

# FASI DELL'IMMUNOISTOCCHIMICA

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

Inibizione degli enzimi endogeni

Smascheramento antigenico

Saturazione dei siti  
di legame aspecifici

Ab primario

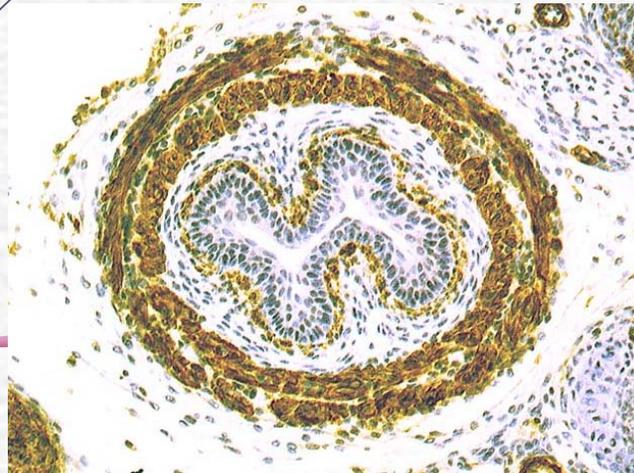
Ab secondario

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)

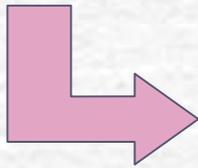
## **Metodi di inibizione della perossidasi endogena:**

- 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%...**

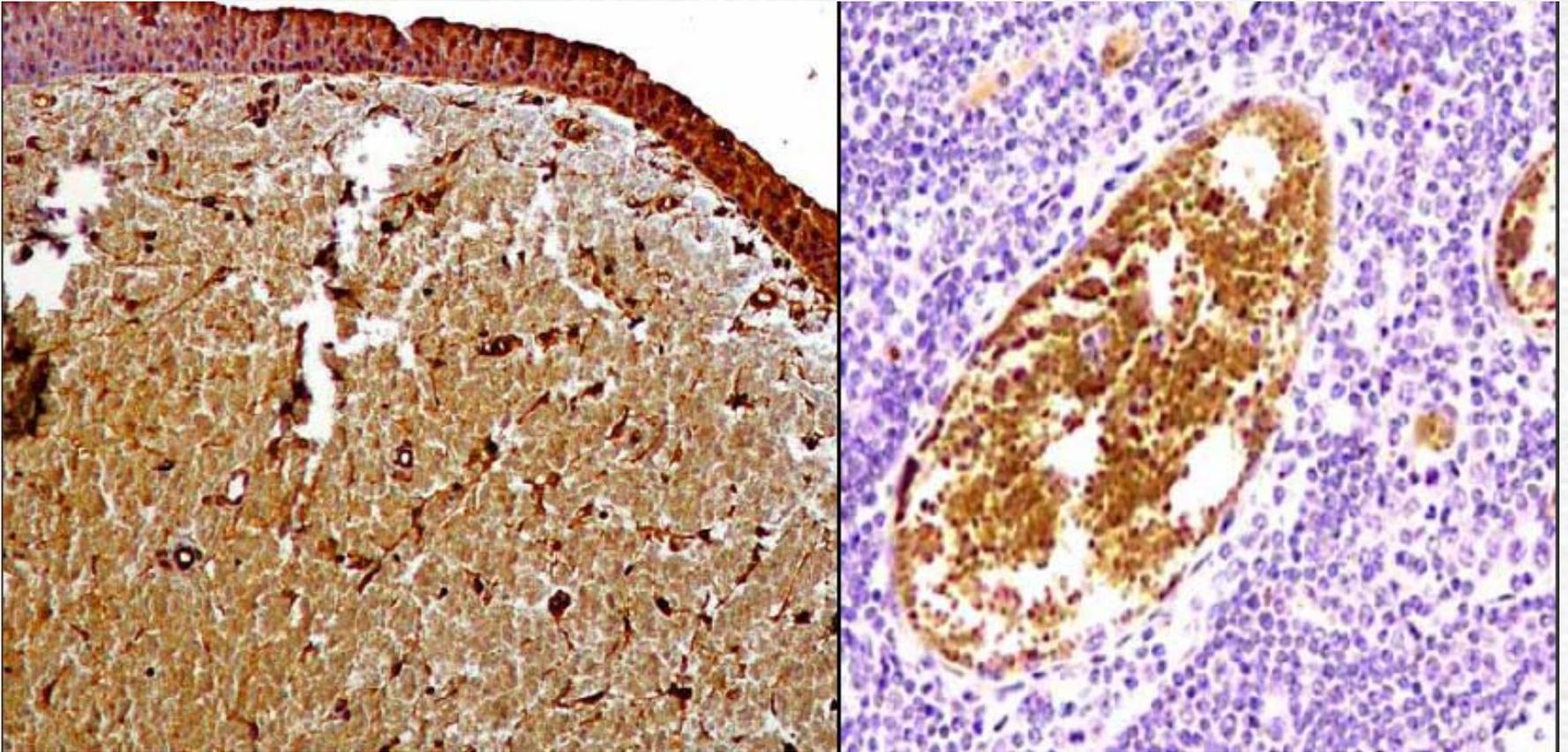


Eccesso di substrato pari a 100 vv. rispetto  
alla quantità richiesta per la reazione

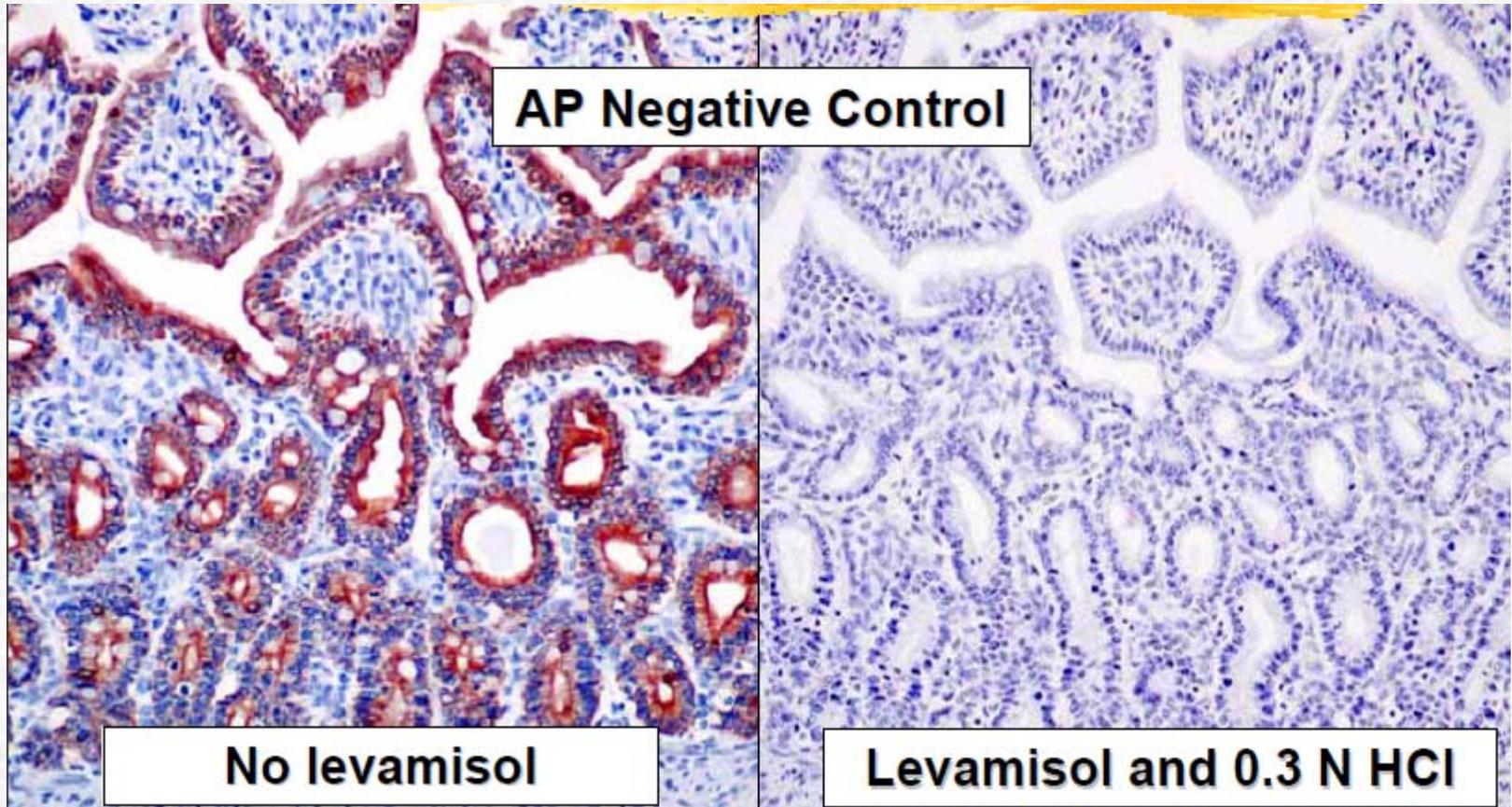


**Inibizione enzimatica  
da substrato**

## PEROSSIDASI ENDOGENA



# FOSFATASI ALCALINA ENDOGENA



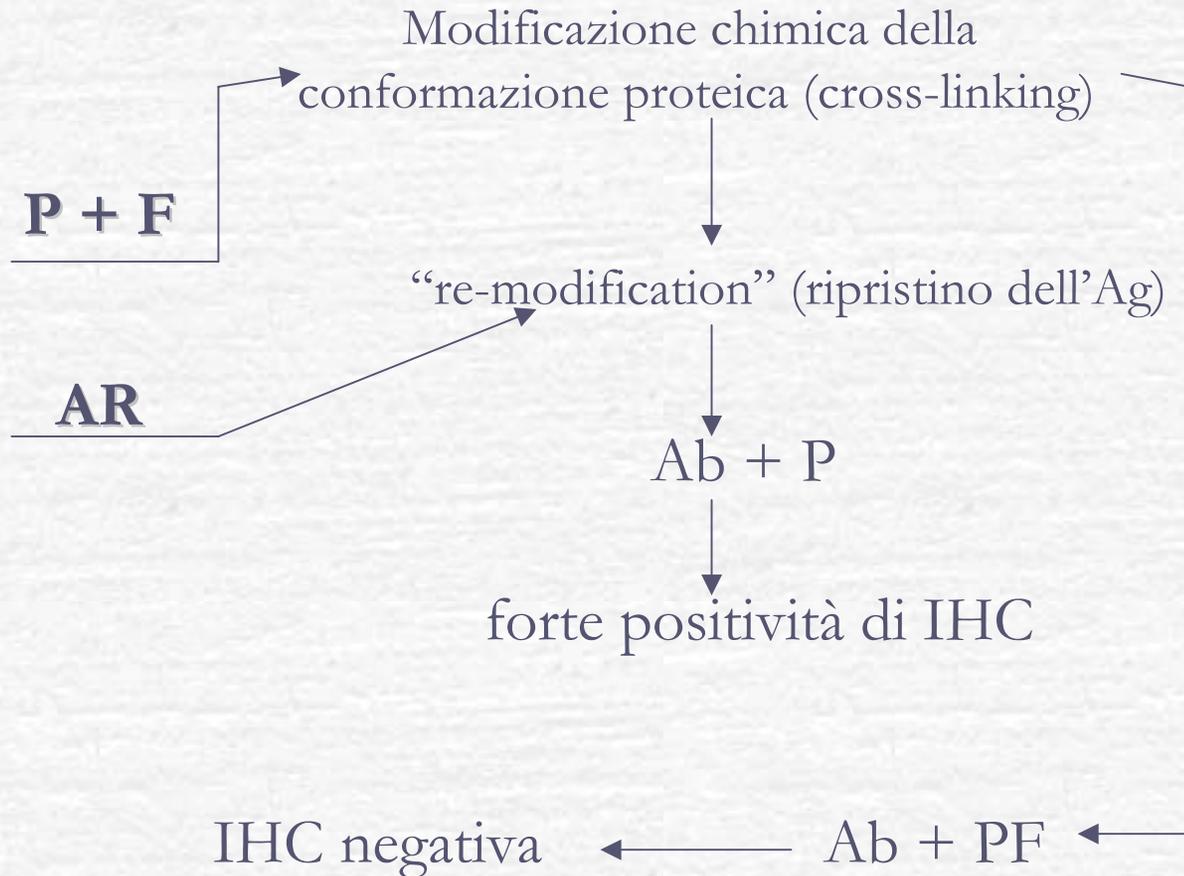
# ***SMASCHERAMENTO ANTIGENICO*** ***(antigen retrieval)***

Eccessiva stabilizzazione  
del tessuto in reattivi aldeidici

Mascheramento  
dei determinanti  
antigenici

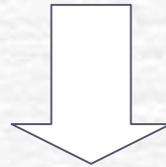
- ☛ **Trattamento proteolitico**
- ☛ **Trattamento termico**

