

Ao6

Revisione e aggiornamento del volume *Tecniche di immunoistochimica Caleidoscopio* n. 128 Medical System 1999.

Paola Muzi
Antonella Rocchi
Mauro Bologna

Tecniche di immunoistochimica

Un manuale operativo essenziale

Presentazione di
Guido Macchiarelli





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it

Copyright © MMXX

Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it
info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-3836-6

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: dicembre 2020

Indice

- 9 *Presentazione*
Guido Macchiarelli
- 11 *Prefazione*
- 13 *Introduzione*
- 19 *Capitolo I*
Storia dell'immunoistochimica
- 23 *Capitolo II*
Fase pre analitica
- 2.1. Gestione dei tessuti, 23 – 2.2. Accettazione e documentazione, 24 – 2.3. Esame macroscopico (Grossing), 25 – 2.4. La fissazione dei tessuti, 25 – 2.4.1. Fissativi a base di formalina, 28 – 2.4.2. Fissativi a base di cloruro mercurico, 33 – 2.4.3. Fissazione alcoolica: etanolo, 36 – 2.4.4. Analisi genetiche, 37 – 2.4.5. Acetone, 39 – 2.4.6. Acido acetico, 39 – 2.4.7. Acido acetico cloruro di zinco, 39 – 2.4.8. Miglioramento della fissazione, 40 – 2.4.9. Fissazione per immuno-elettro-microscopia, 40 – 2.5. Preparazioni Speciali di Tessuto, 41 – 2.5.1. Decalcificazione, 41 – 2.5.2. Preparati ottenuti per striscio, 42 – 2.5.3. Preparati ottenuti per citocentrifugazione, 43 – 2.5.4. Allestimento di citoinclusi, 44 – 2.5.5. Preparati purificati su gradiente, 45 – 2.5.6. Preparati ottenuti per impronta, 46 – 2.5.7. Preparazione di sezioni congelate, 46 – 2.5.8. Campioni di biopsie, 50 – 2.6. Processazione dei tessuti, 51 – 2.6.1. Disidratazione, 51 – 2.6.2. Chiarificazione, 53 – 2.6.3. Infiltrazione, 54 – 2.6.4. Inclusione in paraffina, 54 – 2.6.5. Taglio al microtomo, 57 – 2.6.6. Raccolta delle sezioni, 64 – 2.6.7. Conservazione delle sezioni, 67 – 2.6.8. Sparaffinatura e idratazione dei preparati inclusi, 71.
- 73 *Capitolo III*
Fase analitica
- 3.1. Smascheramento dell'antigene, 73 – 3.1.1. Smascheramento con enzimi proteolitici, 74 – 3.1.2. Smascheramento con il calore, 77 – 3.1.3. Combinazione

