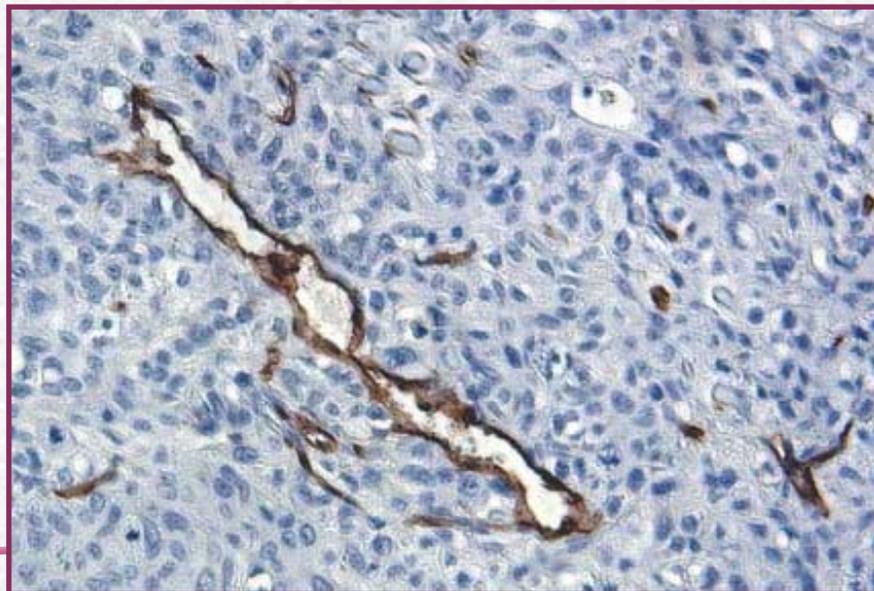


# **IMMUNOISTOCHIMICA**

- ✔ Tecnica che utilizza un anticorpo marcato con un enzima (es: perossidasi) per rivelare la presenza di Ags tissutali
- ✔ La reazione enzima-substrato determina una reazione colorimetrica con visualizzazione dell'interazione Ag/Ab



**Enzima (catalizzatore)  
su substrato**

**Enzima – substrato  
(complesso intermedio)**

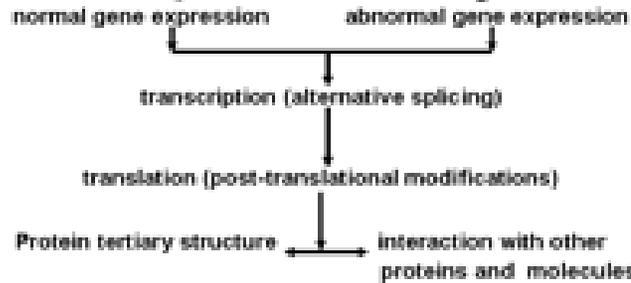
**Enzima + prodotto**

*Maggiore sensibilità rispetto all'IF  
(amplificazione progressiva)*

# FINALITÀ

*Localizzazione antigeni in un tessuto*

## Tissue in vivo (before fixation)



## Tissue manipulation (after biopsy)

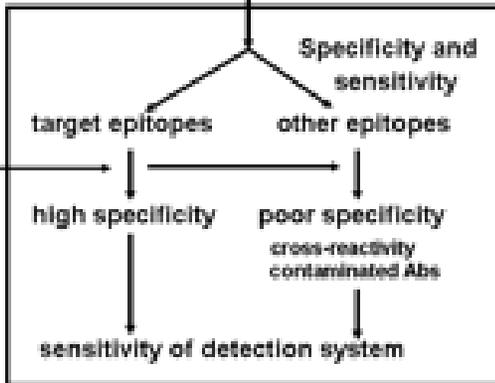
- tissue fixation
- antigen retrieval

modifications → ALL EPITOPES

Exposed epitopes      masked or destroyed epitopes

## Antibody selection

- monoclonal
- polyclonal



Immunohistochemical staining  
Interpretation

No immunohistochemical staining

## Principali fattori che determinano il successo delle analisi immunoistochimiche:

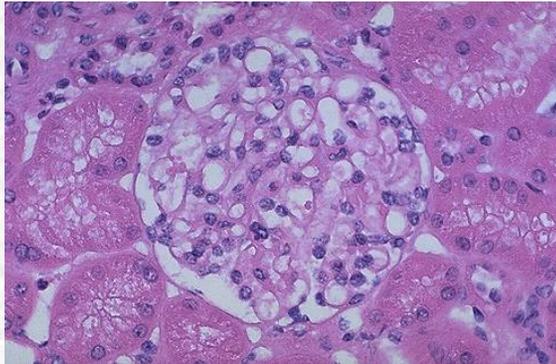
- 1) Processazione del campione (fissazione, smascheramento antigenico)
- 2) Qualità degli anticorpi
- 3) Sensibilità del sistema di rilevazione

## **APPLICABILE SU:**

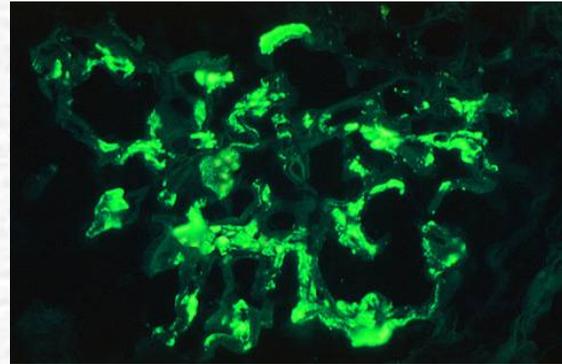
- 1) Sezioni istologiche**
- 2) Strisci citologici**
- 3) Impronte da tessuti**

# VANTAGGI

- ✓ > sensibilità e precisione
- ✓ Risultato più stabile nel tempo; non tende a decadere per effetto della luce
- ✓ Dimostrazione precisa dei dettagli morfologici cellulari



E-E



IF

- ✓ **Uso di microscopio convenzionale**
- ✓ **Colorazione permanente**
- ✓ **Associazione con colorazioni di routine**

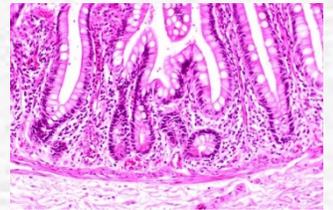
## SVANTAGGI

- ❖ Numerosi passaggi
- ❖ Tempi più lunghi
- ❖ Problemi con reazioni debolmente positive
- ❖ Diffusione del precipitato
- ❖ *Background* (“rumore di fondo”)

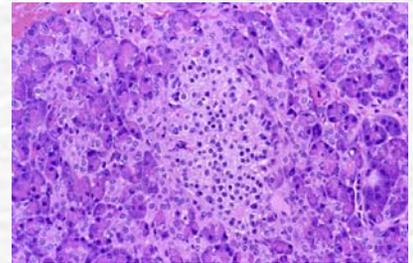
# CAMPIONI PER L'INDAGINE IMMUNOISTOCHIMICA

Criteria specifici dei tessuti campionati per IHC:

1) TIPO DI TESSUTO (tessuti ricchi di enzimi → rapida autolisi)



2) TIPO DI ANTIGENE (protozoi e funghi con > resistenza all'autolisi rispetto ai virus)



3) DISTRIBUZIONE DELL'ANTIGENE:

- Distribuzione non uniforme nel tessuto
- Gravità della lesione non correlata con la localizzazione dell'agente infettivo

# PREPARAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI PER L'IMMUNOISTOCHEMICA

## *Importanza di una corretta fissazione*

*Scopo della fissazione* = preservare la morfologia di cellule e tessuti e rendere le molecole antigeniche disponibili all'anticorpo primario

- impedisce l'autolisi (inattivazione enzimi lisosomiali)
- impedisce la crescita di batteri e muffe (no putrefazione!)
- stabilizza cellule e tessuti (no eccessiva rigidità!)
- > resistenza delle cellule alle fasi successive di processazione

Quantità di fissativo da utilizzare = **rapporto 1:10**





Unico pezzo



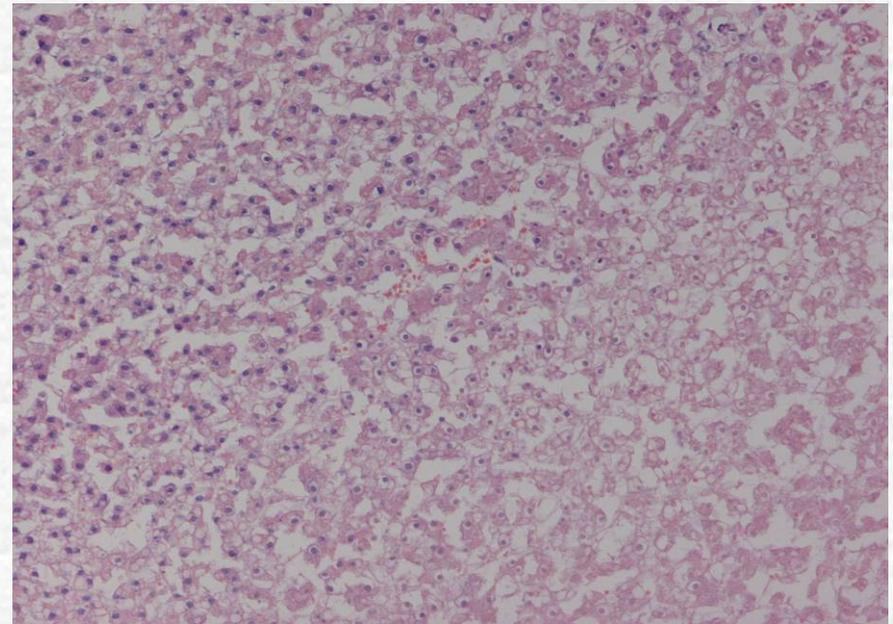
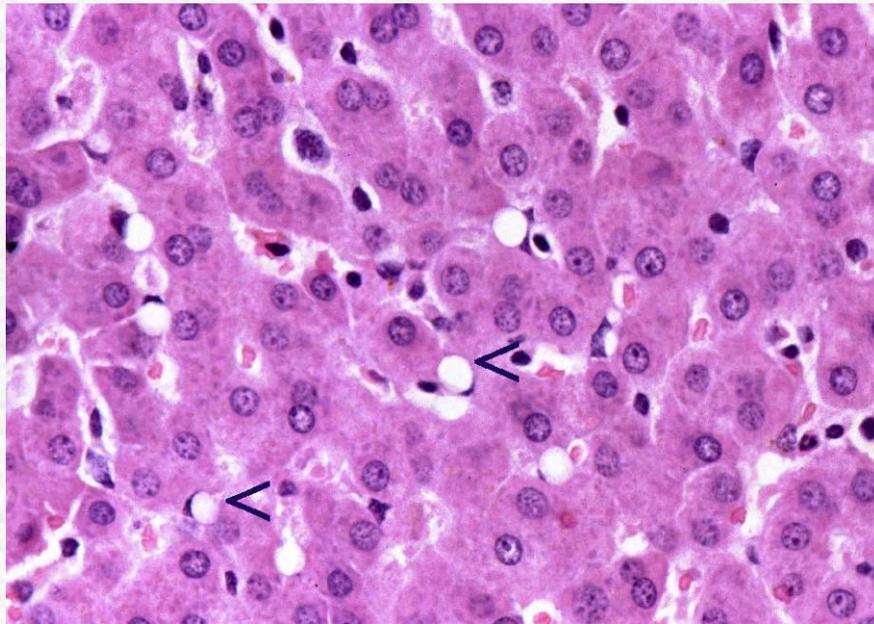
Contenitore troppo piccolo  
(scarsa quantità di fissativo)



*Ridotta fissazione*



Inadeguata fissazione....alterazione della morfologia cellulare...preparato istologico illeggibile!!!!