# *“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

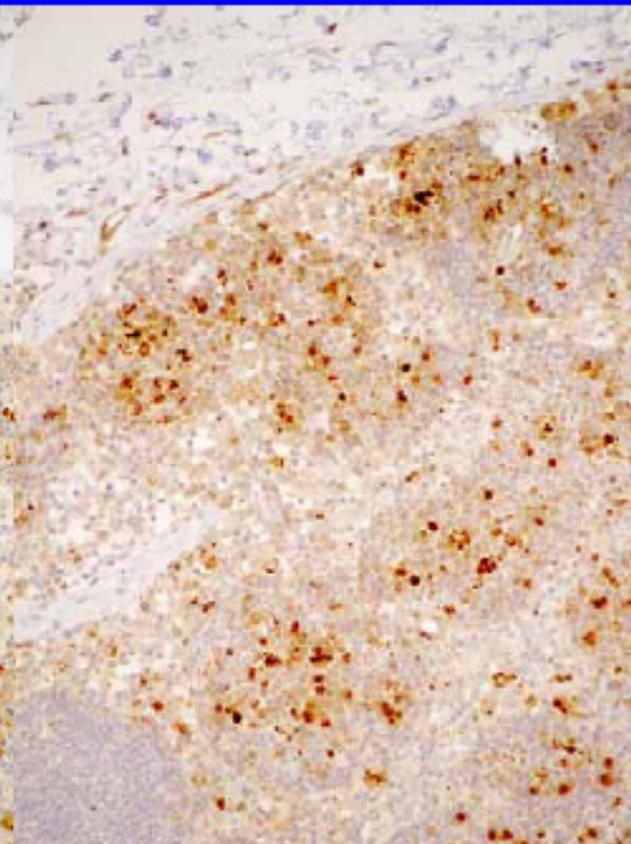
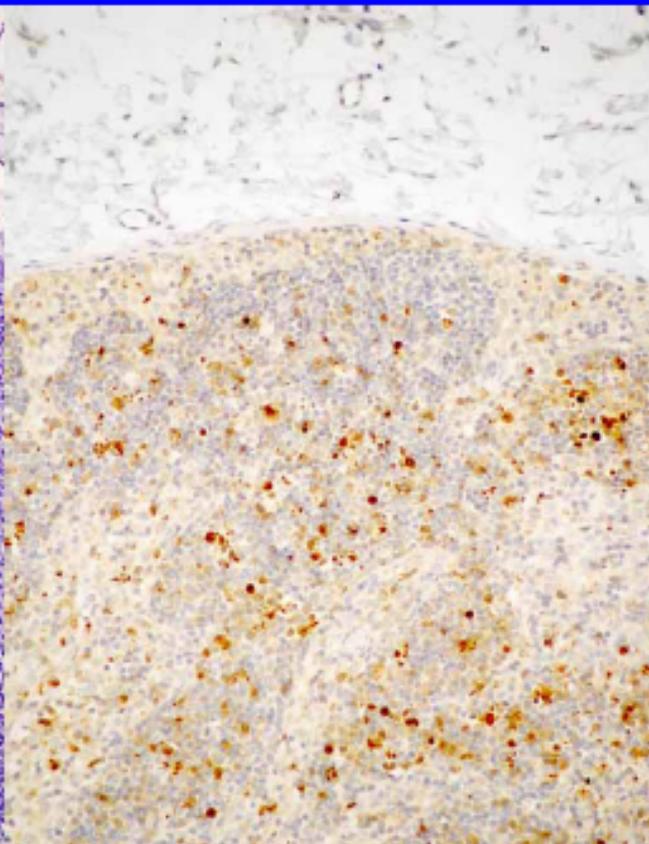
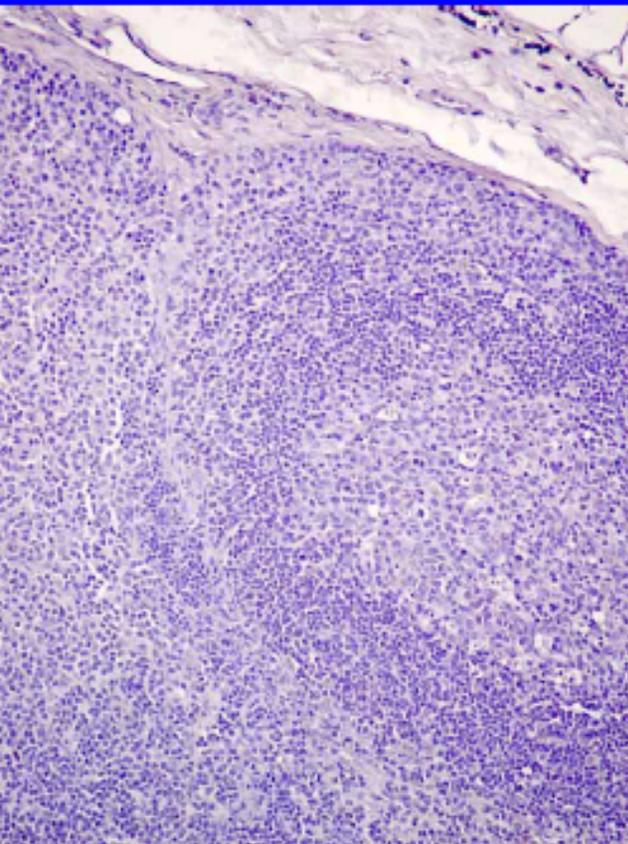
# Heat Retrieval and Protein Digestion

Lysozyme staining in the lymph node

no retrieval

proteinase K

trypsin



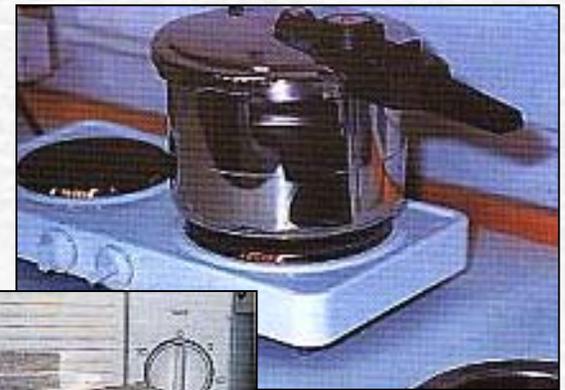
## Uso di alte temperature

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!!!!

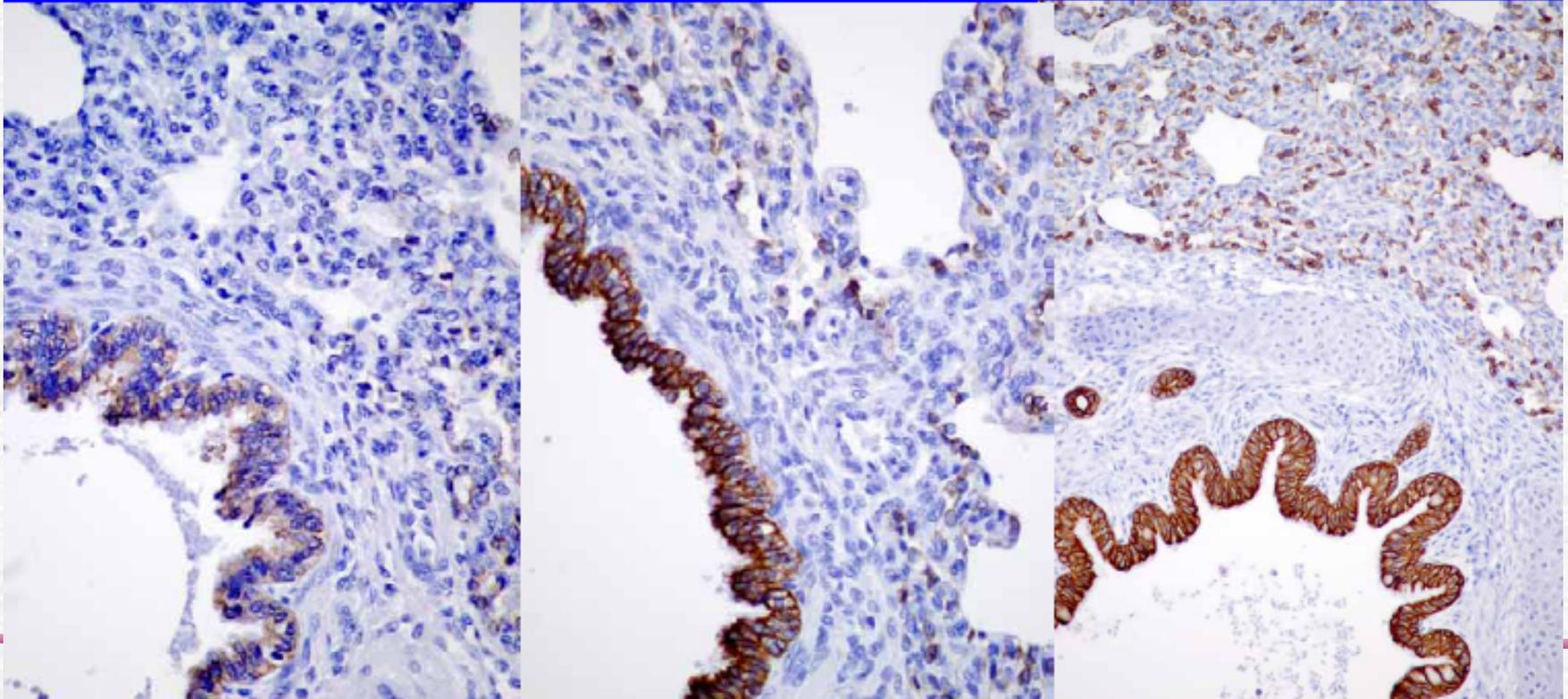
# Influence of Temperature on Antigen Retrieval

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

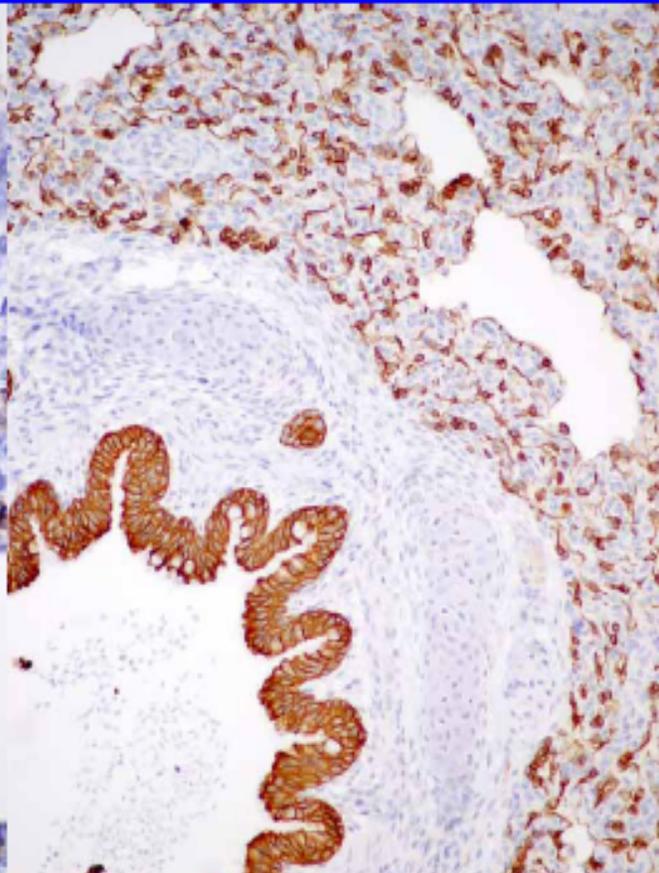
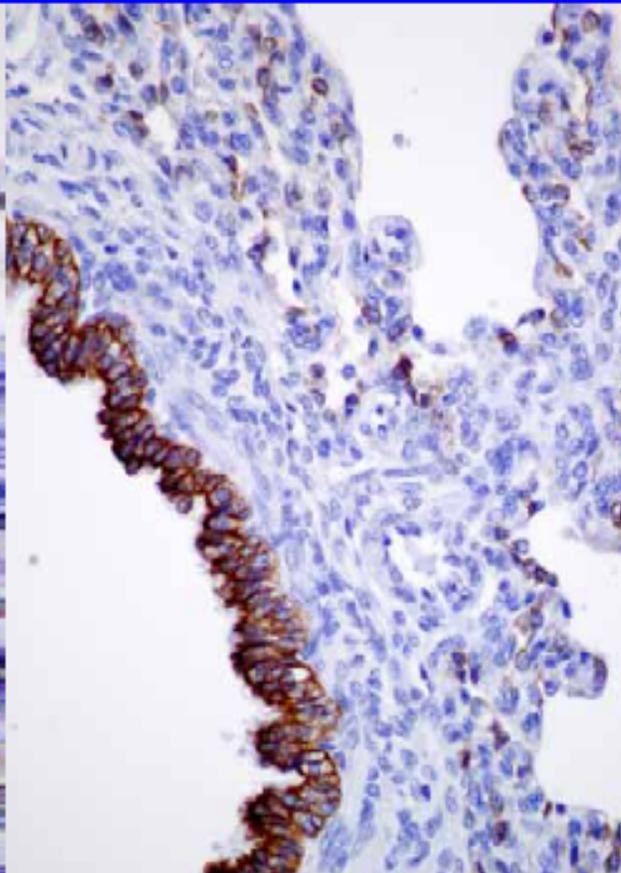
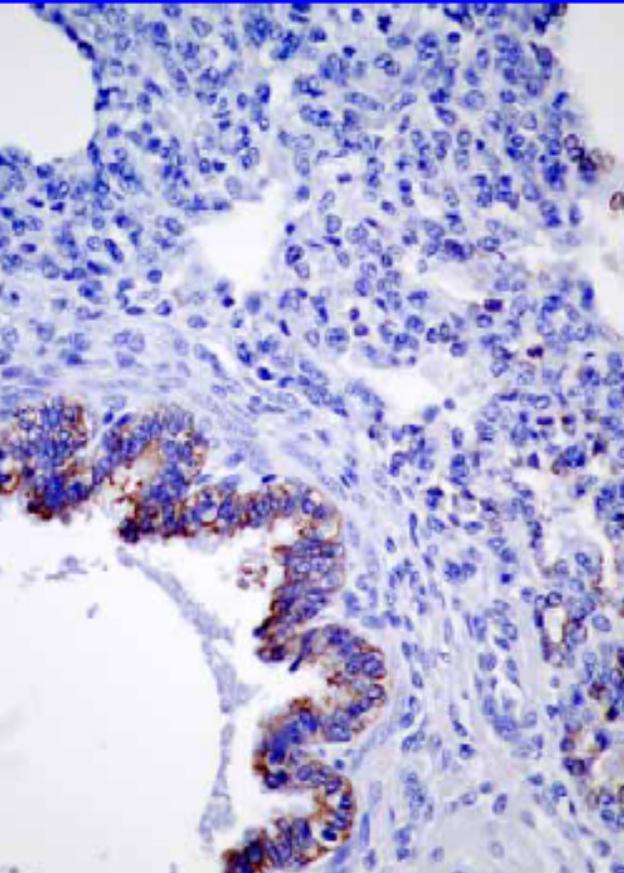
# Influence of pH on Antigen Retrieval

Cytokeratin AE1/AE3 staining in the lung

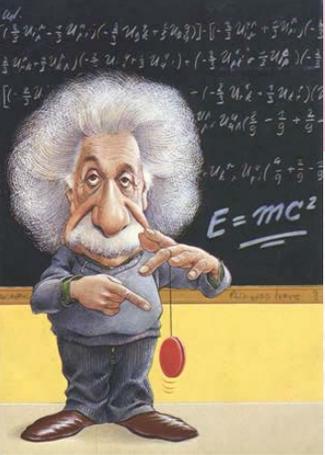
**pH4**

**pH7**

**pH9**



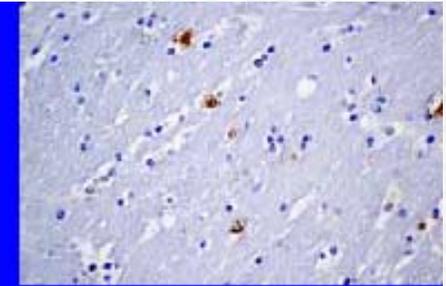
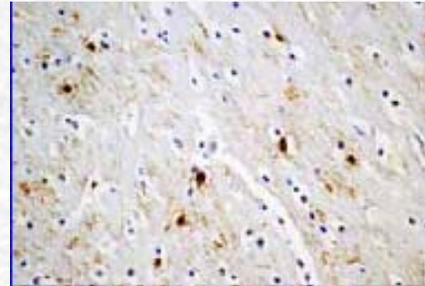
# TEST DI VALUTAZIONE DELLO SMASCHERAMENTO ANTIGENICO (es.: proteina S100)



