

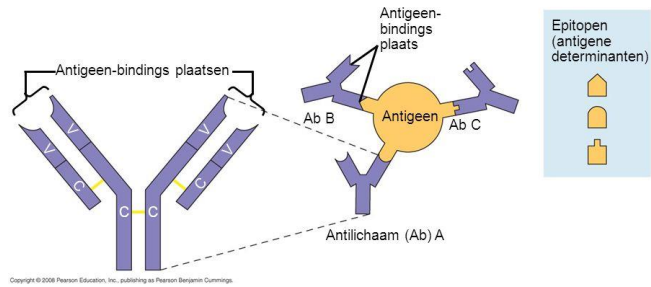
Immunohisto-cytochemie

Immunohistochemie heeft tot doel specifieke cel- en weefselbestanddelen op basis van immunologische kenmerken aan te tonen.

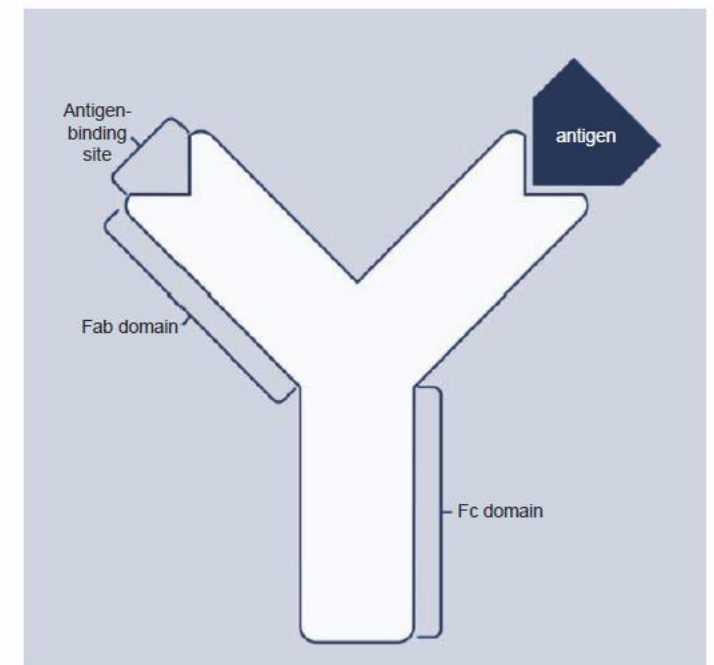
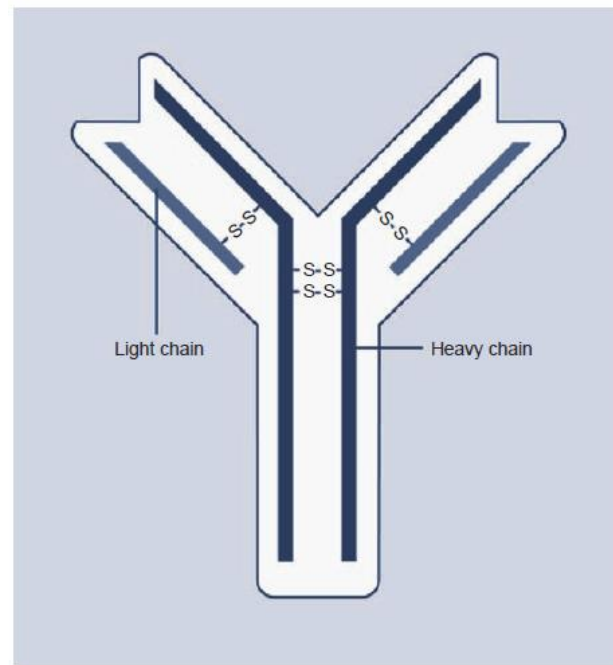
Dit kan zowel op histologisch materiaal (weefsels), immunohistochemie, als op cytologisch materiaal (cellen), immunocytochemie.

Doel van immunohisto-cytochemie:

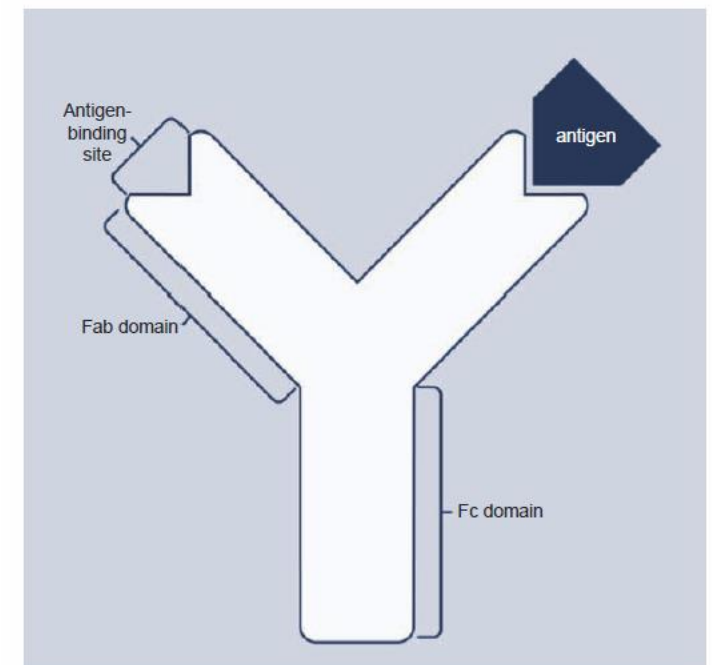
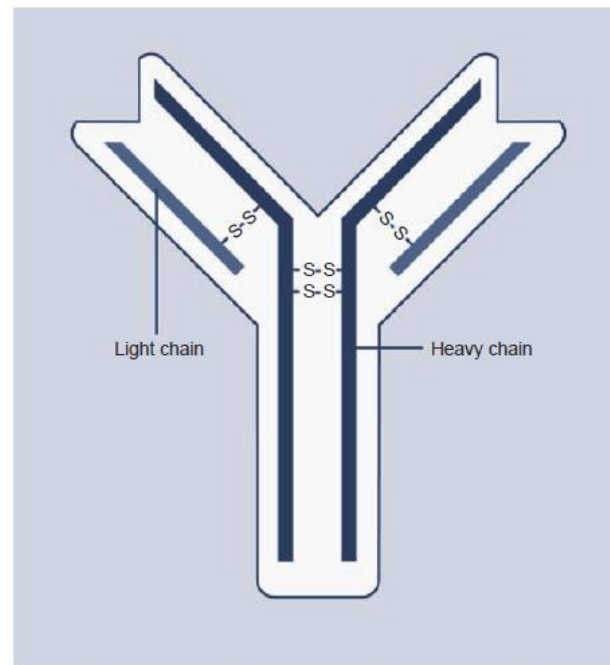
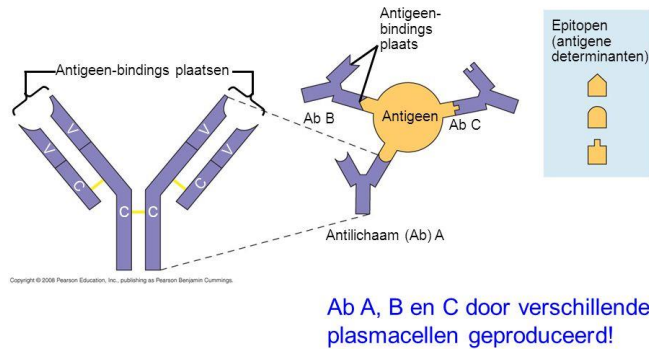
- aanvullend onderzoek, als het routine histologisch of cytologisch onderzoek niet voldoende - of onvoldoende aanwijzingen geeft voor een bepaalde diagnose
- onder andere specifieke tumoren aantonen
- bepalen bij metastasen de origine van de primaire tumor
- Invasiviteit van de tumor bepalen (doorgroei, ingroei enz.)
- aanwijzingen voor het toepassen van therapeutica als b.v. hormonale therapie



Ab A, B en C door verschillende plasmacellen geproduceerd!