di pre-trattamento proteolitico e recupero di antigene, 83 – 3.1.4. Analisi dei principali fattori che influenzano il recupero dell'antigene, 88 – 3.1.5. Applicazione delle tecniche AR, 89 – 3.2. Blocco delle reazioni non specifiche, 92 – 3.2.1. Saturazione dei siti di legame aspecifici, 92 – 3.2.2. Blocco degli enzimi endogeni, 94 – 3.3. L'Anticorpo primario, 98 – 3.3.1. La molecola di IgG, 99 – 3.3.2. Anticorpo primario: proprietà, 108 – 3.3.3. Anticorpo primario: manipolazione, 116 – 3.4. Tecniche di colorazione, 118 – 3.4.1. Metodo diretto, 120 – 3.4.2. Metodo indiretto a due passaggi, 121 – 3.4.3. Metodo indiretto a tre passaggi, 123 – 3.4.4. Metodo dell'immunocomplesso solubile, 124 – 3.4.5. Metodi che utilizzano (Strept) Avidina – Biotina, 126 – 3.4.6. Metodi di amplificazione con polimero, 130 – 3.4.7. Metodi di colorazione rapida, 133 – 3.5. I sistemi di rivelazione, 133 – 3.5.1. Enzimi, 134 – 3.5.2. Substrati cromogeni, 136 – 3.6. Tecniche di pre e post inclusione, 142 – 3.7. La doppia colorazione, 143 – 3.7.1. Metodo che usa lo stesso enzima e differenti substrati, 143 – 3.7.2. Metodo che usa enzimi differenti, 144 – 3.8. Immunocitochimica su preparati colorati, 145 – 3.9. Tra l'istochimica e la biologia molecolare, 146 – 3.9.1. Metodi di studio della proliferazione cellulare, 146 – 3.9.2. Metodi di studio della morte cellulare, 148 – 3.10. Controcolorazione, 155 – 3.10.1. Controcolorazione per prodotti terminali insolubili, 157 – 3.10.2. Controcolorazione per prodotti terminali solubili, 157 – 3.11. Montaggio del vetrino copri oggetto, 157 – 3.12. Accorgimenti per un risultato ottimale, 159 – 3.12.1. Le soluzioni tampone, 159 – 3.12.2. Incubazione degli anticorpi, 165 – 3.12.3. Lavaggio dei vetrini, 170 – 3.12.4. Preparati di controllo, 172.

177 Capitolo IV Fase post analitica

4.1. Interpretazione dei risultati, 177 – 4.1.1. Colorazione specifica, 177 – 4.1.2. Colorazione non specifica, 178 – 4.2. Analisi dei dati, 187 – 4.2.1. Valutazione qualitativa, 187 – 4.2.2. Analisi quantitativa, 187 – 4.2.3. Valutazione semiquantitativa, 187 – 4.2.4. Punteggio semiquantitativo combinato, 188 – 4.2.5. Test statistico del chi quadrato (Approcci del valore minimo di p), 190 – 4.2.6. Analisi della curva ROC, 192.

197 Capitolo V Sicurezza in immunoistochimica

5.1. Note di carattere generale, 197 – 5.2. Pericoli associati ad un laboratorio di immunoistochimica, 198 – 5.2.1. Rischio chimico, 199 – 5.2.2. Rischio fisico, 202 – 5.2.3. Rischio biologico, 204 – 5.2.4. Uso in sicurezza dell'Alcool etilico, 205 – 5.2.5. Uso in sicurezza della formaldeide, 214 – 5.2.6. Uso in sicurezza dello xilene, 219 – 5.2.7. Uso in sicurezza della Paraffina, 225 – 5.2.8. Uso in sicurezza della diaminobenzidina, 226.

229	<i>Glossario</i>
237	<i>Referenze bibliografiche</i>
259	<i>Indice analitico</i>

Presentazione

GUIDO MACCHIARELLI*

Sono estremamente lieto di presentare questo manuale di Paola Muzi e Mauro Bologna, esperti microscopisti da sempre attivi nel dipartimento MeSVA. Gli Autori, con il prezioso contributo della dottoressa Antonella Rocchi, affrontano la metodologia immunoistochimica, che ha visto le sue prime applicazioni negli anni Quaranta del secolo scorso e che, con continue modifiche e aggiustamenti, è ancora oggi uno strumento di fondamentale importanza nel campo della diagnostica e della microscopia clinica.

La mia esperienza scientifica di anatomico e di ricercatore soprattutto nel vasto campo della microscopia e della morfologia ultrastrutturale mi vede particolarmente sensibile ai temi dell'osservazione dei preparati istologici e biologici in generale. In questo manuale vengono trattate con estrema eleganza le fondamentali tecniche di immunoistochimica la cui importanza è legata soprattutto alla possibilità di ottenere una diagnosi accurata senza distruzione dell'architettura tissutale. In questo volume queste tecniche sono presentate con dovizia di particolari, tenendo conto delle ultime scoperte che oggi consentono tempi rapidi di esecuzione e amplificazione del segnale, mai ipotizzati agli albori. Il volume è anche corredato di consigli e accorgimenti per la manipolazione in sicurezza delle sostanze più utilizzate per le procedure: un contributo originale che oltre a dare un valore aggiunto al volume sarà di sicura utilità per il lettore.

