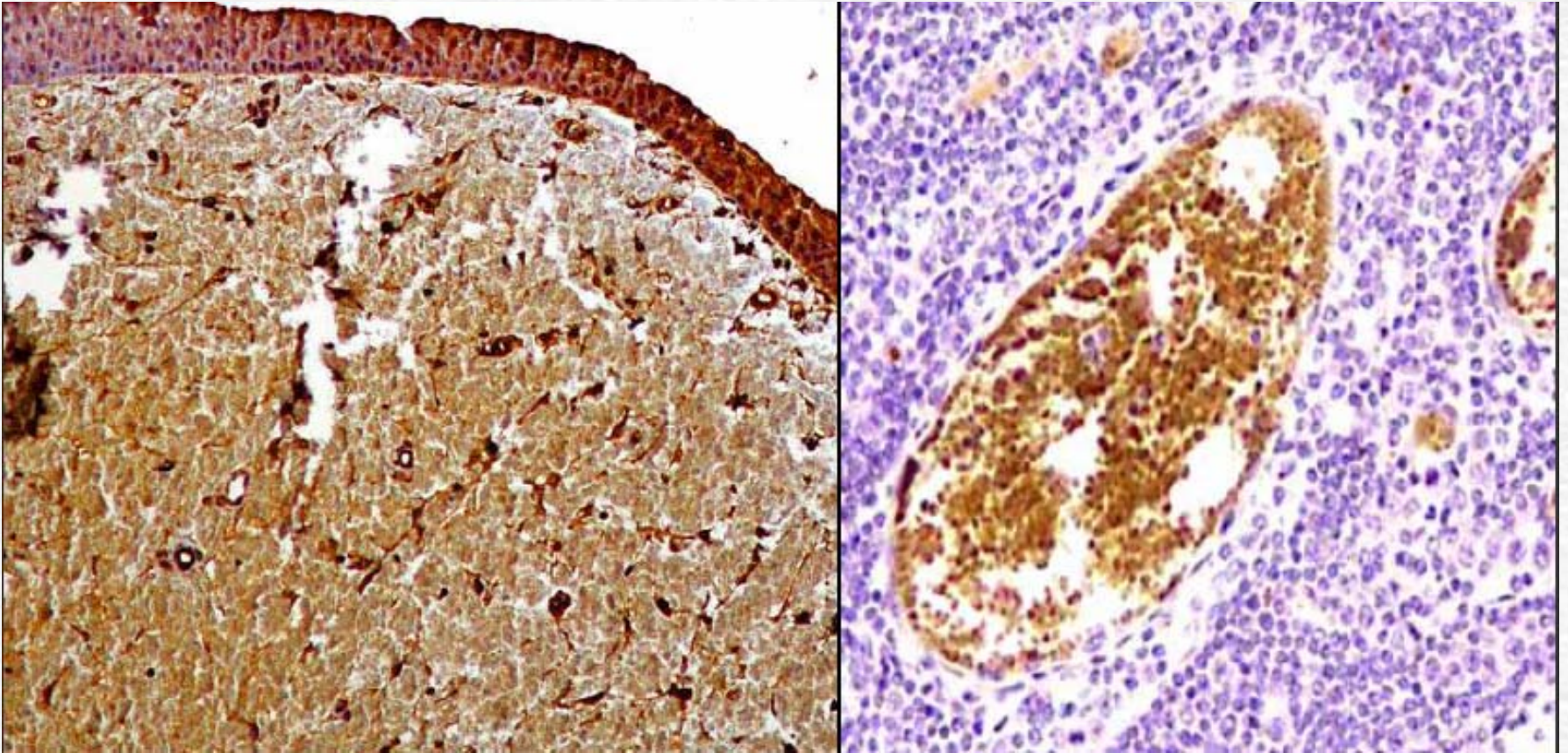


Eccesso di substrato pari a 100 vv. rispetto
alla quantità richiesta per la reazione

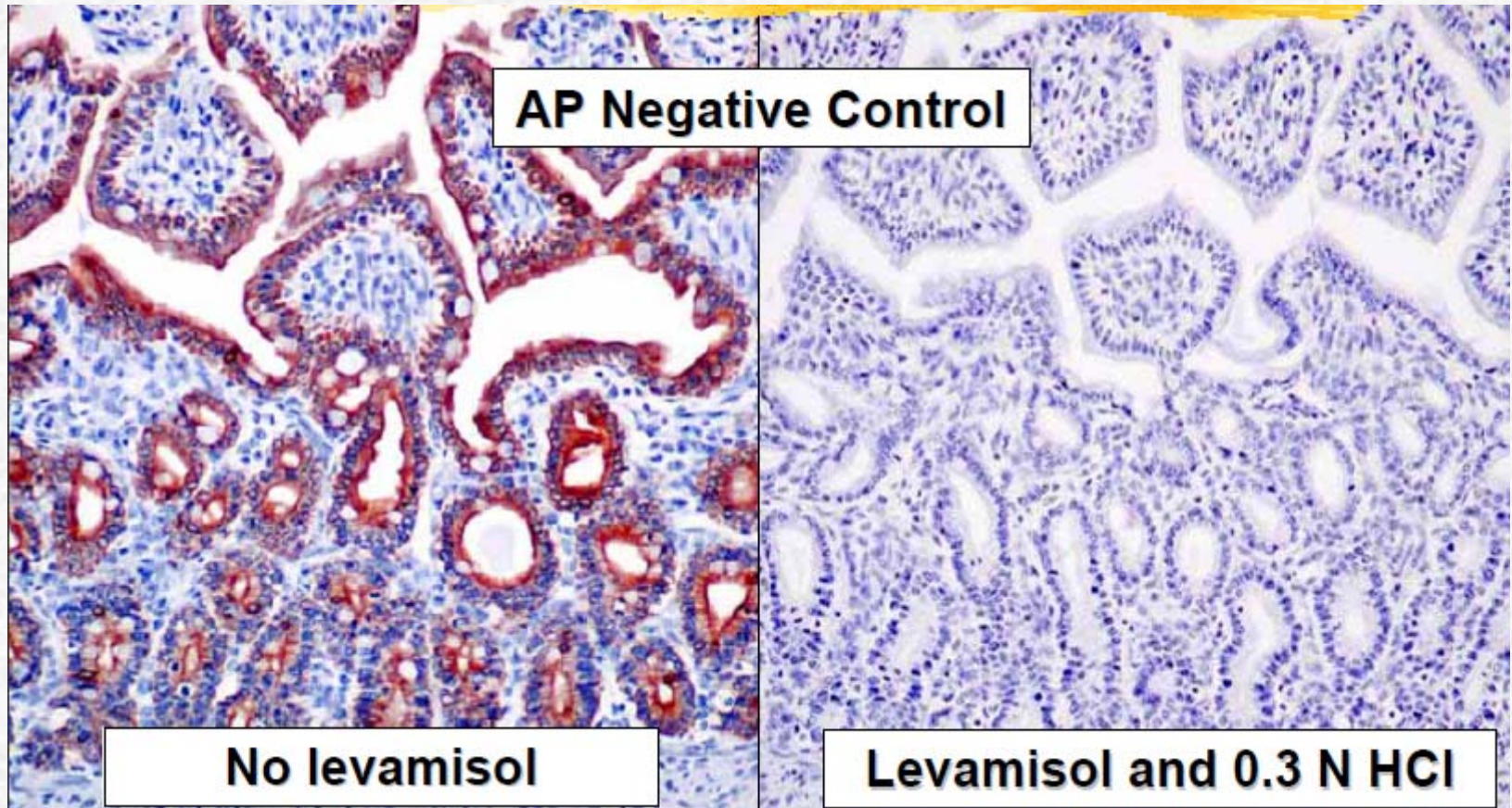


**Inibizione enzimatica
da substrato**

PEROSSIDASI ENDOGENA



FOSFATASI ALCALINA ENDOGENA



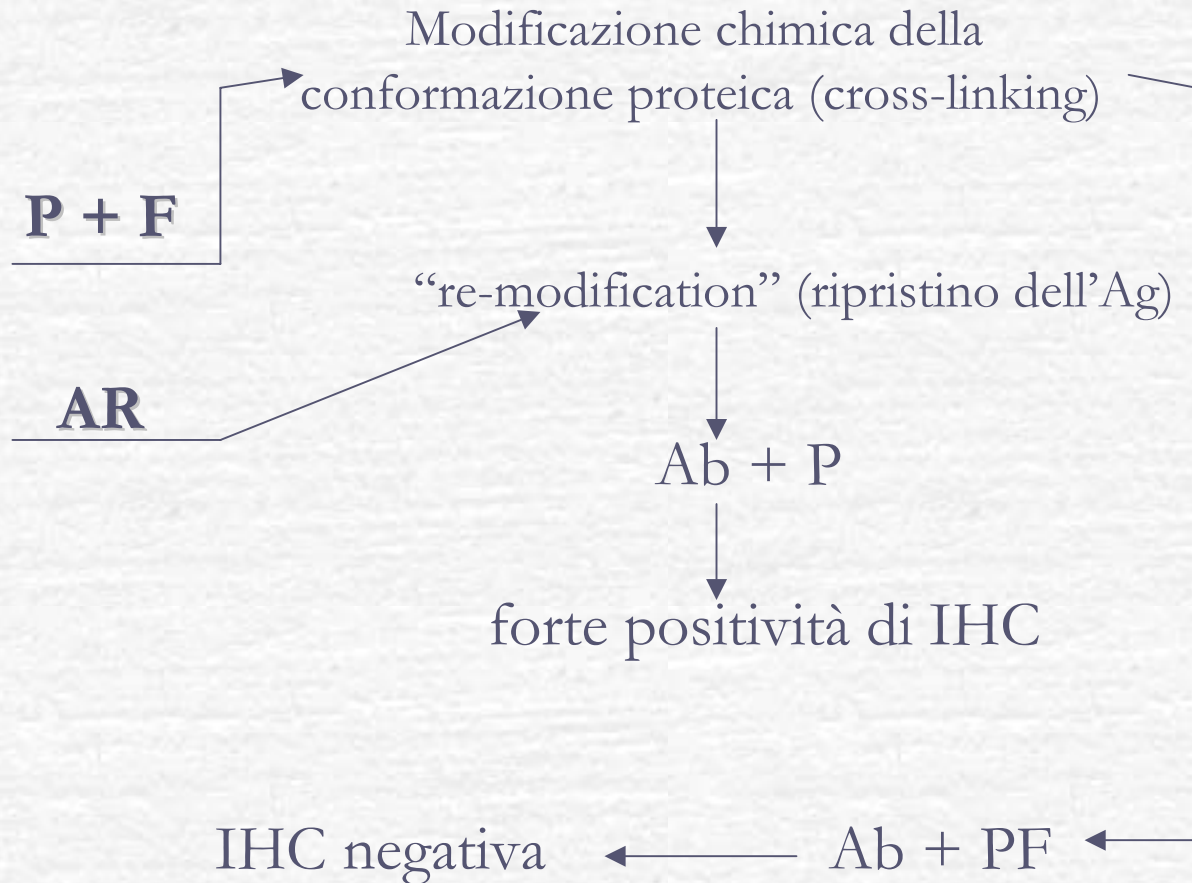
SMASCHERAMENTO ANTIGENICO *(antigen retrieval)*

Eccessiva stabilizzazione
del tessuto in reattivi aldeidici

Mascheramento
dei determinanti
antigenici

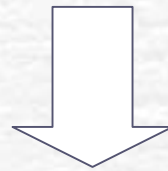
- ☛ **Trattamento proteolitico**
- ☛ **Trattamento termico**

“Modification and re-modification theory”



- P: proteina
- F: formalina
- IHC: immunoistochimica
- AR: smascheramento
- PF: proteina modificata

Struttura secondaria della proteina “bloccata”
dal processo di fissazione



Se la struttura primaria è intatta, è possibile ripristinare
la sua conformazione tridimensionale originale
attraverso un opportuno sistema di
smascheramento

Uso di enzimi proteolitici

- Tipi di enzimi: tripsina, pronase
- Azione: digestione dei legami aldeidici
- a T° di 37°C
- Conseguenze dell'uso improprio:
 - distacco facile delle sezioni dai vetrini
 - tempo di incubazione eccessivamente lungo: danno alla morfologia tissutale
- Svantaggi:
 - Basso numero di Ags per cui rappresenta il metodo di smascheramento ottimale
 - Possibile alterazione della morfologia tissutale
 - Possibile distruzione degli epitopi

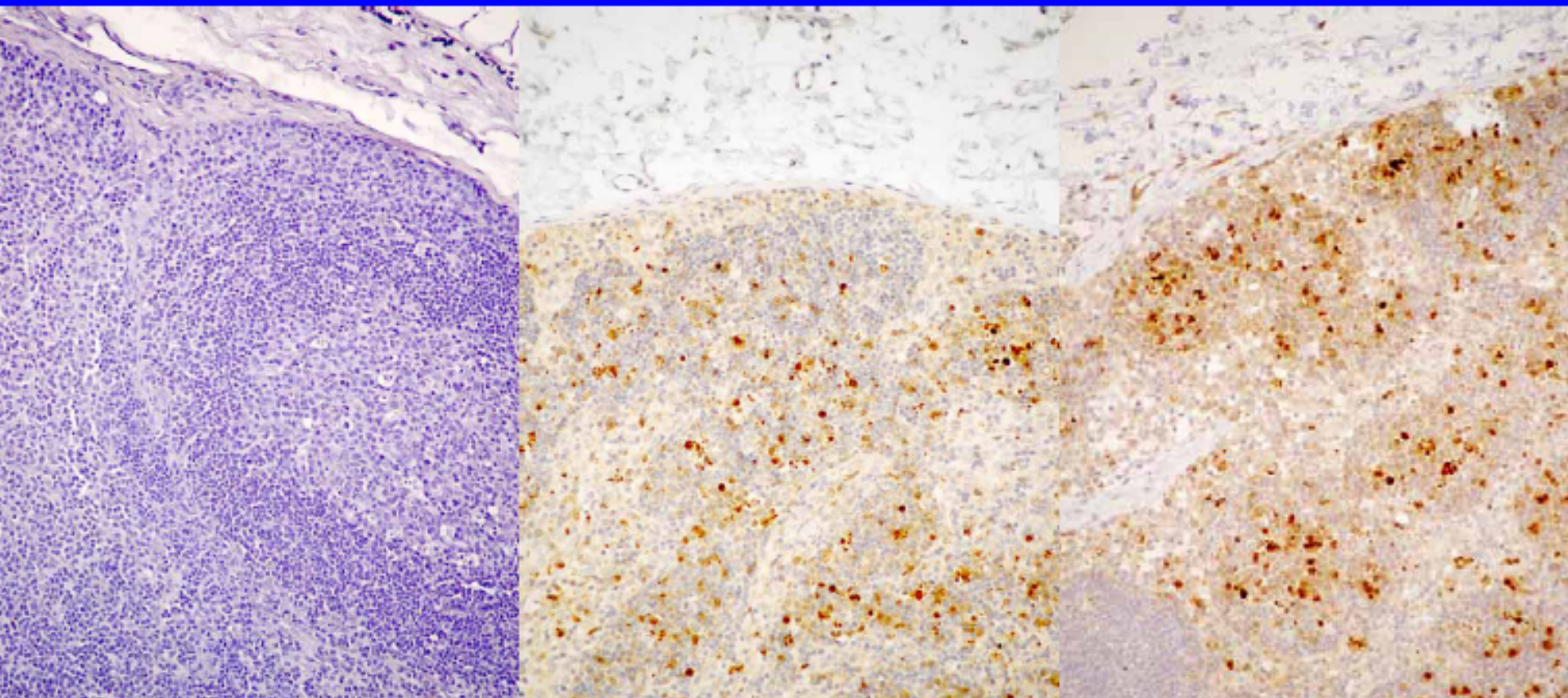
Heat Retrieval and Protein Digestion

Lysozyme staining in the lymph node

no retrieval

proteinase K

trypsin



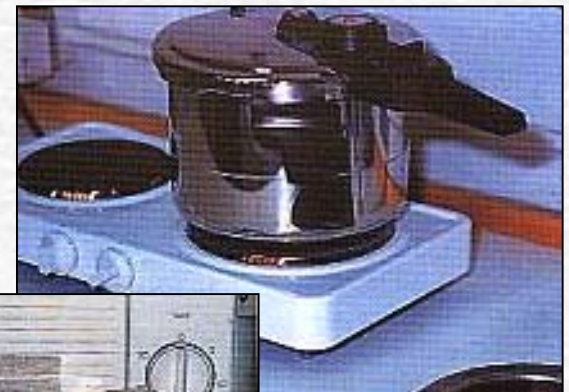
Uso di alte temperature

Meccanismo di azione proposto:

- Rottura ponti metilenici
- Precipitazione o chelazione degli ioni Calcio legati ai tessuti e dei cationi metallici divalenti

Metodi:

- Pentola a pressione
- Forno a microonde
- Autoclave



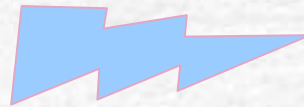
Complessi Ca-proteine tissutali



Mascheramento



*Alte temperature,
agenti chelanti (citrato)*



Legami crociati
formalino-indotti

■ Svantaggio:

- Componenti tissutali non fissate adeguatamente: denaturazione
- struttura antigenica resistente alla formalina (no modificazioni alla fissazione): alterazioni da calore

Correlazione inversa tra tempo e temperatura!!!!
Ottimale: 100°C!!!!

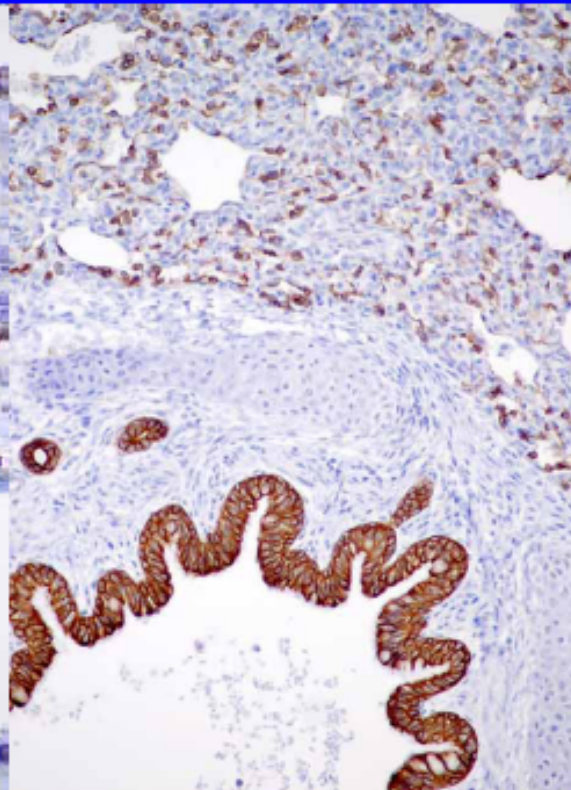
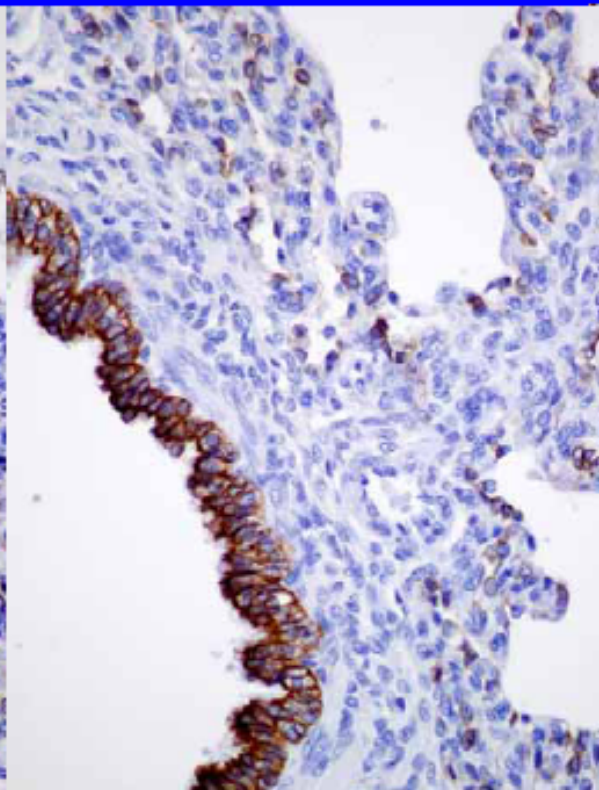
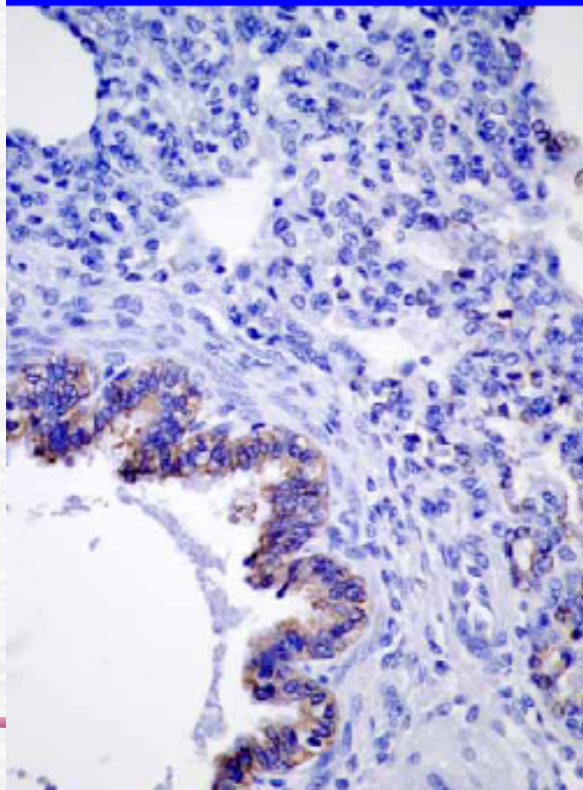
Influence of Temperature on Antigen Retrieval

Cytokeratin AE1/AE3 staining in the lung

no heat

heat

heat



RETRIEVAL SOLUTION pH

- ✓ alcuni Abs mostrano un buon segnale indipendentemente dal pH
- ✓ Alcuni Abs mostrano un segnale ridotto a pH neutro e > a pH acido o alcalino
- ✓ Basso pH +++ utile per antigeni nucleari

Esempi:

- Buffer acetato pH 1-2
- Buffer citrato pH 6-7
- Buffer Tris-HCl pH 8-9

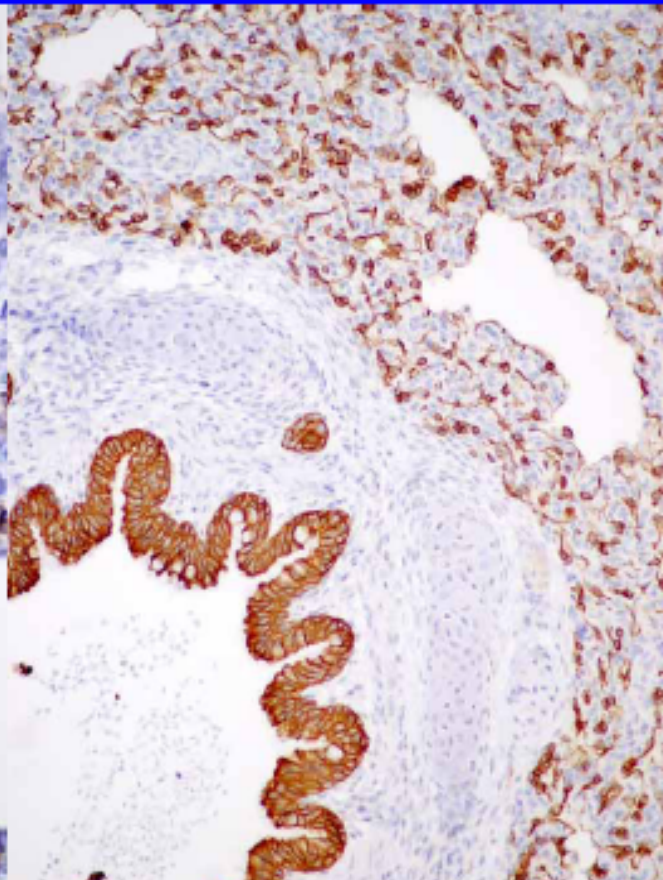
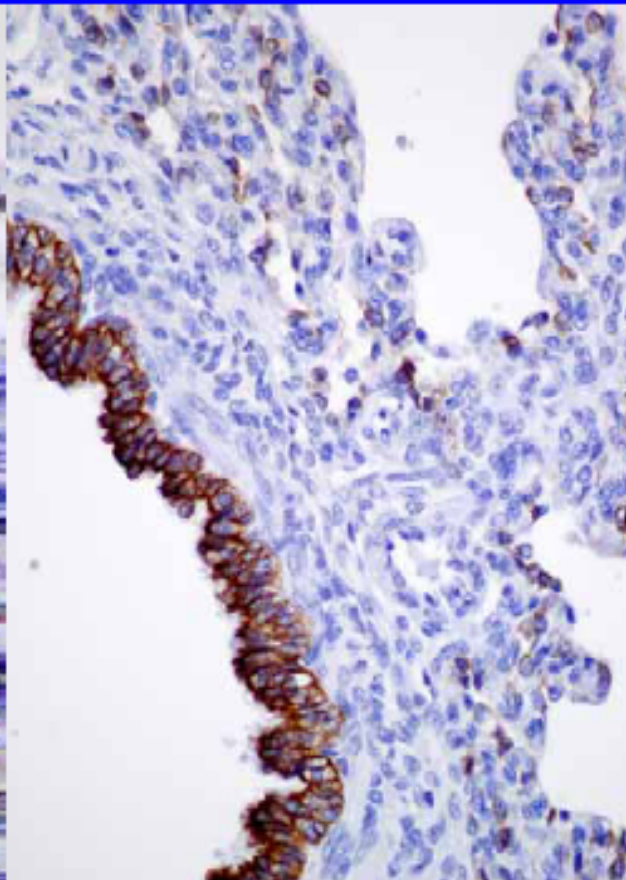
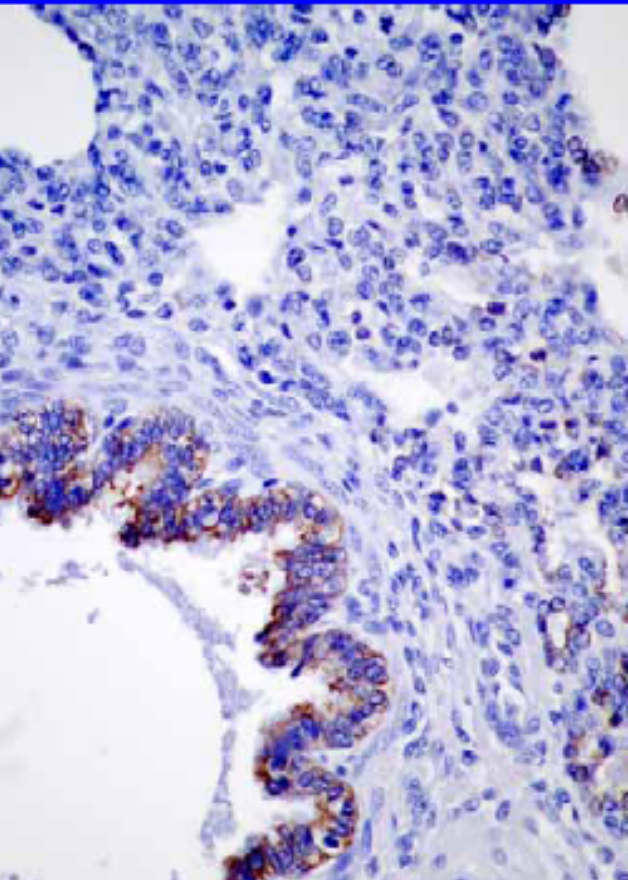
Influence of pH on Antigen Retrieval

Cytokeratin AE1/AE3 staining in the lung

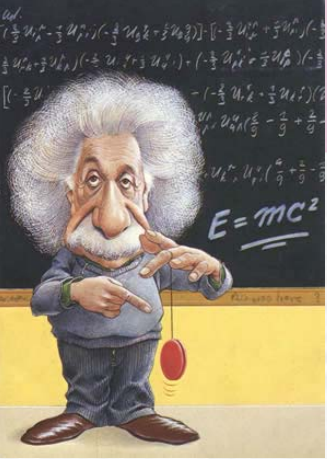
pH4

pH7

pH9



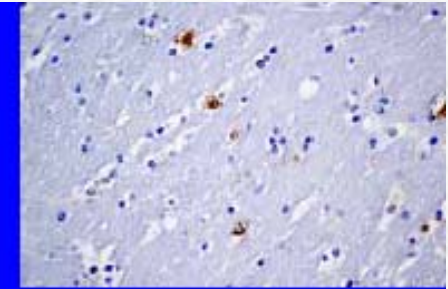
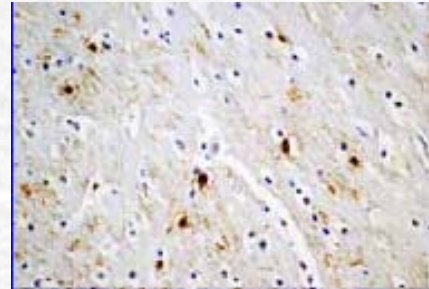
TEST DI VALUTAZIONE DELLO SMASCHERAMENTO ANTIGENICO (es.: proteina S100)