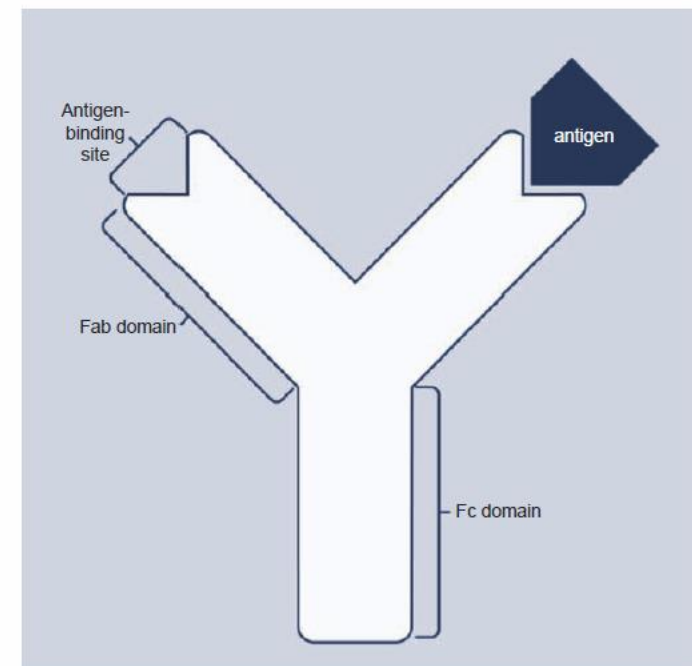
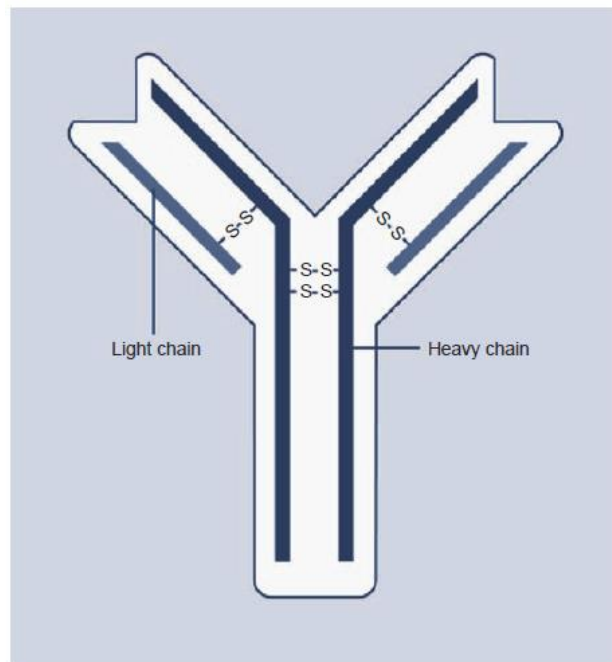
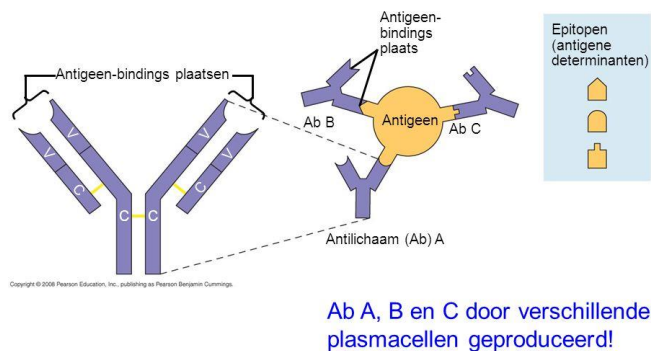


In de ImmunoHisto-Cytochemie wordt gebruik gemaakt van antilichamen die gericht zijn tegen bekende antigenen/epitopen (antigene determinanten).



In de ImmunoHisto-Cytochemie wordt gebruik gemaakt van antilichamen die gericht zijn tegen bekende antigenen/epitopen (antigene determinanten).

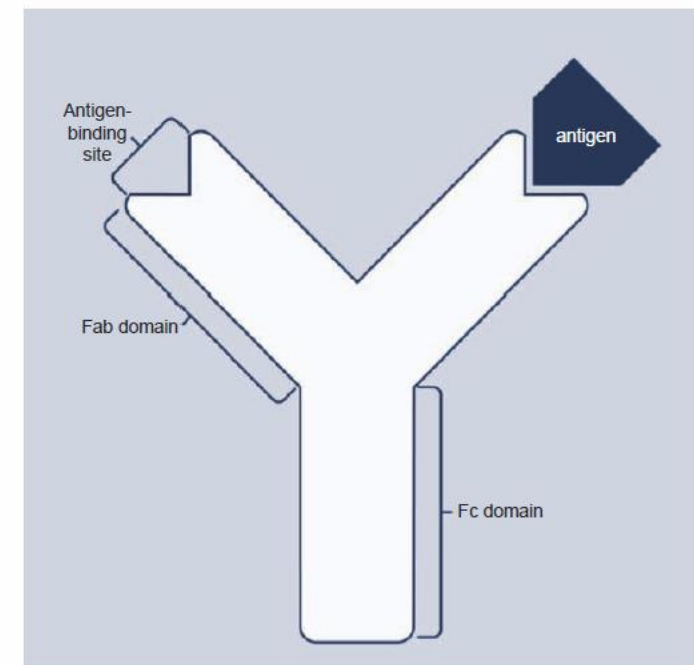
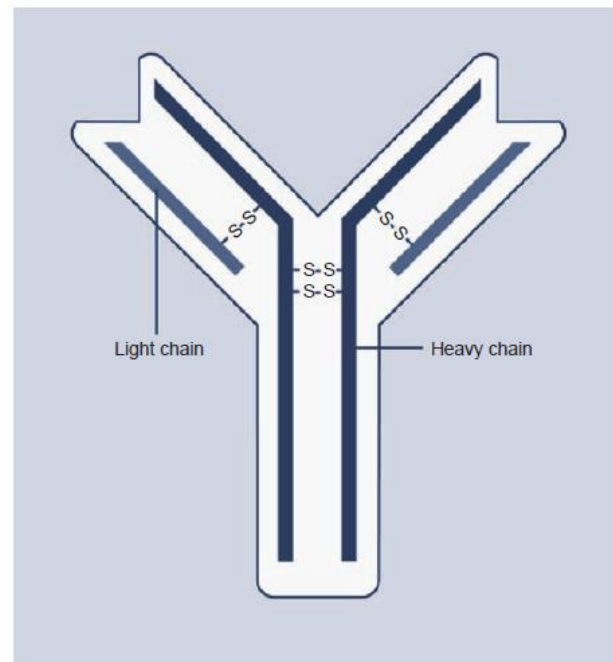
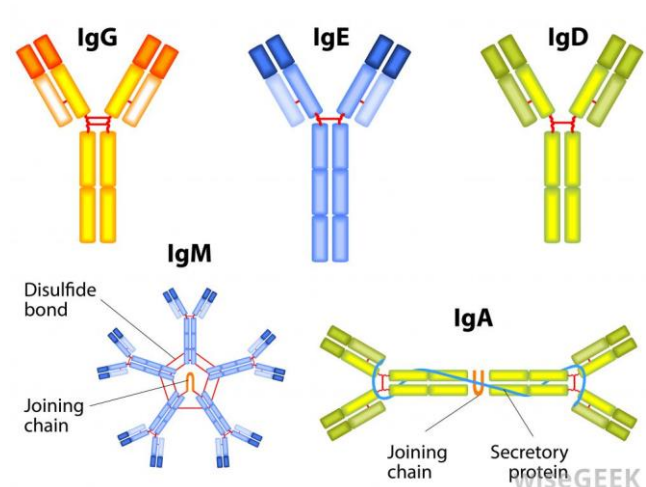
Het specifieke **antilichamen** bindt aan het target-eiwit, het antigeen, waartegen het is opgewekt. De antigeen-antilichaambinding wordt met een kleurstof zichtbaar gemaakt en onder de microscoop bekeken.