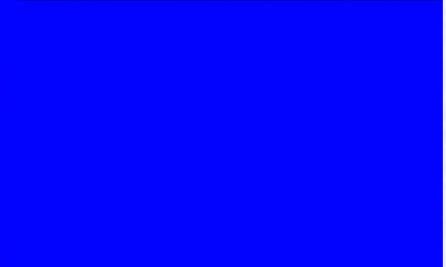
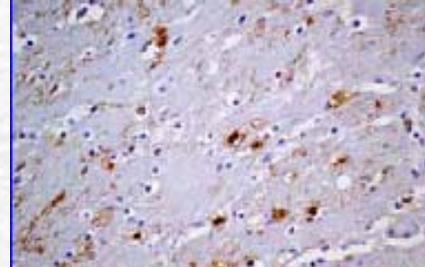
100°C per 15 min

NO trattamento  
con calore

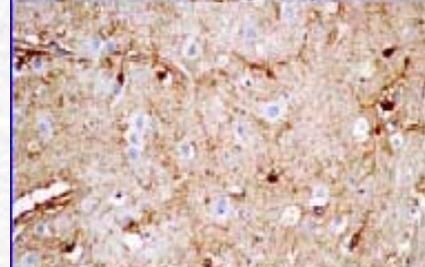
Basso pH



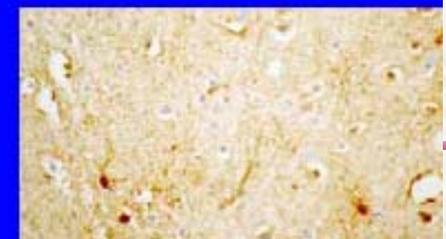
pH 6-7



EDTA, pH 10



Proteinase K



## ***SATURAZIONE DEI SITI DI LEGAME ASPECIFICI***

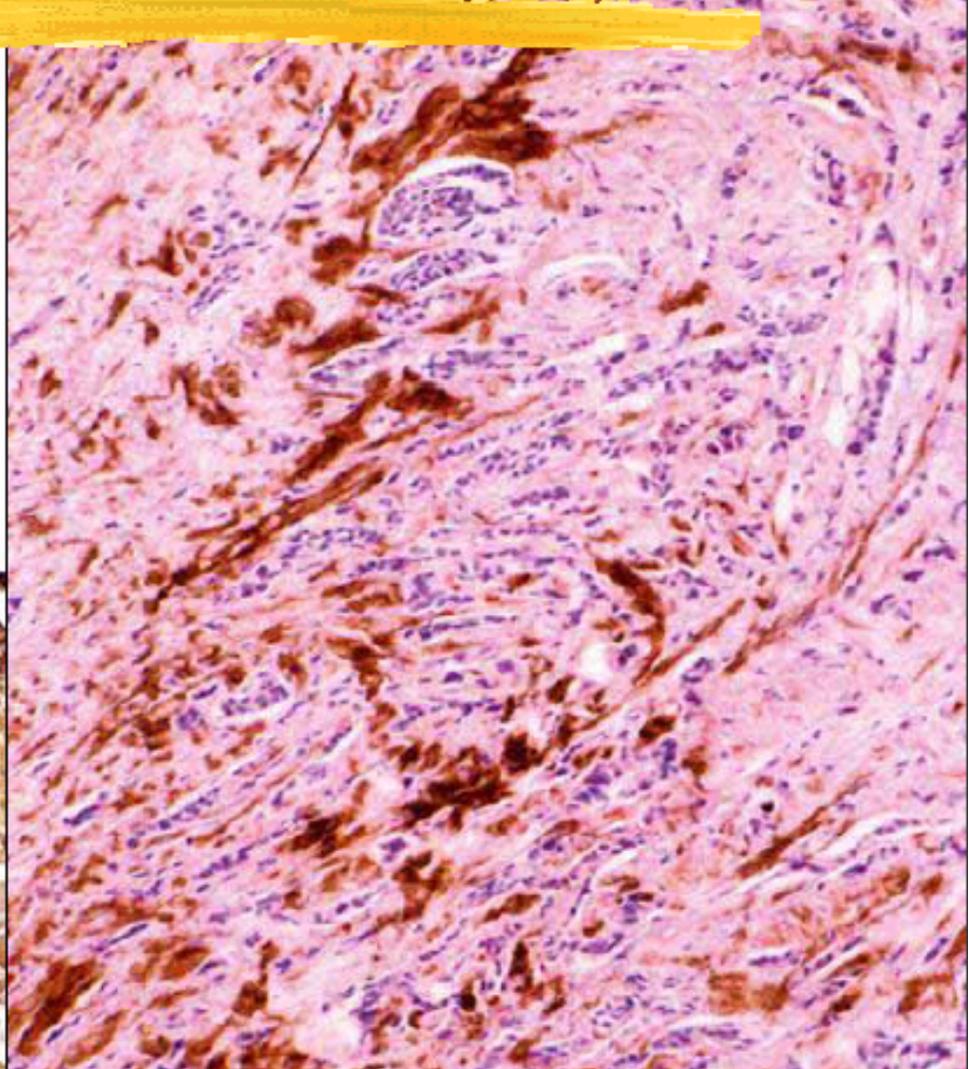
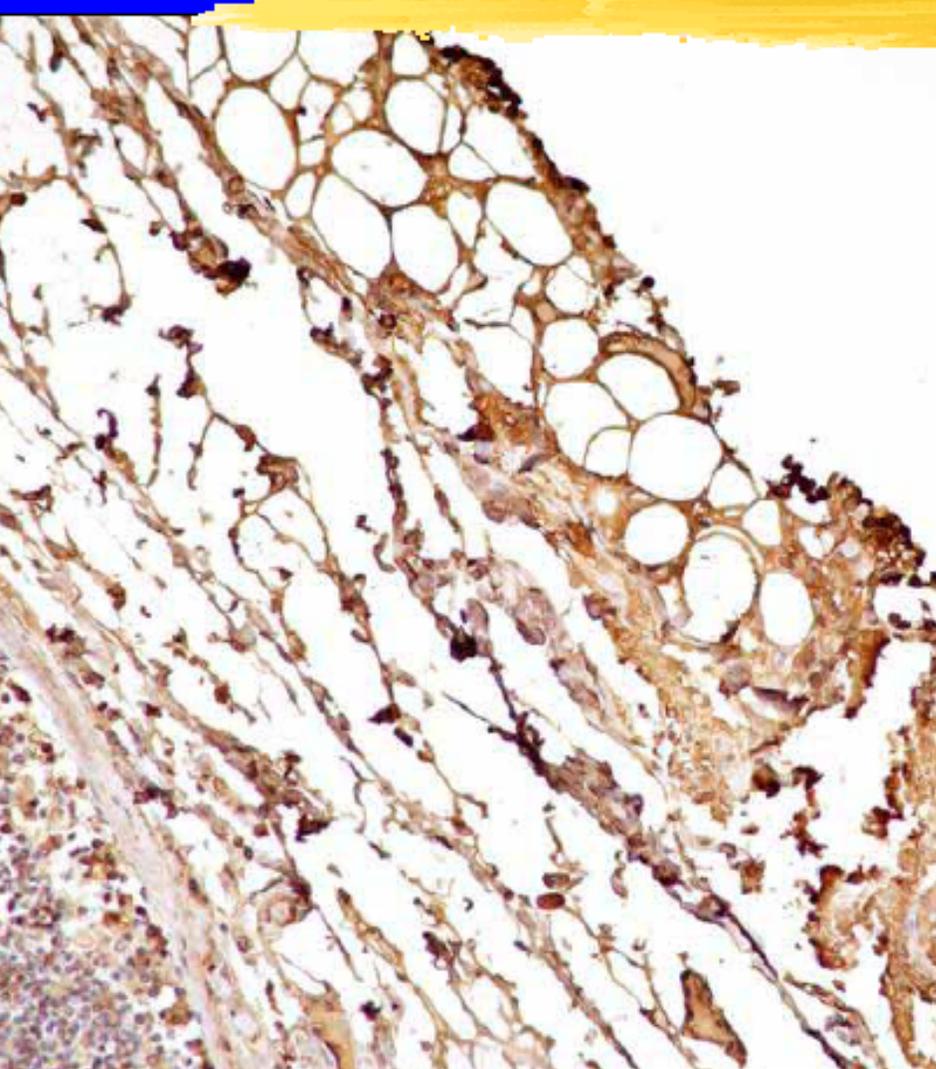
***Colorazione di fondo aspecifica*** (background)=  
colorazione

positiva del campione che non deriva dal legame Ag-Ab

Cause:

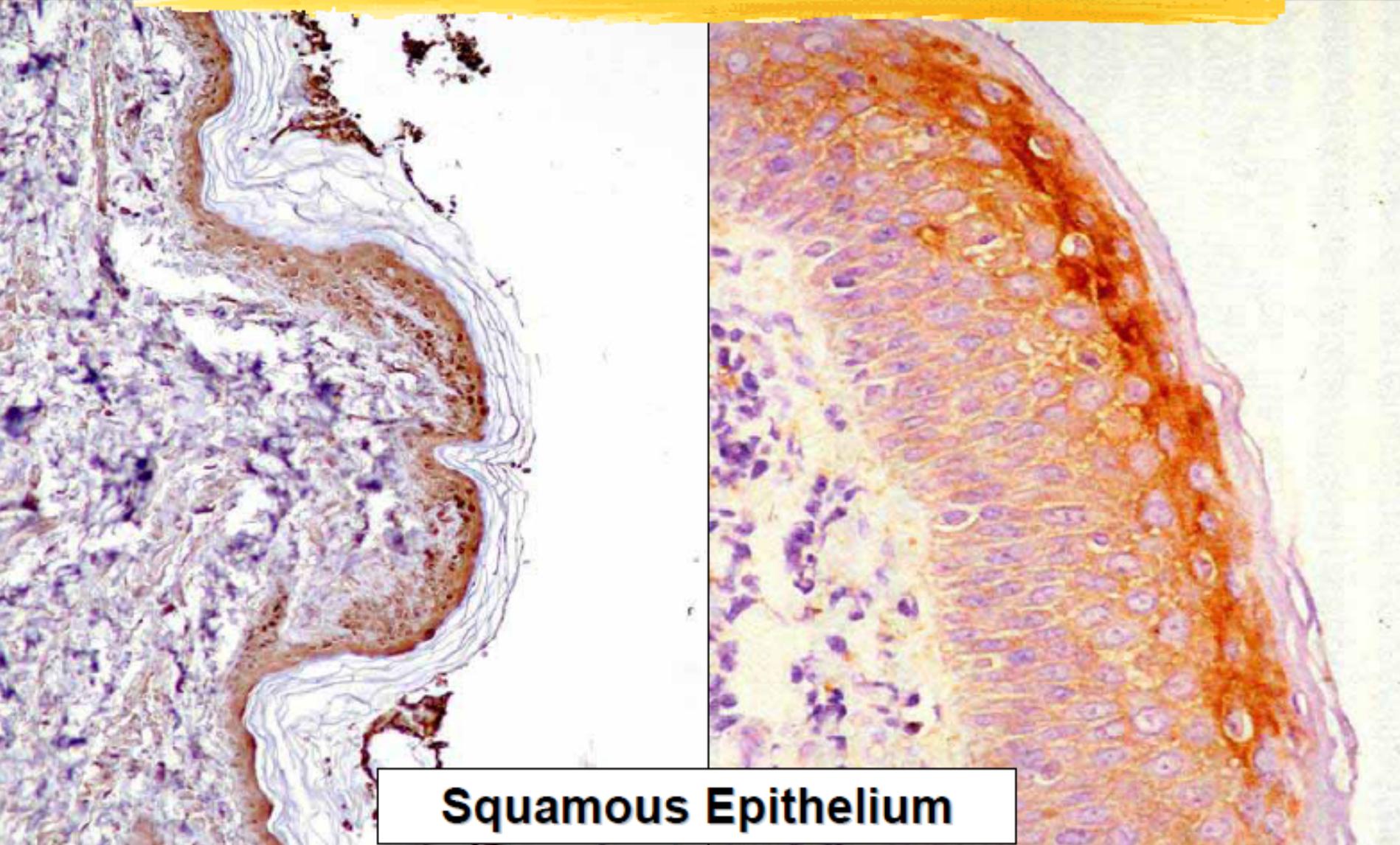
- Interazioni ioniche ed elettrostatiche tra Ab e elementi con carica opposta del tessuto (es: collagene, endotelio)
- interazioni idrofobiche tra Ab e componenti del tessuto (+++ collagene, elastina, adipociti, epitelio squamoso)

# Hydrophobic Interaction



**Collagen**

# Hydrophobic Interaction



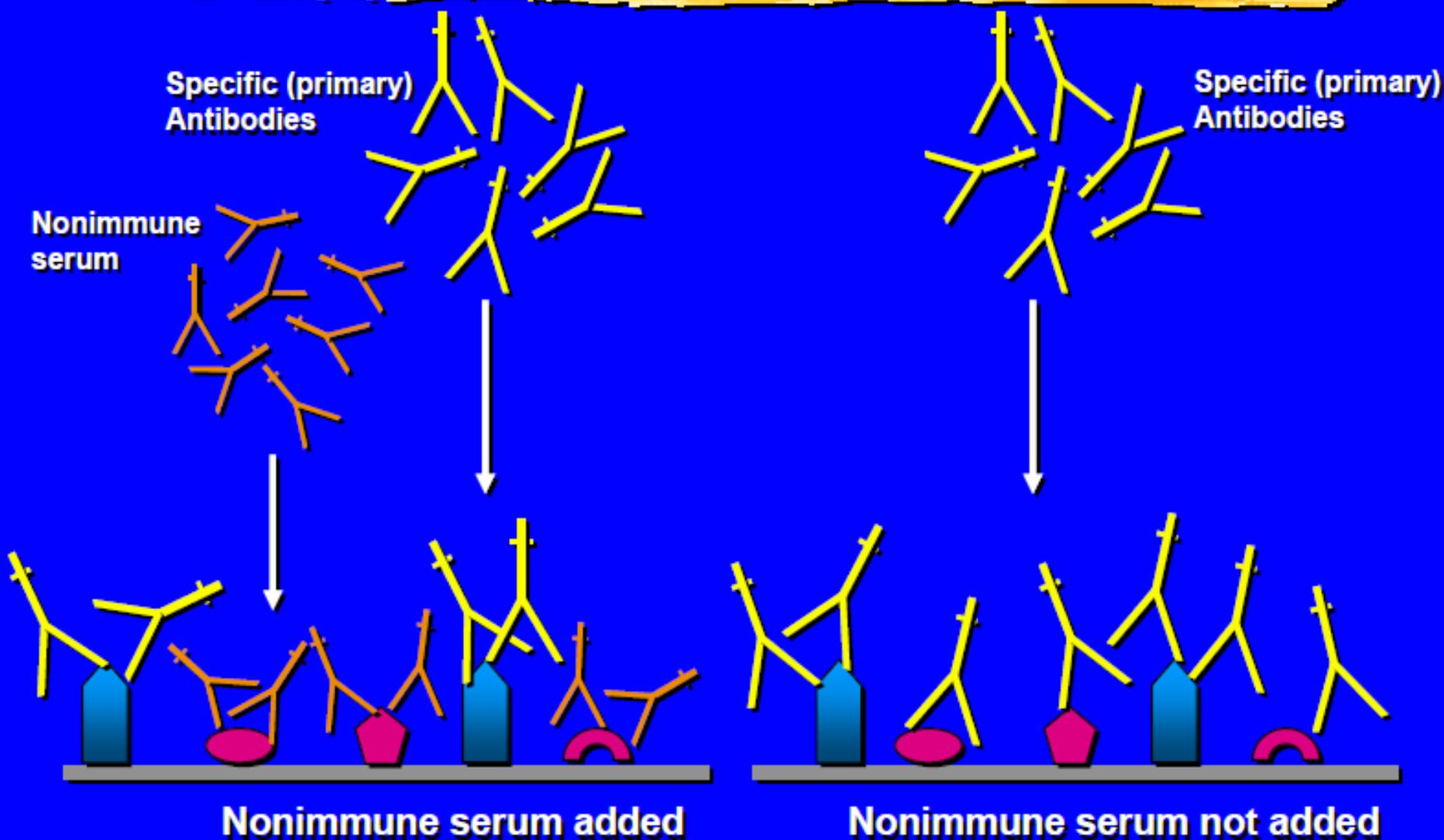
**Squamous Epithelium**

## *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.....

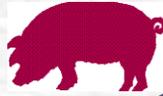
**NO** risciacquo con tampone dopo il blocking:

- 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



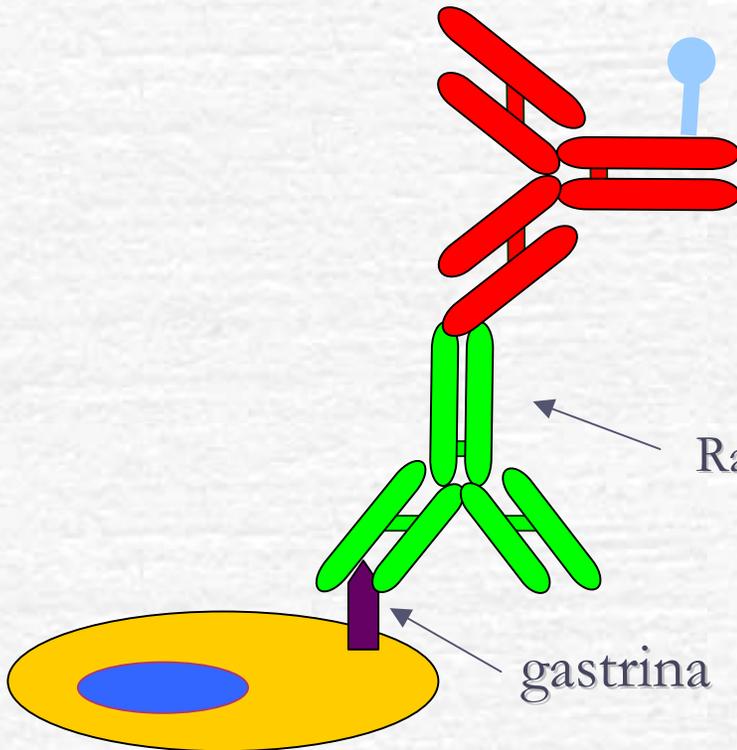
Biotinylated swine anti-  
rabbit IgG



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***

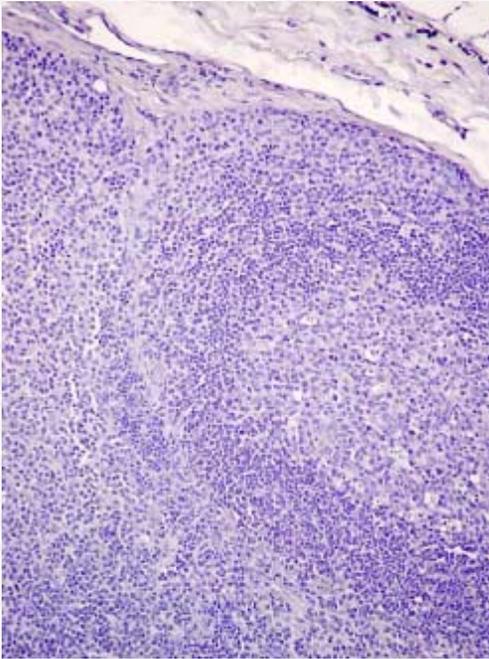
- ✓ Substrato della reazione
- ✓ Donatori di elettroni, danno origine ad un prodotto di reazione finale colorato
- ✓ Localizzazione dell'Ag mediante la formazione di un precipitato vicino al punto in cui è avvenuta la reazione

# 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

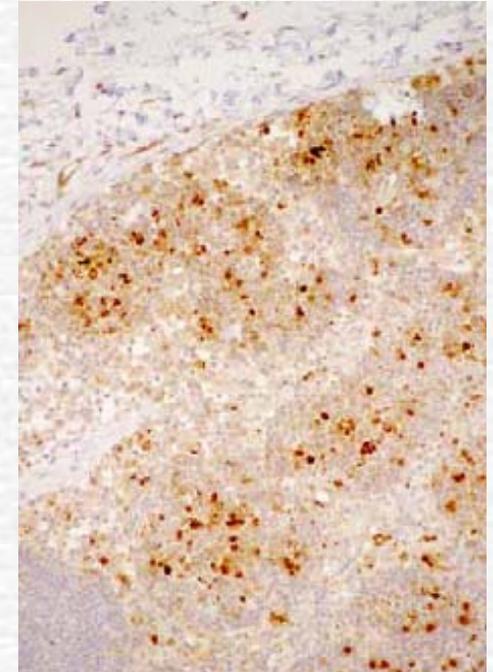


Fattori chiave:

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



BACKGROUND STAINING



## Processazione del campione:

### 1) **AUTOLISI**

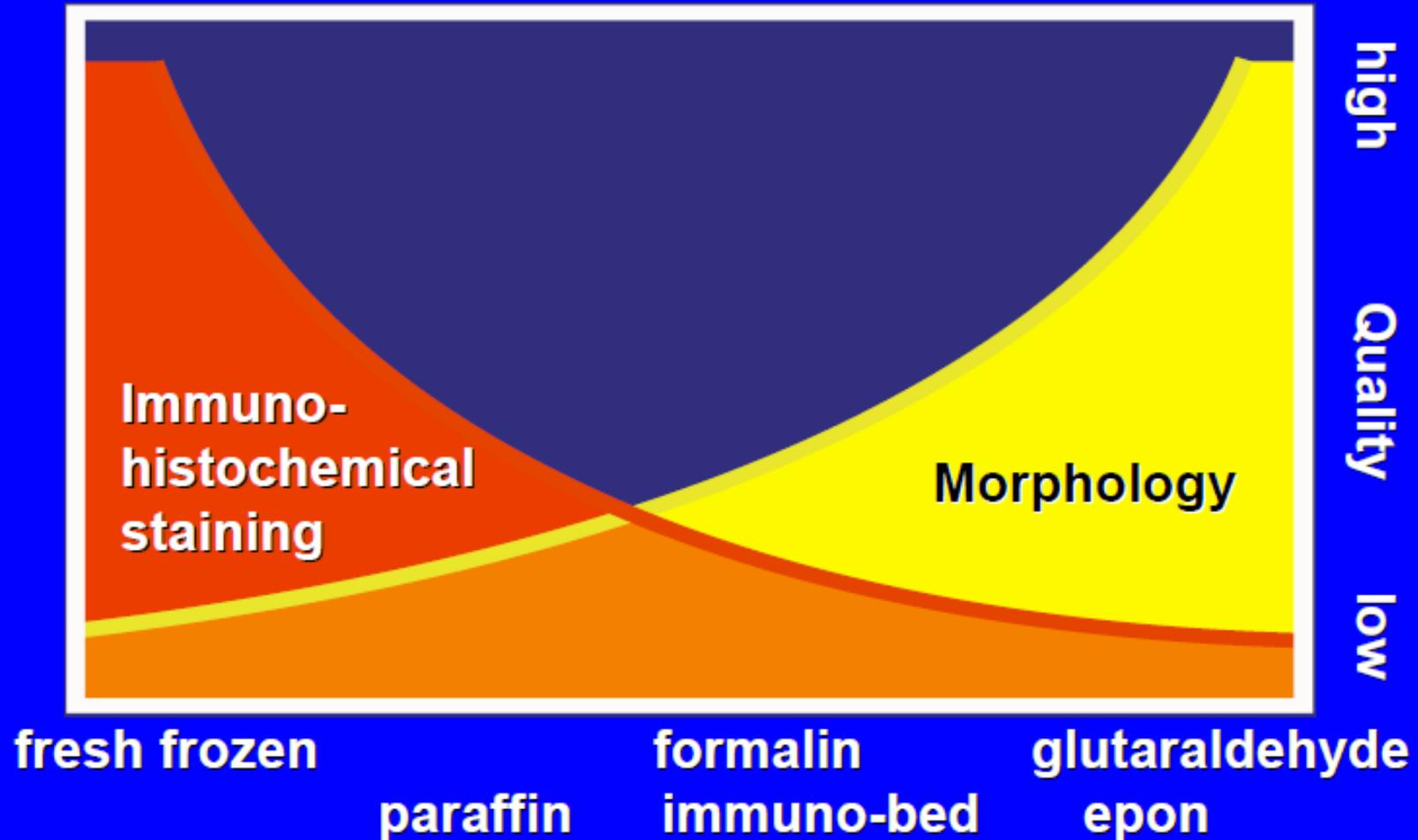
Effetti:

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

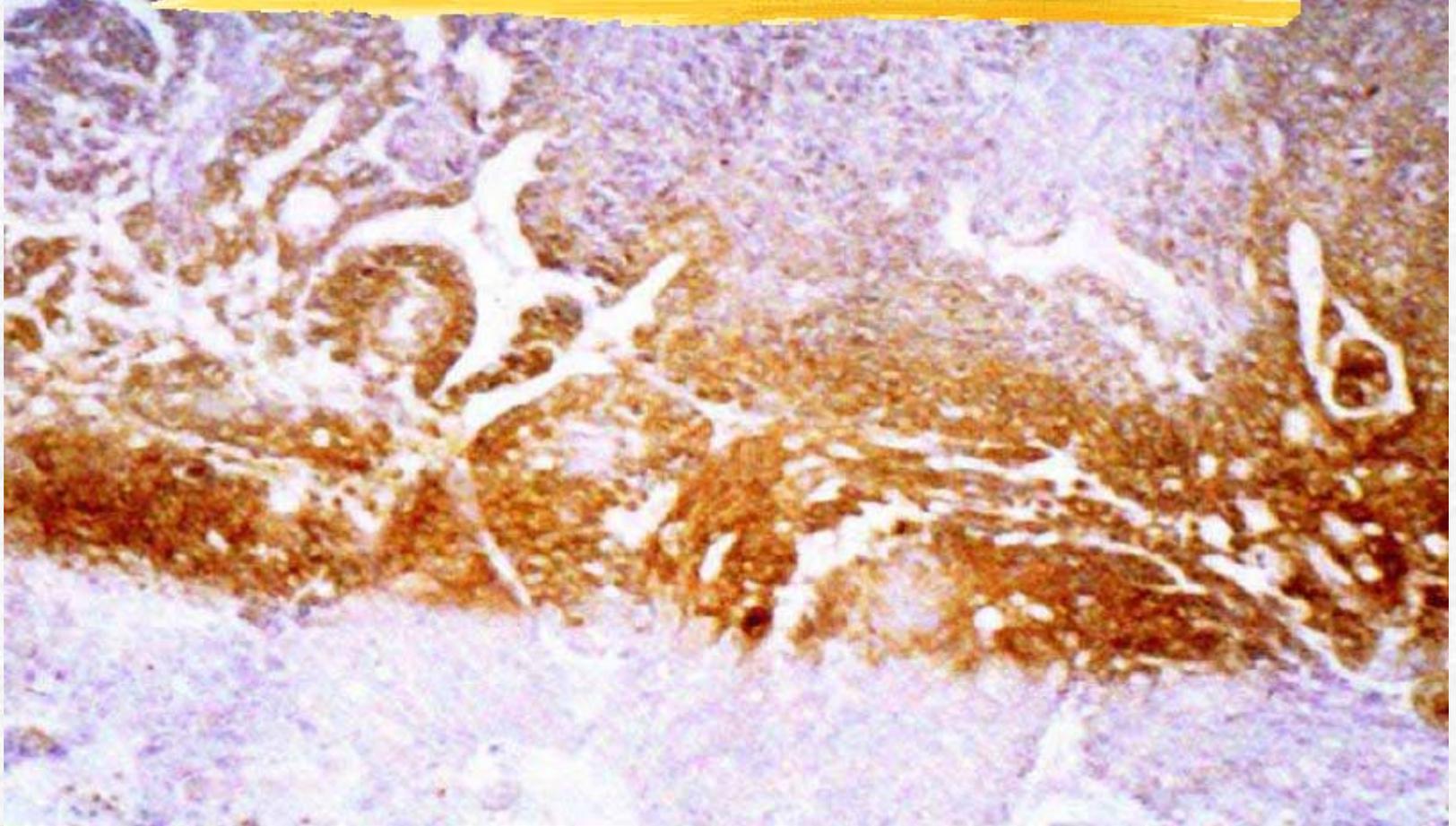
### 2) **Effetti della fissazione:**

- 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

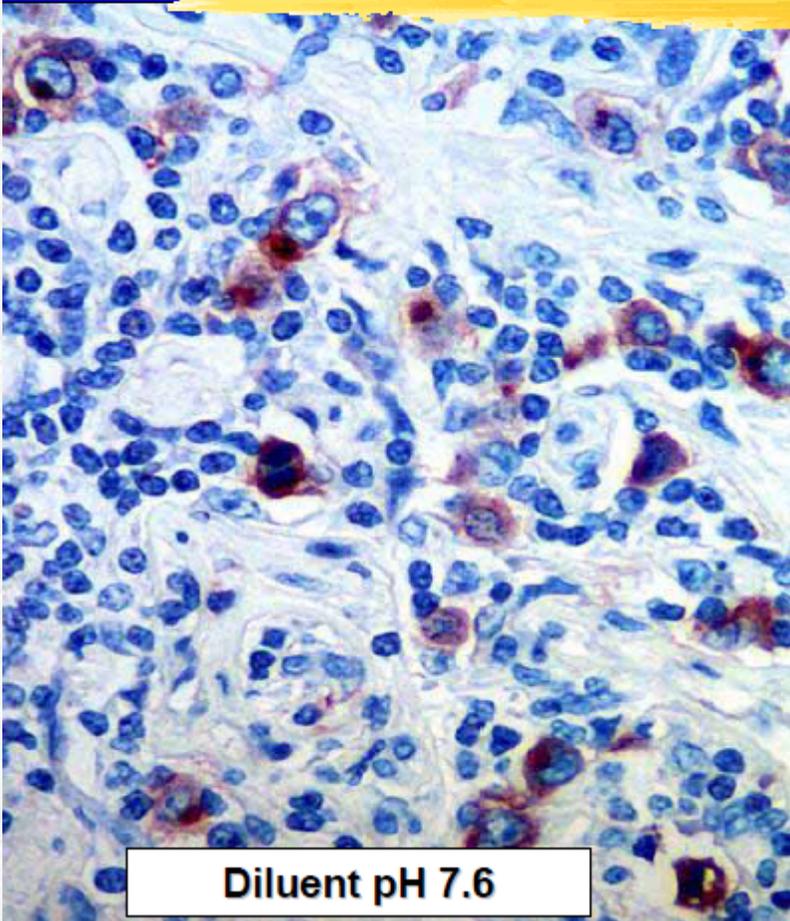
## FALSI POSITIVI:

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

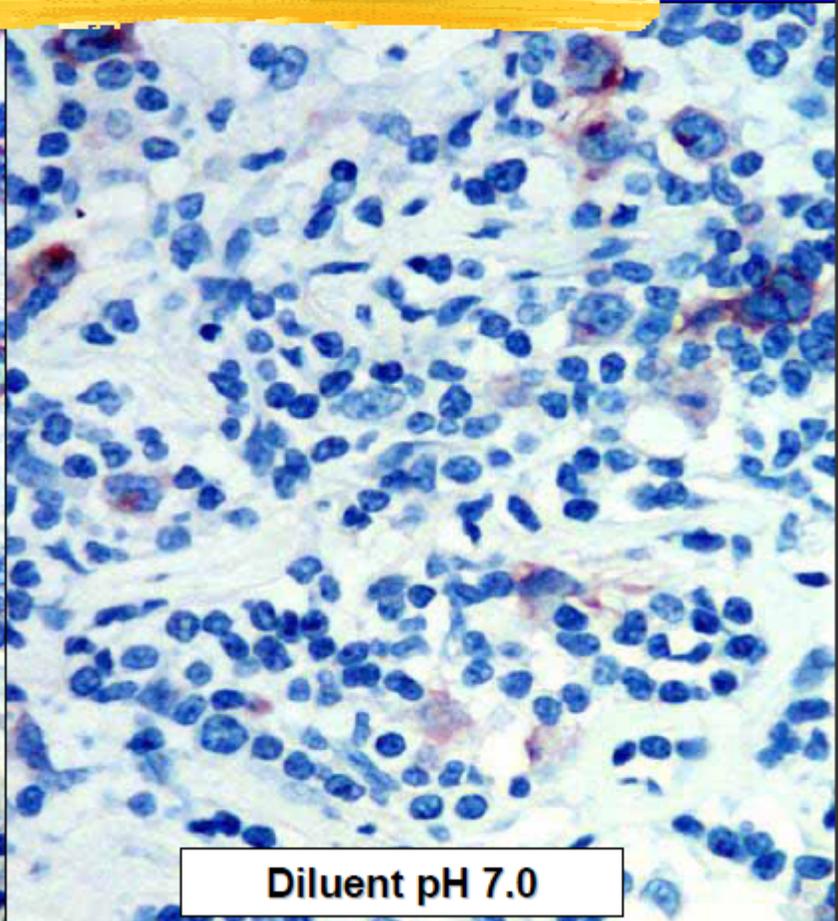
## SEGNALE DEBOLE

- Incubazione inadeguata
- Diluizione inadeguata

# The Role of the Antibody Diluent

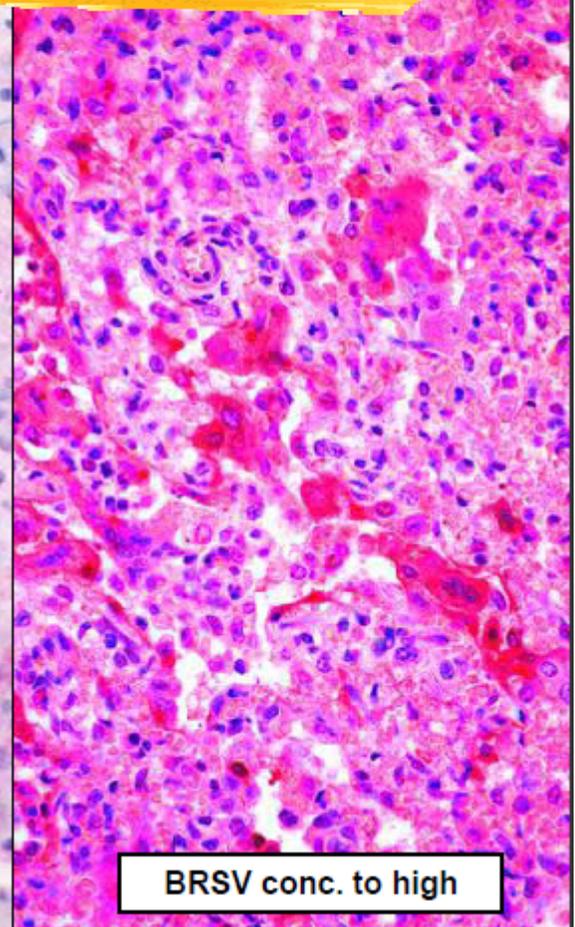
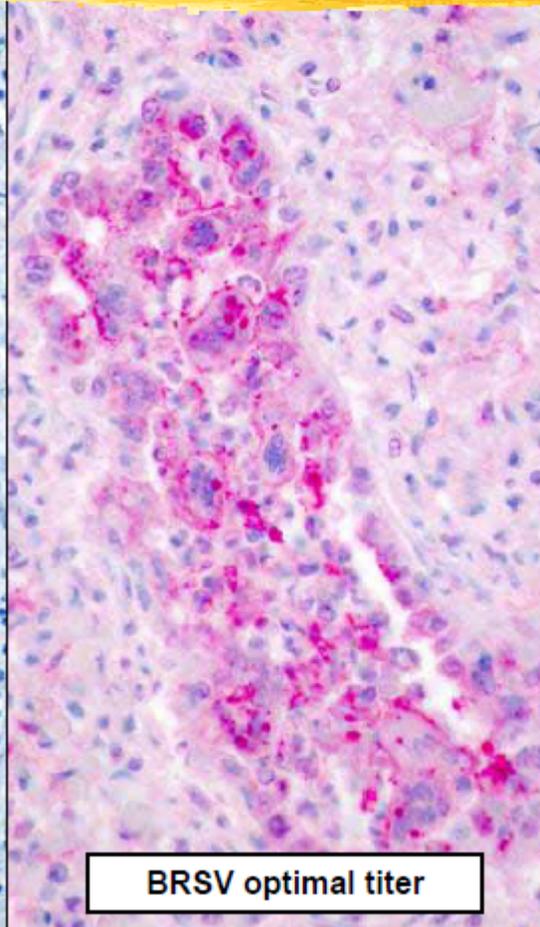
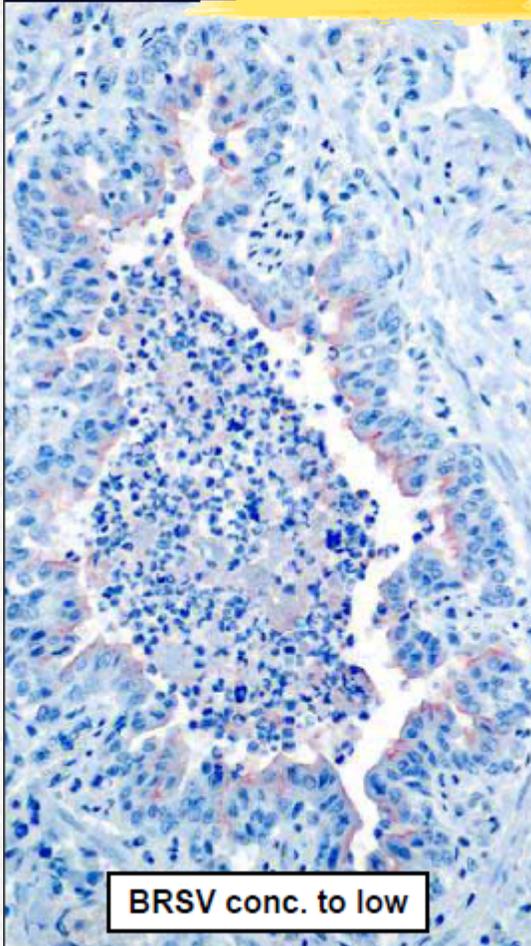