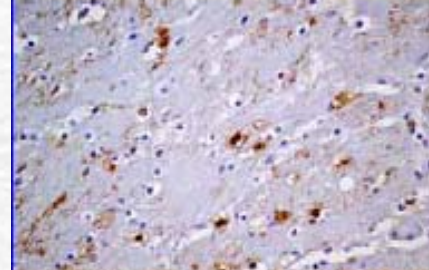
100°C per 15 min

NO trattamento
con calore

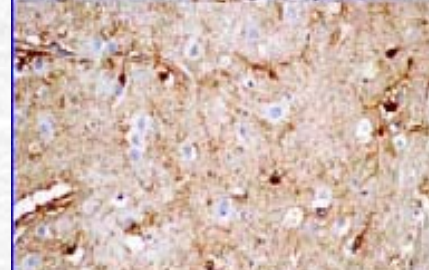
Basso pH



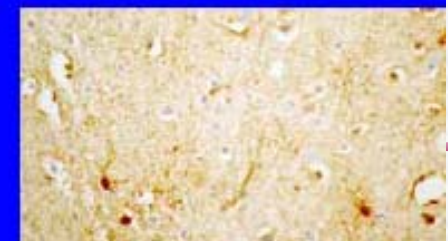
pH 6-7



EDTA, pH 10



Proteinase K



SATURAZIONE DEI SITI DI LEGAME ASPECIFICI

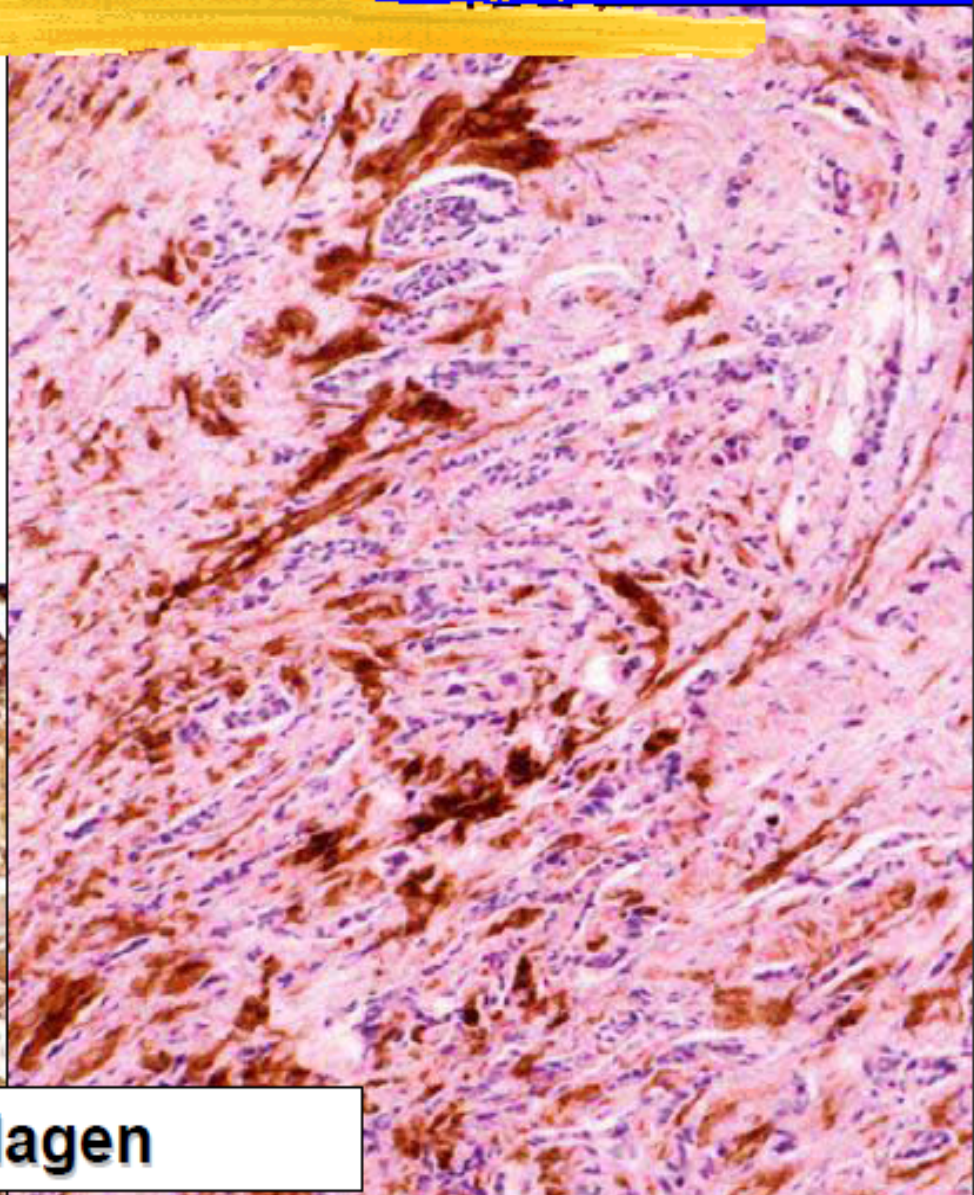
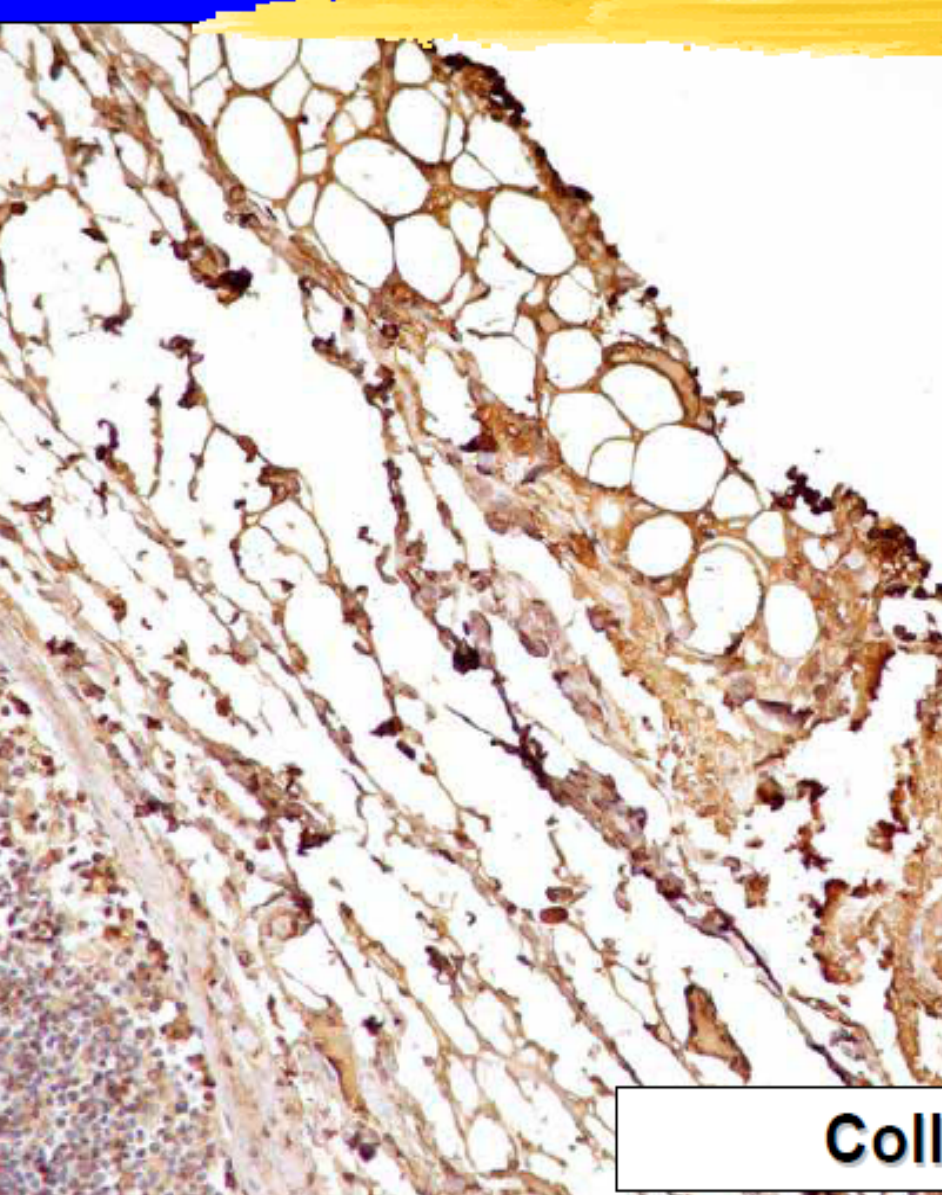
Colorazione di fondo aspecifica (background)=
colorazione

positiva del campione che non deriva dal legame Ag-Ab

Cause:

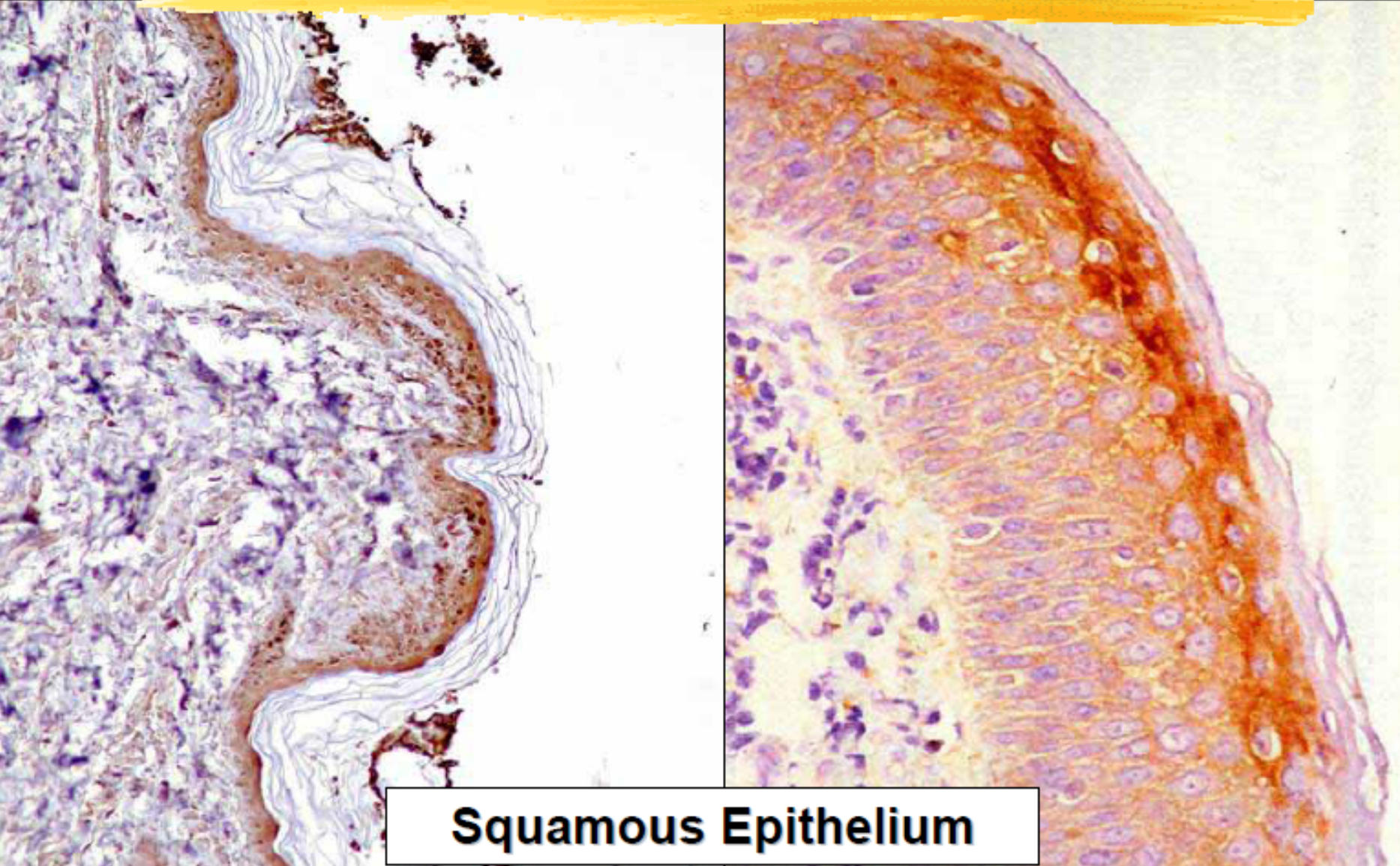
- Interazioni ioniche ed elettrostatiche tra Ab e elementi con carica opposta del tessuto (es: collagene, endotelio)
- interazioni idrofobiche tra Ab e componenti del tessuto (+++ collagene, elastina, adipociti, epitelio squamoso)

Hydrophobic Interaction



Collagen

Hydrophobic Interaction



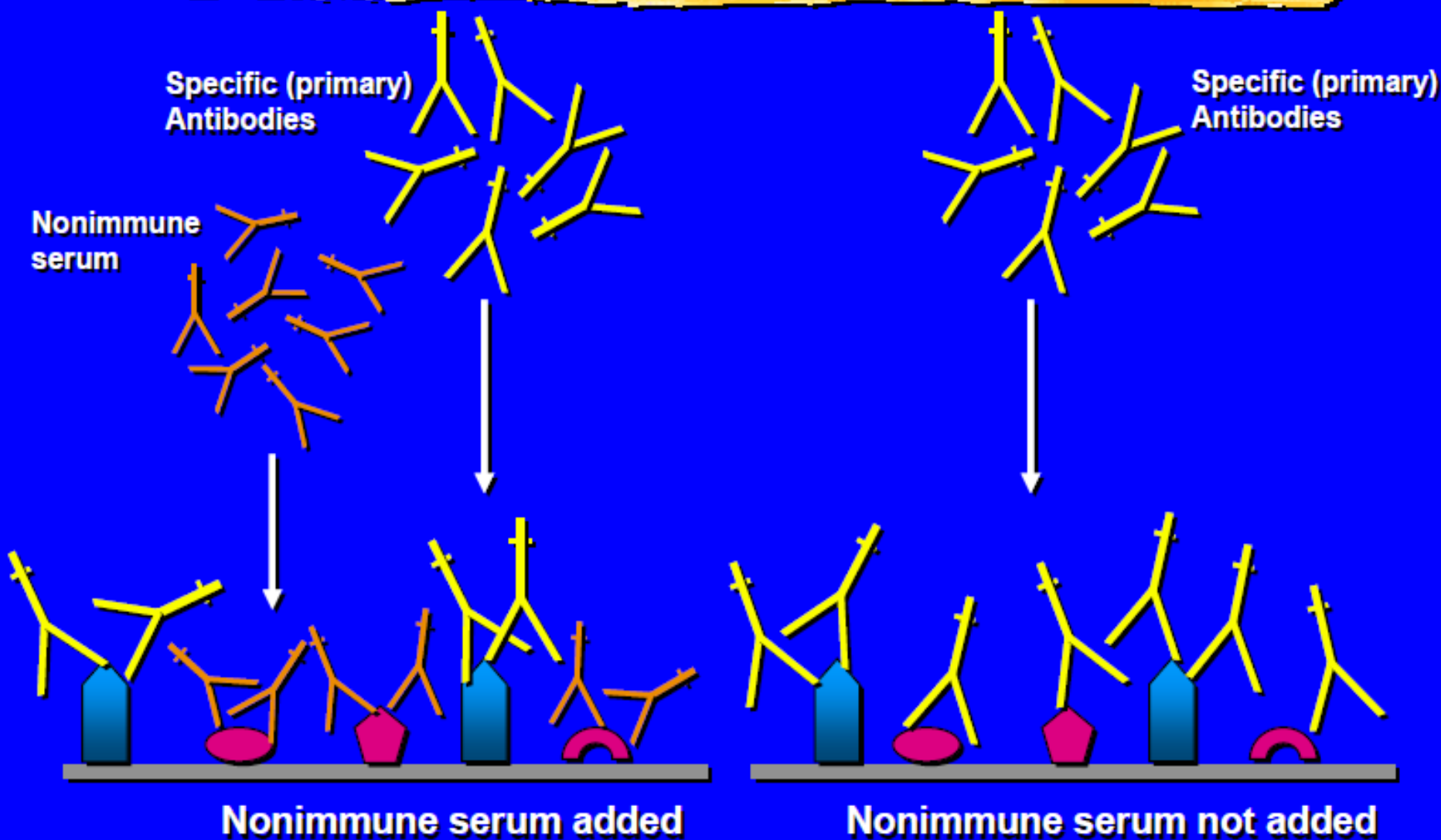
Squamous Epithelium

Metodo per eseguire la saturazione

Blocco dei siti di legame aspecifici da proteine inerti che vengono applicate prima dell'Ab primario :

- ✓ latte in polvere
- ✓ siero di albumina bovina (BSA)
- ✓ normal goat/donkey/swine/horse serum
IgG free

Blocking Nonspecific Binding with Nonimmune Antiserum



Importante.....