Sono dunque particolarmente orgoglioso del fatto che questo manuale abbia visto la sua realizzazione nel nostro Dipartimento e sono certo che avrà successo sia tra i discenti che i docenti

* Professore Ordinario di Anatomia Umana e Direttore del Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente presso l'Università degli Studi dell'Aquila.

che avranno a disposizione delle linee guida aggiornate e facilmente applicabili su una tecnologia complessa e insostituibile per la microscopia clinica.

Prefazione

L'Immunoistochimica (IHC) è una tecnica messa a punto negli anni Quaranta da Albert Coons e coll. (1), che viene tuttora eseguita in migliaia di laboratori in tutto il mondo, con progressivi miglioramenti intercorsi nei suoi ottanta ed oltre anni di applicazione.

La caratteristica unica che contraddistingue l'IHC tra i molti altri test di laboratorio è che questa procedura si effettua senza distruzione dell'architettura istologica, e quindi la valutazione del quadro di espressione di una data molecola bersaglio è possibile nel contesto del microambiente in cui si trova (2).

Questo fatto permette di analizzare la sua relazione con altri elementi a livello subcellulare, cellulare e intercellulare; l'importanza di questa co-analisi è sempre più riconosciuta nel campo della diagnostica di routine così come nella ricerca di base e clinica per lo studio di biomarcatori prognostici/predittivi e lo sviluppo di nuovi farmaci.

Le applicazioni dei metodi di IHC sono state di recente estese in modo amplissimo con l'aumentare del numero di molecole che sono state scoperte, e che sono coinvolte nella patogenesi, nella diagnosi e nel trattamento delle malattie.

Sebbene ci sia stato un notevole progresso nell'automazione e nella standardizzazione della IHC, ci sono ancora molte cose da considerare nella corretta ottimizzazione del metodo e nell'interpretazione appropriata dei risultati.

Il grande scrittore di fantascienza, inventore e futurista britannico, Arthur C. Clarke affermava che qualsiasi tecnologia "abbastanza" avanzata è indistinguibile dalla magia (3). Molti sistemi di autocolorazione chiusi possono assomigliare a misteriose "scatole magiche" al cui interno si effettuano dei passaggi in sequenza che non è possibile verificare. Per questo motivo, questa tecnologia avanzata a volte può sembrare inspiegabile, soprattutto per il neofita. Ma è importante per tutti gli studiosi delle materie biologiche e mediche avere una

comprensione delle metodologie e saper riconoscere i problemi che possono produrre un risultato errato.

È importante rendersi conto che la IHC non è una “colorazione speciale”, simile alla colorazione acido-periodico Schiff o tricromica, ma piuttosto una procedura base su vetrino, che consente il rilevamento di proteine specifiche, zuccheri, ed altre molecole presenti nelle sezioni di tessuto, preservando contemporaneamente l’istologia del campione in esame (4).

Questo manuale non ha lo scopo di fornire informazioni complete sulla IHC, ma mira a fornire consigli utili ed a spiegare possibili insidie che essa può nascondere.

In primo luogo, è riassunta la procedura generale di IHC, seguita in ogni fase, e accompagnata da una sintesi dei problemi che possono presentarsi. In secondo luogo, vengono discussi i modi per un’interpretazione accurata della IHC, con introduzione a metodi generali di quantificazione e di analisi. Infine, vengono prese in considerazione le principali fonti di rischio nell’utilizzo dei reagenti e gli accorgimenti per lavorare in sicurezza.