Buona fissazione



Scarsa fissazione

*Conseguenze di una fissazione inappropriata:  
distruzione parziale dei determinanti antigenici  
o alterazione della loro struttura o scomparsa dell'antigene*

**Ipofissazione**



**Conservazione  
dell'antigene**



**Danno alla morfologia  
tissutale (e diffusione di  
Ags intracellulari)**

**Fissazione  
troppo prolungata**

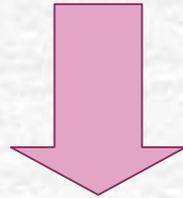


**Migliore qualità della  
morfologia**

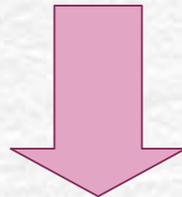


**> quantità di Ags  
mascherata, denaturata o  
distrutta**

**Campione non fissato rapidamente o troppo spesso**



**Conservazione impropria**



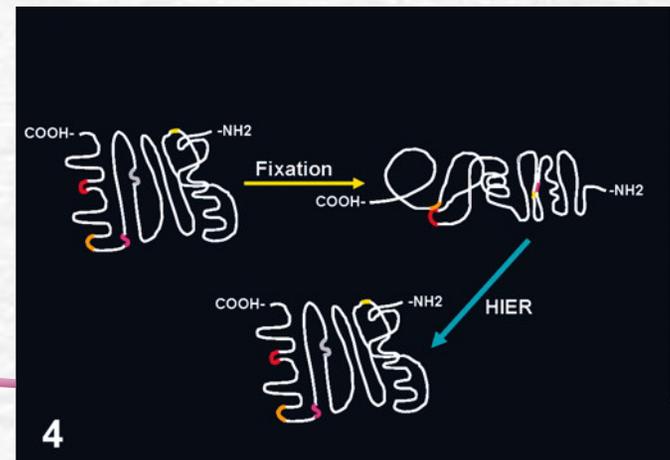
**Colorazione aspecifica delle porzioni di tessuto  
non esposte al fissativo**

## *Fissativi più adatti per strisci cellulari*

- ☛ Asciugatura all'aria e poi metanolo per 1-3 minuti
- ☛ 95% etanolo
- ☛ acetone

## *Fissativi più adatti per tessuti*

- Formalina al 4-10%, pH 7-7.6 (non > 24 h):
  - Conservazione +++ dei peptidi e della struttura generale degli organuli cellulari; interazione con acidi nucleici ma scarso effetto sui carboidrati
  - formazione di cross-legami con residui AA
  - Alto potere di penetrazione
  - Modificazione struttura tridimensionale (terziaria e quaternaria) della proteina, ma non primaria e secondaria



- Liquido di Bouin (miscela di acido picrico, formalina concentrata e acido acetico glaciale): > grado di penetrazione
- Acido acetico (in miscele fissative): eccellente potere penetrante, ma precipitazione nucleoproteine, rigonfiamento del collagene, alterazioni dei mitocondri

## *Fissazione per congelamento*

- NO fissazione e inclusione: riduzione del rischio di denaturazione di componenti tissutali
- Utile per l'esame di campioni intraoperatori
- Evitare la formazione di cristalli di ghiaccio
- Azoto liquido

## ***SISTEMI DI RIVELAZIONE***

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

Enzimi comunemente usati:

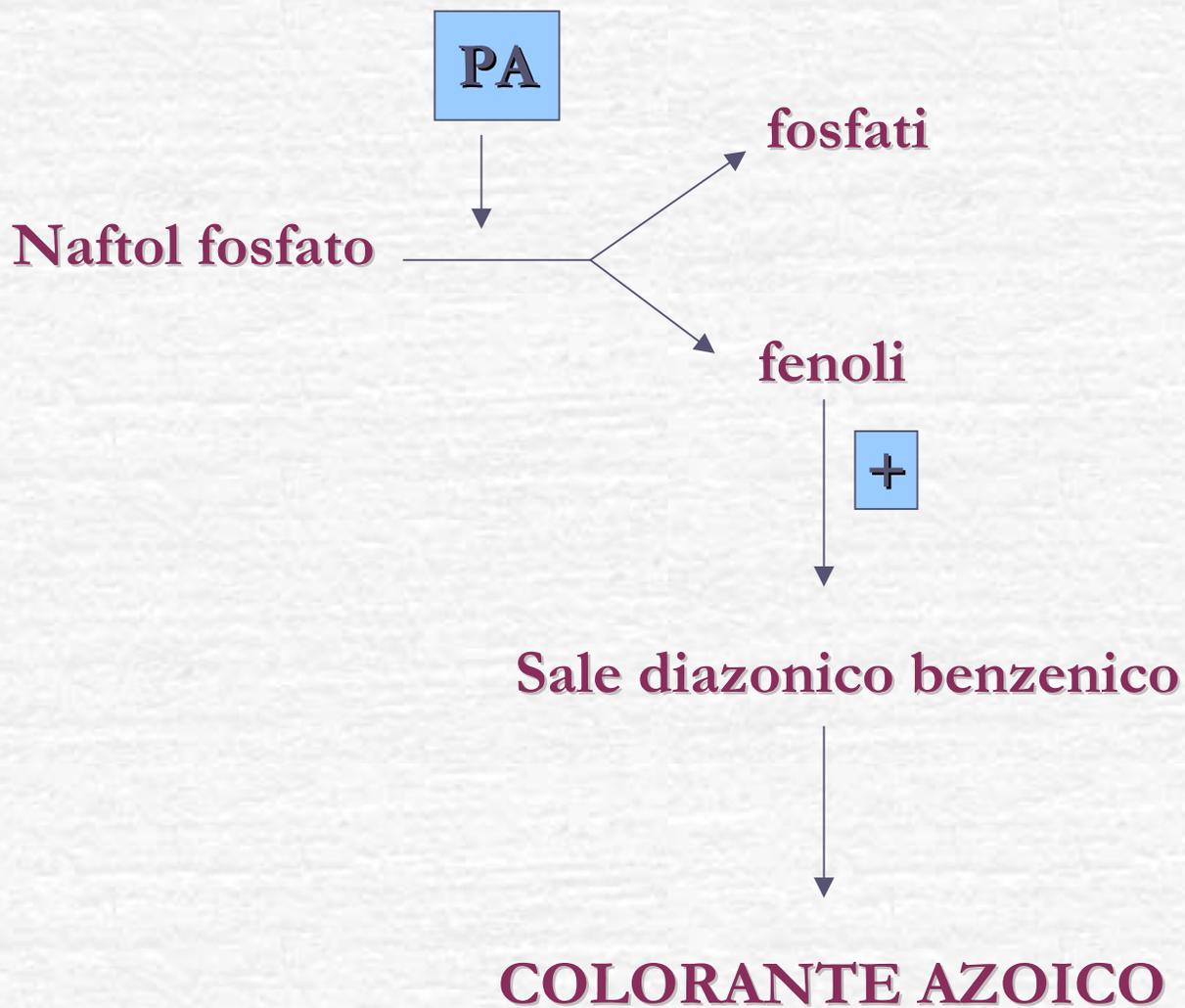
- **fosfatasi alcalina**
- **perossidasi**

## *Horseradish peroxidase (HRP)*

- ✔ Isolato dalla radice del rabarbaro
- ✔ Contiene ematina nel sito attivo
- ✔ Catalizza una reazione tra un substrato donatore di elettrone, che si ossida formando un prodotto finale di reazione costituito da una molecola colorata, e il perossido di H che sarà ridotto ad acqua

## *Calf intestine alkaline phosphatase (AP)*

- ☛ Rimozione e trasferimento di gruppi fosfati
- ☛ Idrolisi di esteri naftol fosfati (substrato) in composti fenolici e fosfati
- ☛ Combinazione dei fenoli con sali diazonici (cromogeno) per formare coloranti azoici insolubili
- ☛ Naftolo AS-MX fosfato; Naftolo AS-BI fosfato; naftolo AS-TR fosfato; 5-bromo-4-cloro-3-indossil fosfato (BCIP)



## ***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

## *Cromogeno per la perossidasi*

**DAB**



**(3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro)**

- 1) Perossidasi +  $H_2O_2$  + cromogeno
- 2) Reazione enzimatica
- 3) DAB ossidata + POD +  $H_2O$
- 4) Precipitato insolubile polimerizzato

- Preparazione prima dell'uso
- Precipitato marrone, non solubile in acqua e in acqua
- Sostanza irritante e sospetto carcinogeno
- Decontaminazione della vetreria con ipoclorito di sodio

## *Altri cromogeni per la perossidasi*

AEC 

(3-amino-9-etilcarbazolo): insolubile in alcool (non immergere il vetrino in alcool o soluzioni alcooliche, come l'ematossilina di Harris); si riduce di intensità con la luce

CN 

(4-cloro-1-naftol): tende a diffondere dal sito di precipitazione; solubile in alcool

## *Cromogeno per la fosfatasi alcalina*

**Fast Red**



**Fast blue BB**



...Solubili in alcool...

## 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*

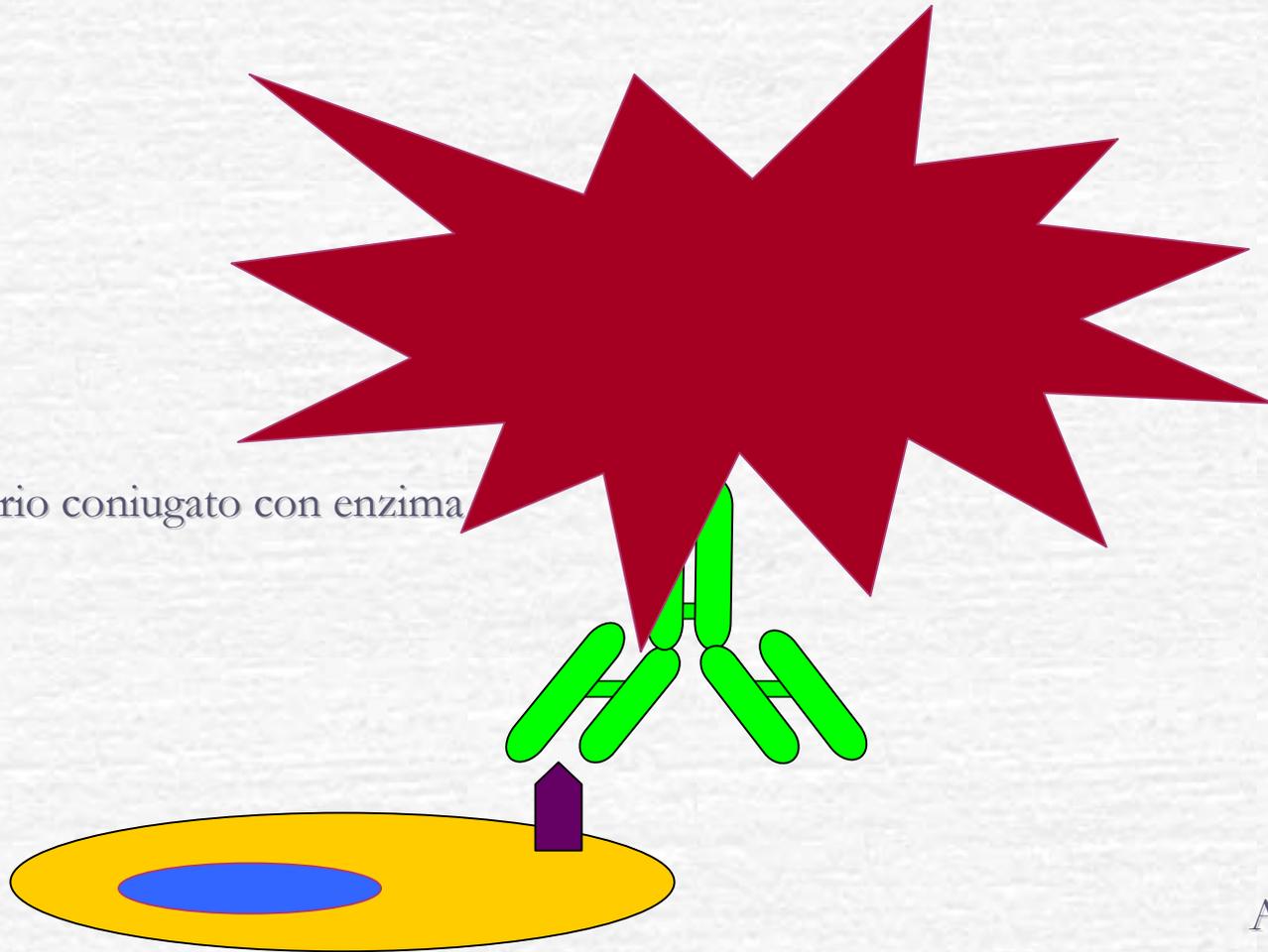
## Vantaggi dell'amplificazione....