NO risciacquo con tampone dopo il blocking:

- lavaggio del siero
- nuova esposizione dei siti di legame aspecifici
- colorazione di fondo

Importante.....

usare un siero della stessa
specie in cui è stato
prodotto il secondario e
non correlato col primario

Blocking: normal swine
serum



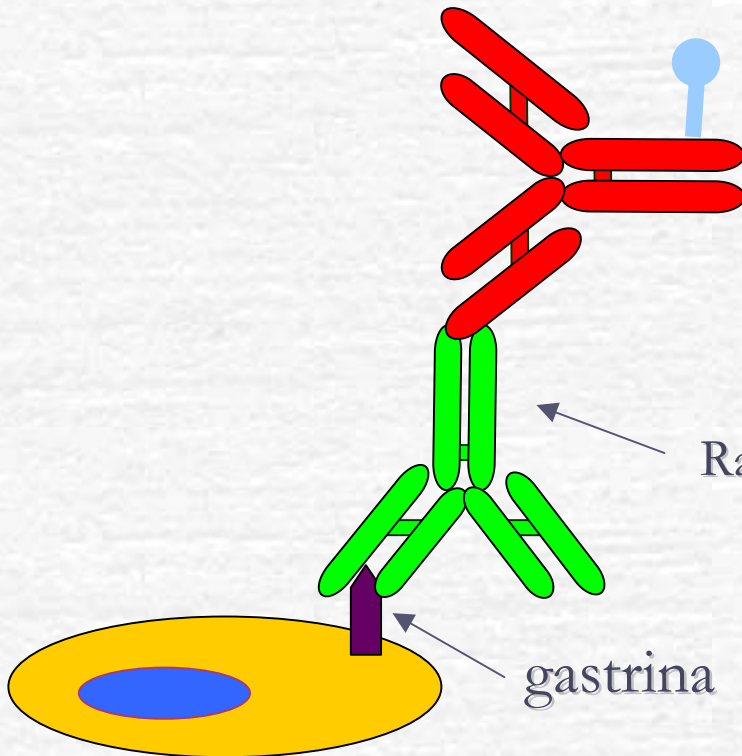
Biotinylated swine anti-
rabbit IgG



Rabbit anti-human gastrin



gastrina



ANTICORPO PRIMARIO

- ✓ Anticorpi policlonali
- ✓ Anticorpi monoclonali

Concentrazione dell'Ab primario dipende da:

- ❖ quantità dell'antigene
- ❖ sensibilità del sistema di rivelazione

SISTEMI DI RIVELAZIONE

Utilizzo di enzimi coniugati per “rivelare” il legame dell’Ab primario con l’antigene

Enzimi comunemente usati:

- **fosfatasi alcalina**
- **perossidasi**

Metodi di rivelazione

Metodo diretto

Metodo indiretto

Metodi degli immunocomplessi enzimatici solubili:

- metodo PAP
- metodo APAAP

Metodi avidina-biotina:

- metodo ABC
- metodo LSAB

Metodo EnVision

CROMOGENI

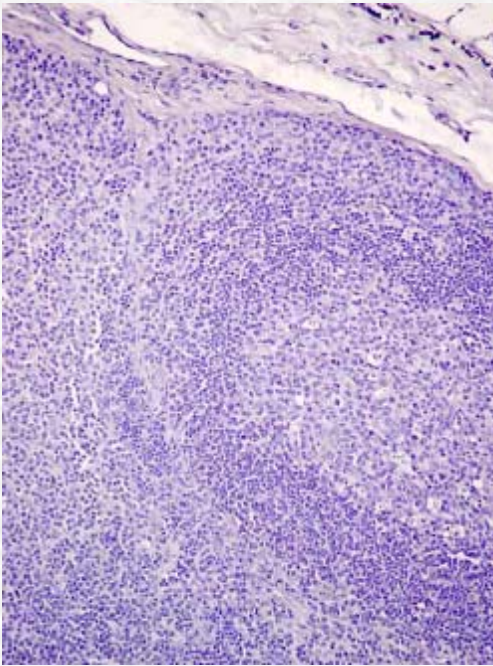
- ✓ Substrato della reazione
- ✓ Donatori di elettroni, danno origine ad un prodotto di reazione finale colorato
- ✓ Localizzazione dell'Ag mediante la formazione di un precipitato vicino al punto in cui è avvenuta la reazione

VALUTAZIONE DEI RISULTATI

- ❖ Positività nucleare (diffusa, nucleolare), citoplasmatica (diffusa, perinucleare, paranucleare) o di membrana (regolare, intermittente)
- ❖ Positività focale o diffusa
- ❖ Intensità variabile
- ❖ Colorazione specifica (cellulare) e di fondo (collagene e connettivo, distribuzione aspecifica)
- ❖ Artefatti

PROBLEMI PRINCIPALI

NO STAINING

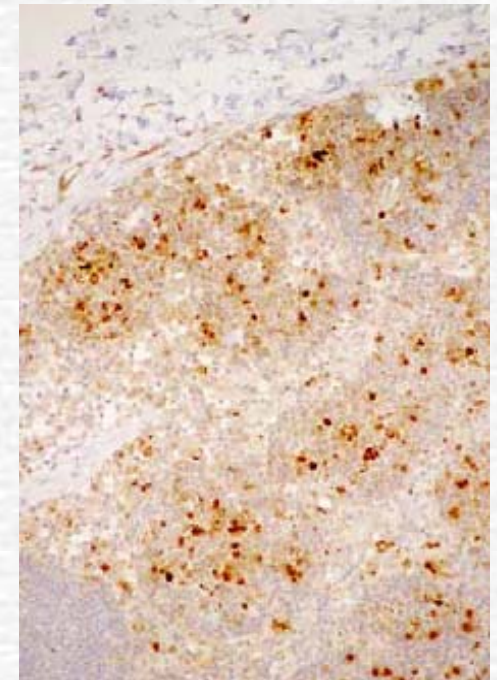


Fattori chiave:

- 1) Fissazione e processazione del campione
- 2) metodo IHC
- 3) Qualità Ab primario
- 4) Interpretazione microscopica



BACKGROUND STAINING



Processazione del campione:

1) **AUTOLISI**

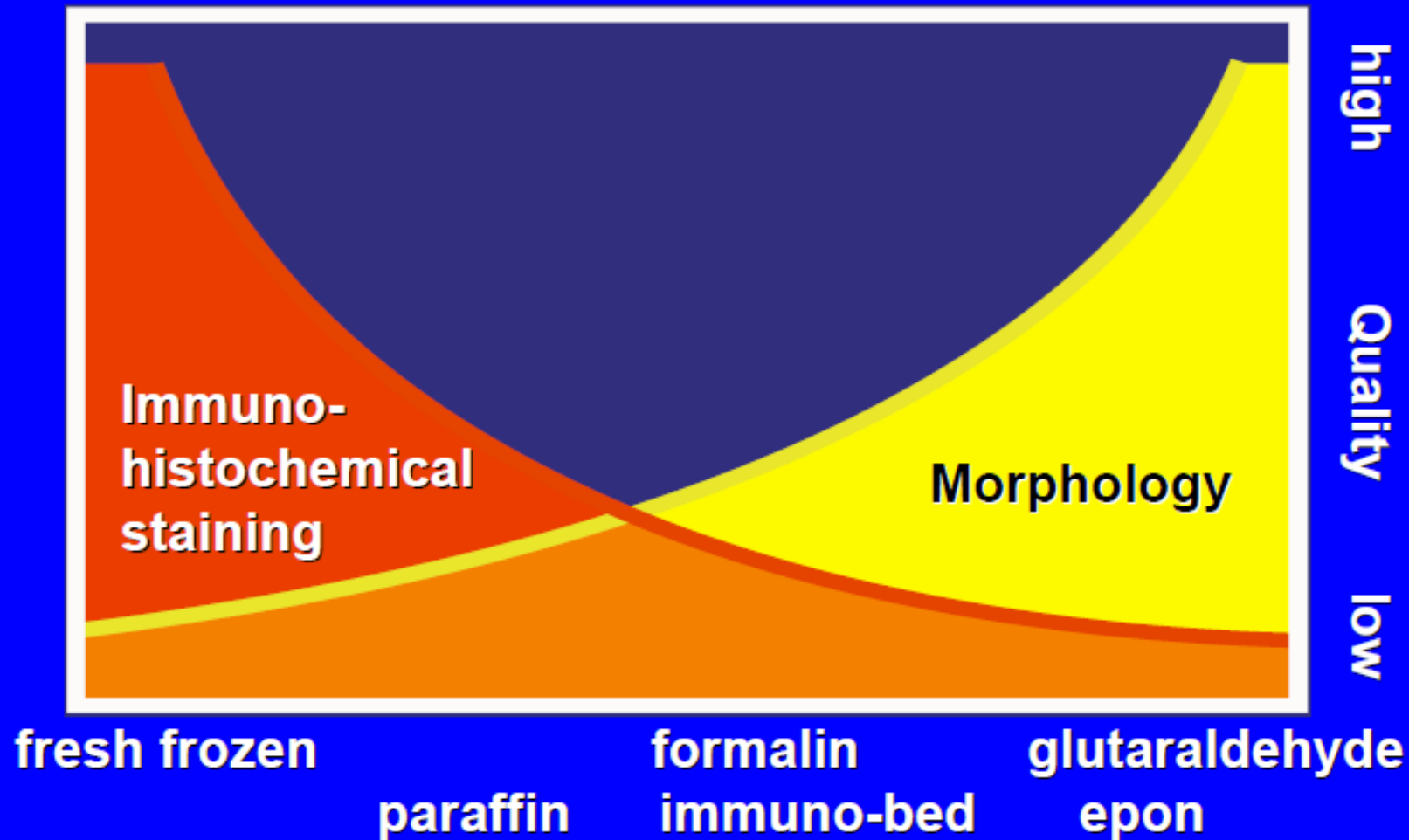
Effetti:

- Diffusione degli Ags
- Degradazione degli Ags
- Elevato background
- Perdita dei dettagli morfologici

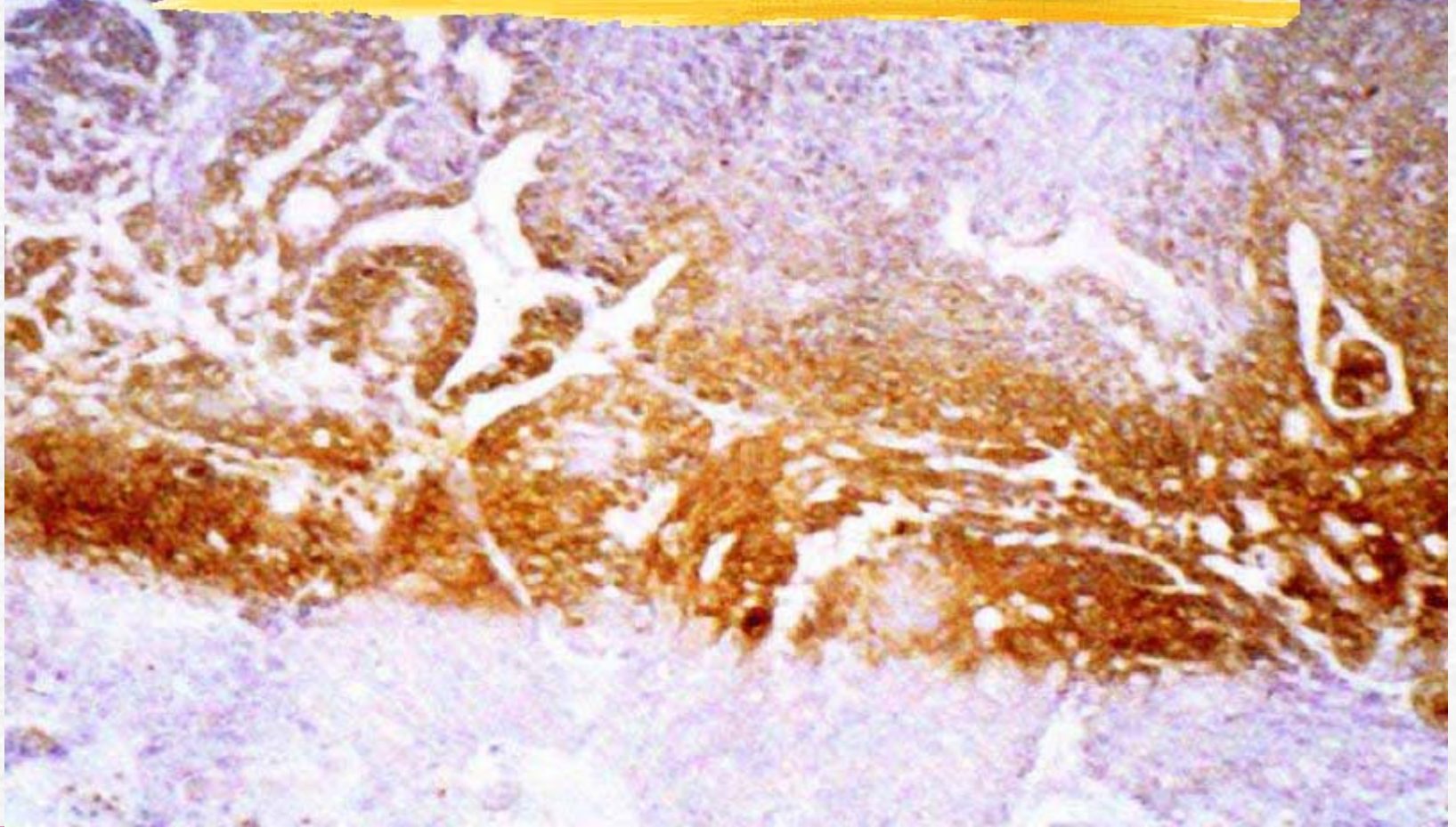
2) **Effetti della fissazione:**

- Assenza di segnale (falso negativo)
- Segnale ridotto
- Segnale “unexpected” (cross-reattività)
- Aumento del background (overfissazione > cross-legami)