In de ImmunoHisto-Cytochemie wordt gebruik gemaakt van antilichamen die gericht zijn tegen bekende antigenen/epitopen (antigene determinanten).

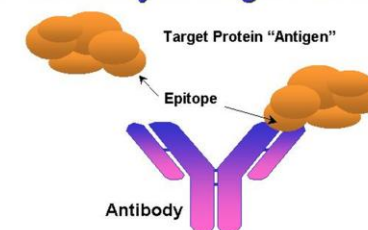
Het specifieke antilichamen bindt aan het target-eiwit, het antigeen, waartegen het is opgewekt. De antigeen-antilichaambinding wordt met een kleurstof zichtbaar gemaakt en onder de microscoop bekeken.

Het antigeen bindende deel (F(ab)) herkent het antigeen waartegen het is opgewekt. Het constante deel (Fc fragment) bevat de eigenschappen van het antilichaam zelf;
o.a.: - tot welke groep van antilichamen het behoort IgG, IgA, IgM, IgD of IgE
- in welk dier het is opgewekt
- enz.



Het “antigeen bindende deel” (F(ab)) herkent het antigeen waartegen het is opgewekt.
 Het “constante deel” (Fc fragment) bevat de eigenschappen van het antilichaam zelf.
 o.a.: - tot welke groep van antilichamen het behoort IgG, IgA, IgM, IgD of IgE
 - in welk dier het is opgewekt
 - enz.

Antibody-Antigen Binding



In gebruik nemen van antilichamen

SOP:

Afdeling Pathologie Erasmus MC Rotterdam			Pagina 1 van 3
Stroomdiagram van binnenkomst tot in gebruikname van antilichamen			 Erasmus MC Universitair Medisch Centrum Rotterdam
Document: IN-LAS-364	Versie nr	7	
Auteur: J. Shukla	Uitgifte datum	05-07-2018	

In gebruik nemen van antilichamen

Nieuwe antilichamen; nog niet eerder in gebruik:



Antilichamen om direct te gebruiken (Ready To Use):

- in eerste instantie alleen het bestaande/voorgeschreven protocol
- indien nodig aanpassen
- m.b.v. standaard Ultraview en Optiview protocol
- aanpassen wat betreft antigeen retrieval (CC1 of CC2 en/of Protease) en amplificatie



Antilichamen in geconcentreerde vorm geleverd:

- in eerste instantie aanbevolen verdunning (titer) uittesten
m.b.v. standaard Ultraview en Optiview protocol
- aanpassen wat betreft antigeen retrieval (CC1 of CC2 en/of Protease) en amplificatie

In gebruik nemen van antilichamen

Nieuwe antilichamen (al in gebruik):



Afdeling Pathologie Erasmus MC Rotterdam			1 / 1
Verificatie van antilichamen			Erasmus MC Universitair Medisch Centrum Rotterdam 
Document: FO-LAS-129	Versie nr	10	
Auteur: B. R. Autar	Uitgifte datum	02-10-2017	

Antilichamen om direct te gebruiken (RTU):

- zelfde lotnr.: direct in gebruik nemen
- ander lotnr. zelfde concentratie: formulier invullen en testen op patiënten weefsel bij goedkeuring in gebruik nemen
- ander lotnr. andere concentratie: eerst uittesten op controle weefsel



Antilichamen om direct te gebruiken (RTU):

zelfde lotnr.: direct in gebruik nemen

ander lotnr. zelfde concentratie: formulier invullen en testen op patiënten weefsel
bij goedkeuring in gebruik nemen

ander lotnr. andere concentratie: eerst uittesten op controle weefsel

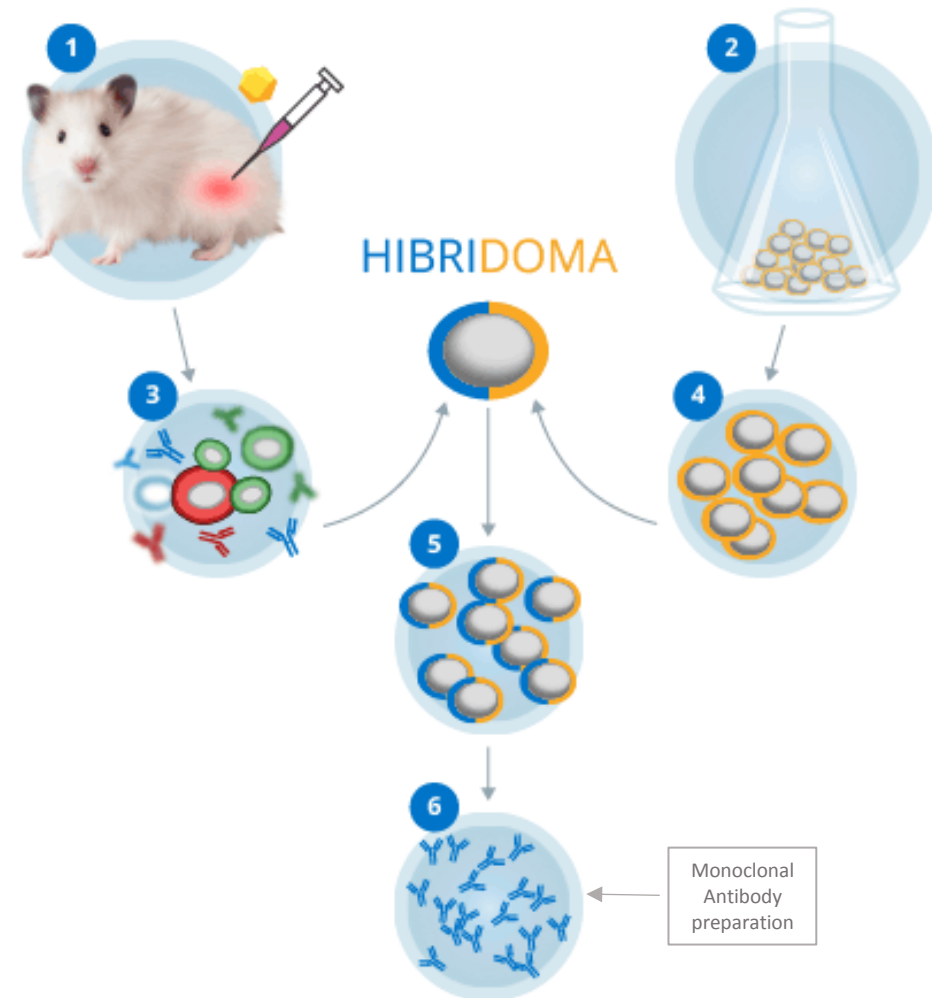
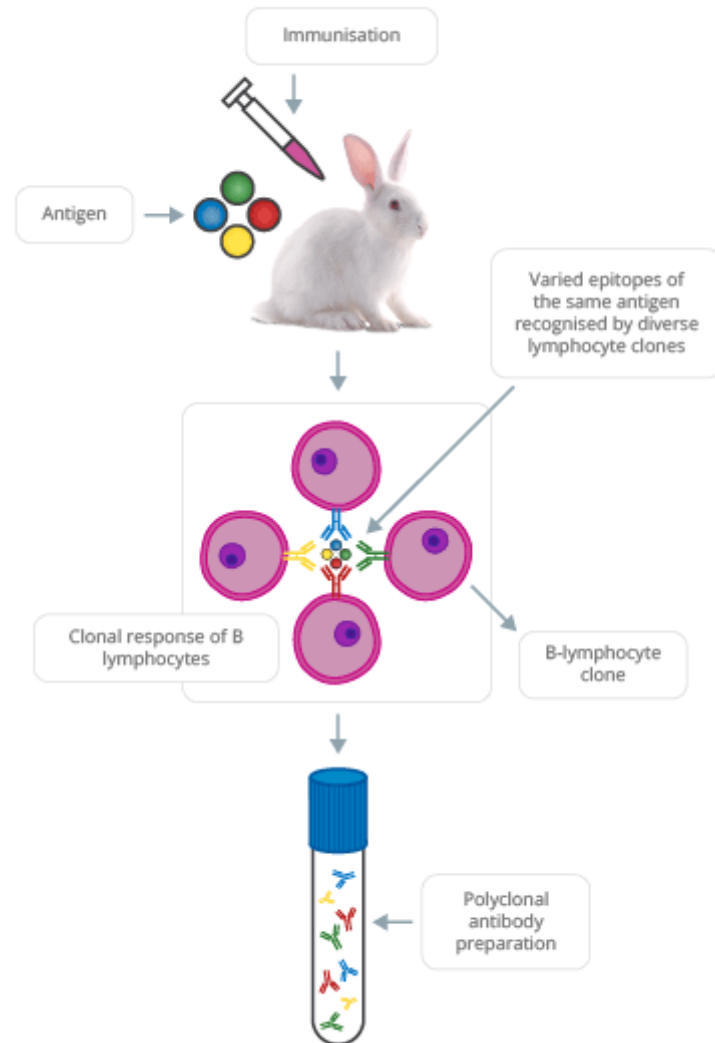