Diluent pH 7.6

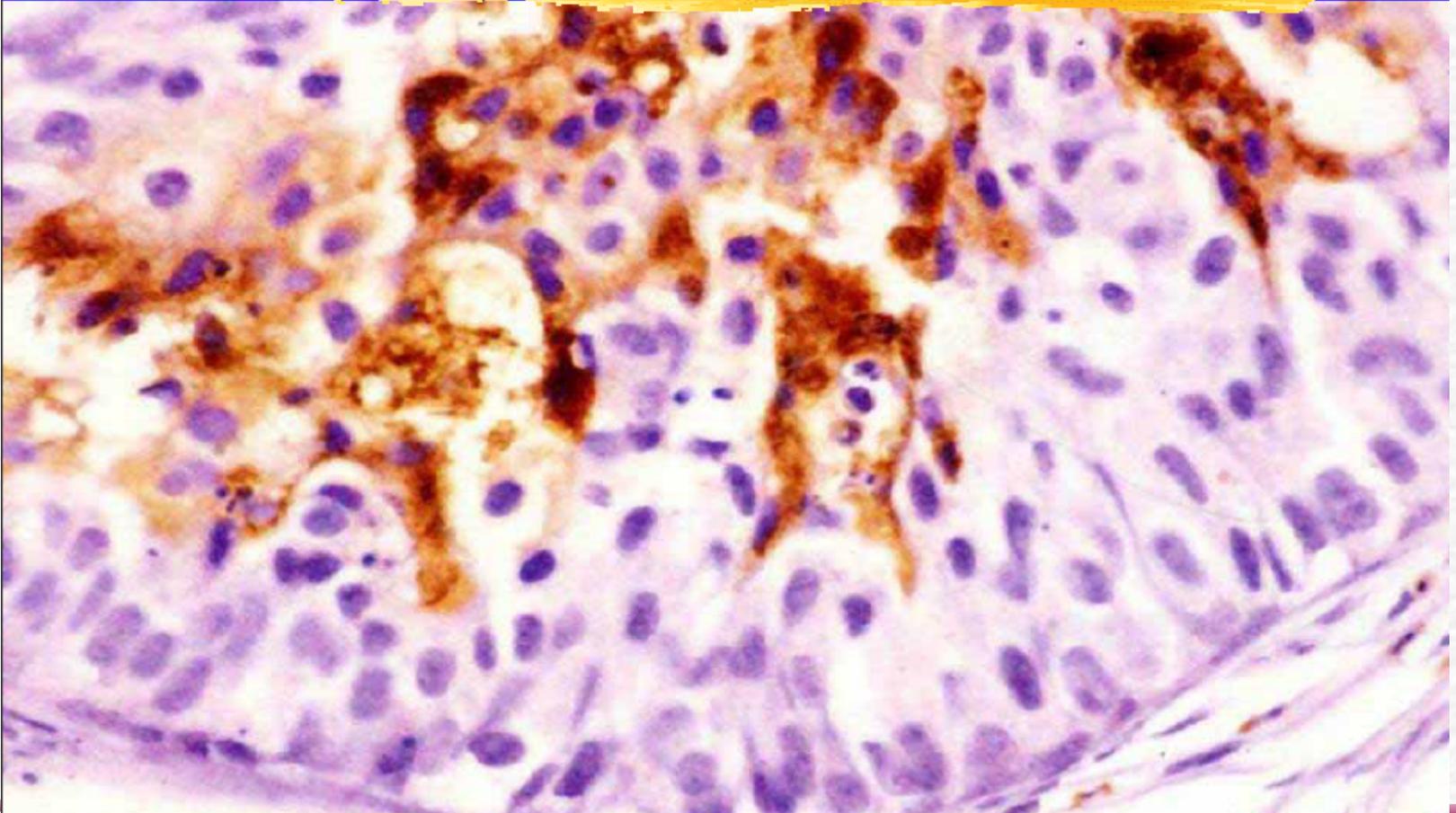


Diluent pH 7.0

# Inadequate Antibody Titration



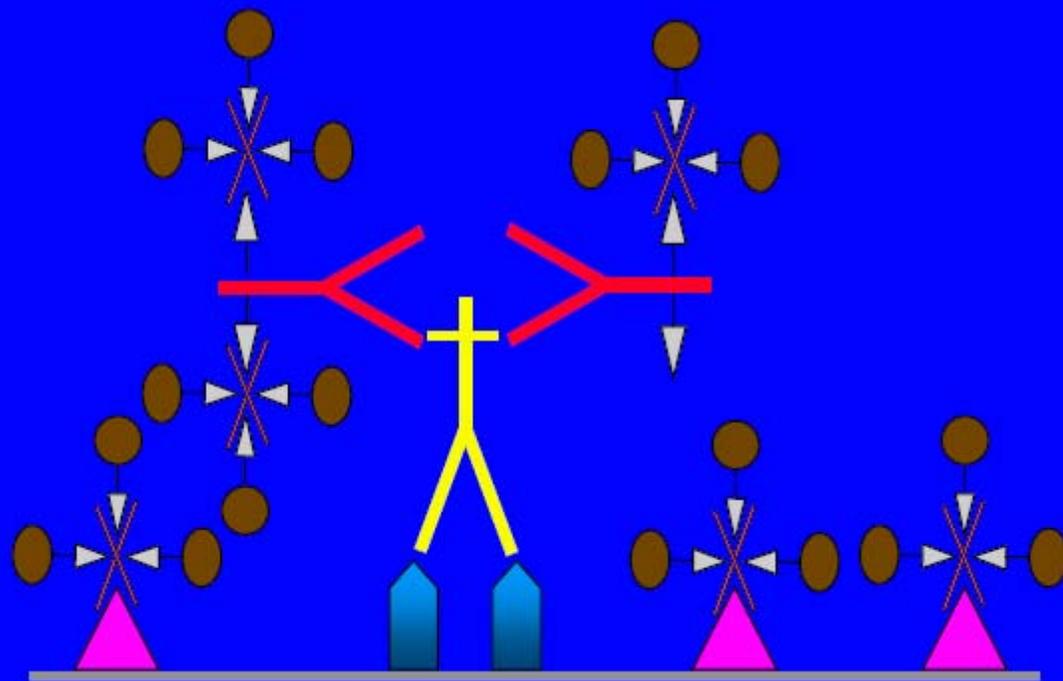
# Staining of Necrotic Debris



## BACKGROUND DOVUTO A....

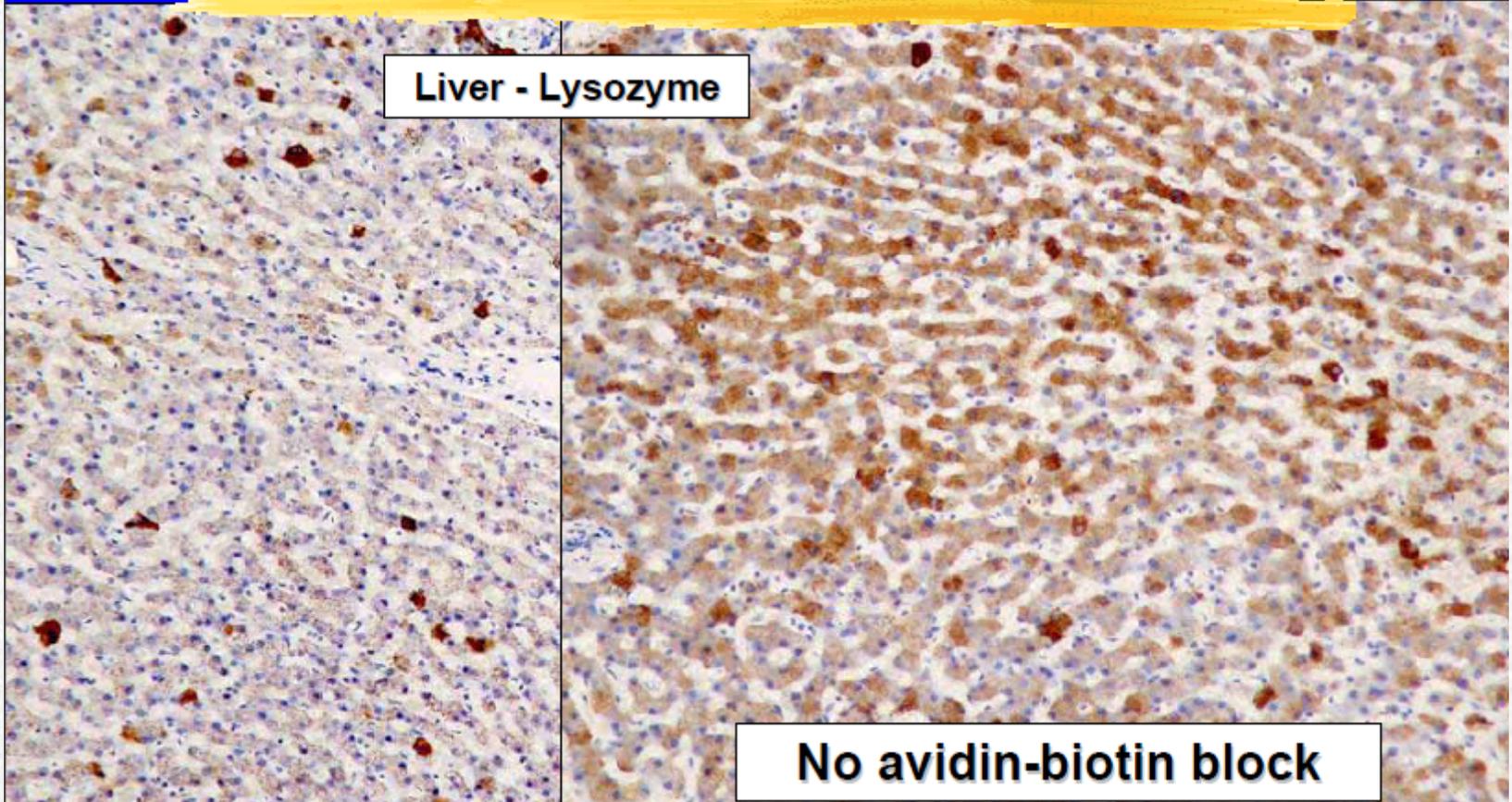
- 1)Attività endogena della perossidasi
- 2)Attività endogena della fosfatasi alcalina
- 3)Attività endogena della biotina-avidina
  - Biotina presente in fegato, polmone, rene, tessuto adiposo, cervello, mastociti; inclusi intranucleari in cellule neoplastiche; inclusi intranucleari in cellule endometriali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

# Endogenous Avidin-Biotin Activity

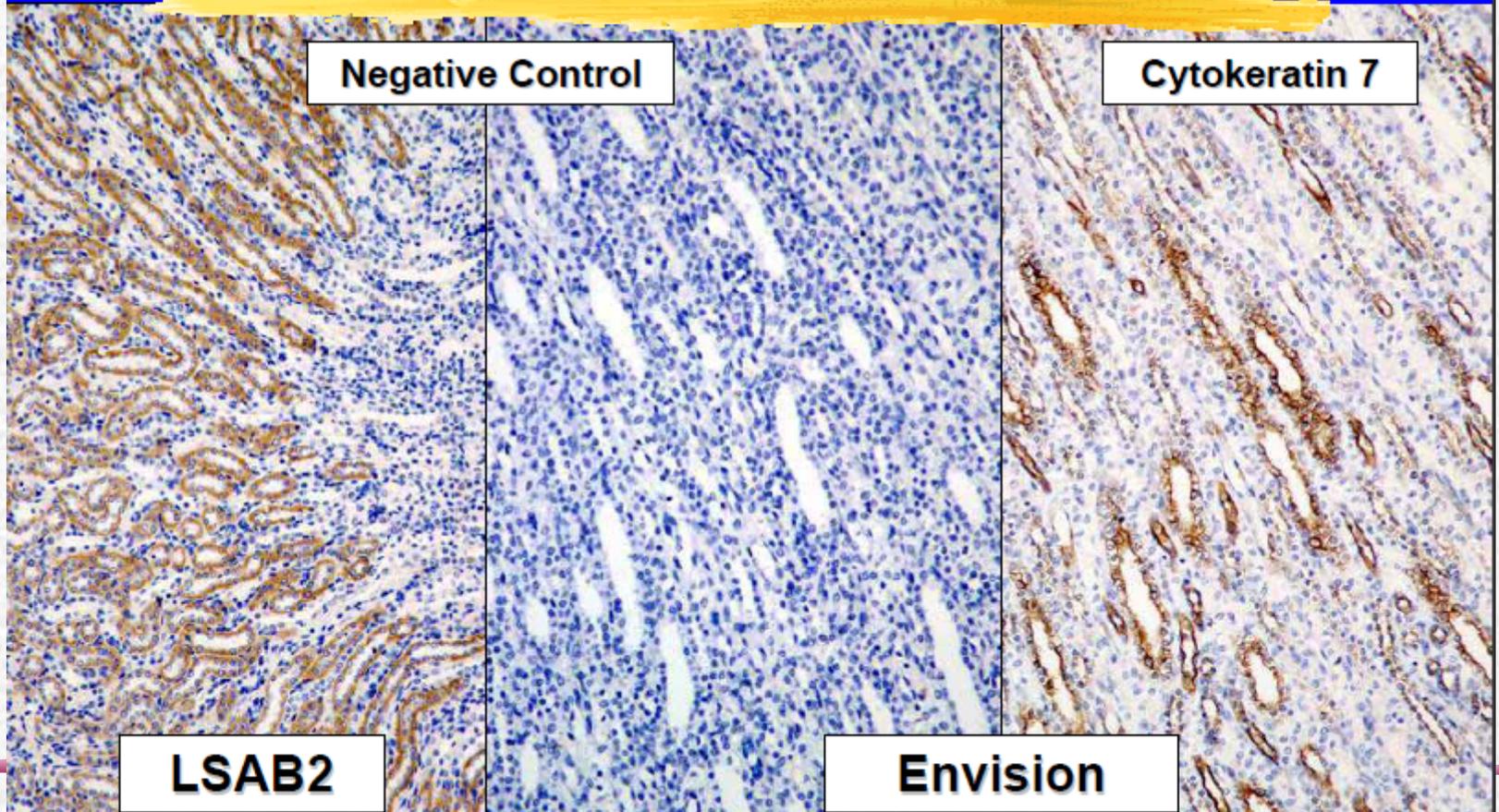


- X Avidin
- ➔ Biotin-antigen complex
- ➔ Biotin-antigen complex
- Y First Antibody
- Antigen
- ▲ Endogenous Biotin

# Endogenous Biotin Background

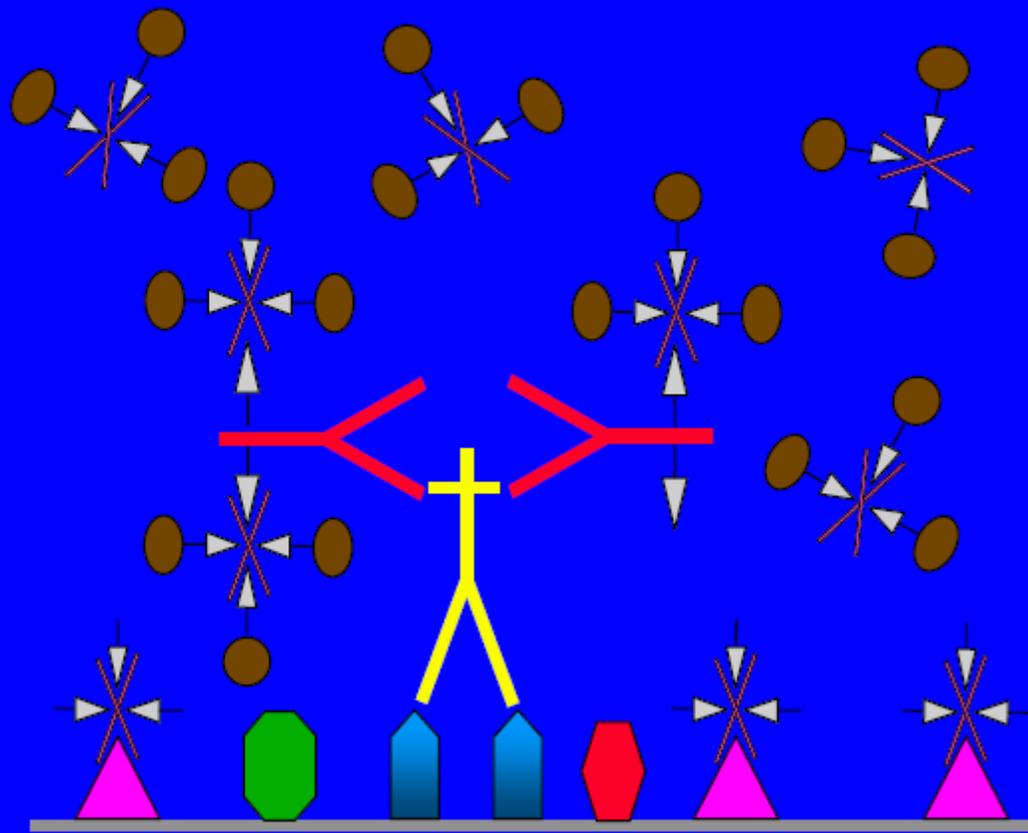


# Endogenous Biotin Background



# Preincubazione delle sezioni tissutali con avidina e biotina non marcate

## Blocking Endogenous Avidin Biotin Activity

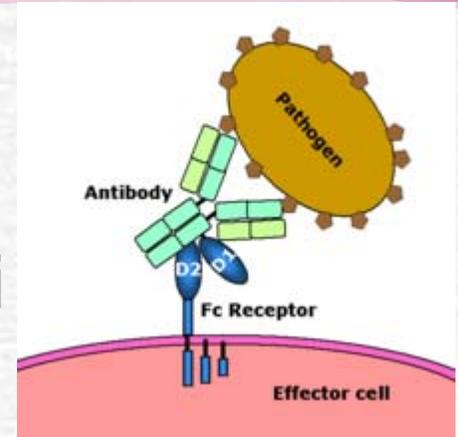


-  Avidin
-  Biotin-avidin complex
-  Biotinylated
-  First Antibody
-  Antigens
-  Endogenous Biotin

## ALTRE CAUSE DI BACKGROUND

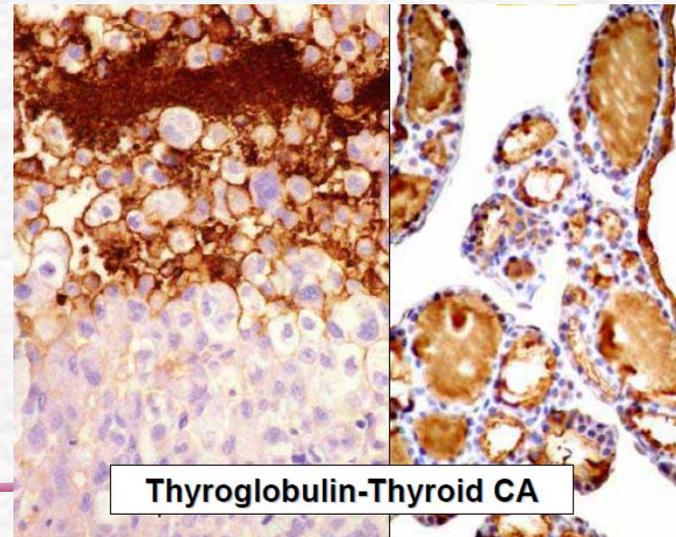
### **Recettori Fc:**

- ✓ 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



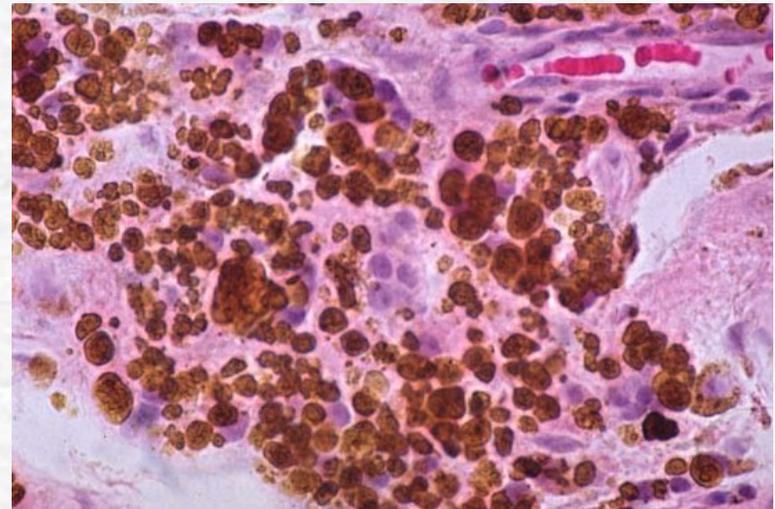
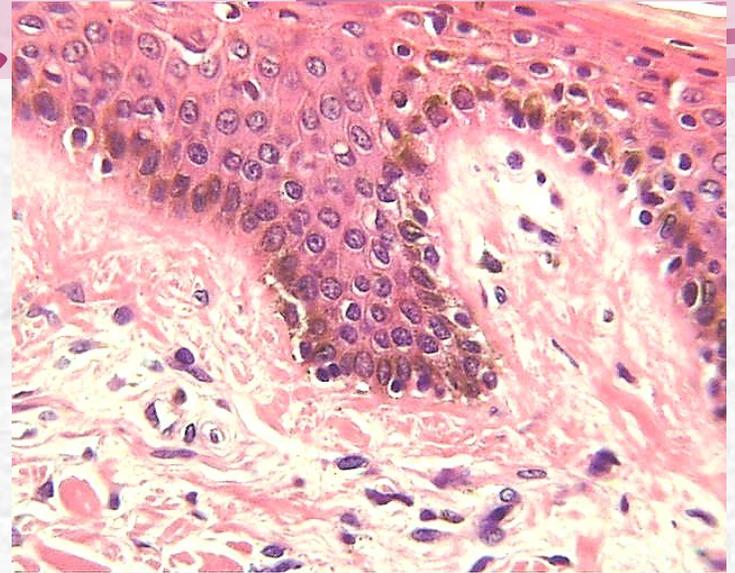
# Diffusione aspecifica del'Ag (sequestro)