Effects of Fixation and Processing on Morphology and Immunohistochemical Staining



Incomplete Fixation



Anticorpo primario

FALSI NEGATIVI:

- specie-specificità
- Modificazioni conformazionali dell'Ag non riconosciute dall'Ab
- Incubazione non adeguata
- Diluizione non adeguata
- Ridotta concentrazione dell'Ag nel tessuto

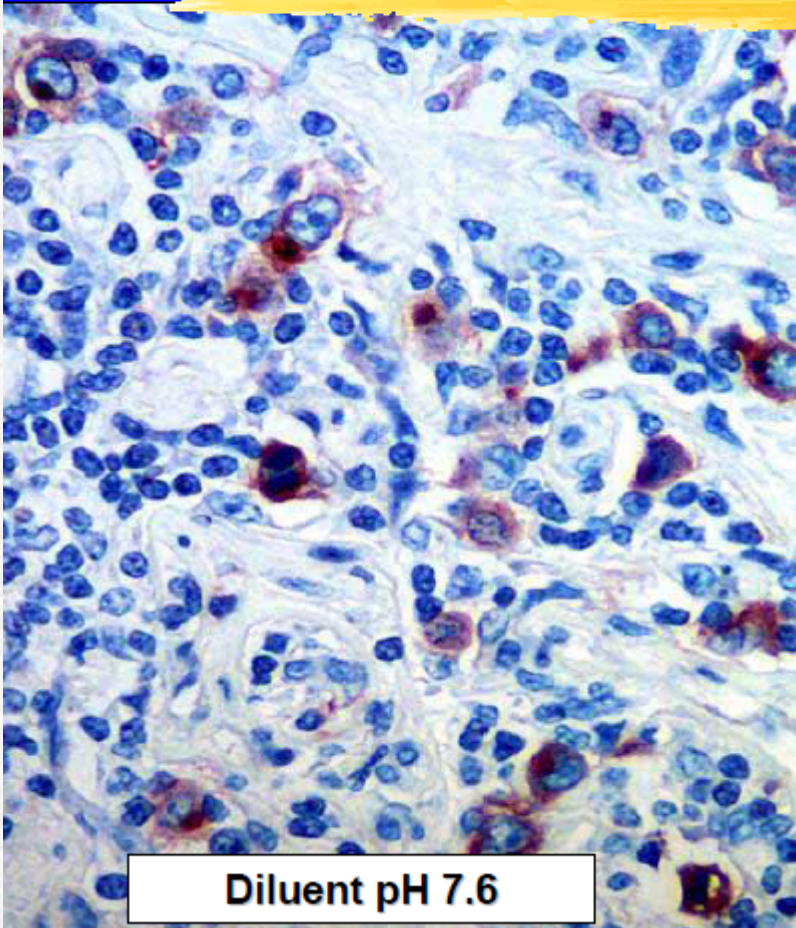
FALSI POSITIVI:

- cross-reattività aspecifiche
- Cross-reattività specifiche (stesso epitopo in una cellula diversa)

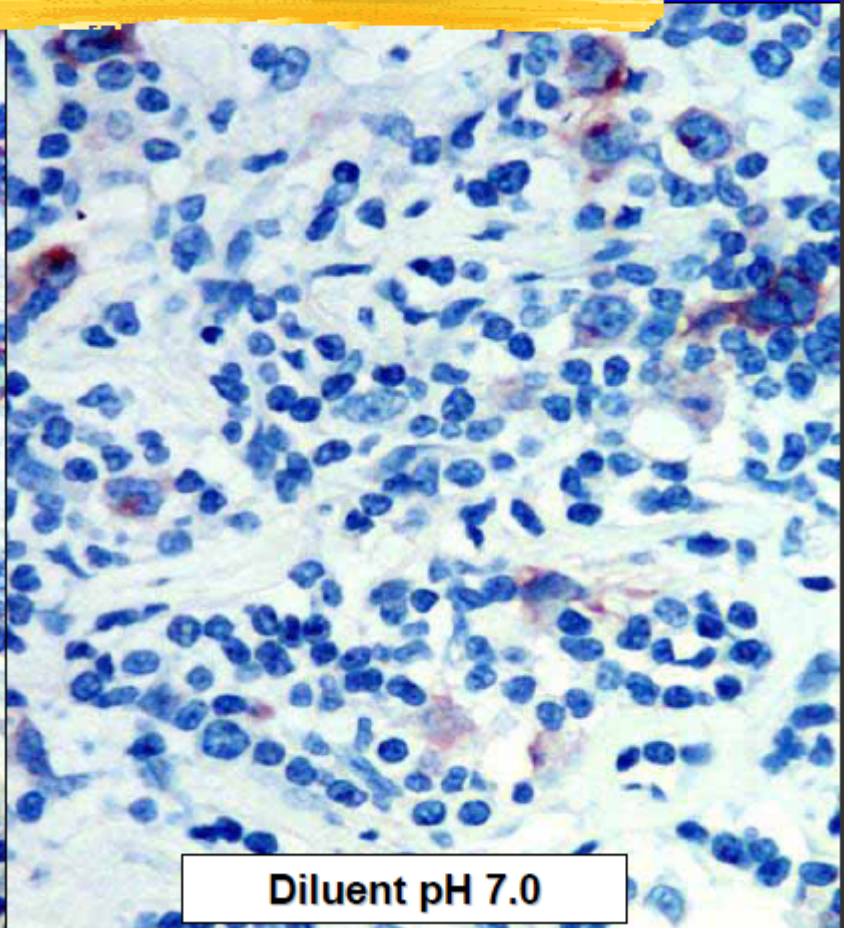
SEGNALE DEBOLE

- Incubazione inadeguata
- Diluizione inadeguata

The Role of the Antibody Diluent

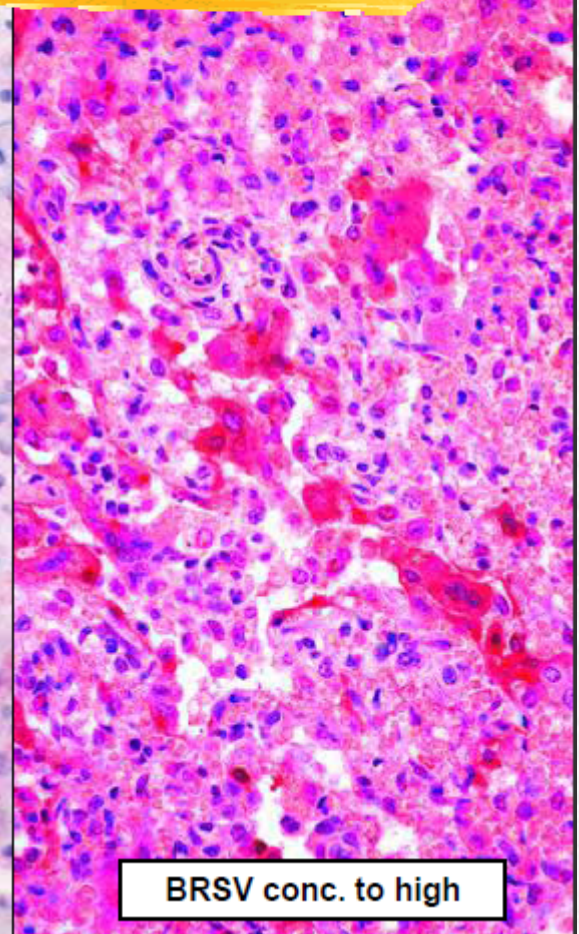
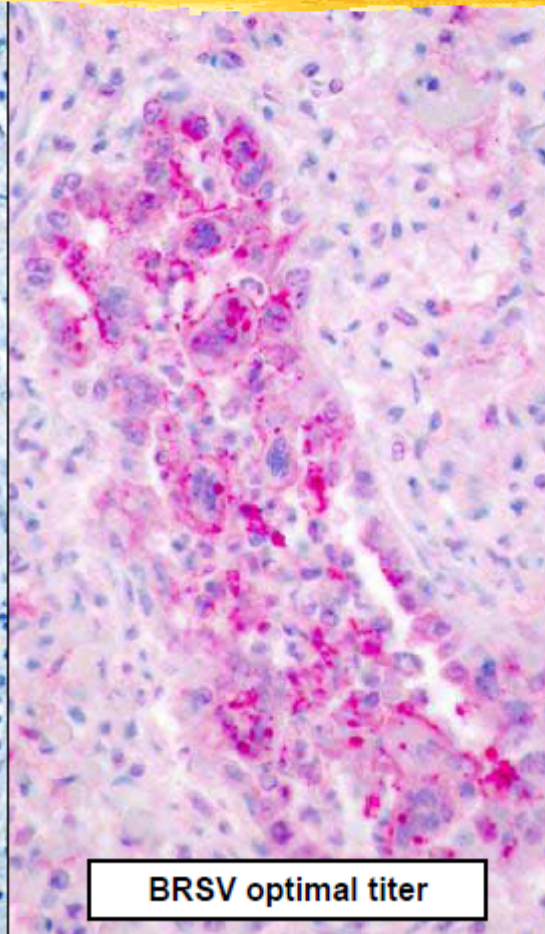
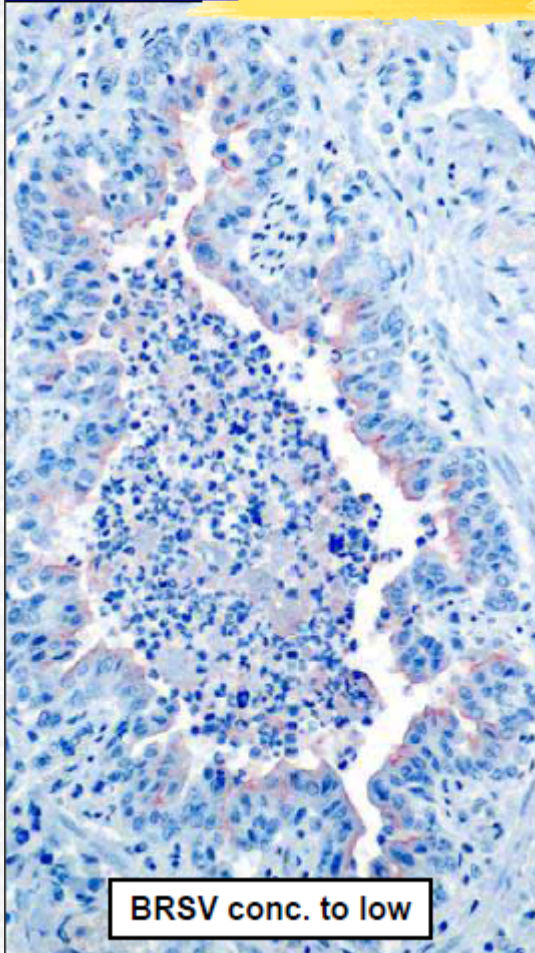