Antilichamen in geconcentreerde vorm geleverd:

zelfde lotnr.: direct in gebruik nemen

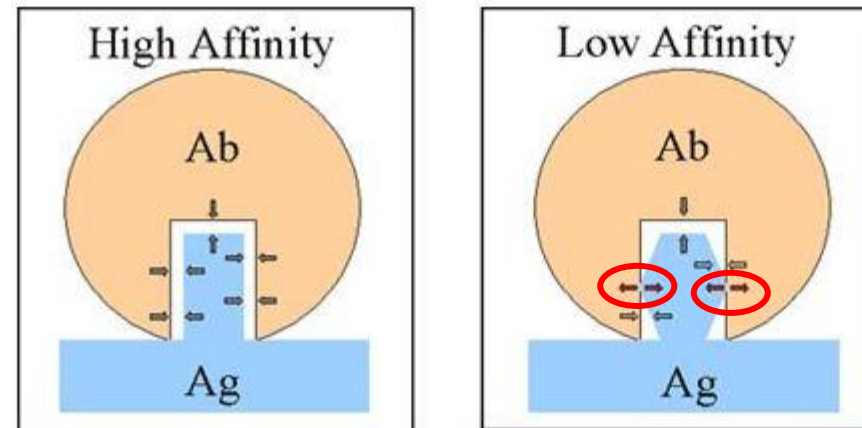
ander lotnr.: eerst uittesten op controle weefsel

Polyclonale – en monoclonale antilichamen



Affiniteit: de sterkte van de reactie tussen een enkele antigene determinant en het antilichaam

Aviditeit: de gezamenlijke affiniteit van meerdere bindingsplaatsen





Bulk vloeistoffen



EZ prep: “zeep” oplossing om de paraffine te verwijderen van de FFPE coupes die Verhit worden tot boven de 70°C. En de SSC **buffer** te verdunnen voor de ISH reactie.

LCS (Liquid Cover Slip): oplossing die wordt gebruikt als barrière tussen vluchtige reagentia en de lucht. Deze barrière voorkomt verdamping.

LCS is samengesteld uit organische oliemoleculen. Wanneer dit wordt aangebracht verspreidt de olie zich over het oppervlak van de buffer en vormt daarbij een barrière tussen buffer en lucht, die verdamping voorkomt.

Ventana’s automated slide stainer brengt tijdens het uitvoeren van de verschillende kleuringsprotocollen automatisch het benodigde LCS (Predilute) aan.

SSC (Salin-Sodium-Citrate buffer): gebruikt voor het wassen bij de ISH procedure.
(“wasbuffer”)

Reactie buffer: pH 7,4-7,8 Gebruikt voor het wassen bij de IHC procedure

CC1 en CC2: Antigen retrieval oplossing: om de herkenning te verbeteren van het doelwit antigeen.

Bulk vloeistoffen

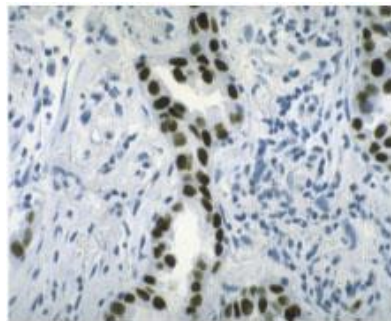


CC1: oplossing die wordt gebruikt als voorbehandeling bij de bewerking van weefselmonsters voor IH. CC1 is een op Tris gebaseerde buffer met een licht basische pH (8,4) die bij verhoogde temperatuur in staat is bindingen die door formaline in het weefsel zijn gevormd te verwijderen waardoor de bereikbaarheid voor antilichamen wordt verbeterd.

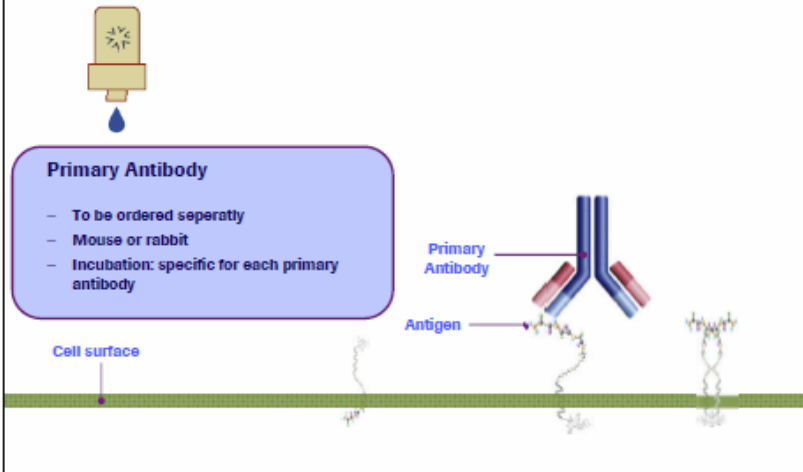
CC2: een citraatbuffer met pH 6,0 die wordt gebruikt als voorbehandeling bij de bewerking van weefselmonsters voor IH. Bij een verhoogde temperatuur is CC2 in staat **is** bindingen die door formaline in het weefsel zijn gevormd te verwijderen waardoor de bereikbaarheid voor antilichamen wordt verbeterd.