Pertanto, questo manuale può essere utilizzato come riferimento di base per la pratica di laboratorio di biologi, patologi, specializzandi e studenti delle materie che utilizzano campioni istologici e patologici nei diversi ambiti delle analisi e delle ricerche di laboratorio.

Introduzione

L'immunoistochimica (IHC) è un metodo ausiliario importante per i patologi in quanto consente di determinare in modo specifico l'espressione, la distribuzione e la quantità di una certa molecola bersaglio nel tessuto usando una specifica reazione antigene anticorpo. L'immunoistochimica è ormai un metodo di laboratorio indispensabile cui si fa ricorso costantemente in anatomia patologica come aiuto nella diagnosi differenziale di numerose malattie, comprese le infezioni.

In campo oncologico è utilizzata per la classificazione dei tumori nonché come test diagnostico e prognostico, e i risultati ottenuti contribuiscono alla scelta delle migliori opzioni terapeutiche per i pazienti in ambito clinico.

I risultati della colorazione dipendono in gran parte dalla qualità del preparato. I fattori che influenzano l'esito di un'immunoistochimica iniziano nella sala operatoria e finiscono con l'interpretazione della colorazione da parte del patologo, che, in ultima analisi, porta alla decisione del trattamento da parte del medico specialista. Numerose sono le potenzialità e le insidie presenti nel processo di colorazione immunoistochimica, dalla biopsia alla valutazione, pertanto particolare attenzione deve essere posta a tutti i passaggi delle procedure al fine di migliorare la certezza nel risultato (5) (6).

L'IHC è un saggio complesso, composto da parametri multipli; tutte le fasi, che dal reperto biologico portano al risultato, possono essere raggruppate in una fase pre-analitica, una fase analitica e una fase post-analitica (7).

Fase pre-analitica: dal prelievo del materiale biologico fino all'allestimento del vetrino:

- un campione di tessuto (rimosso chirurgicamente o con ago biopsia) dalla sala chirurgica arriva, immerso in fissativo, presso il laboratorio di patologia;

- all'arrivo, i dettagli del campione vengono inseriti nel Sistema Informatico di Laboratorio (LIS). Il nome del paziente e i suoi dati identificativi vengono sostituiti da un codice univoco che ne tuteli la privacy;
- durante una prima analisi sommaria il reperto viene esaminato visivamente per rilevare zone sospette che richiedono ulteriori esami. Se presenti, esse sono escisse dal blocco di tessuto e collocate in cassette a parte;
- la processazione e l'inclusione sono i passaggi in cui il pezzo di tessuto viene trasformato in una forma e condizione tale da costituire un blocco omogeneo che può essere tagliato senza difficoltà. Tipicamente, il tessuto è prima fissato in formalina, poi disidratato, infine incluso in paraffina;
- il taglio è il passaggio chiave, in cui dai blocchetti di tessuti inclusi in paraffina si ottengono sezioni ultrasottili (circa 4 μm) da porre su vetrini. Un codice a barre sui vetrini può garantire la tracciabilità e può anche contenere informazioni sul protocollo di trattamento.

Fase analitica: colorazione del vetrino, controcolorazione e montaggio. La parte analitica del processo di IHC comprende:

- recupero dell'antigene: viene eseguito per recuperare quelle molecole che possono essere state alterate dalla fissazione;
- blocco degli enzimi endogeni: questo passaggio serve ad eliminare reazioni chimiche che potrebbero avvenire nel tessuto e interferire con il risultato finale;
- applicazione dell'anticorpo primario che si lega specificamente all'antigene di interesse;
- applicazione del sistema di visualizzazione che comunemente utilizza un anticorpo, detto secondario, che riconosce il primario e trasporta un marcatore enzimatico;
- applicazione di un cromogeno che funge da substrato per l'enzima e genera un prodotto che consente di visualizzare il complesso antigene/anticorpo;
- controcolorazione: viene eseguita per visualizzare i nuclei e l'architettura complessiva dei tessuti;

- montaggio: le sezioni sono disidratate e montate cioè protette con un vetrino coprioggetto che le rende stabili nel tempo.