Diluent pH 7.6

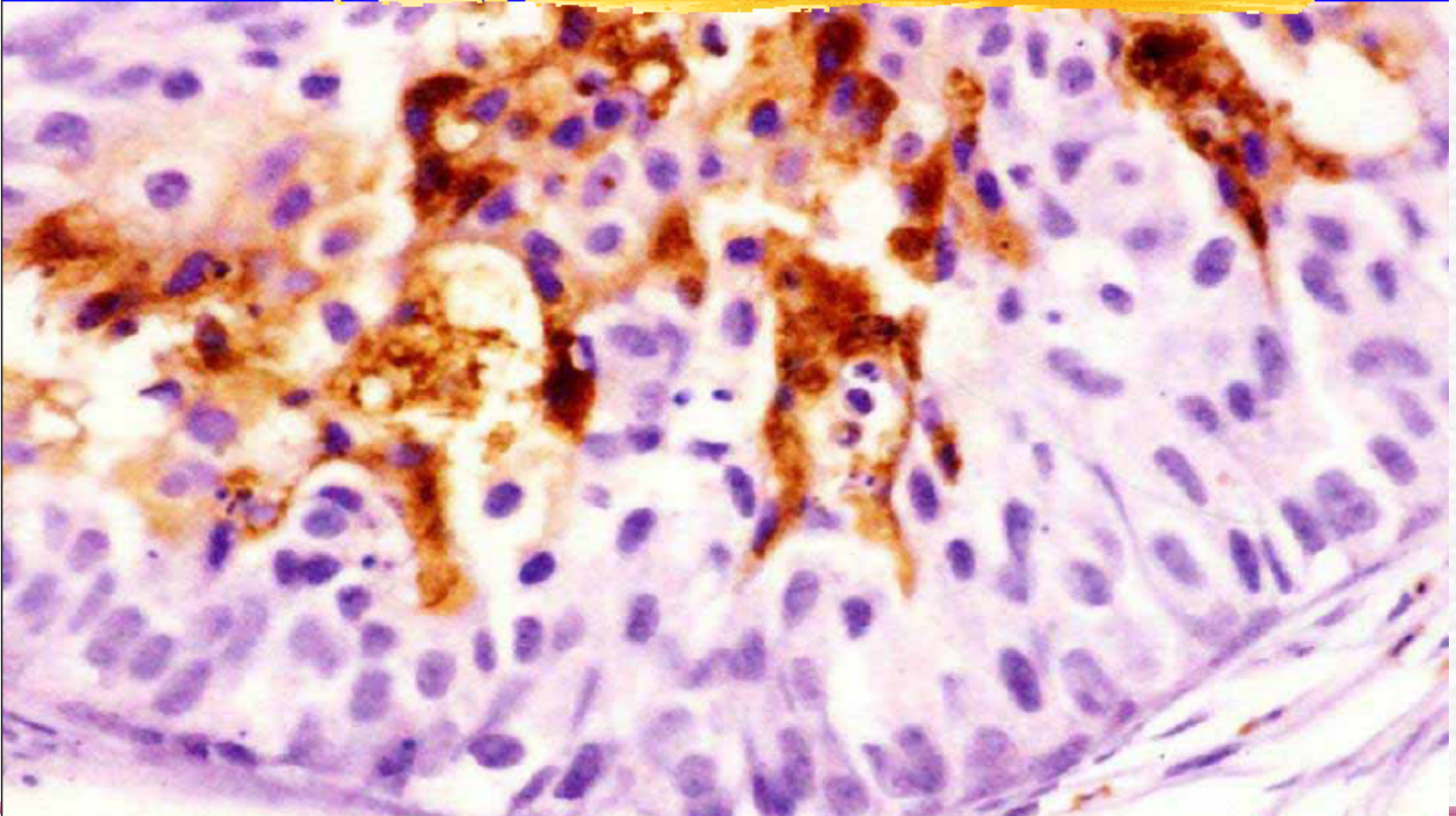


Diluent pH 7.0

Inadequate Antibody Titration



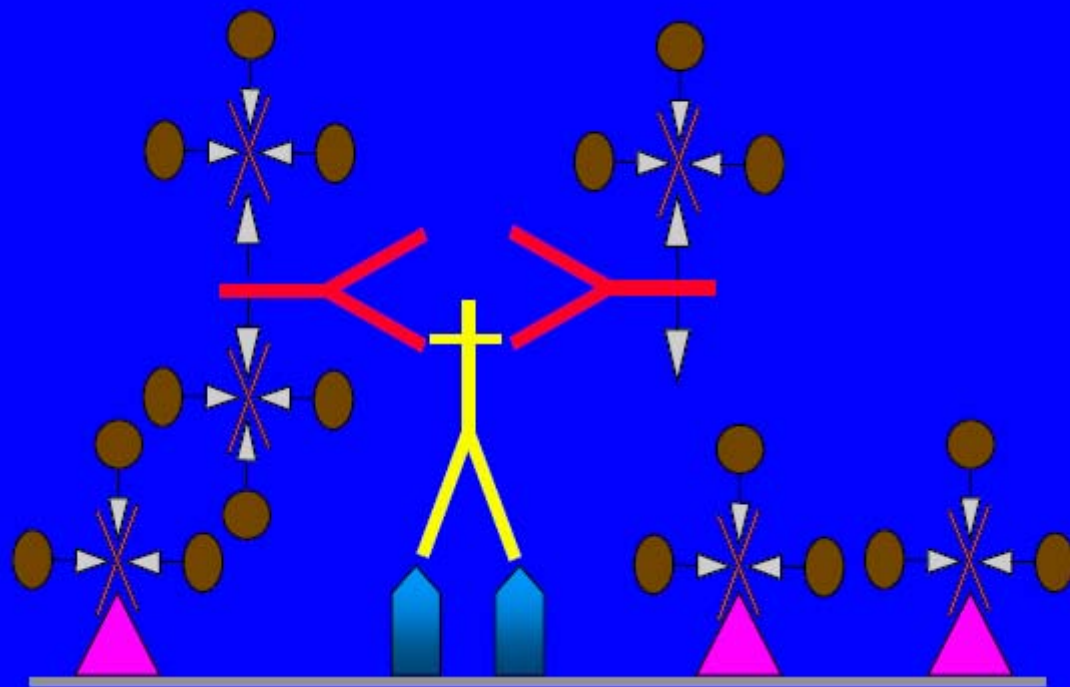
Staining of Necrotic Debris



BACKGROUND DOVUTO A....

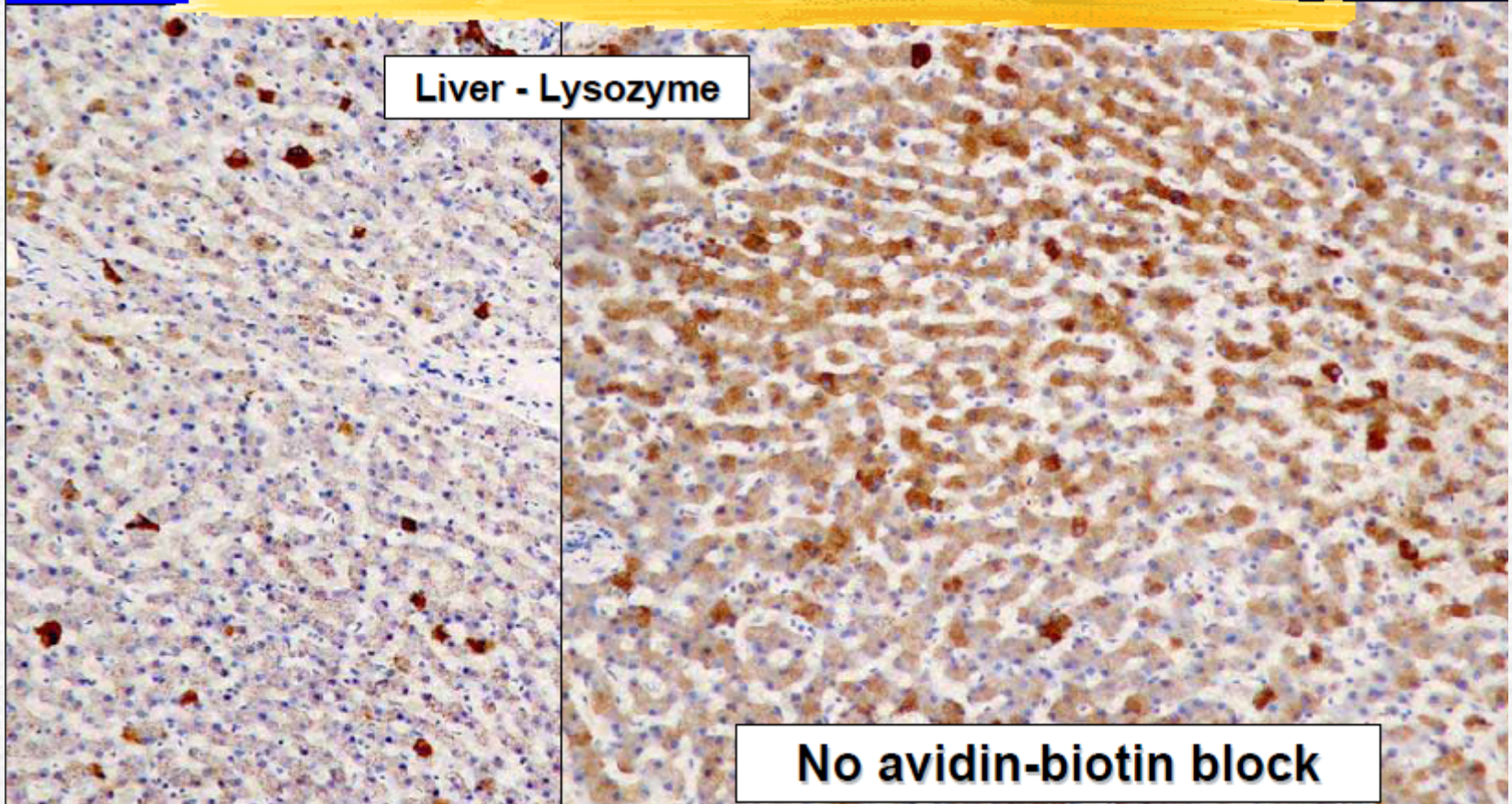
- 1)Attività endogena della perossidasi
- 2)Attività endogena della fosfatasi alcalina
- 3)Attività endogena della biotina-avidina
 - Biotina presente in fegato, polmone, rene, tessuto adiposo, cervello, mastociti; inclusi intranucleari in cellule neoplastiche; inclusi intranucleari in cellule endometriali durante la gestazione ed il post-partum,
 - Avidina con carica positiva a pH neutro e legame a tessuti carichi -

Endogenous Avidin-Biotin Activity

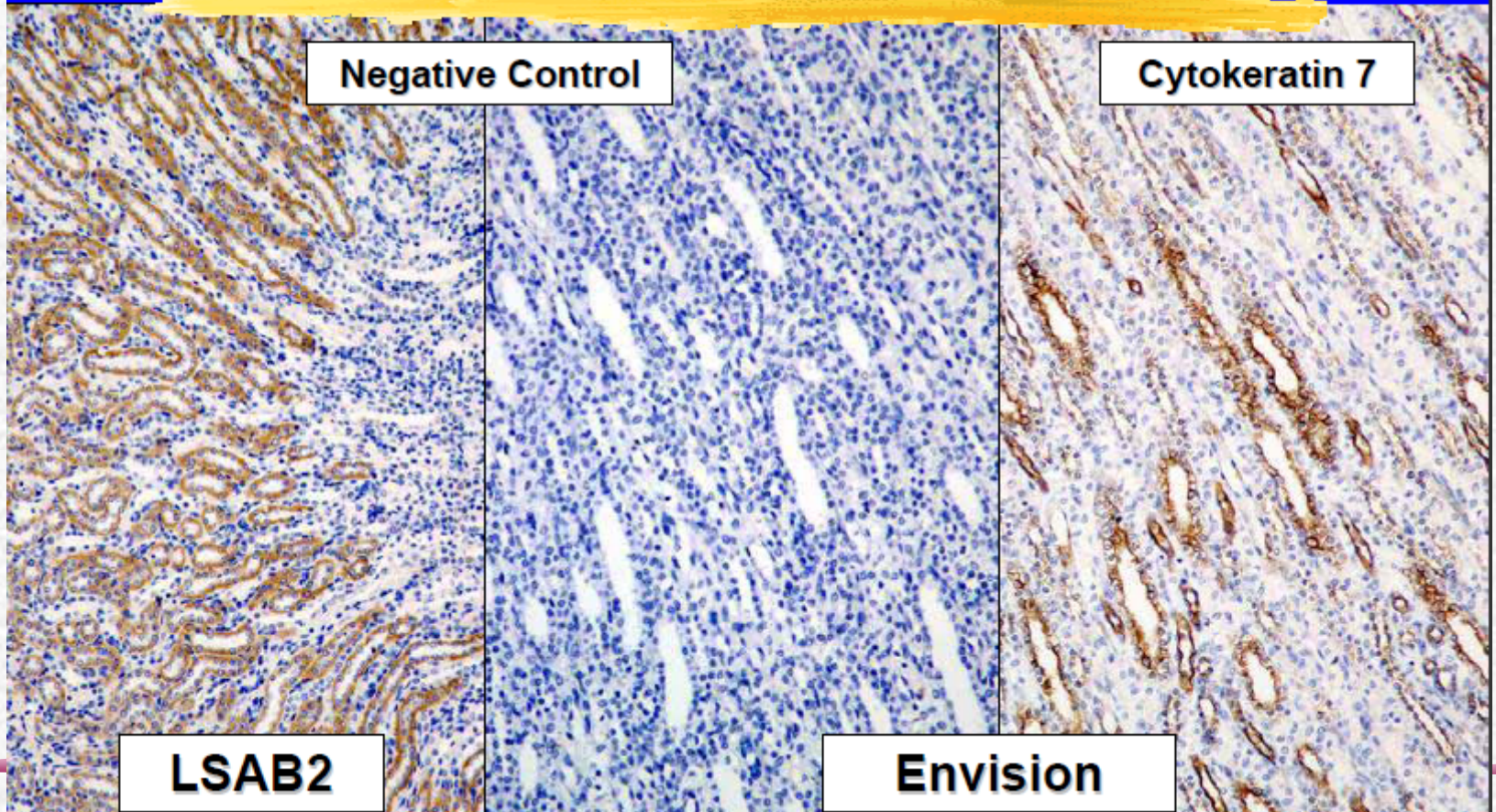


- X Avidin
- Biotin-avidin complex
- Y Biotinylated
- Y First Antibody
- Antigens
- ▲ Endogenous Biotin

Endogenous Biotin Background

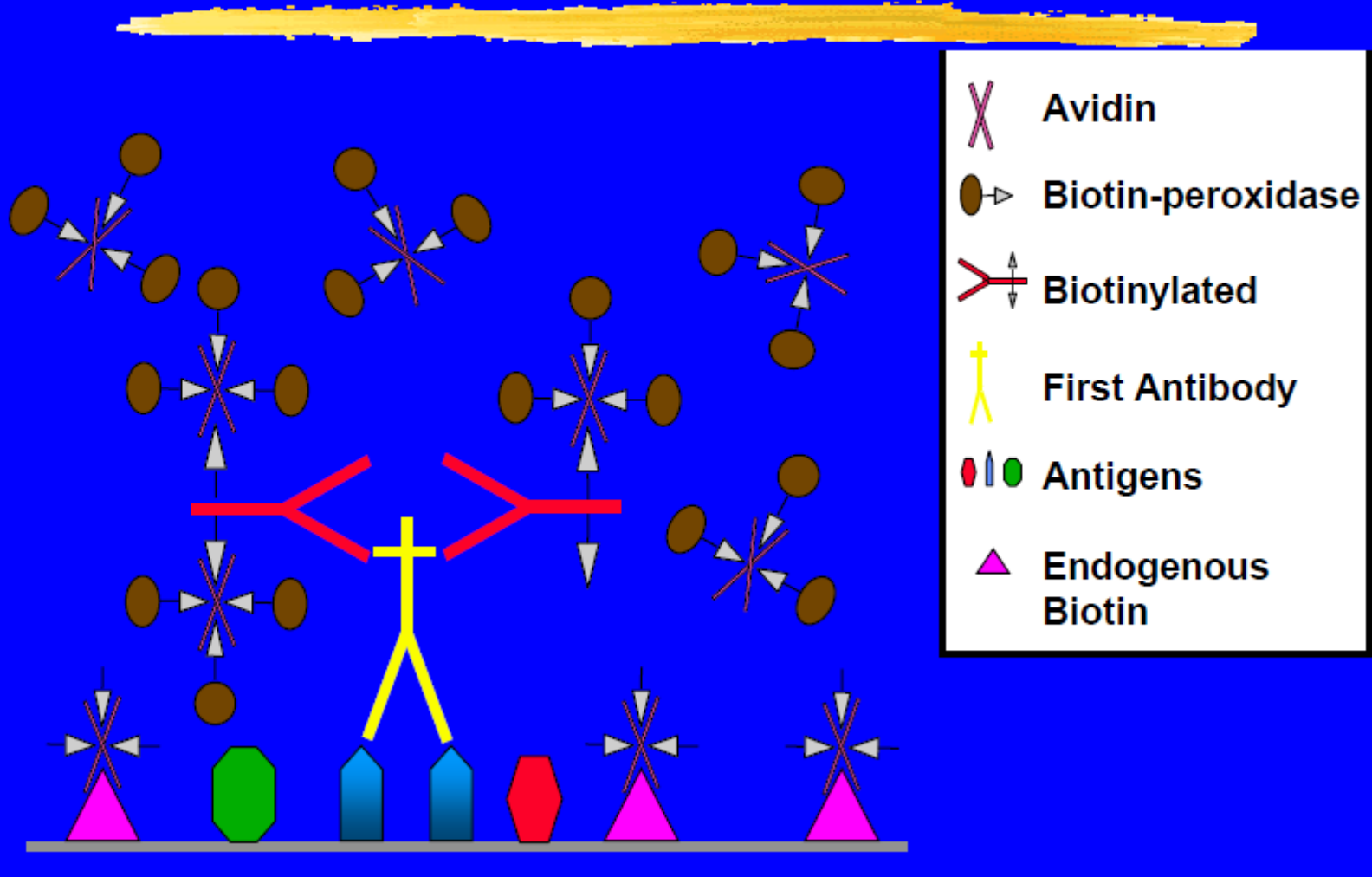


Endogenous Biotin Background



Preincubazione delle sezioni tissutali con avidina e biotina non marcate

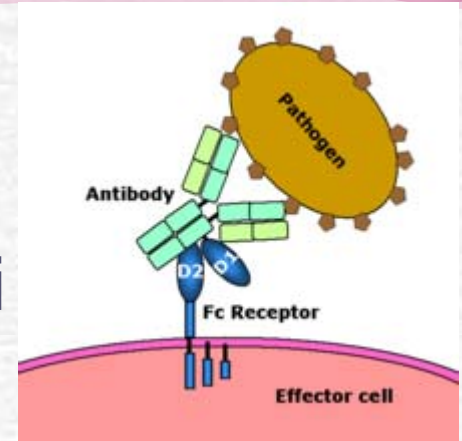
Blocking Endogenous Avidin Biotin Activity