Option: was-buffer pH4 voor de SISH procedure

In de Ventana BenchMark Ultra wordt het gehele IHC proces automatisch uitgevoerd, van deparaffineren tot de visualisatie Van het gebonden primaire antilichaam.

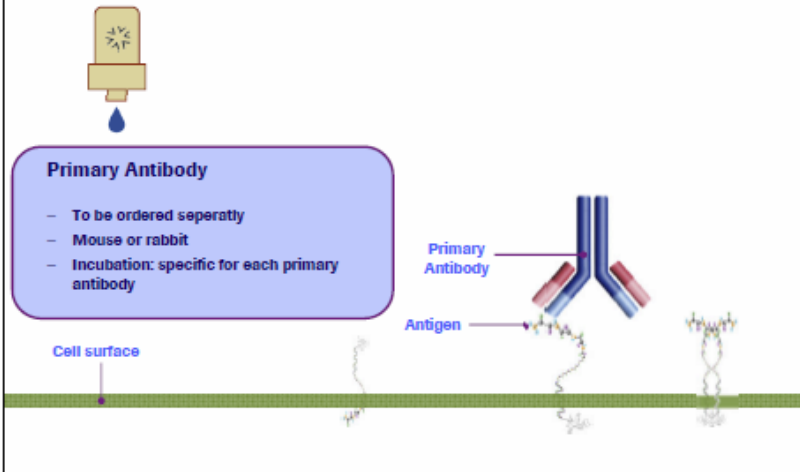


Multimer technology



Het primaire antilichaam is gericht tegen “humaan” menselijk antigeen en is opgewekt in een “muis” of een “konijn”.

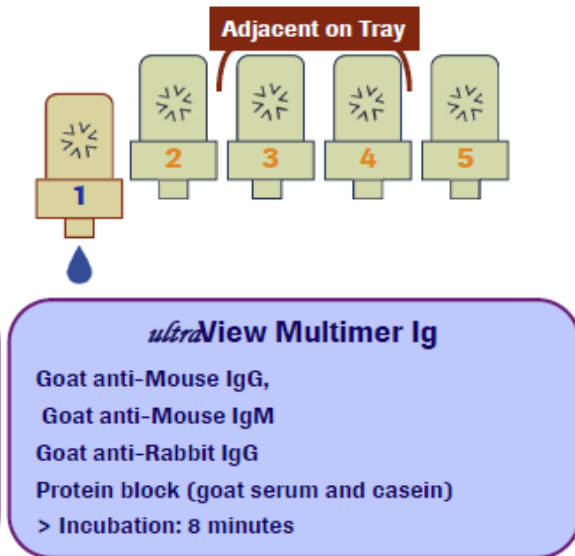
Multimer technology



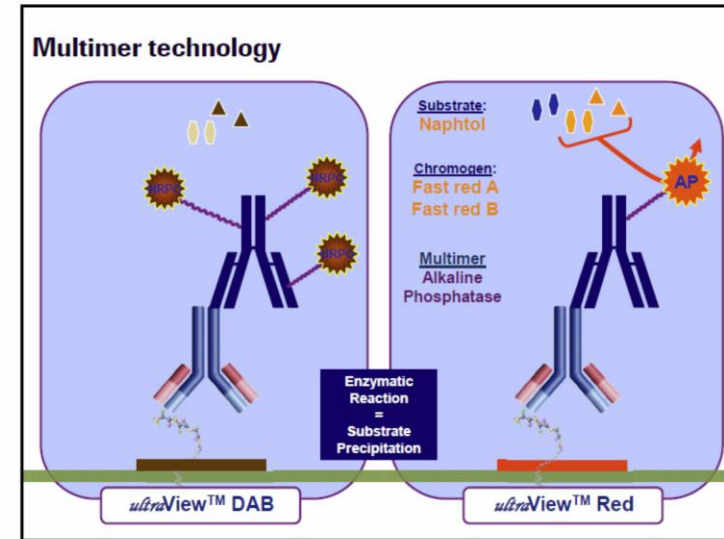
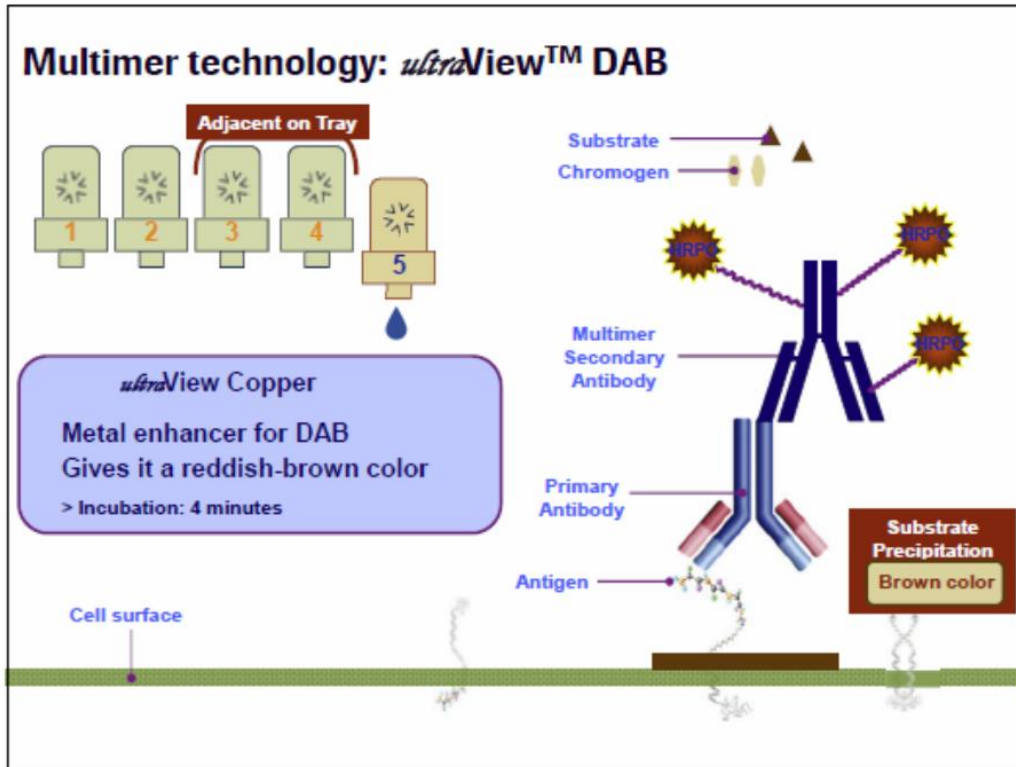
Het primaire antilichaam is gericht tegen “humaan” menselijk antigeen en is opgewekt in een “muis” of een “konijn”.