- ✓ 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



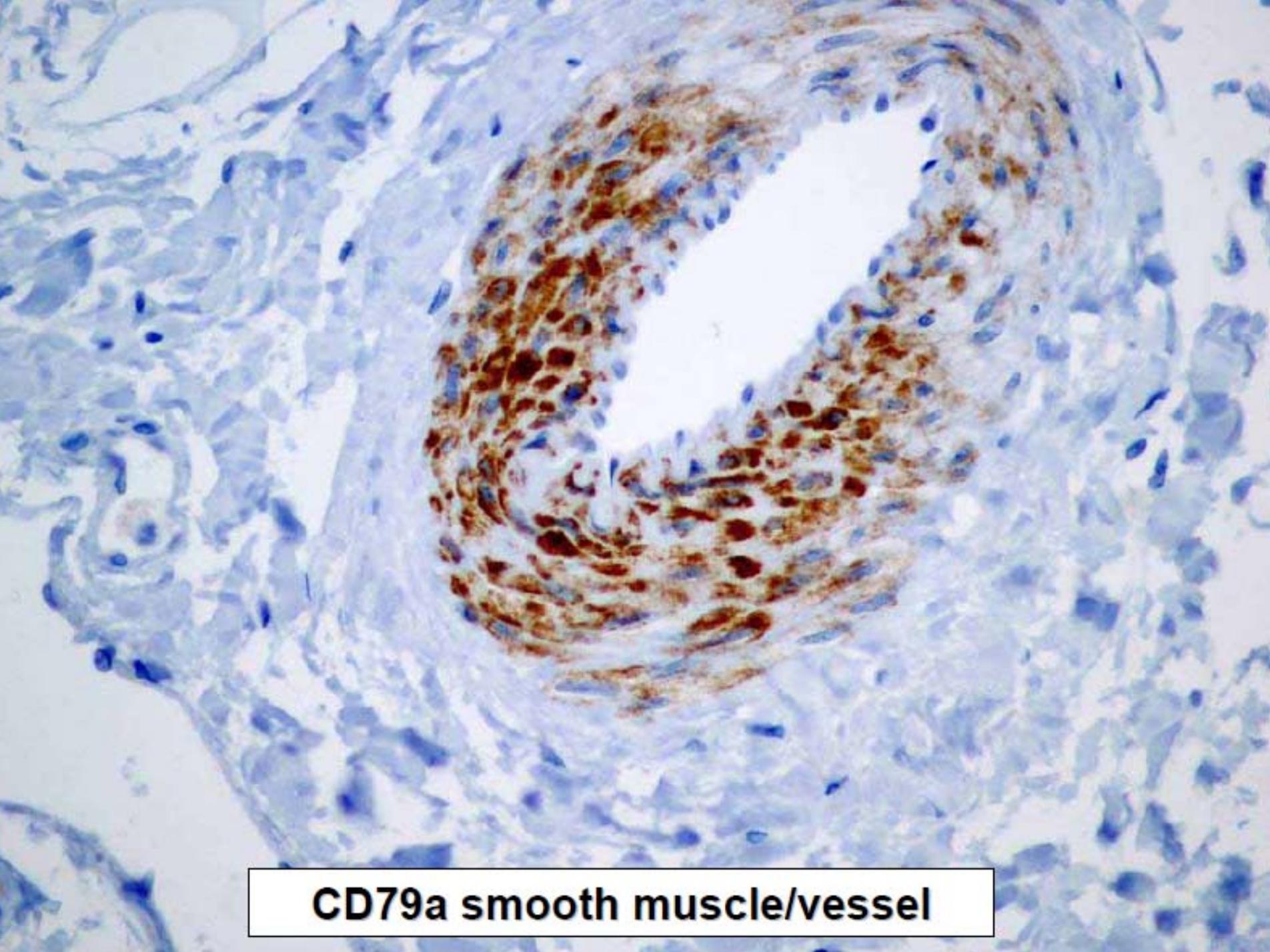
## Pigmenti

- ✓ 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

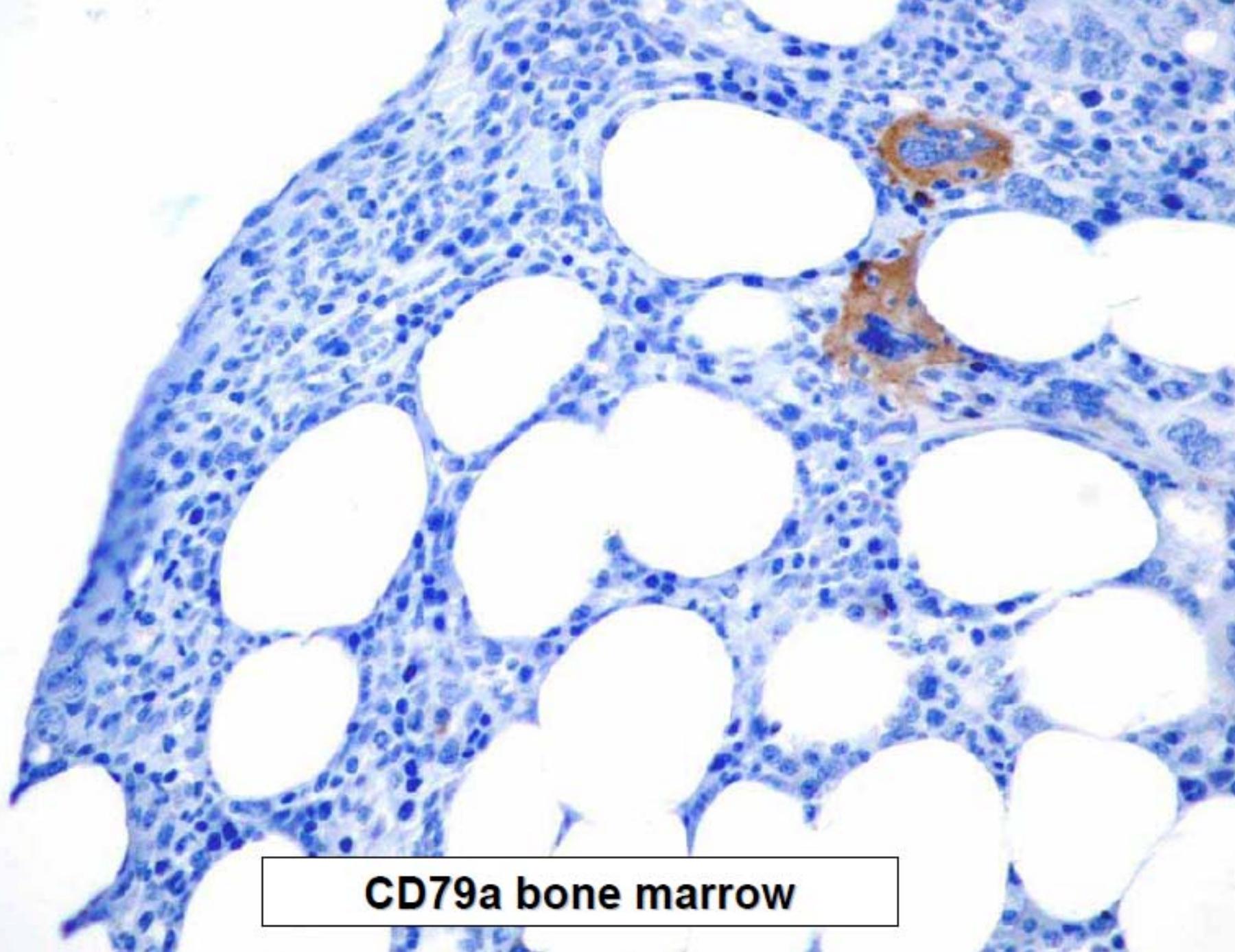


# CROSS-REATTIVITA'

- 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)