- 1) Aumento della sensibilità (rilevazione di quantità più piccole di Ag con la stessa quantità di Ab)
- 2) Aumento della specificità (rilevazione della stessa quantità di Ag con una ridotta quantità di Ab)

# METODO DIRETTO

Substrato cromogeno

Ab primario coniugato con enzima



Ag cellulare

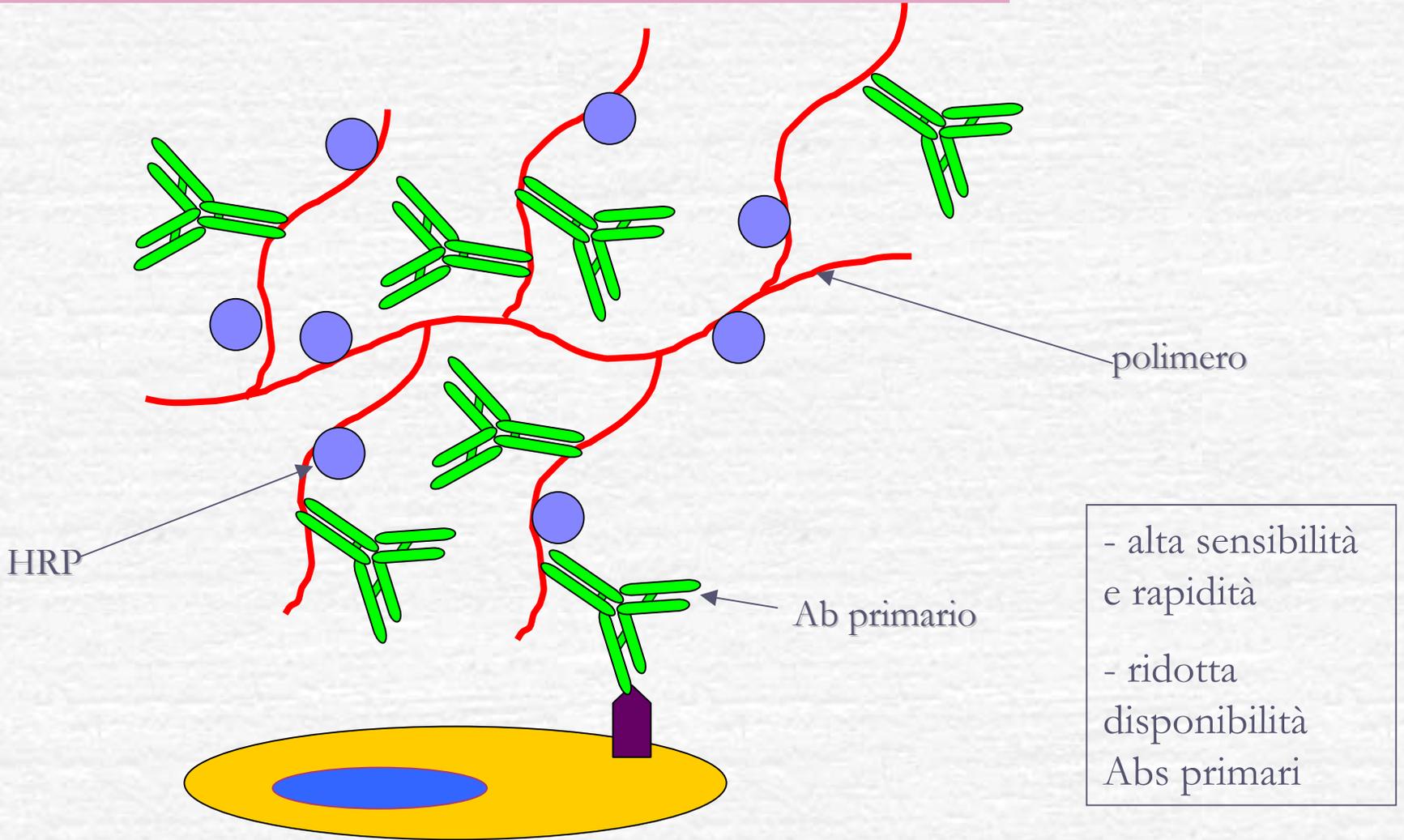
### Vantaggi:

- rapidità di esecuzione
- bassa probabilità di reazione aspecifica

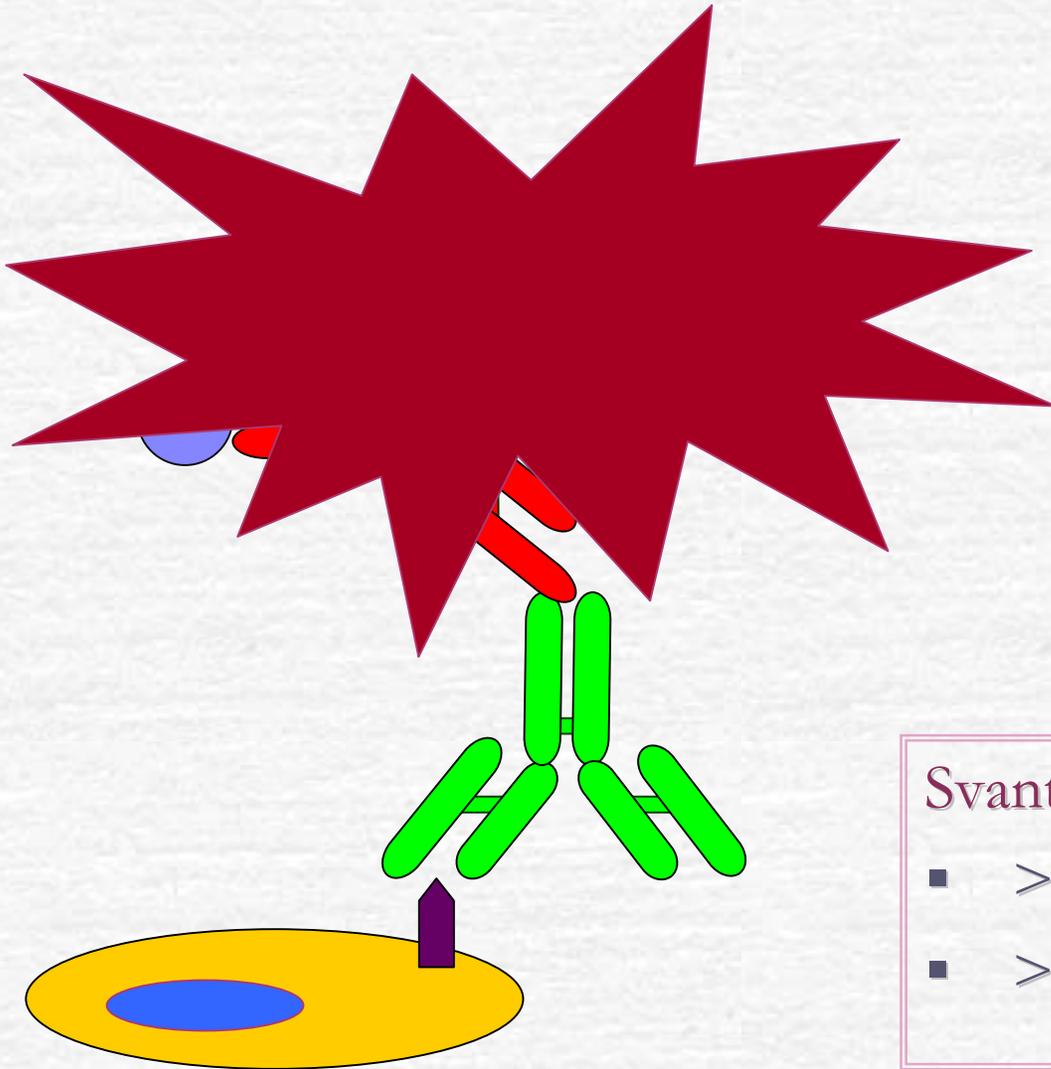
### Svantaggi:

- difficoltà di ottenere un diverso anticorpo coniugato per ogni Ag da localizzare
- minore sensibilità
- Scarsa amplificazione del segnale

New direct technique (enhanced polymer one-step staining system)



# METODO INDIRECTO



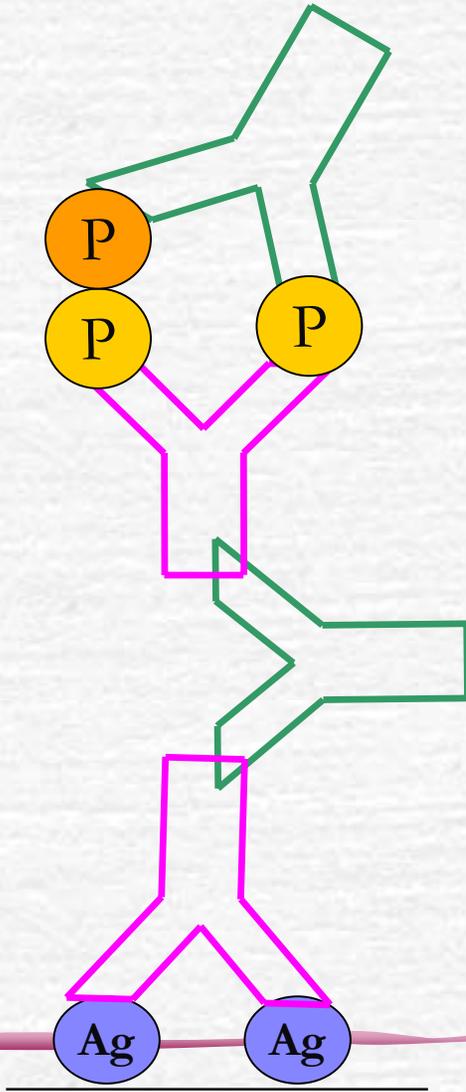
## Vantaggi:

- reazione più intensa
- > versatilità

## Svantaggi:

- > tempo di esecuzione
- > rischi di reazioni aspecifiche

# METODO DEGLI IMMUNOCOMPLESSI ENZIMATICI SOLUBILI



complesso enzima anti-enzima

Ab secondario

Ab primario non coniugato

# METODO PAP

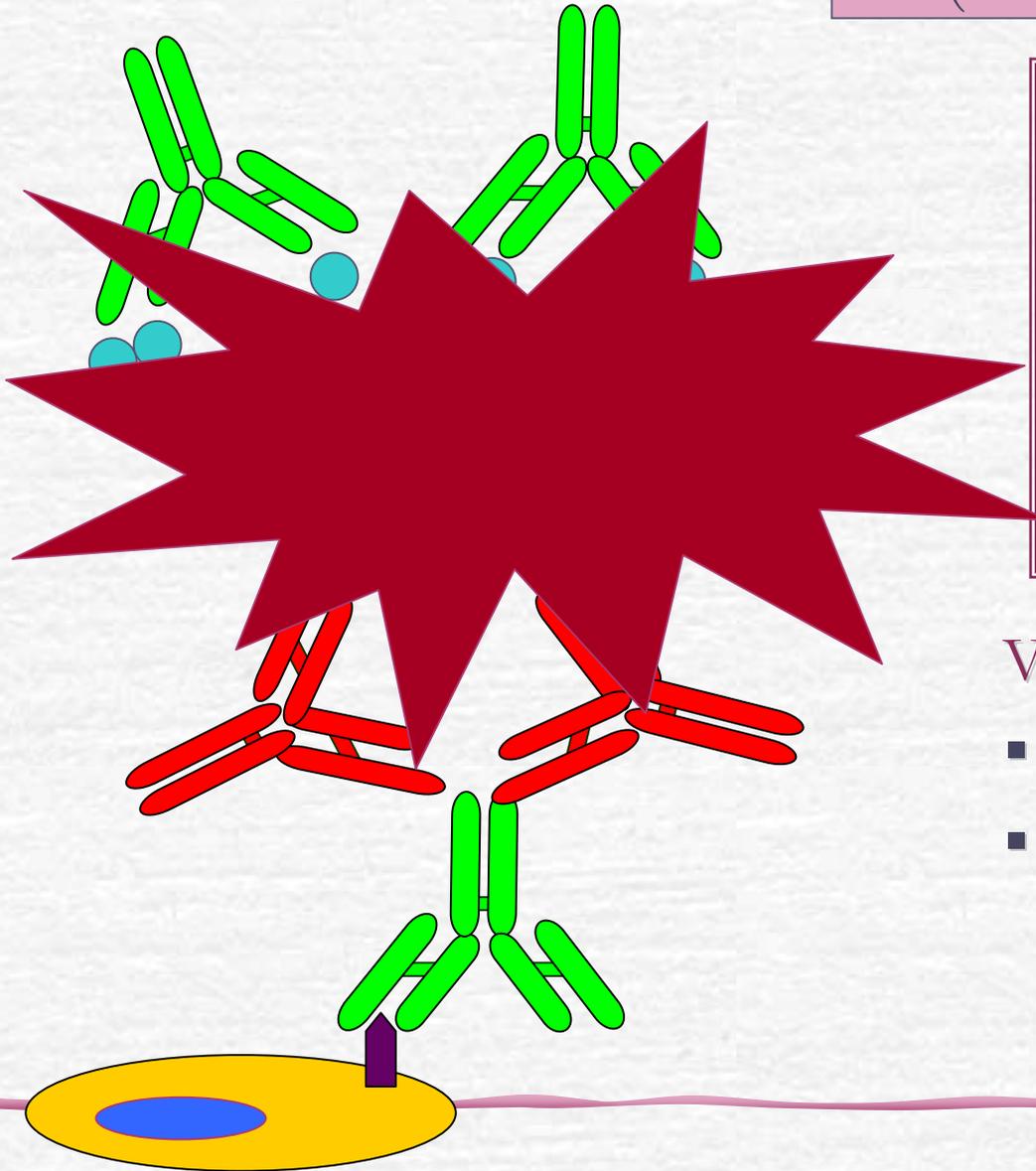
(Perossidasi Anti-Perossidasi)

## Reagenti:

- 1) Ab primario
- 2) Ab secondario ("ponte")
- 3) Complesso PAP  
(perossidasi + Ab contro perossidasi)

## Vantaggi:

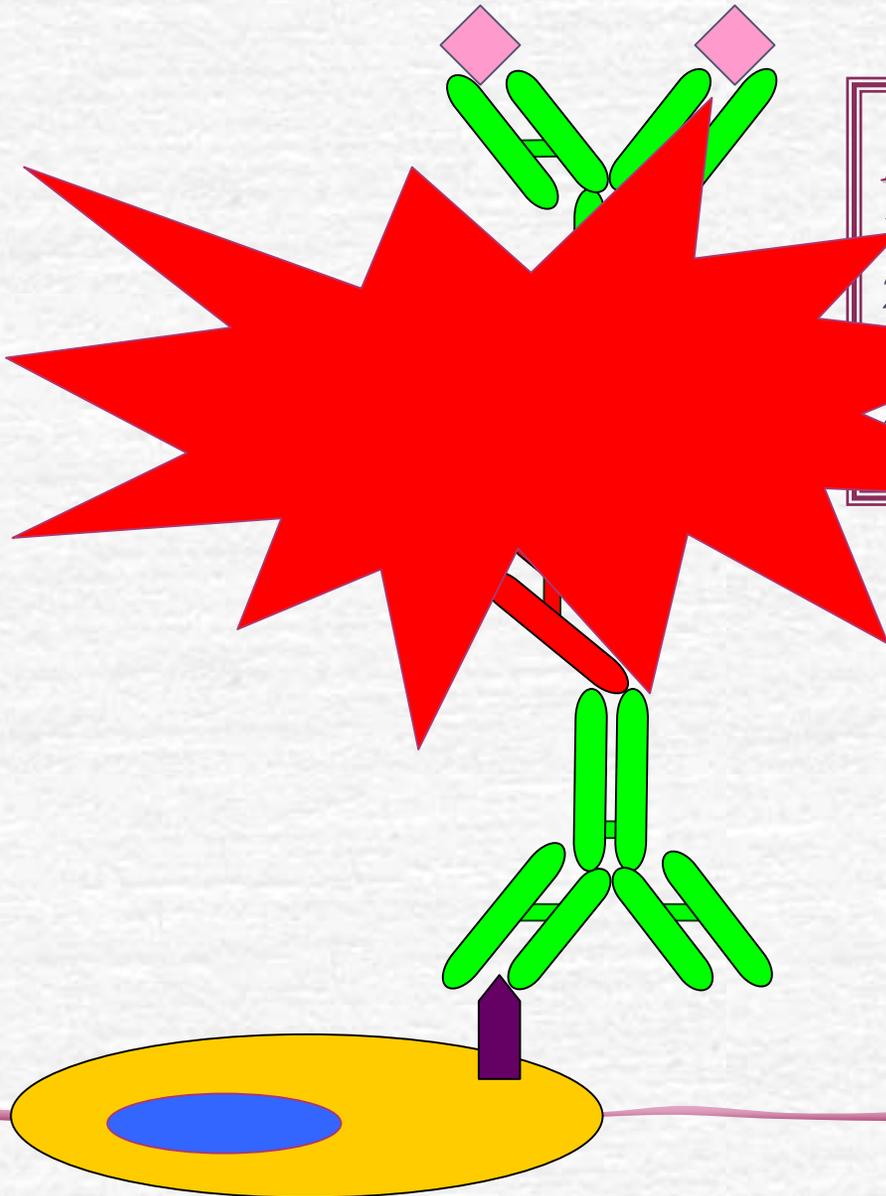
- > sensibilità
- Molecola di perossidasi legata all'AB immunologicam. e non chimicam (NO perdita attività!)



# METODO APAAP

## APAAP :

- 1) Ab coniugato con fosfatasi alcalina
- 2) Substrato (naftolo)
- 3) Levamisolo (inibitore PA endogena)
- 4) Fast red (cromogeno)



# METODO AVIDINA-BIOTINA

- avidina: glicoproteina dell'albumine
- biotina: vit.H
- legame di 1 avidina a 4 molecole di biotina

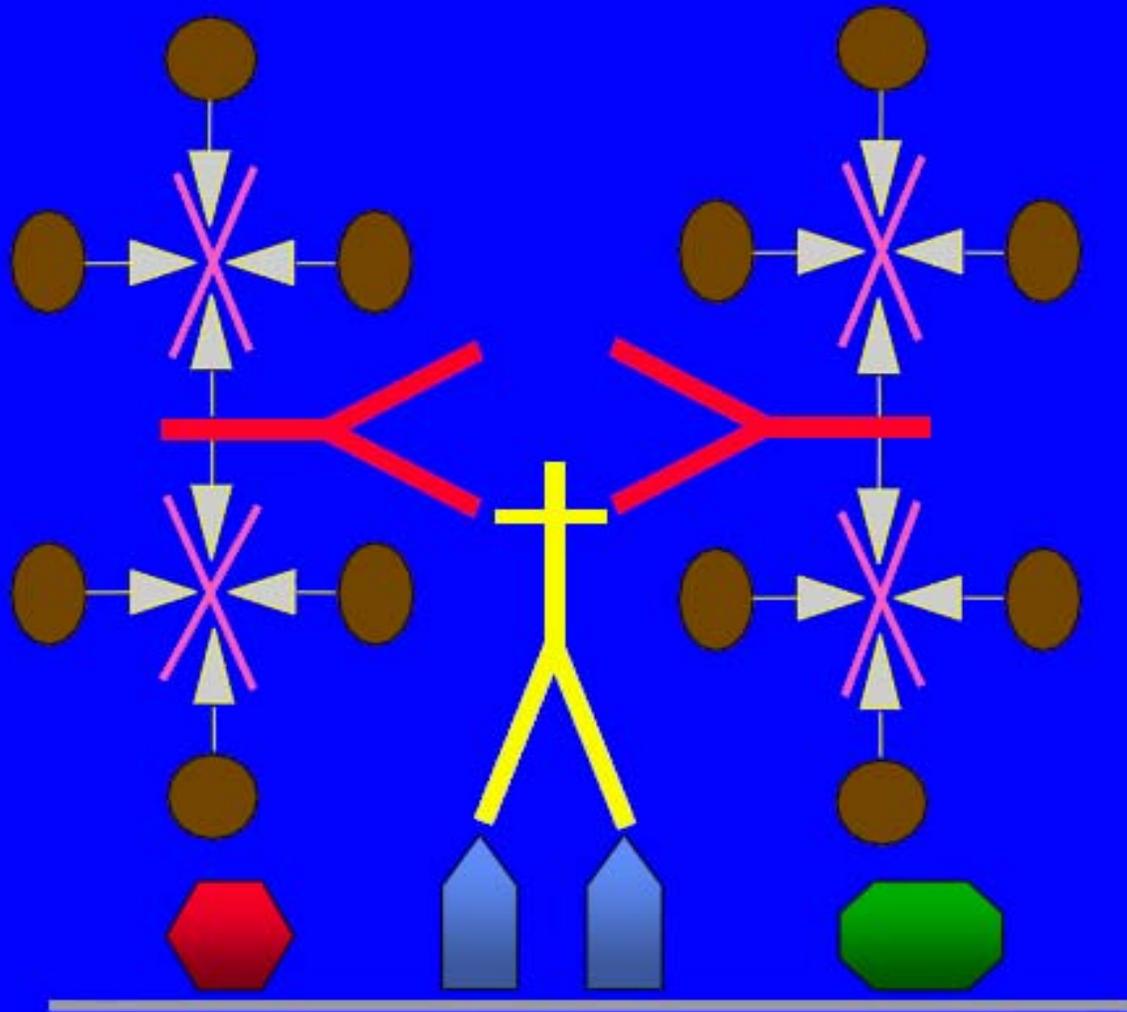
Circa 150 molecole di biotina possono essere coniugate ad un anticorpo!!!