ALTRE CAUSE DI BACKGROUND

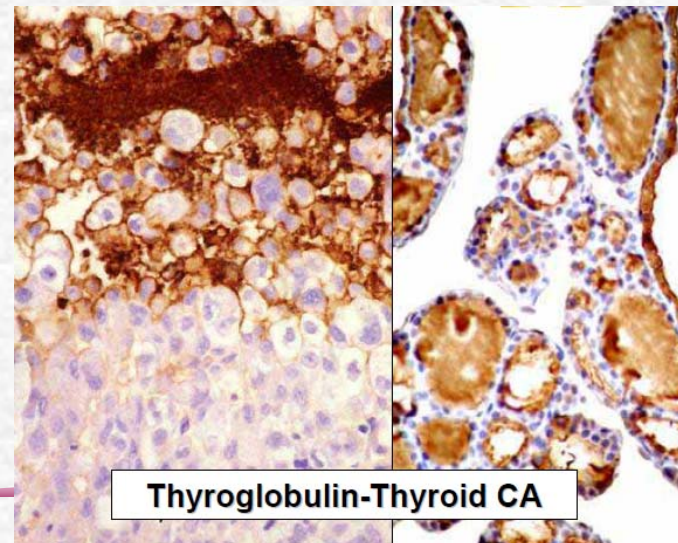
Recettori Fc:

- ✓ presenza di recettori per Fc degli Abs sulle cellule mononucleate del sangue
- ✓ Non è un problema nelle sezioni in paraffina (distruzione dei recettori durante la processazione)
- ✓ Solo in caso di blanda fissazione, sezioni congelate di tessuti linfoidei o preparazioni citologiche contenenti cellule mononucleate



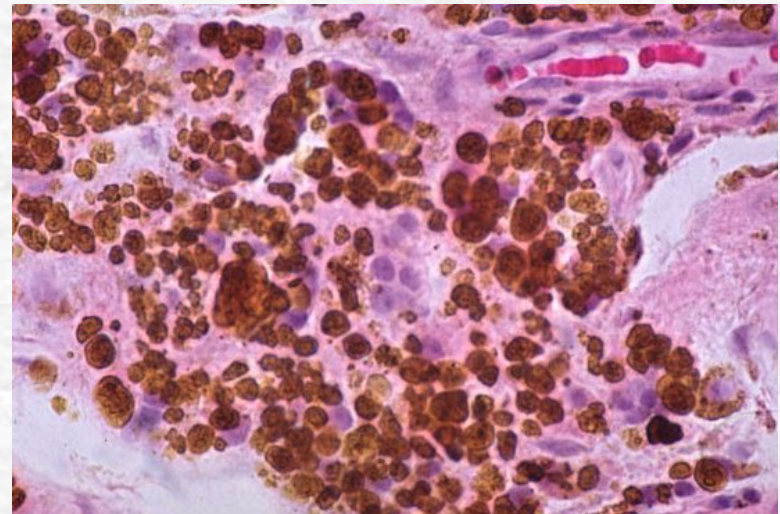
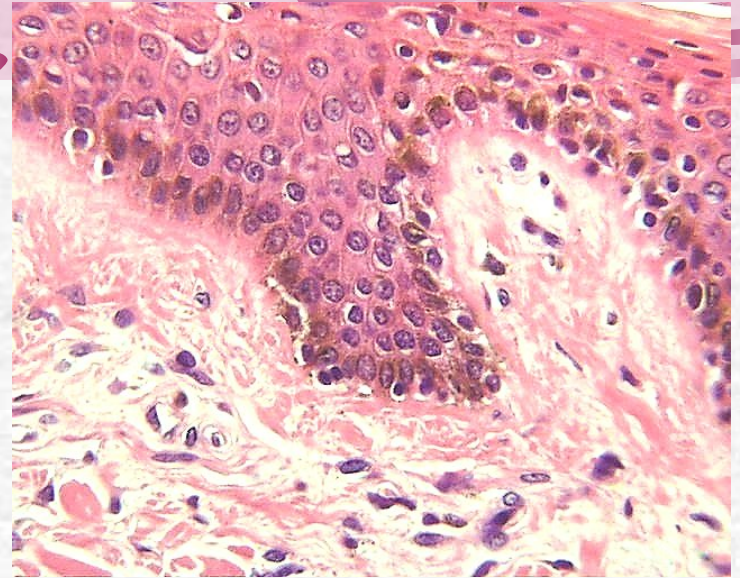
Diffusione aspecifica del'Ag (sequestro)

- ✓ diffusione delle proteine solubili dalle cellule e sequestro da altre cellule di diverso tipo o dalle cellule interstiziali
- ✓ Problema frequente con la tireoglobulina
- ✓ > frequenza con l'uso di fissativi che non creano legami aldeidici (es.: etanolo)
- ✓ Anche con mioglobina, proteina acida fibrillare gliale



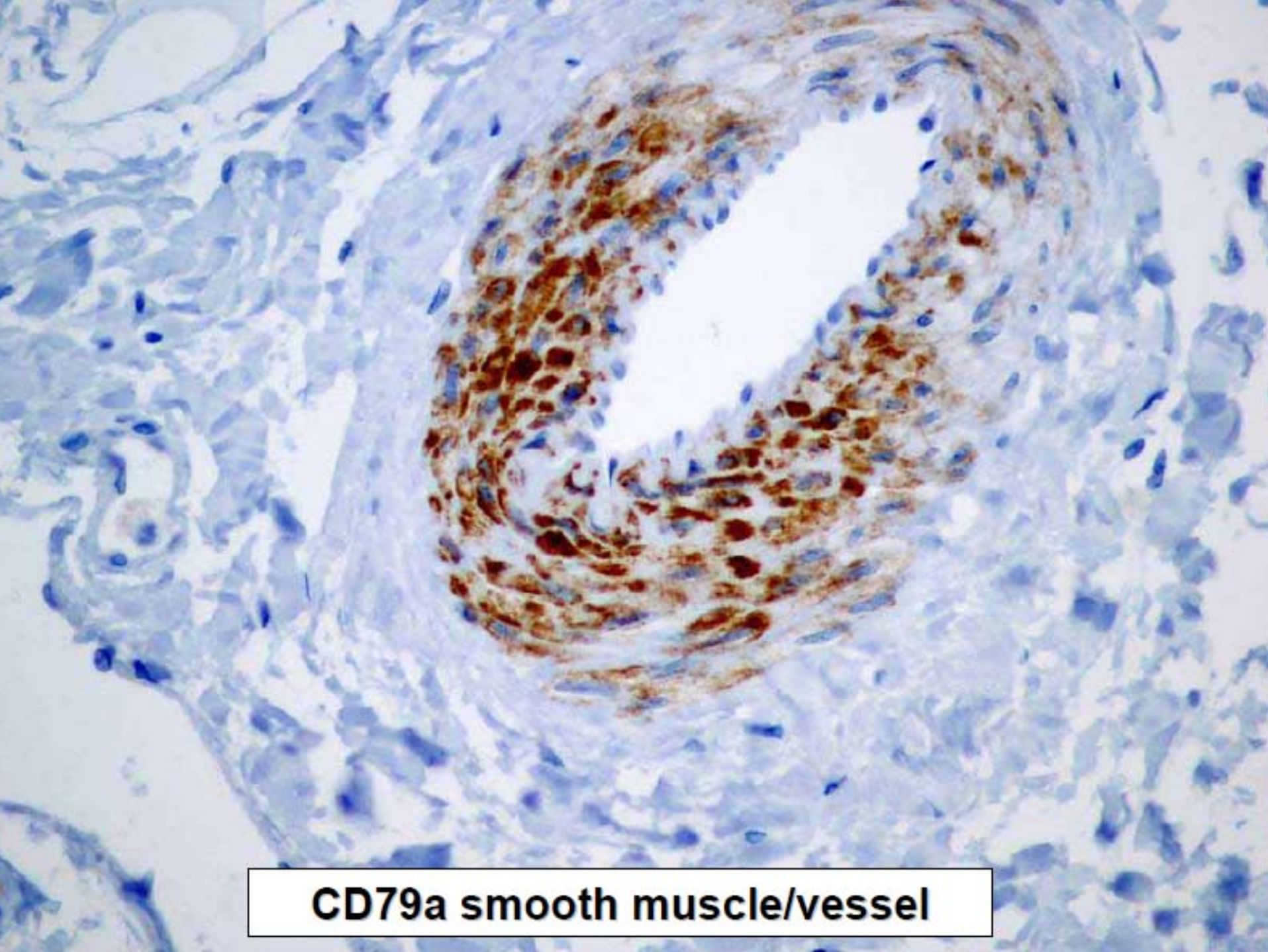
Pigmenti

- ✓ melanina, emosiderina
- ✓ Uso un sistema di rilevazione con diverso cromogeno
- ✓ Uso del permanganato di potassio per bloccare la melanina....ma possibile danno ad alcuni epitopi cellulari!
- ✓ Uso di colorazioni di contrasto quali Giemsa o Azzurro B (melanina: verde; DASB: marrone)
- ✓ Per emosiderina: uso di soluzione 1% di ditionite (agente chelante del ferro) in acetato buffer a pH5 per 5 min

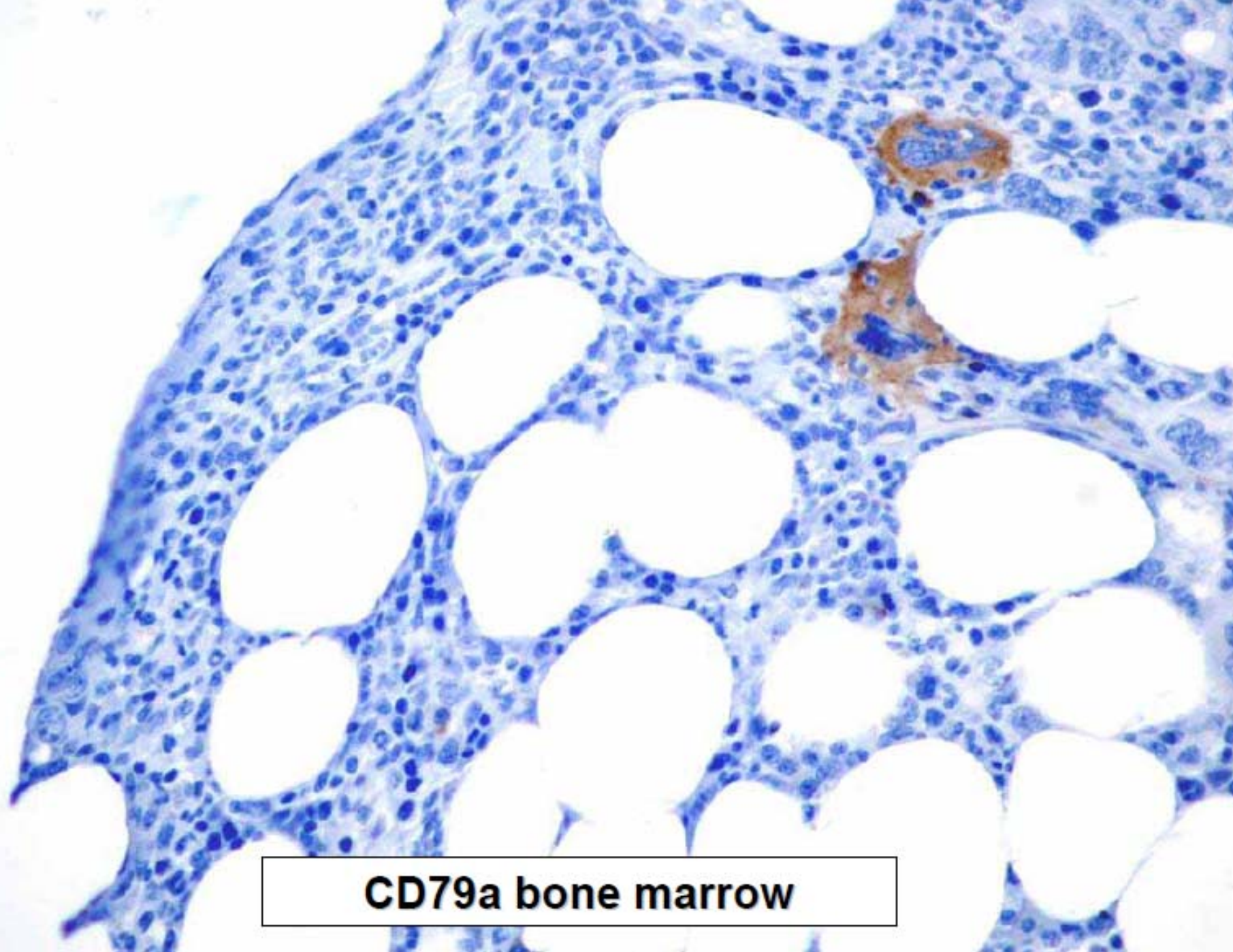


CROSS-REATTIVITA'

- Stesso epitopo in diverse proteine (es.: CD79a in linfociti B e cellule muscolari lisce)
- Cross-reattività aspecifica degli Abs con epitopi simili o diversi sullo stesso antigene (Ab a bassa affinità)