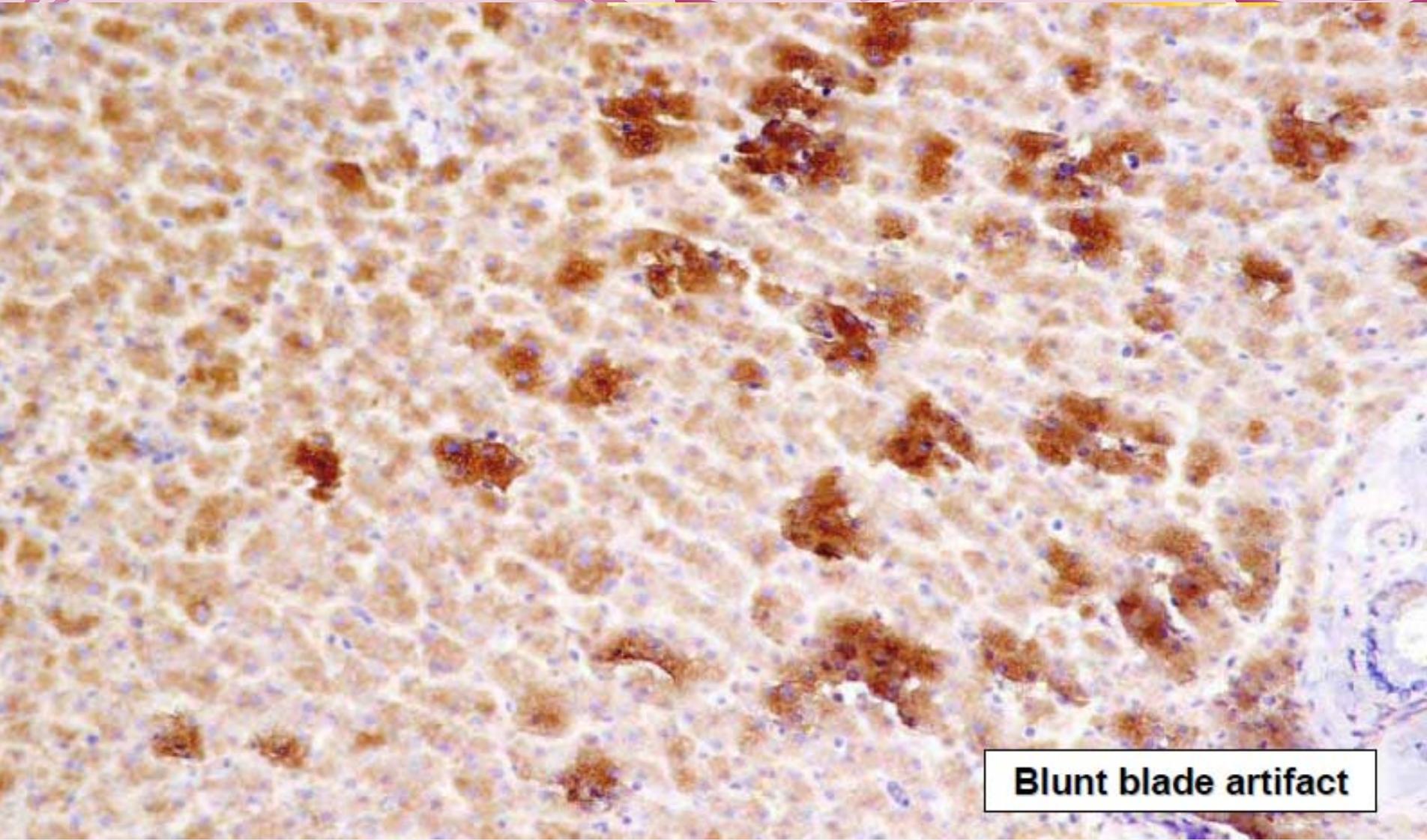
**CD79a smooth muscle/vessel**



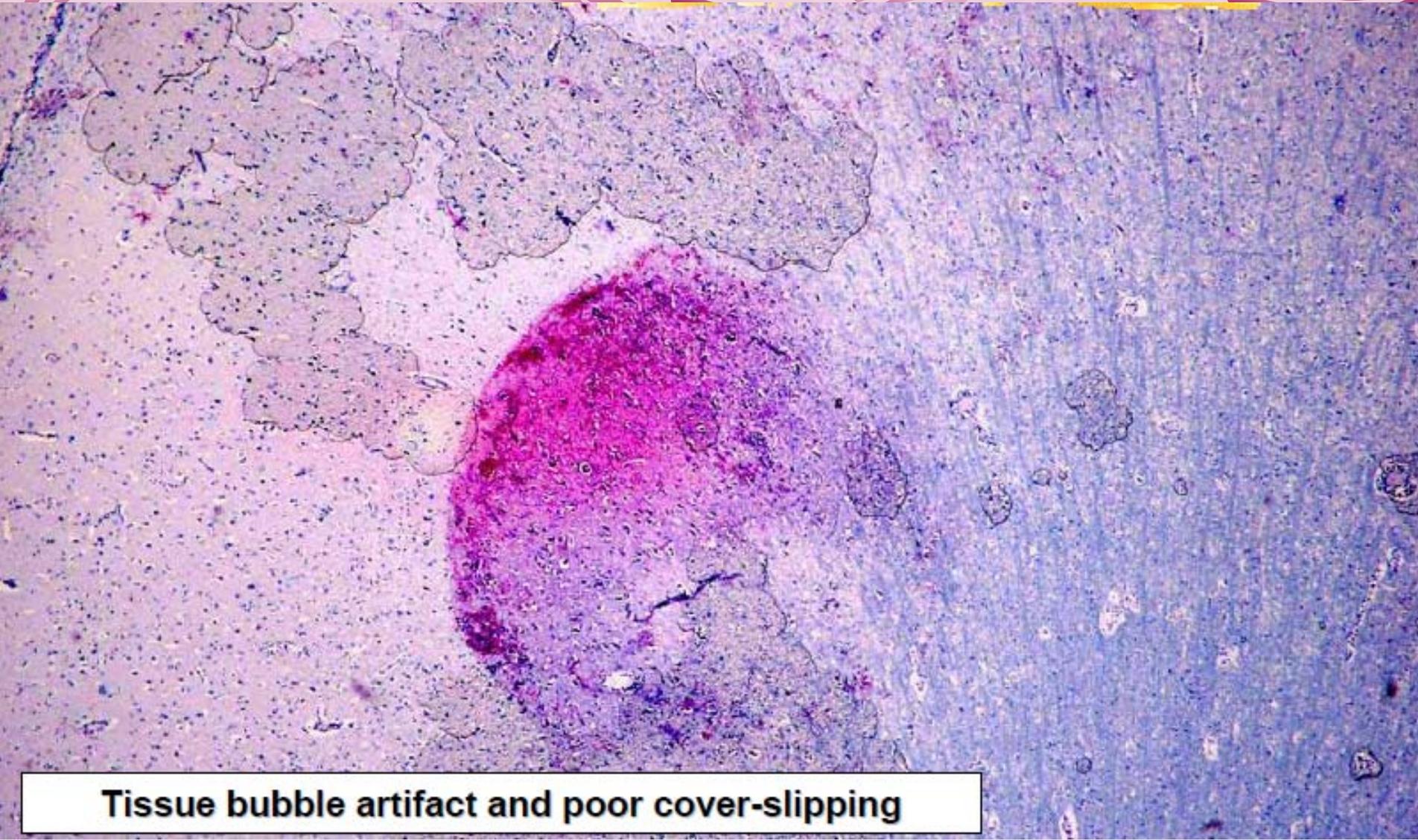
**CD79a bone marrow**

## *Artefatti*

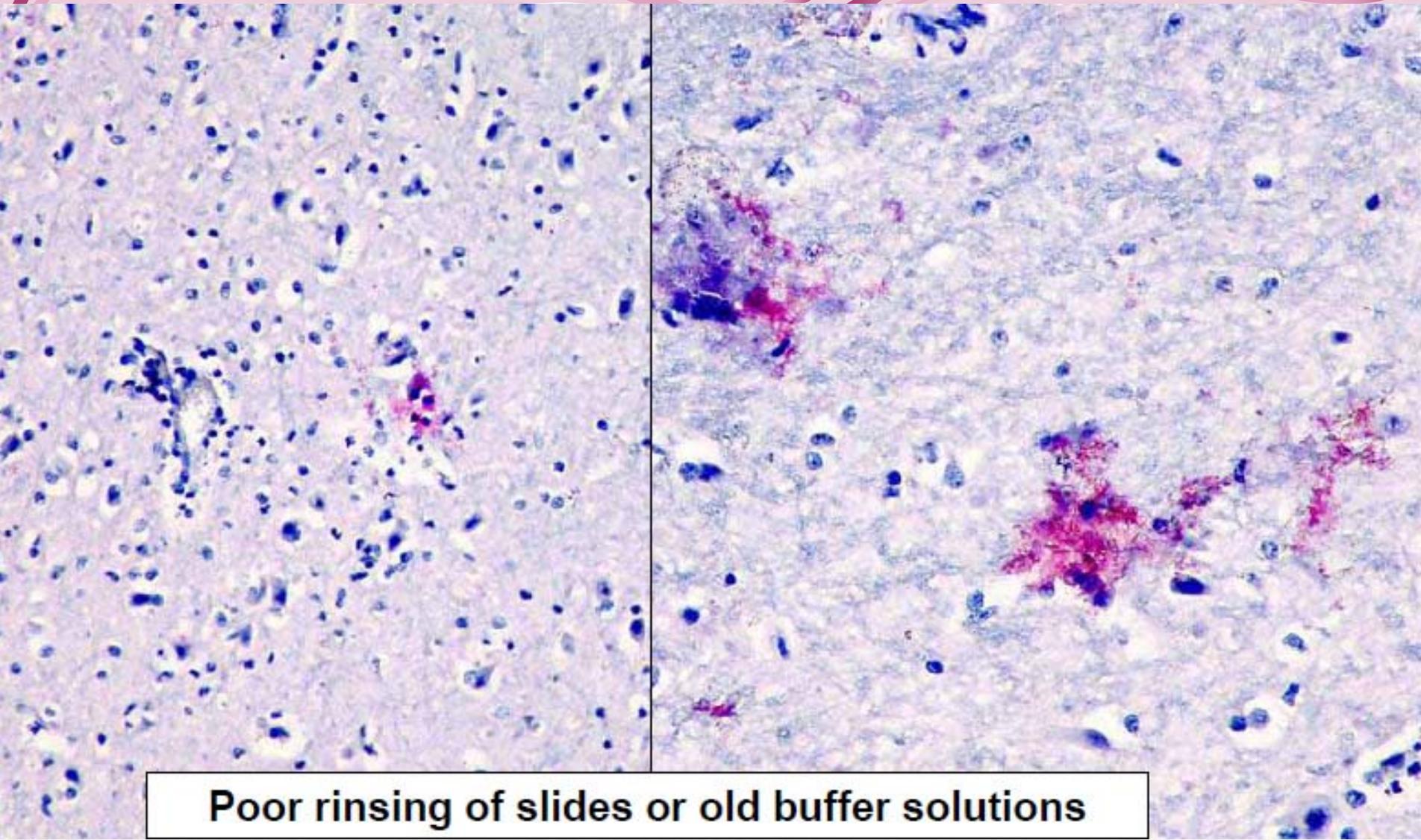
<b>Precipitati</b>	Non sono confinati nelle cellule, ma appaiono sparsi casualmente
<b>Artefatti tissutali</b>	Sezioni troppo spesse o piegate (reagenti “intrappolati” tra gli strati cellulari o nelle pieghe)
<b>Artefatti cellulari</b>	Cellule necrotiche, frantumate, soggette ad autolisi, tessuti emorragici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



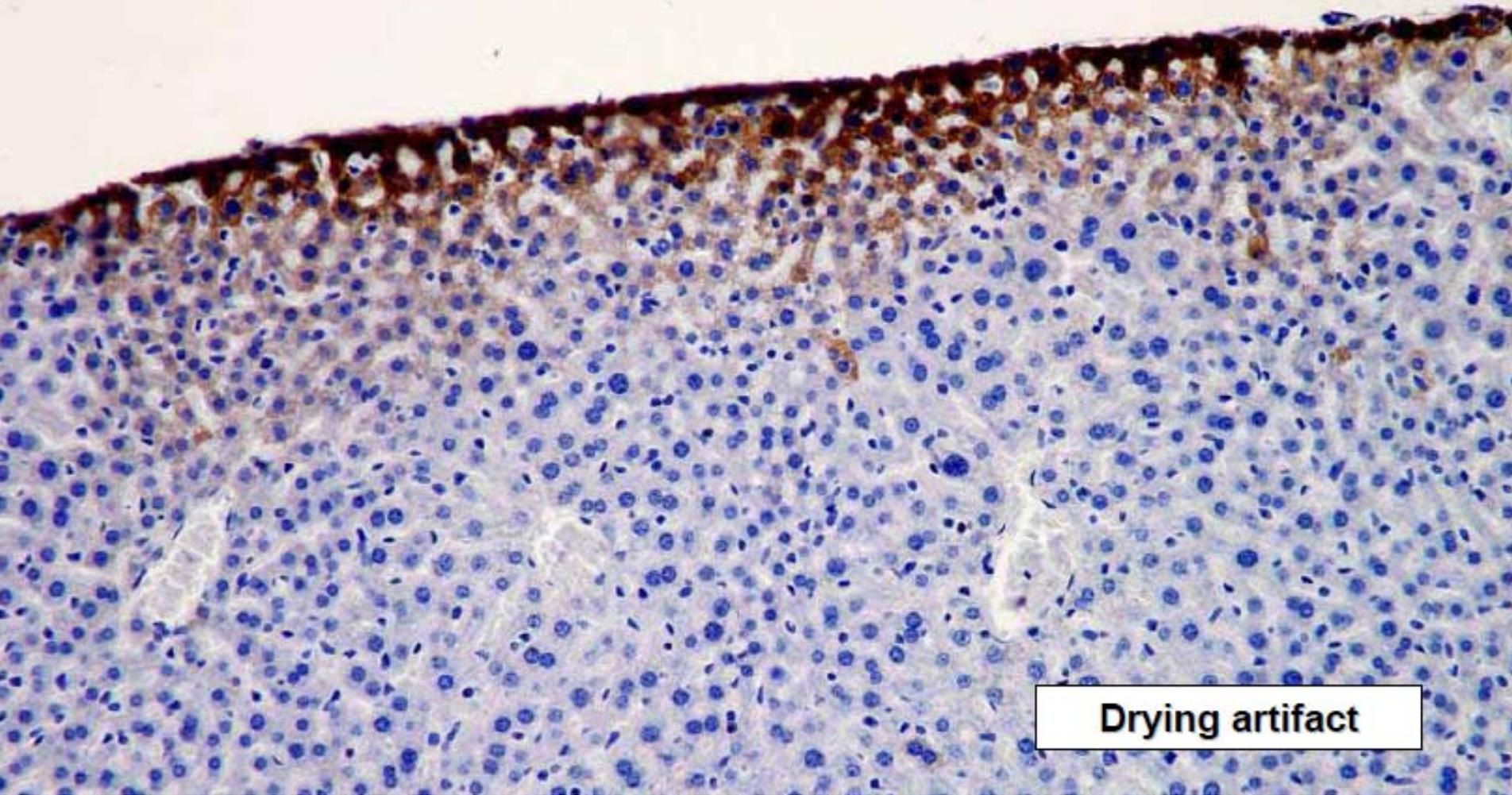
**Blunt blade artifact**



**Tissue bubble artifact and poor cover-slipping**



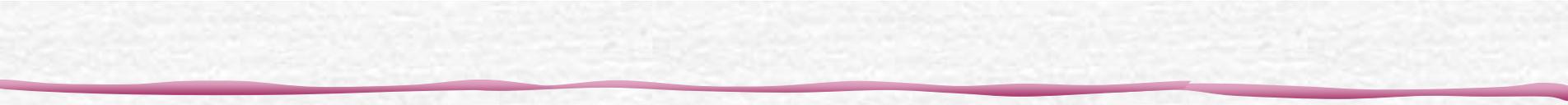
**Poor rinsing of slides or old buffer solutions**

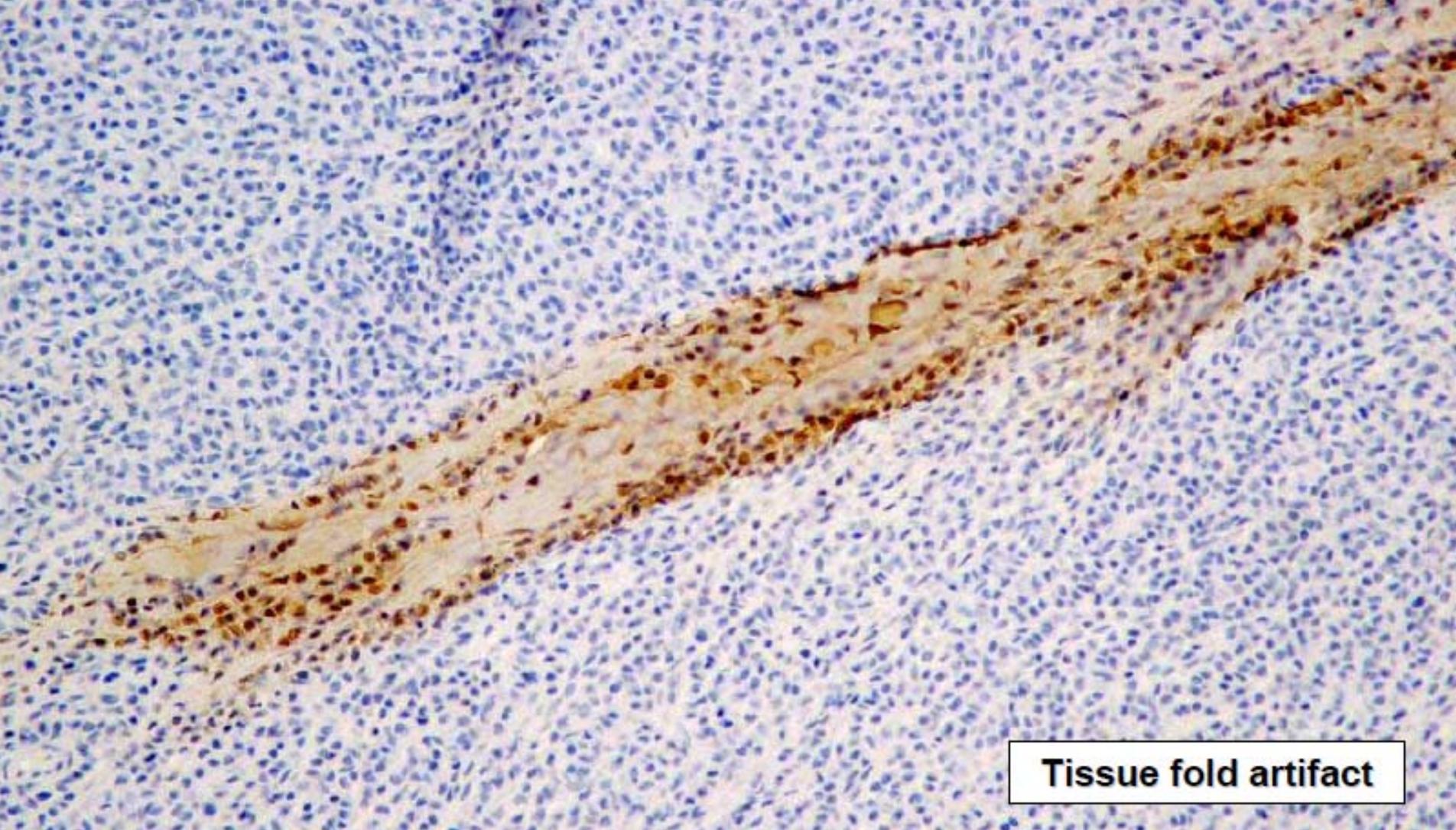


**Drying artifact**



**Drying and air bubble artifact**





**Tissue fold artifact**