## Vantaggio:

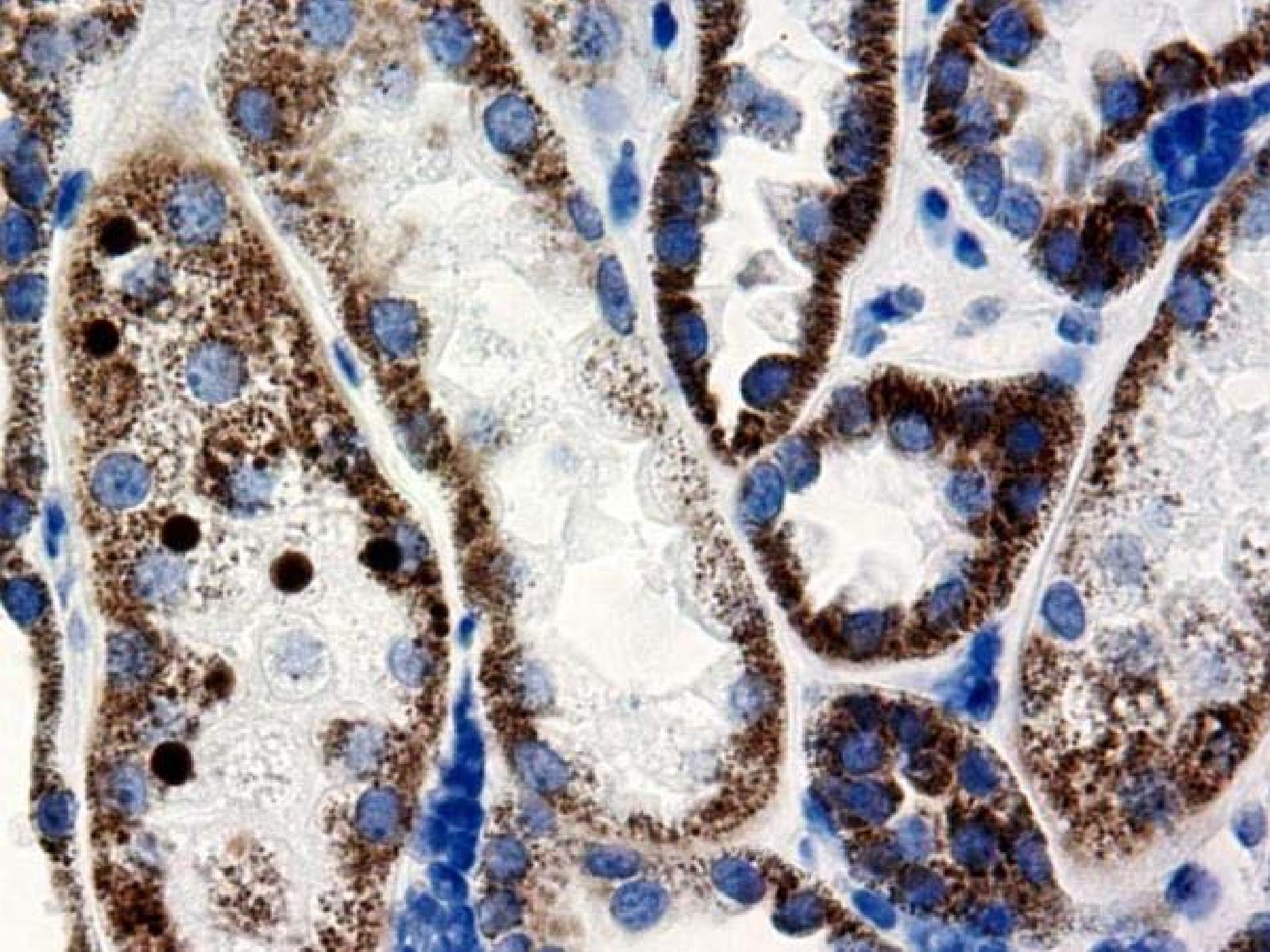
- ottima sensibilità

## Svantaggi:

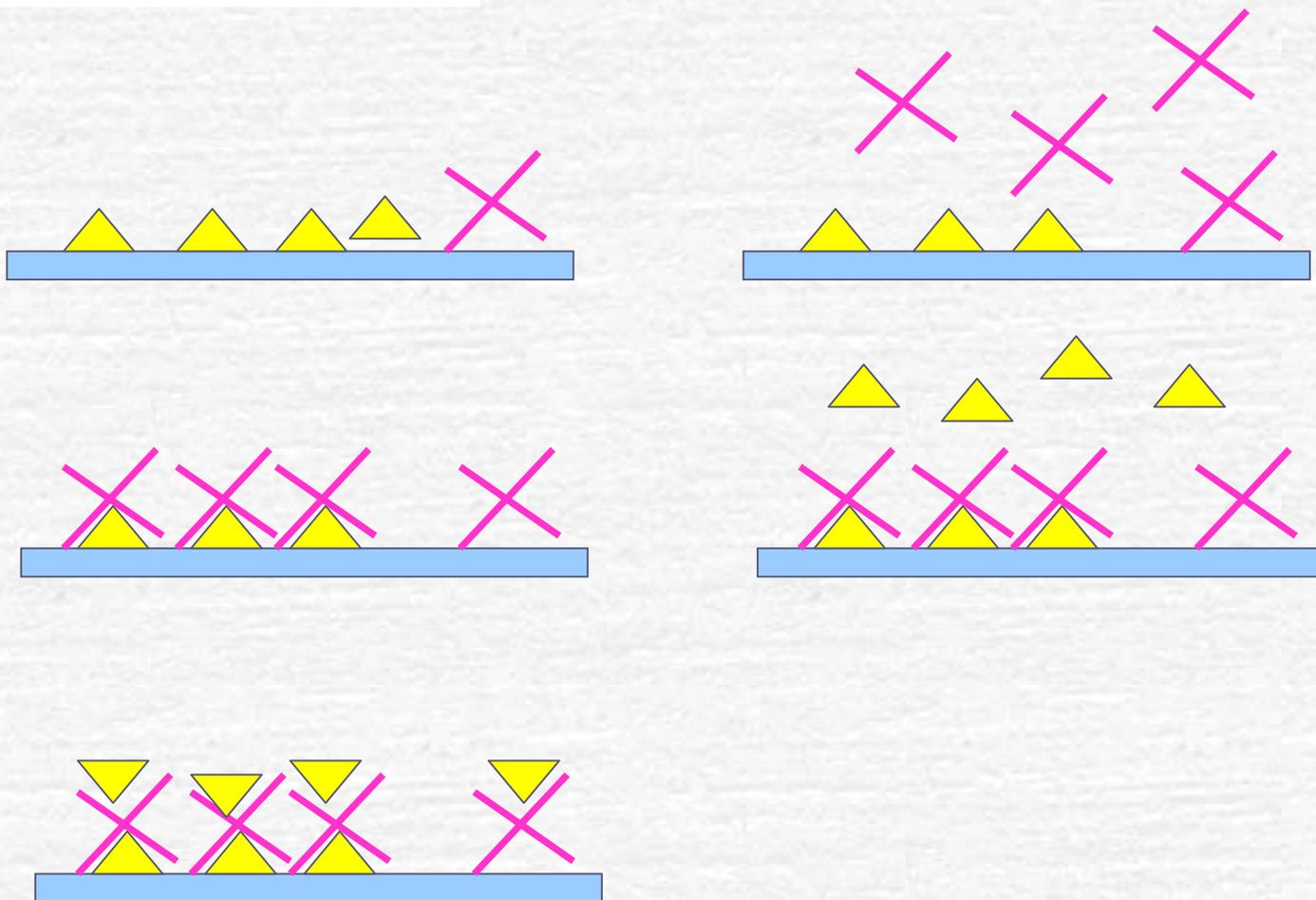
- biotina endogena (fegato)
- Legame dell'avidina a componenti lectino-simili e carichi negativamente