Fase post analitica: osservazione al microscopio, interpretazione dei risultati e diagnosi:

- nel processo post-analitico, il patologo interpreta le colorazioni in un contesto con tessuti di controllo positivi e negativi, utilizzando la microscopia a campo chiaro;
- i risultati sono riferiti all'oncologo per la decisione sul trattamento opportuno.

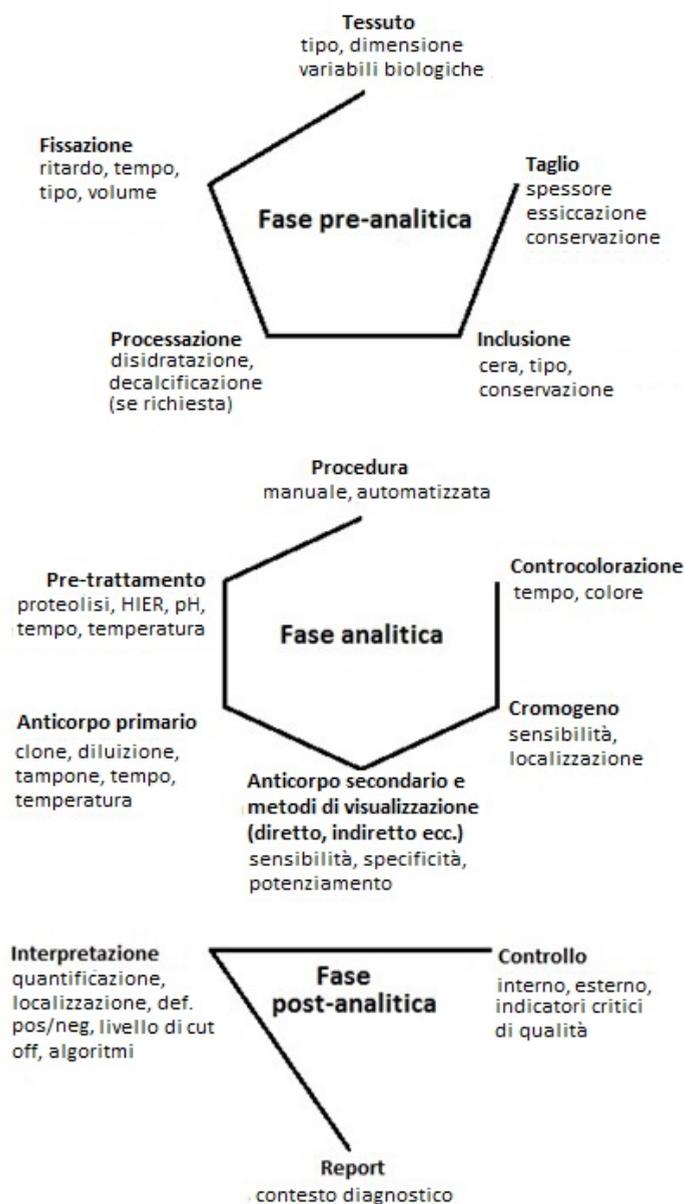


Figura 1. Rappresentazione schematica dei molteplici fattori che possono influenzare il risultato di una colorazione immunoistochimica (8).

L'esecuzione della IHC richiede molti passaggi; questi includono una corretta manipolazione del campione, una fissazione appropriata, la preparazione del blocchetto di paraffina, il recupero dell'antigene, la selezione e preparazione di anticorpi e reagenti, l'incubazione, il lavaggio e la controcolorazione (9). Per i 14 passaggi critici descritti in fig. 1, e che compongono le tre fasi della IHC, esistono migliaia di differenti procedure. La fig. 1 indica solo alcuni dei passaggi principali di un test totale; va però considerato che il solo processo pre-analitico contiene numerose variabili capaci di influenzare il risultato di colorazione immunoistochimica; esse comprendono il ritardo della fissazione, il tipo di fissativo, il tempo di permanenza in fissativi, i reagenti e le condizioni di disidratazione, chiarificazione, impregnazione di paraffina nonché le condizioni di asciugatura e conservazione del vetrino.