Inhoud van Ultraview kit

1. Multimeer Ig, deze bevat Goat anti mouse IgG en IgM
Goat anti Rabbit IgG
2. Chromogen
3. Substraat
4. Koper oplossing



Ultraview



Het enzym HRP + H₂O₂ + DAB → Bruine kleur

Het enzym AP + Naphtol + Fast Red A & B → Rode kleur

Koper zorgt voor de rood-bruine kleur

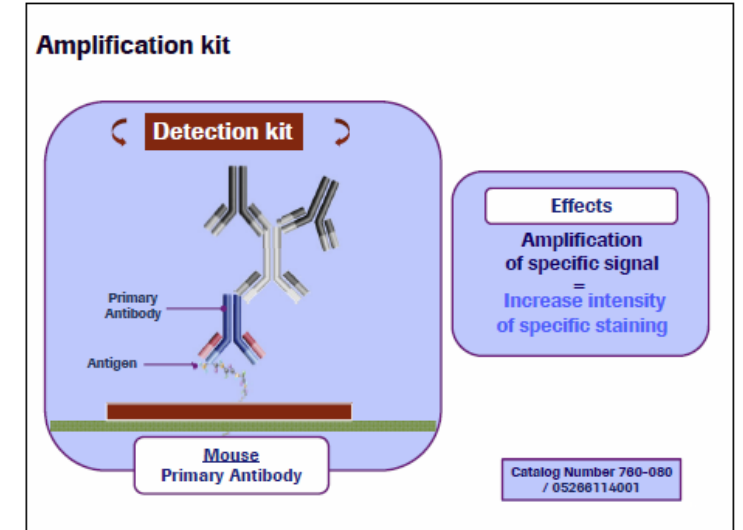
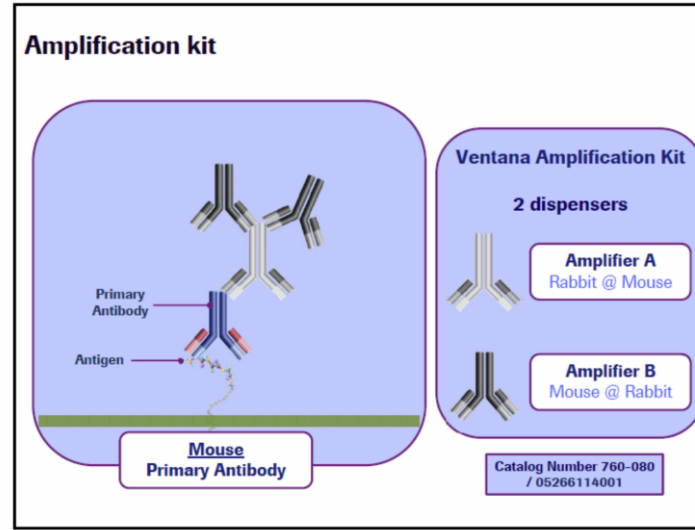
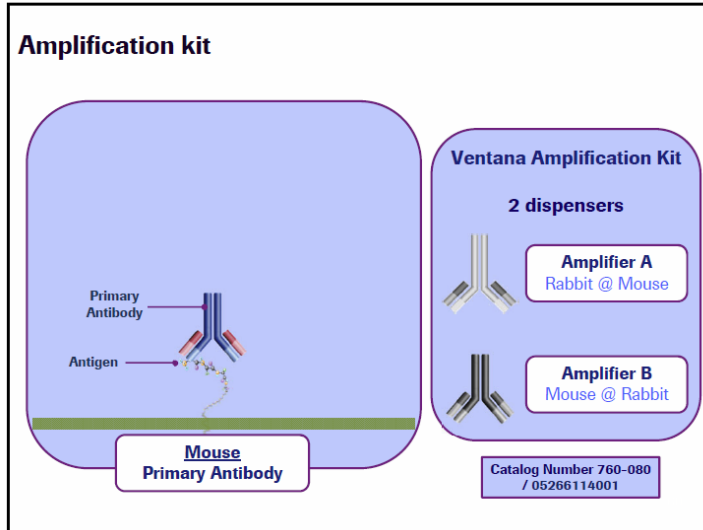
Voor detecteren en zichtbaar maken van het humane antigeen wordt gebruik gemaakt van:

het primaire antilichaam, wat het te detecteren antigeen herkent en bindt

een secundair antilichaam “multimeer” waar een enzym aan vastzit. Deze herkent het Fc fragment van het primaire antilichaam

het substraat waar het enzym een product mee vormt dat het chromogen neer doet slaan

Ultraview met amplificatie



Voor versterking van het uiteindelijk gevormde signaal wordt gebruik gemaakt van het Fc deel van het primaire antilichaam (afgebeeld: “mouse anti human”).

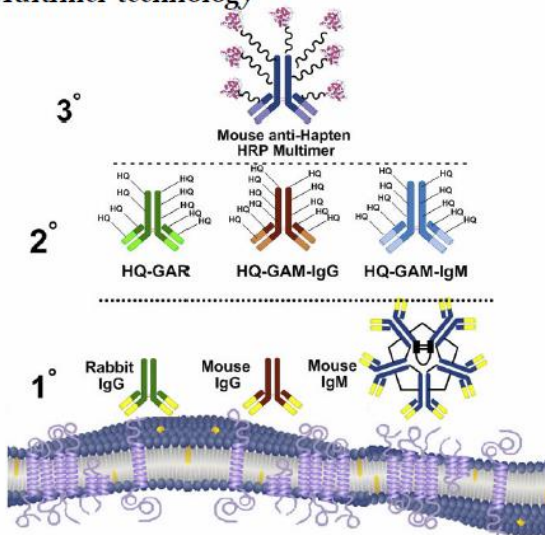
Het tweede antilichaam is opgewekt in een konijn (“rabbit”) en gericht tegen het Fc deel van het primaire antilichaam (dit bevat de “mouse” eigenschap): “rabbit anti mouse”.

Het derde antilichaam is gericht tegen het Fc deel van het tweede antilichaam: “mouse anti rabbit”.

De vierde incubatie is zowel gericht tegen het Fc deel van het “mouse anti rabbit” als “rabbit anti mouse” antilichaam. Deze multimeer bevat een enzym dat met het substraat een product vormt dat het aanwezige chromogen neer doet slaan.