-  Avidin
-  Biotin-Peroxidase
-  Biotinylated-Ab
-  First Antibody
-  Antigens

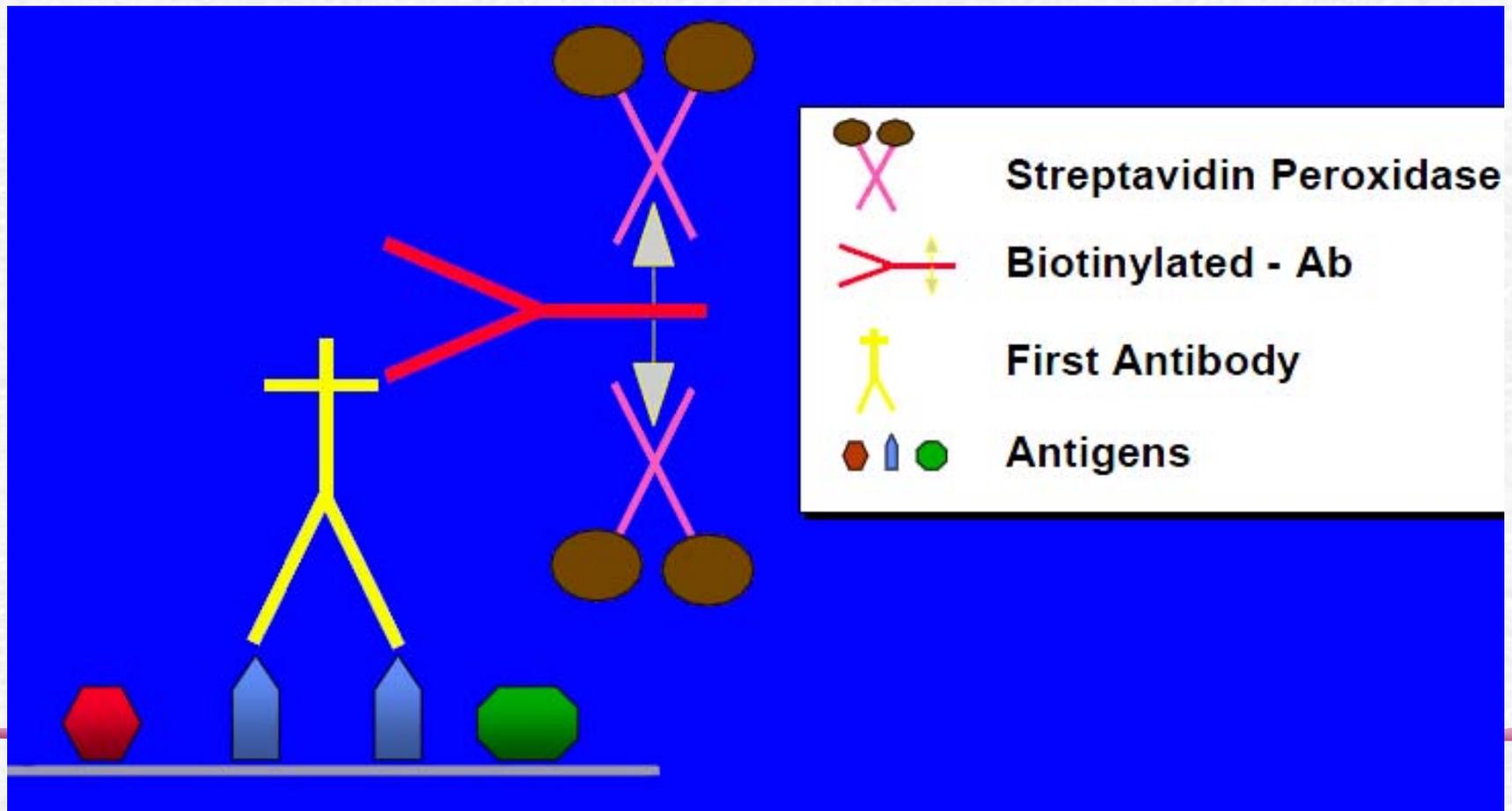


# Blocco biotina endogena



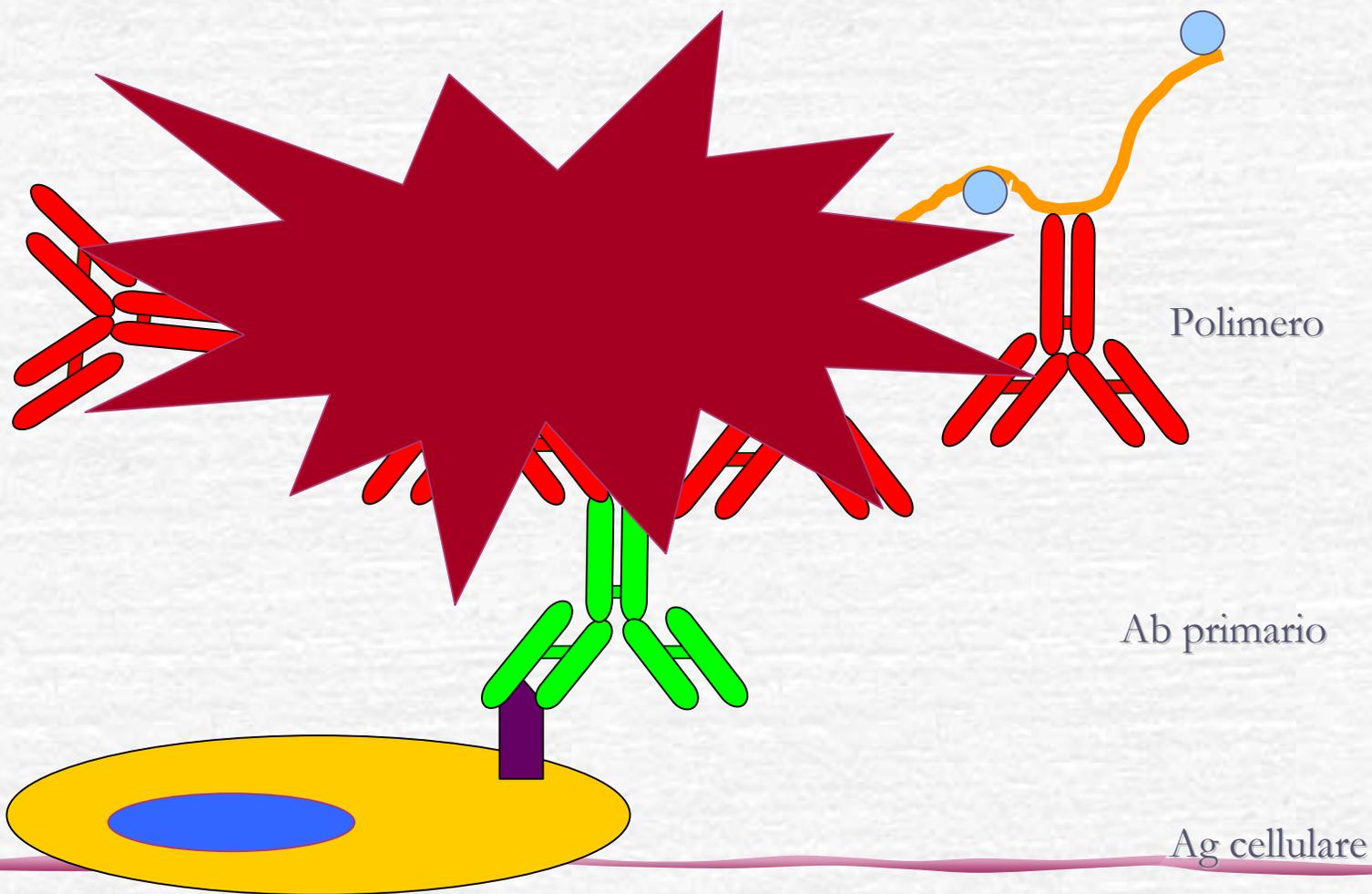
# METODO LSAB (labelled streptavidin biotin)

Streptavidina: da *Streptomyces avidinii*



# METODO Envision

Substrato cromogeno



# ACCORGIMENTI PER UN RISULTATO OTTIMALE

## *Vetrini per immunoistochimica:*

- vetrini polilisinati (poli-L-lisina = conferimento di una carica – al vetrino)
- vetrini a carica elettrostatica

## *Diluizioni dei reagenti:*

- diluizione ottimale dell'ab:  
colorazione specifica più intensa e  
intensità di fondo più bassa.

### ***Incubazione:***

- più diluito è l'Ab, più bassa sarà la colorazione aspecifica.
- in camera umida

### ***Vetrini di controllo:***

*Controlli positivi* : campioni di tessuto di cui è conosciuta con certezza l'espressione di un determinato Ag

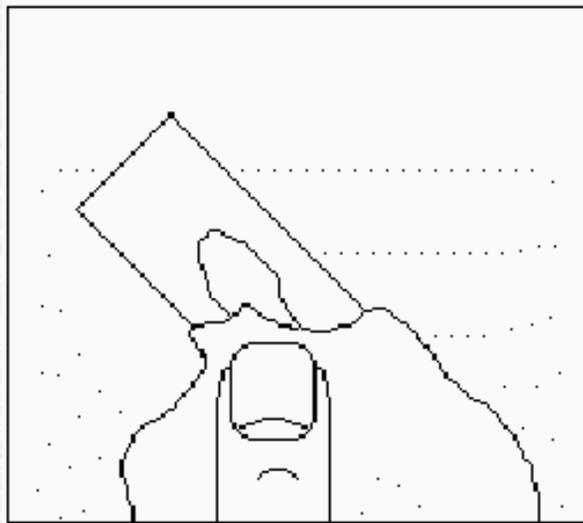
*Controlli negativi:*

- campione dello stesso tessuto senza l'Ab primario
- Uso di un anticorpo primario verso un Ag non correlato

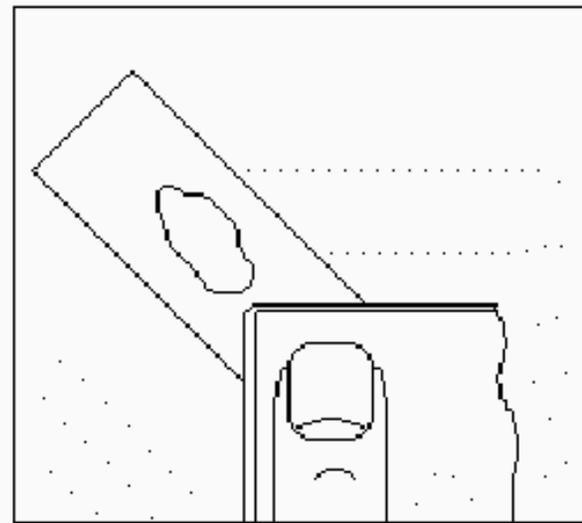
*Vimentina*: spia di danno tissutale (parzialmente sensibile alla fissazione aldeidica)

## *“Trattamento” dei vetrini:*

- evitare l'essiccazione delle sezioni (colorazioni aspecifiche, morfologia scadente)
- asciugare i vetrini