L'avvento delle macchine automatizzate per IHC ha migliorato la affidabilità e la riproducibilità della IHC, in particolare nella impostazione clinica, tuttavia ci sono ancora molti parametri da considerare nella corretta ottimizzazione del metodo e nell'interpretazione appropriata dei risultati (10).

D'altra parte, il metodo di colorazione manuale offre maggiore flessibilità, consentendo l'ottimizzazione di una specifica reazione antigene-anticorpo, e quindi risultati migliori, in particolare nell'ambito della ricerca. Entrambi i metodi hanno pro e contro, ma principi e procedure di base rimangono gli stessi (7).

Il risultato finale di un protocollo di IHC non è solo una "colorazione", la cui intensità deve essere adattata alla capacità interpretativa del patologo. L'IHC è un immunodosaggio preciso che è strettamente quantificabile, pertanto essa deve essere eseguita solo con il grado di rigore tecnico e controllo che richiede qualsiasi altra analisi immunologica (fig. 2).

A causa della lunga storia dell'uso delle sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE), in patologia, la maggior parte delle diagnosi istologiche è stata fatta in base all'osservazione di sezioni di tessuto FFPE colorate con ematossilina ed eosina (11) (12).

I blocchetti di tessuti FFPE accompagnati da dati noti di follow-up, che in gran numero si sono accumulati negli archivi dei laboratori di tutto il mondo, potrebbero dunque costituire una risorsa unica ed estremamente preziosa per la ricerca clinica traslazionale e per la ricerca di base.

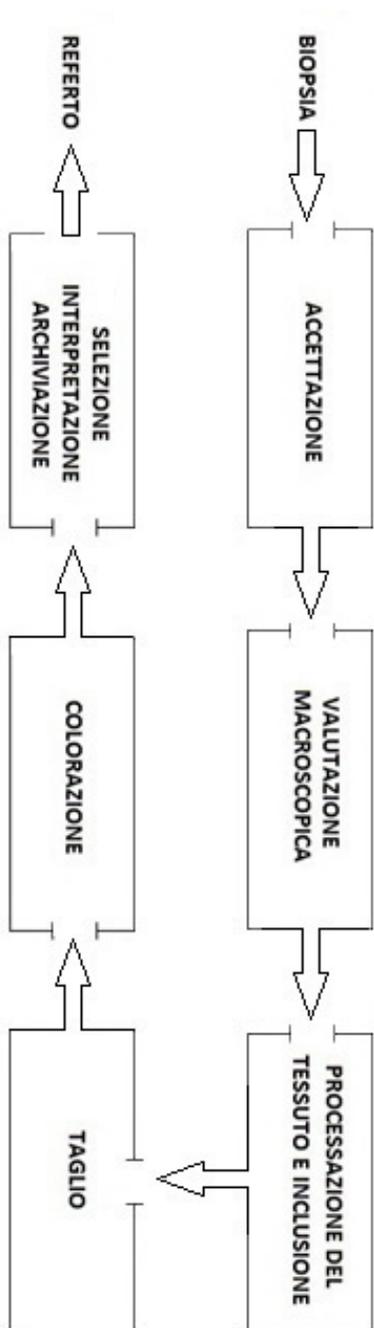


Figura 2. Dalla biopsia al risultato; ref (9).

Storia dell'immunoistochimica

Prima che l'utilizzo dell'immunoistochimica raggiungesse una diffusione pressoché globale come importante metodo nella diagnosi routinaria di cancro, questa tecnica ha avuto una lunga serie di sviluppi e modifiche che sono elencati nella tabella 1.1.