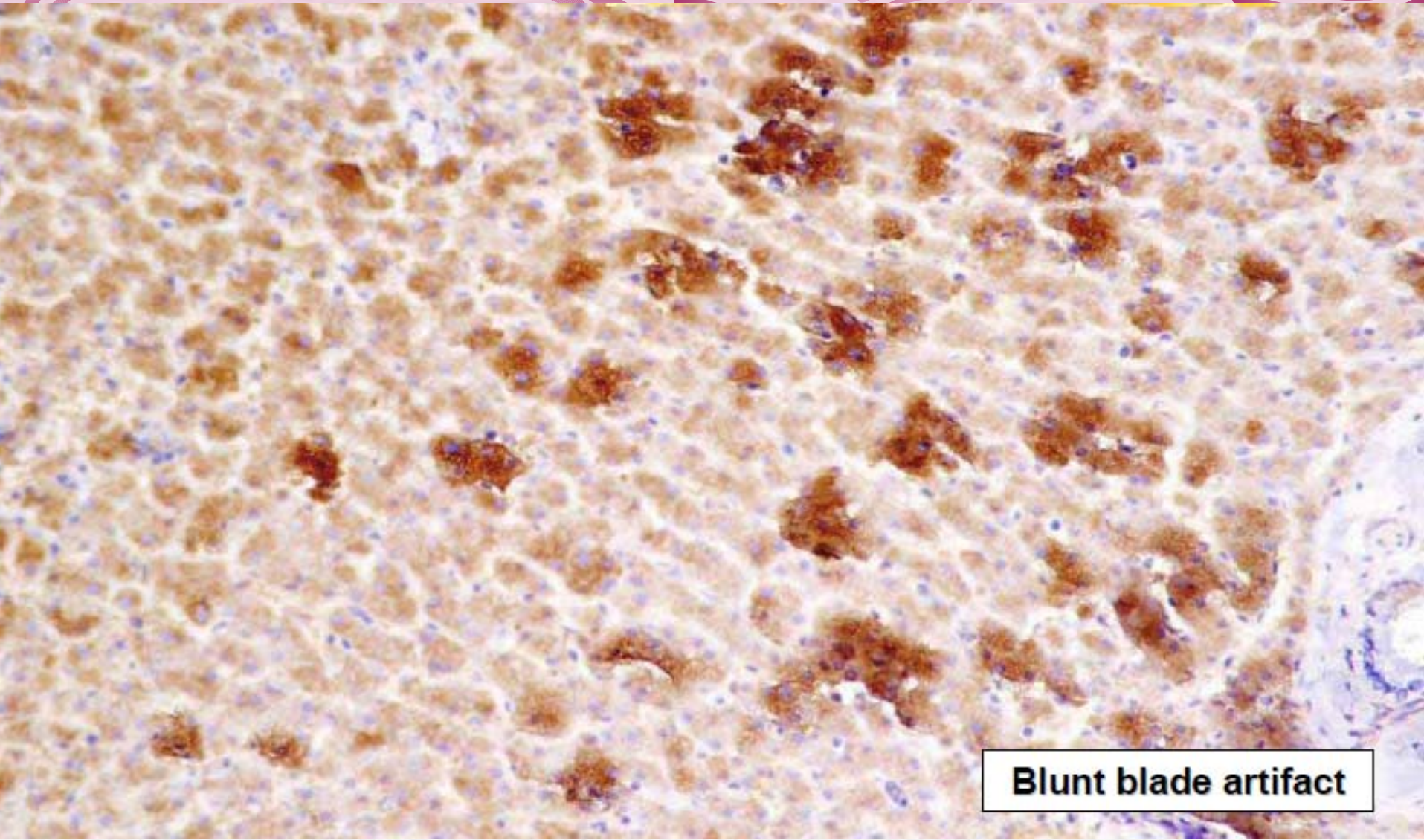
CD79a smooth muscle/vessel



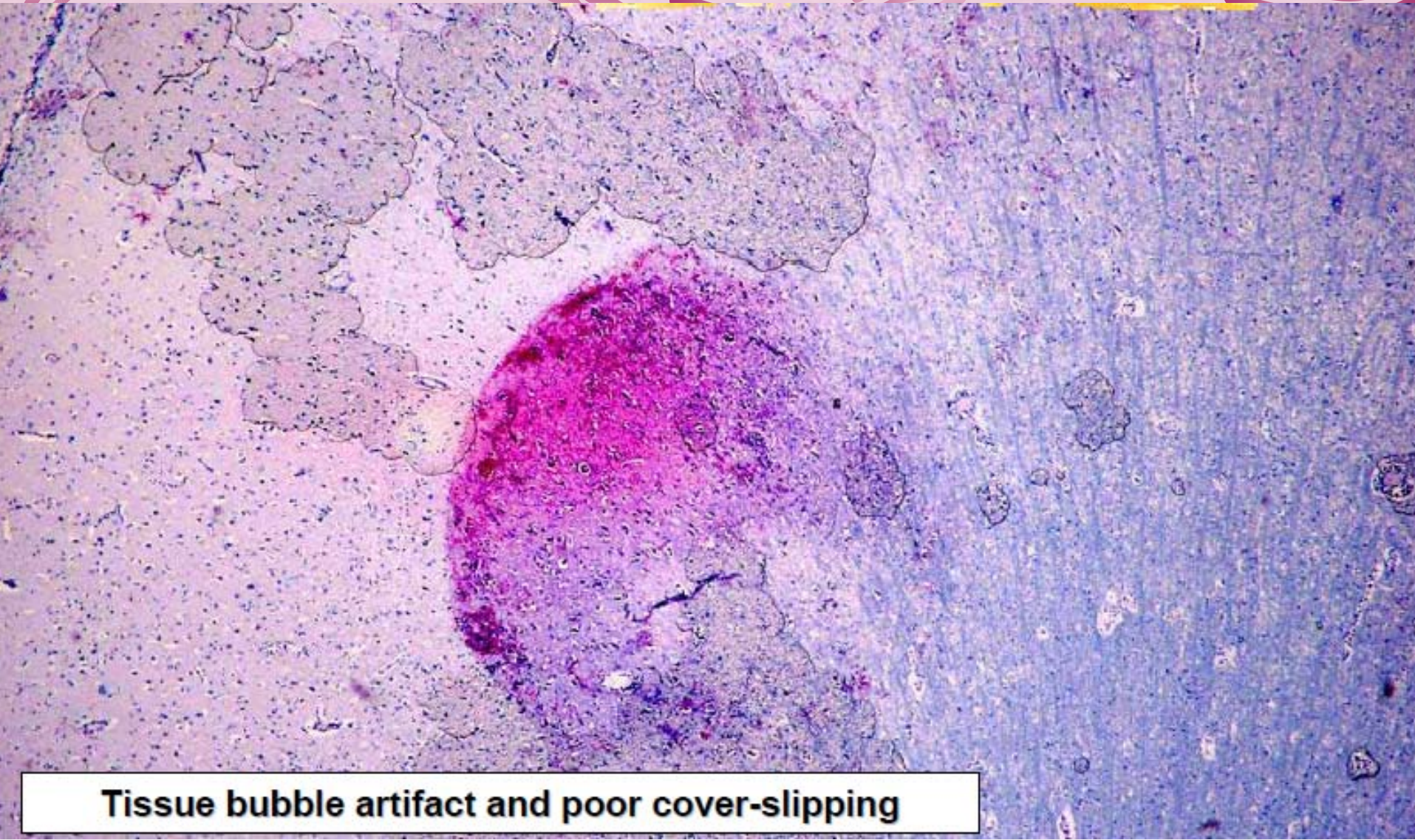
CD79a bone marrow

Artefatti

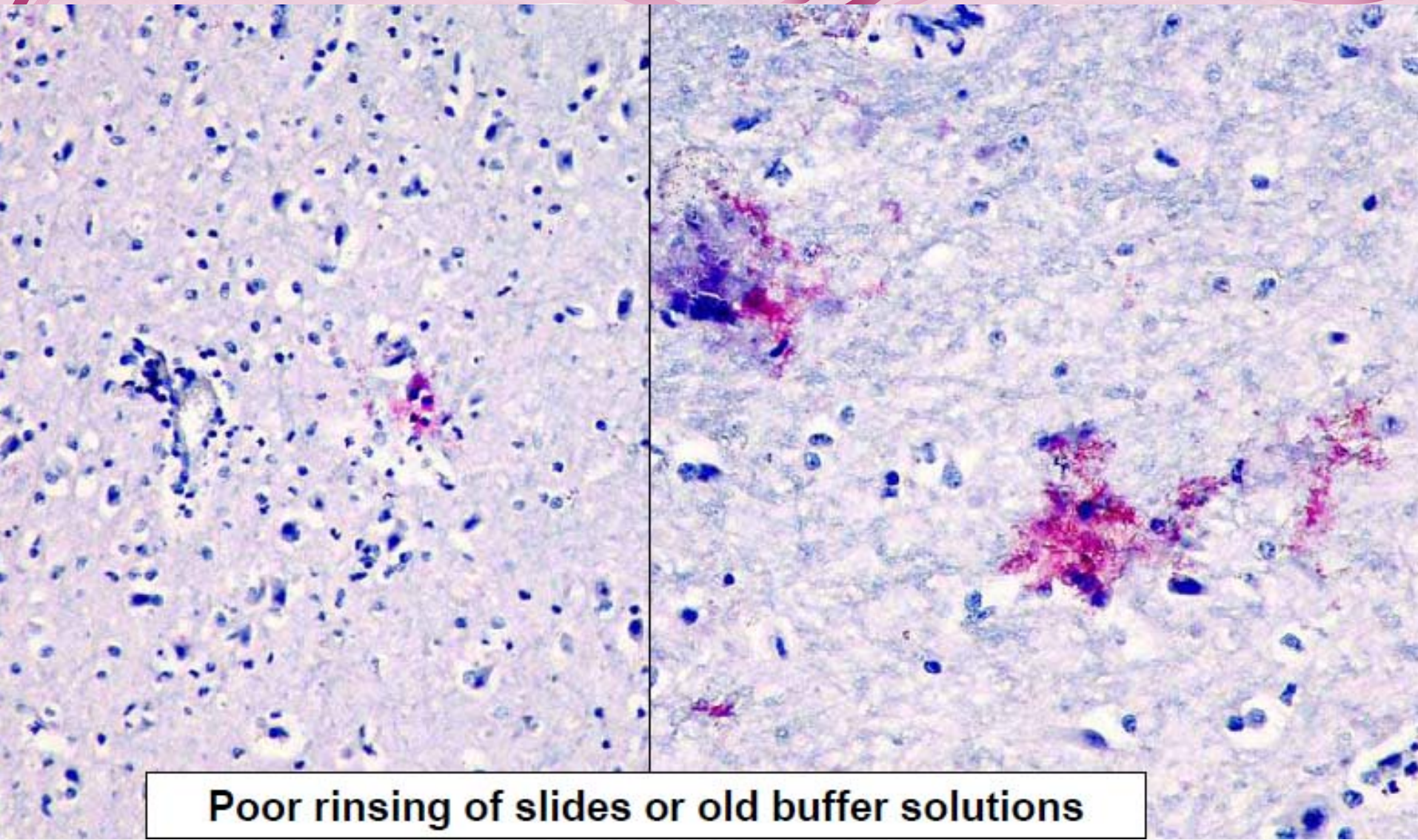
Precipitati	Non sono confinati nelle cellule, ma appaiono sparsi casualmente
Artefatti tissutali	Sezioni troppo spesse o piegate (reagenti “intrappolati” tra gli strati cellulari o nelle pieghe)
Artefatti cellulari	Cellule necrotiche, frantumate, soggette ad autolisi, tessuti emorragici
Drying artifacts	Evaporazione dei reagenti; mancanza di positività o colorazione marrone (DAB) diffusa
Scarsa fissazione	Scarsa positività nelle aree centrali e forte nelle parti periferiche
Contaminazione batterica	Aggregati sparsi granulari di deposito di cromogeno; piano focale diverso



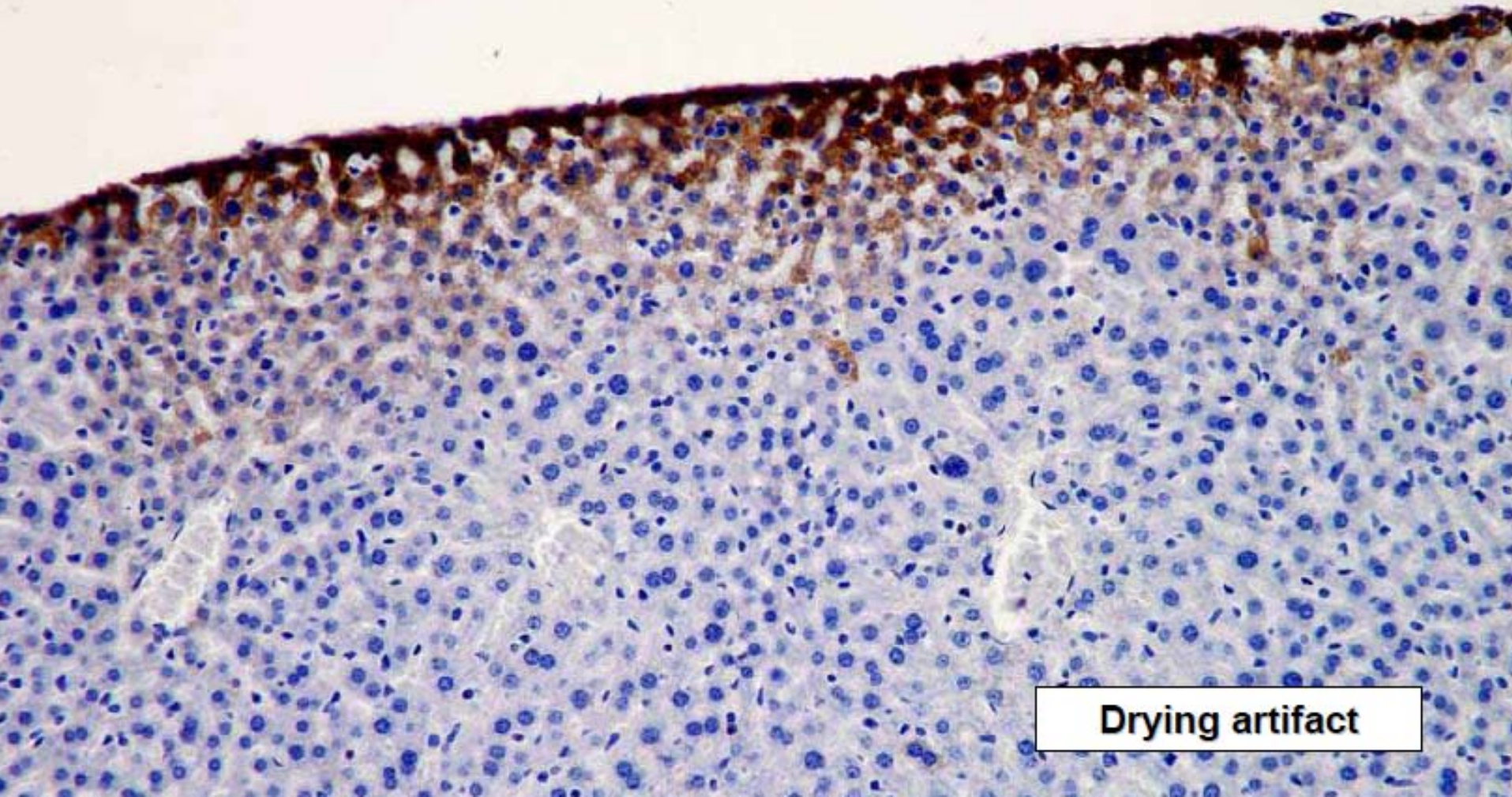
Blunt blade artifact



Tissue bubble artifact and poor cover-slipping



Poor rinsing of slides or old buffer solutions



Drying artifact



Drying and air bubble artifact





Tissue fold artifact