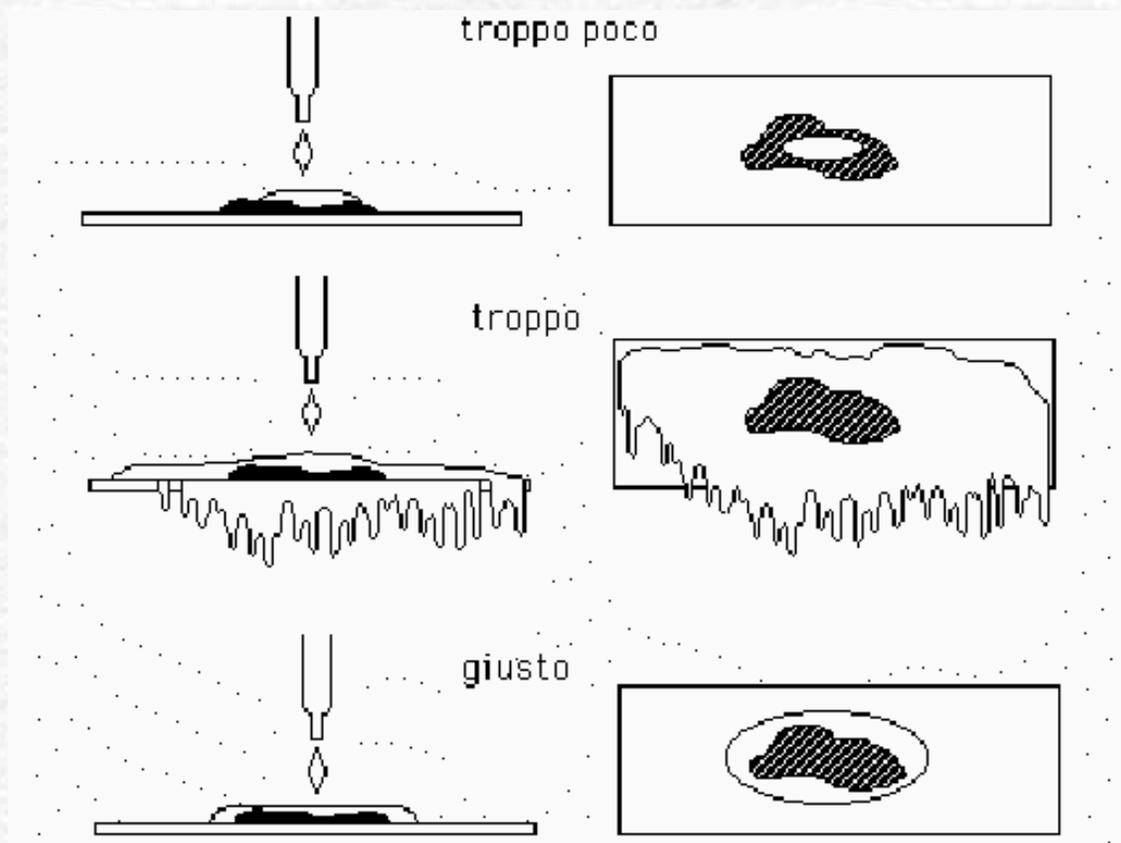


errato



corretto

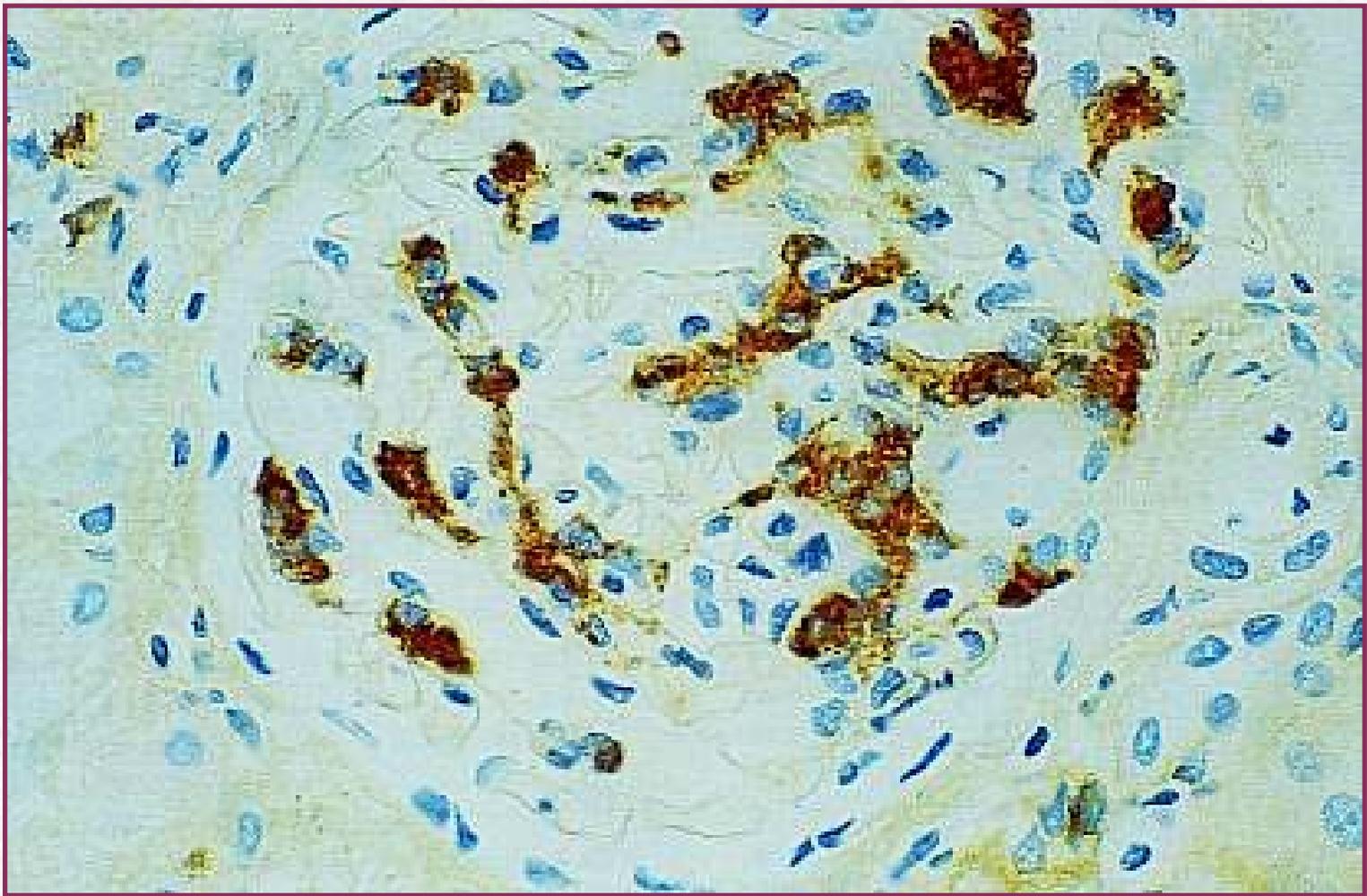
- accurata modalità di applicazione dei reagenti



- circoscrivere la sezione con penna indelebile:
- ✓ alcuni campioni, soprattutto strisci cellulari, non sono chiaramente visibili dopo reidratazione
- ✓ applicazione facile dell' Ab nell'area circoscritta
- ✓ guida quando si asciuga l'eccesso di liquido
- ✓ creazione di una tensione superficiale (agisce da "barriera" e mantiene la soluzione di anticorpo sul campione prevenendone la diffusione sul vetrino)

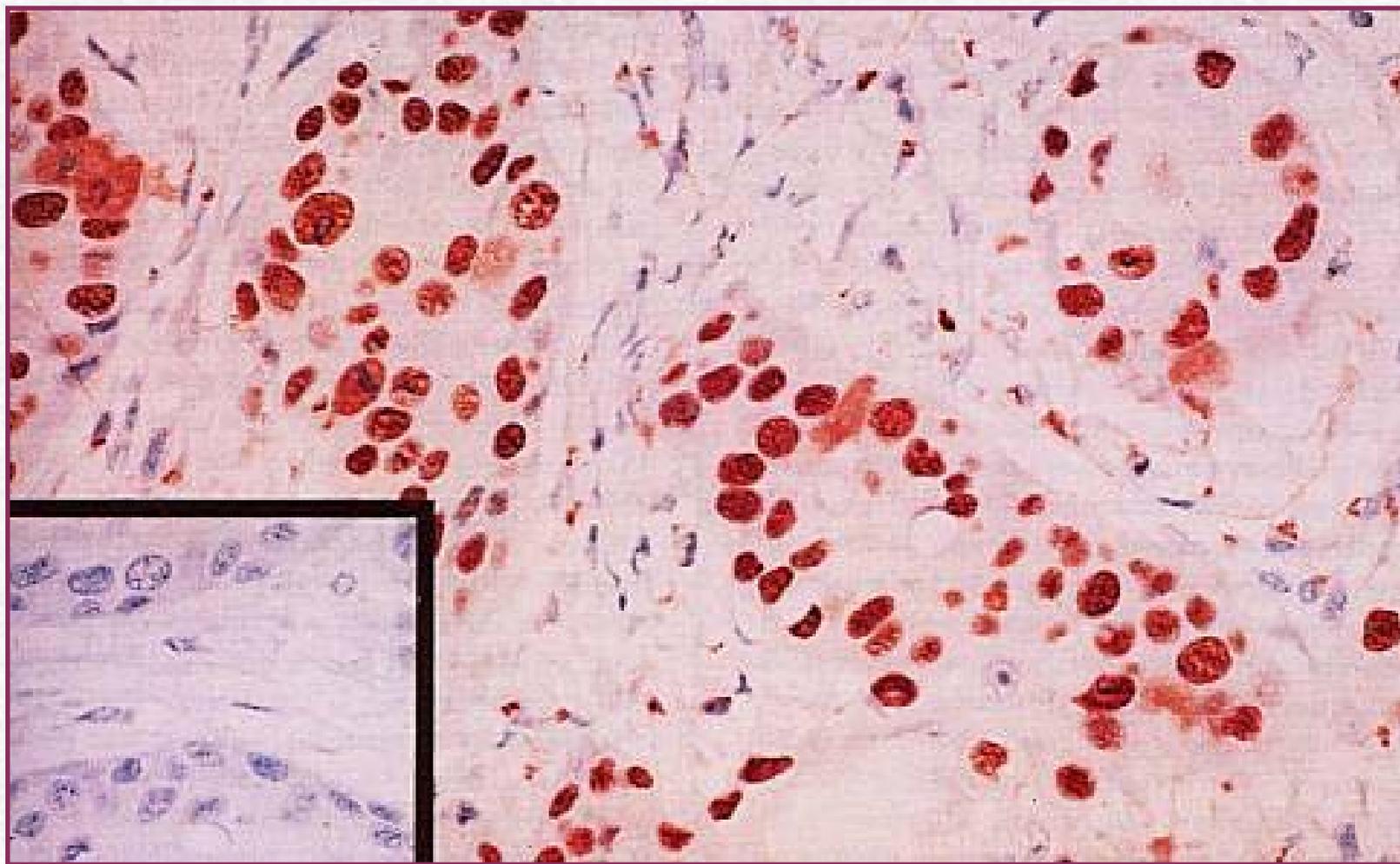
## *Tamponi:*

- tampone d'elezione: TRIS
- evitare tamponi contenenti azide  
(Alte concentrazioni: NO legame della perossidasi al substrato mediante inibizione competitiva – è un substrato della perossidasi!!!)