Tabella 1.1. Le principali tappe della storia dell'immunoistochimica.

Anni	Metodi	Referenze
1941	Anticorpi primari marcati con fluorescenza	(1)
1967	Anticorpi primari marcati con enzimi	(13)
1969	Metodo indiretto anticorpi secondari marcati	(14)
1970	Anticorpi secondari non marcati	(15)
1970	Rilevazione di antigeni su sezioni ultrasottili	(16)
1974	Applicazione su sezioni di routine in paraffina a formalina	(17)
1975	Invenzione degli anticorpi monoclonali	(18)
1978	Doppia colorazione con anticorpi non marcati (APAAP)	(19)
1979	Anticorpi monoclonali per antigeni umani	(20)
1988	Colorazione semi-automatizzata con colonna capillare	(21)
1991	Recupero di antigene indotto dal calore	(22)
1993	Sforzi di standardizzazione come "test totali"	(23)
1995	Sistema di rilevazione a base di polimero di destrano	(24)
1998	Immunoistochimica come complemento diagnostico	(25)
2007	Raccomandazioni per migliorare la standardizzazione della IHC	(5)
2008	Tests Molecolari per HER2 CISH nel laboratorio di IHC	(10)

Già nel 1941, Albert H. Coons e coll. hanno dimostrato che era possibile localizzare gli antigeni in sezioni di tessuto utilizzando anticorpi

contro *Streptococcus pneumoniae* marcati con fluoresceina e visualizzati con luce ultravioletta (microscopia a fluorescenza) (1). Durante i successivi 25 anni il metodo Coons è stato utilizzato con diverse modifiche, tra cui la marcatura con metalli pesanti; tuttavia fino all'introduzione della marcatura enzimatica degli anticorpi (13), non è stato possibile superare molti dei problemi connessi con la marcatura degli anticorpi con fluoresceina e con metalli pesanti.

Nei primi anni Settanta, l'applicazione, da parte di Taylor, Mason e coll. del metodo «immunoperossidasi» a tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina, ha rappresentato un passo fondamentale per estendere l'utilizzo dell'immunoistochimica alla "routine" diagnostica in anatomia patologica. I metodi delle marcature diretta e indiretta avevano l'inconveniente che ogni singolo anticorpo primario, o l'anticorpo secondario, doveva essere coniugato con enzima (17). Questo implicava una bassa resa di anticorpo effettivamente marcato.

Questo problema fu aggirato con lo sviluppo di un metodo enzimatico che non richiedeva la marcatura dell'anticorpo: il metodo "perossidasi antiperossidasi" (PAP), che aveva l'ulteriore vantaggio di avere una maggiore sensibilità, e di essere facilmente applicabile per le analisi di routine.

Una variazione correlata è stata l'introduzione, nel 1978, del metodo "fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina" (APAAP) (19).

Nonostante lo sviluppo di sistemi di rivelazione nuovi e migliorati per la visualizzazione di antigeni nei tessuti, l'IHC ha subito la mancanza di riproducibilità, dovuta in parte ai reagenti anticorpali di scarsa qualità, e in parte agli effetti incoerenti e avversi della fissazione.

L'aumentata domanda ha portato alla produzione di reagenti di qualità più elevata dal settore commerciale, con un migliore controllo sui metodi di produzione.

L'affinità e la specificità delle preparazioni di anticorpi policlonali differiscono tra campioni di siero diversi, così come varia nel tempo la risposta immune. Questo può accadere ad es. quando un animale è sostituito da un altro come fonte di immunoglobuline.

Nei primi anni Settanta si manifestò la necessità di avere a disposizione preparazioni anticorpali standardizzate, per migliorare la sicurezza e la riproducibilità delle diagnosi e si cominciarono a produrre, a livello industriale, anticorpi policlonali purificati, la cui forza (misurata dal titolo) restava costante da lotto a lotto (26).