OptiView™ DAB

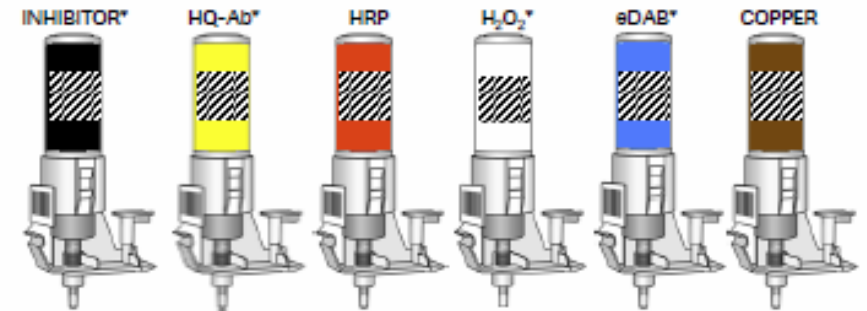
General Multimer technology



Optiview

OptiView™ DAB

Multimer technology

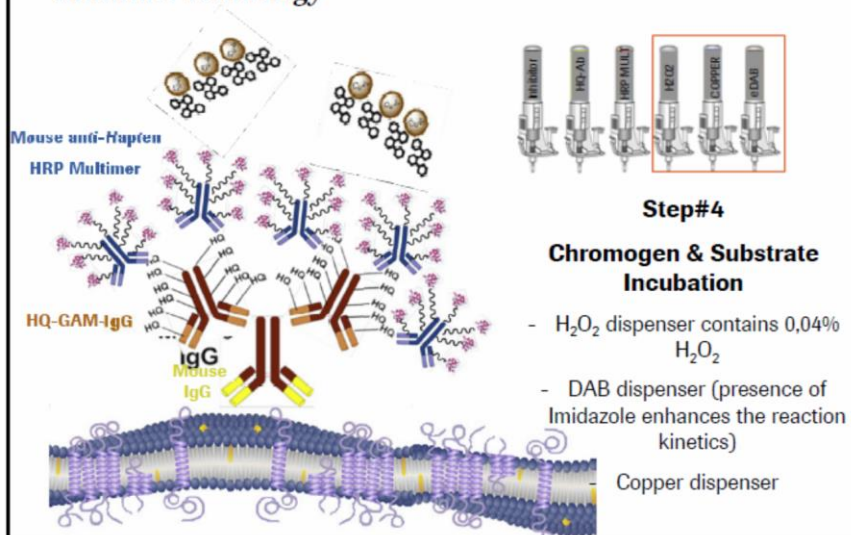


Optiview kit

1. Inhibitor, bevat 3% H₂O₂
2. HQ-ab, bevat 3 polyclonale antilichamen gelabeld met HQ: geit anti muis IgG en IgM geit anti konijn IgG
3. HRP: monoclonaal antilichaam gericht tegen HQ en gelabeld met HRP (enzym)
4. H₂O₂
5. DAB
6. Koper oplossing

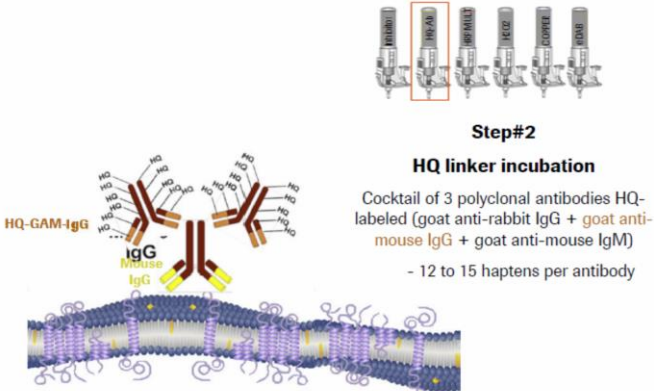
OptiView™ DAB

Multimer technology



Optiview met amplificatie

OptiView™ DAB
Multimer technology



Step#2
HQ linker incubation

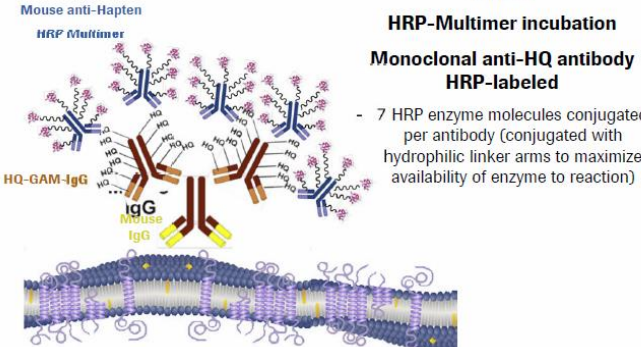
Cocktail of 3 polyclonal antibodies HQ-labeled (goat anti-rabbit IgG + goat anti-mouse IgG + goat anti-mouse IgM)

- 12 to 15 haptens per antibody

OptiView™ DAB
Multimer technology

Step#3
HRP-Multimer incubation
Monoclonal anti-HQ antibody HRP-labeled

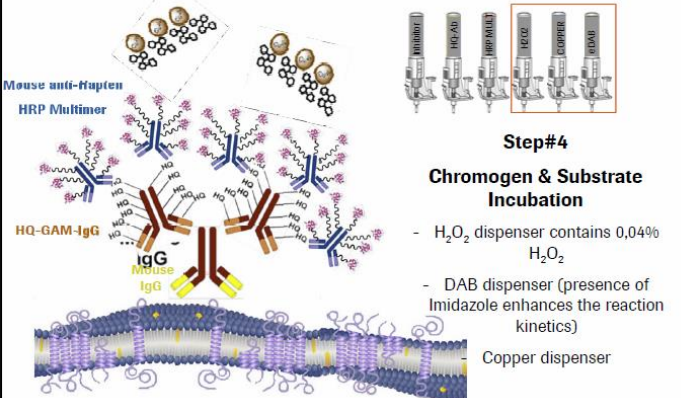
- 7 HRP enzyme molecules conjugated per antibody (conjugated with hydrophilic linker arms to maximize availability of enzyme to reaction)