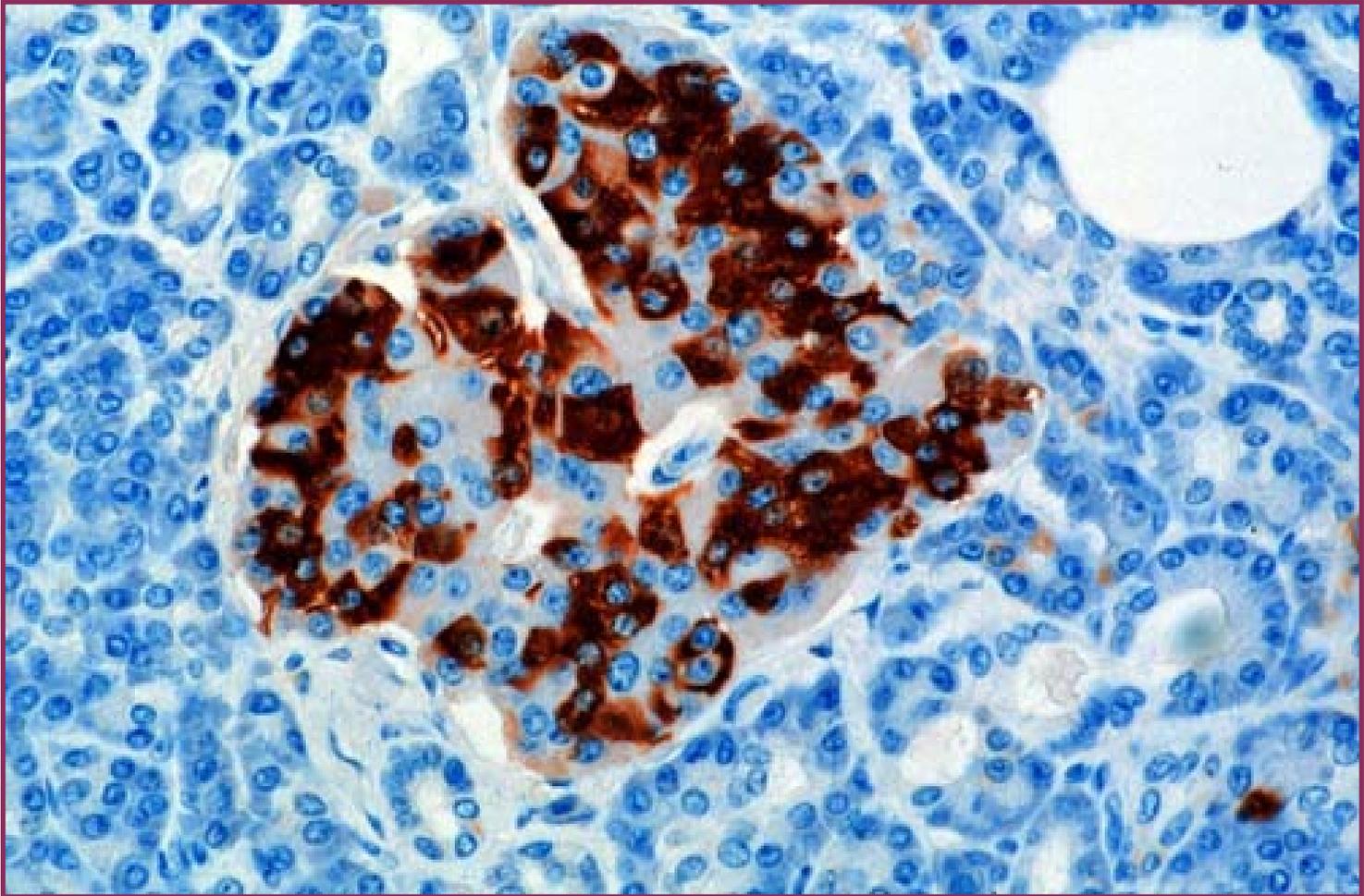
PAP + DAB

*IgA*

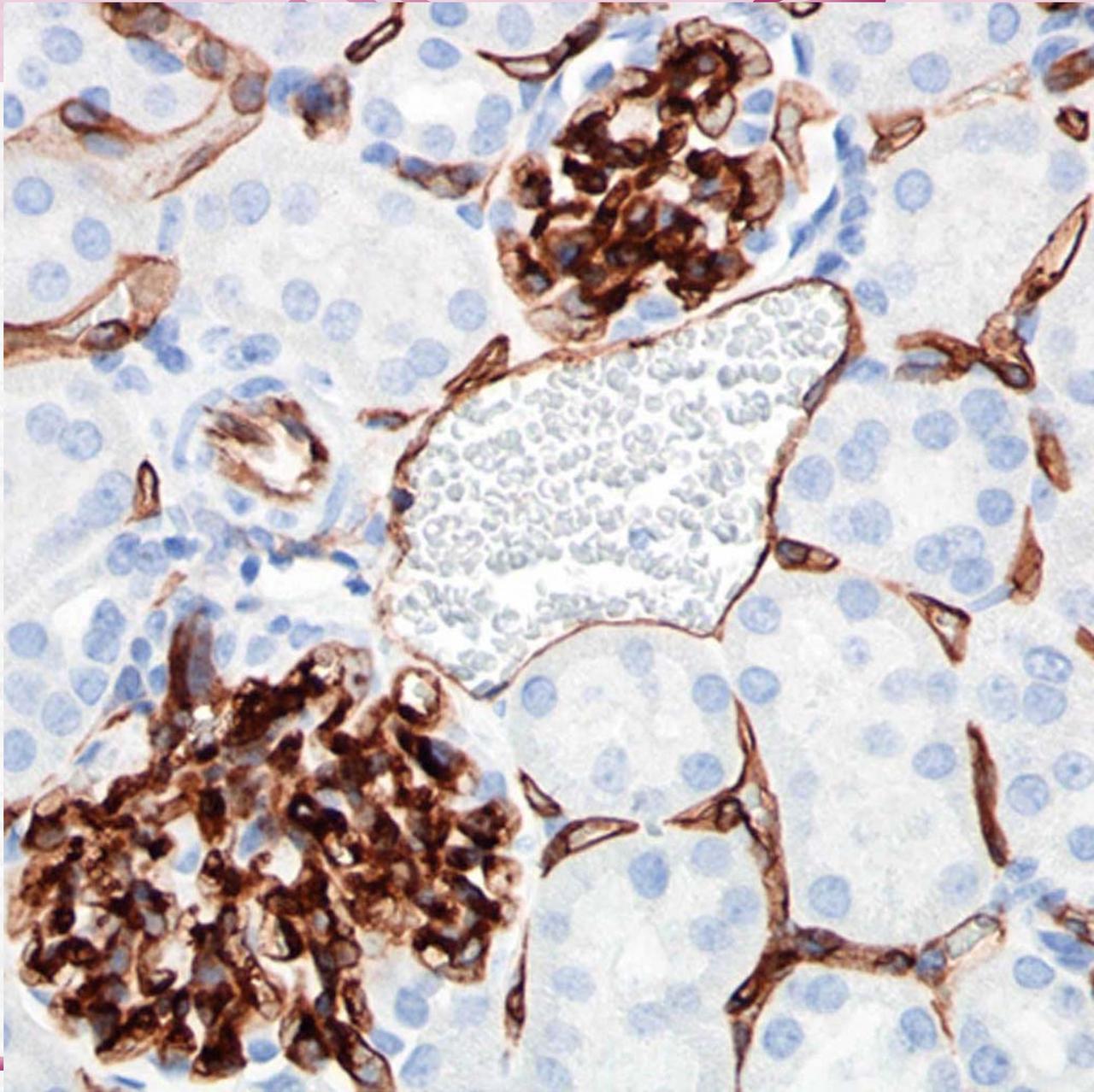


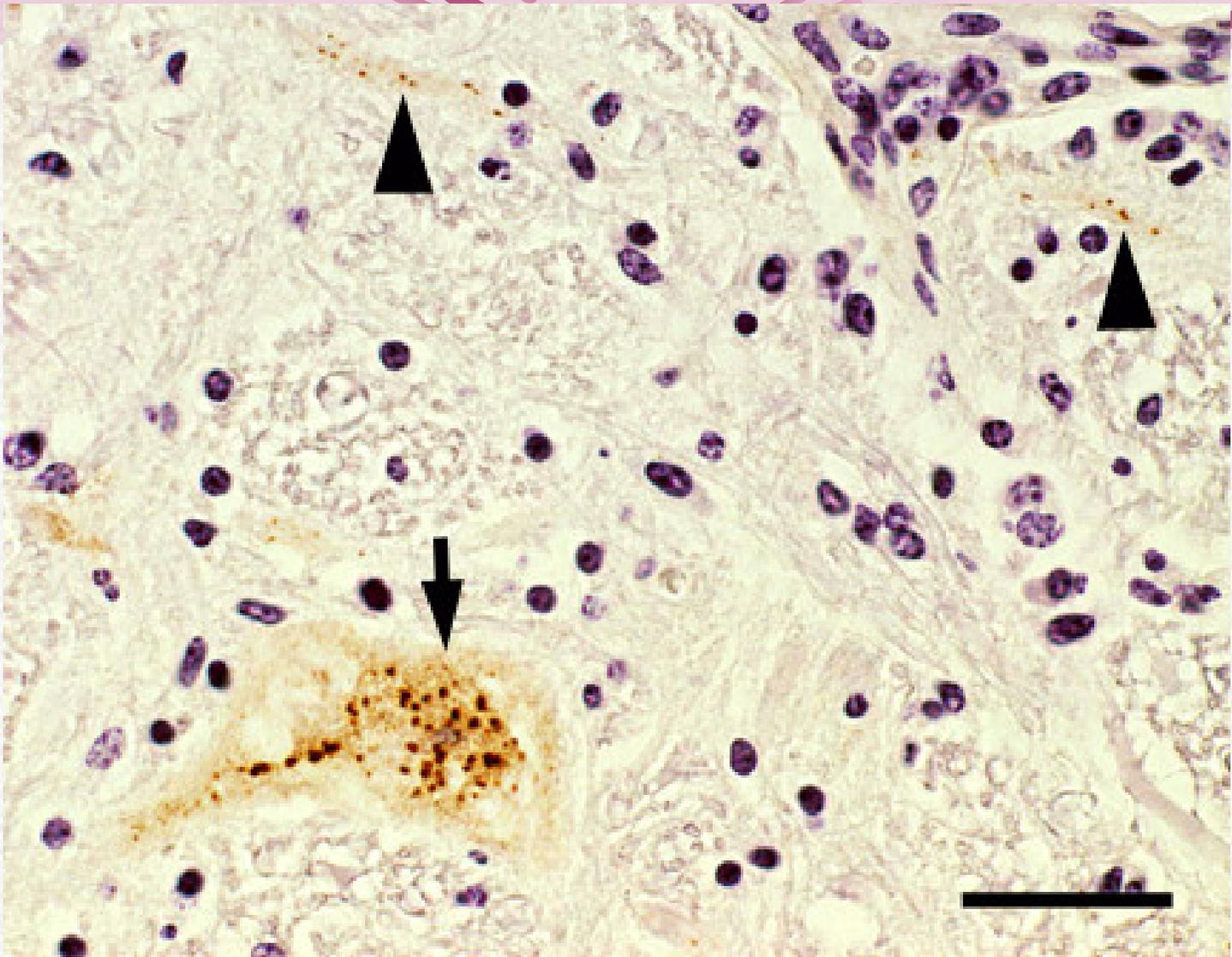
*Proteina nucleare*

ABC + AEC

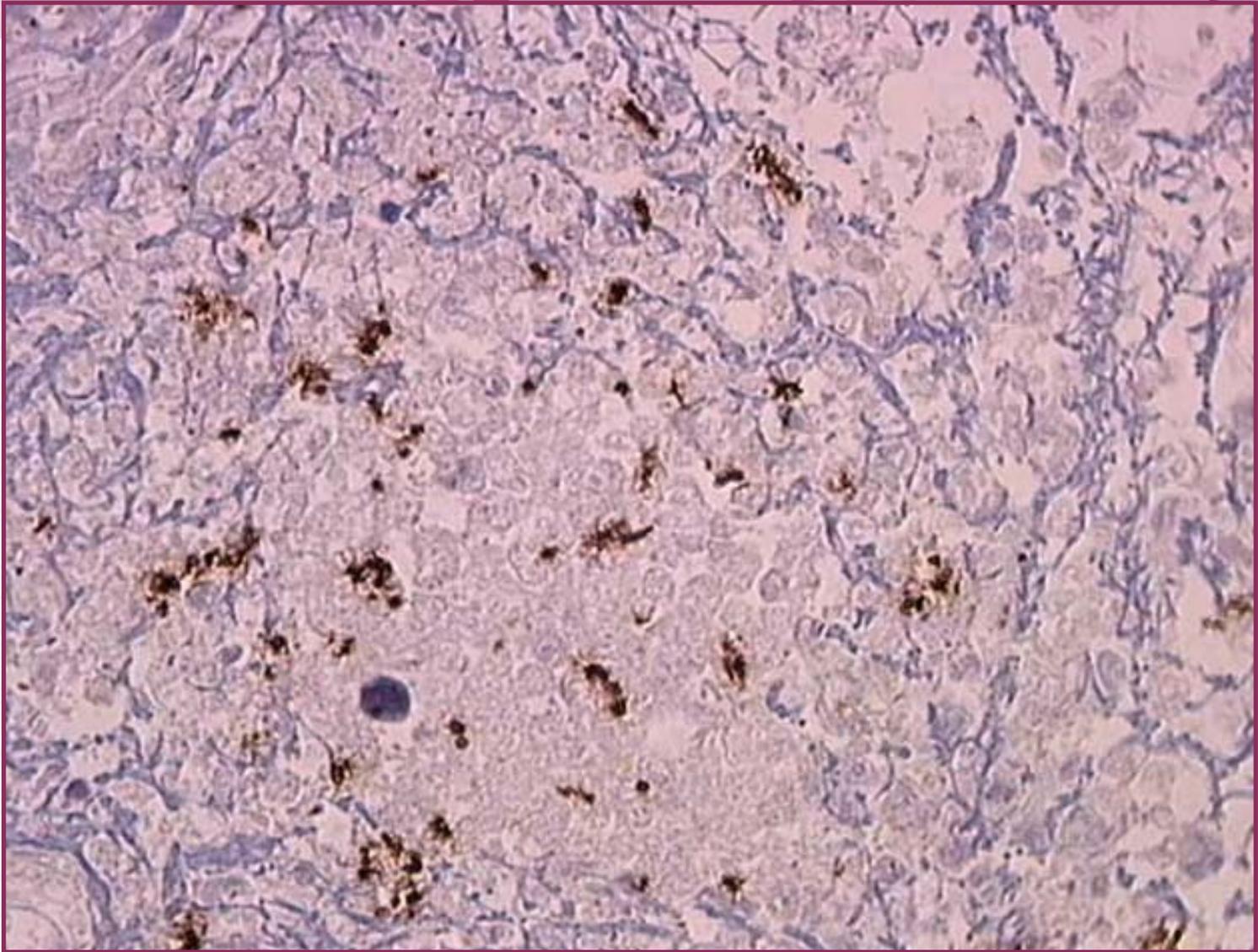


*Ormoni*





*Virus*



*M. tuberculosis*