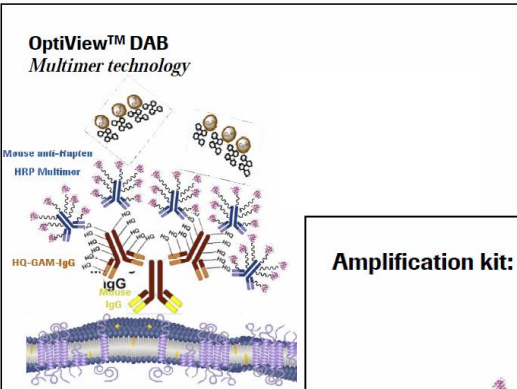


OptiView™ DAB
Multimer technology

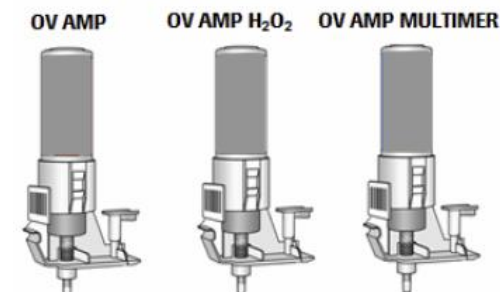
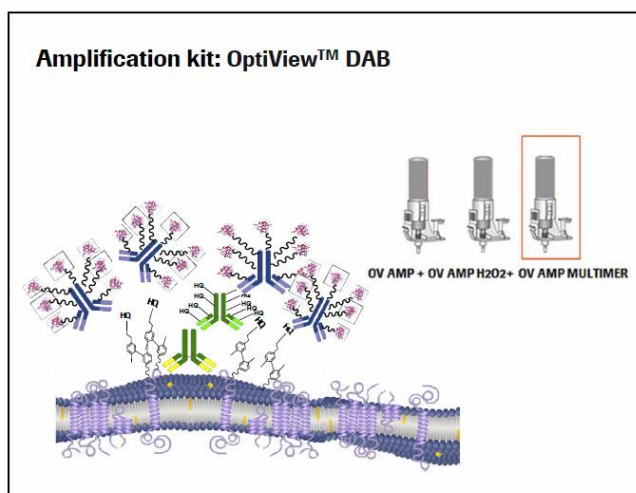
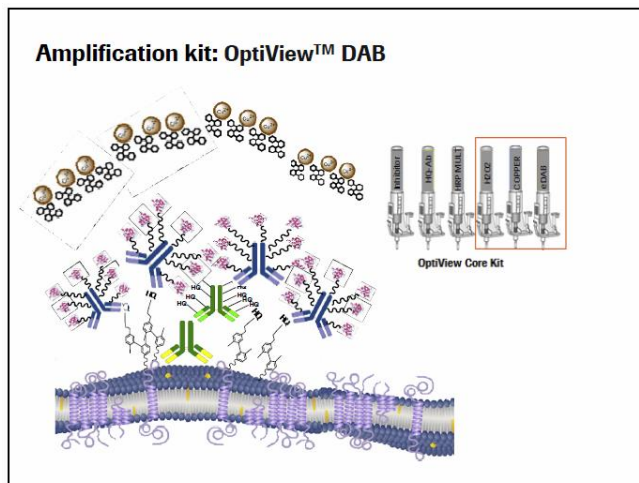
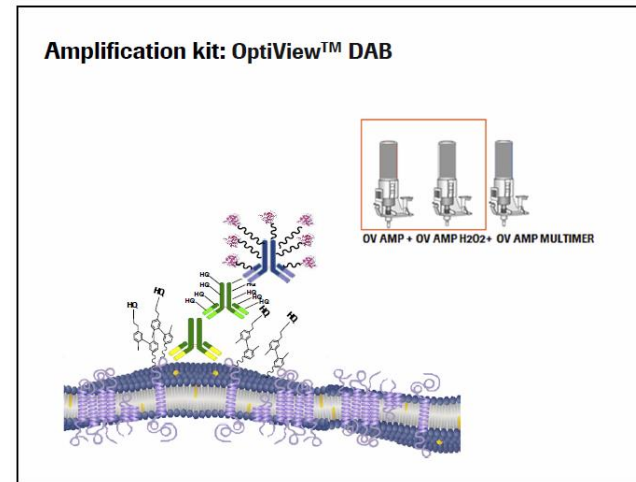
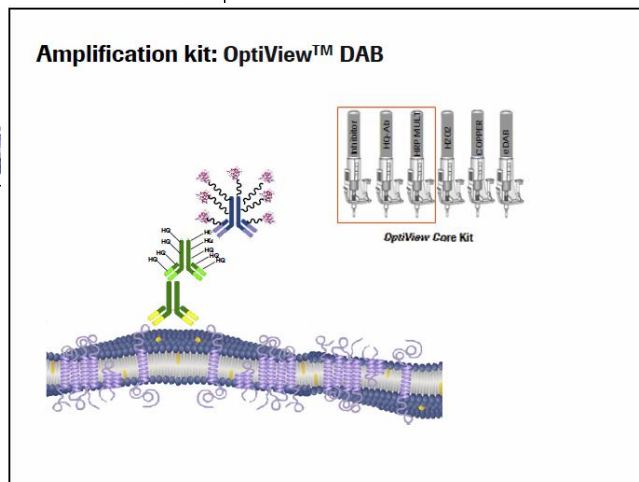
Step#4
Chromogen & Substrate Incubation

- H_2O_2 dispenser contains 0,04% H_2O_2
- DAB dispenser (presence of Imidazole enhances the reaction kinetics)
- Copper dispenser

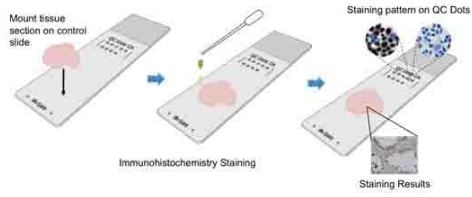




Optiview met amplificatie



OV amp: tyramide met linker waaraan HQ
OV amp H₂O₂: 0,04% H₂O₂
OV amp multimeer: muis- anti-HQ:HRP



De controlecoupe

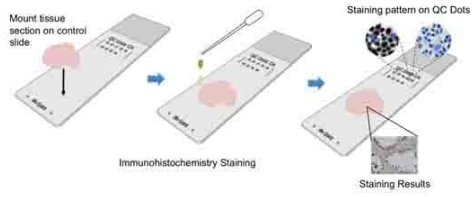
Bepaalt of het kleuringsprotocol goed gevolgd is en/of de reagentia in orde zijn

Nodig voor het bepalen van het diagnostisch nut van het antilichaam (sensitiviteit / specificiteit)

Nodig voor standaardisatie

Nodig voor het bepalen van de consistentie van de bepaling, het bewijs leveren dat er geen grote variatie is in de sensitiviteit en specificiteit van de analytische fase

Nodig voor validatie en verificatie van het primaire en secundaire antilichaam



De controlecoupe

Controle weefsel mag niet te kort of te lang gefixeerd zijn. 4 - 168u in 10% gebufferde neutrale formaline
Het moet goed gekozen worden

Er moet zowel weefsel of cellen zijn met een lage als met een hoge expressie van het antigeen aanwezig zijn

Indien mogelijk normaal humaan weefsel

Sensitiviteit hoog

Primair antilichaam in een hoge verdunning te gebruiken

IHC test toont cellen aan met een erg lage expressie van het doelwit-antigeen

Sensitiviteitstest CD45: Kupffercellen in de lever

Specificiteit hoog

Alleen het doelwit wordt door het antilichaam gedetecteerd

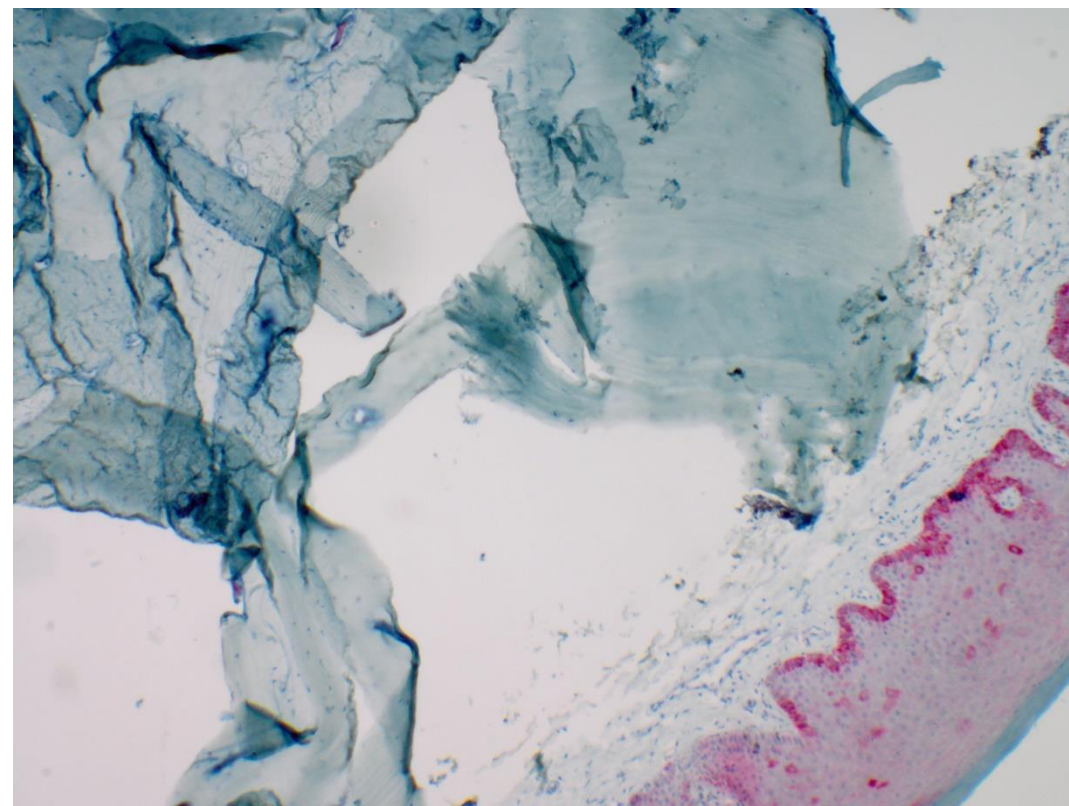
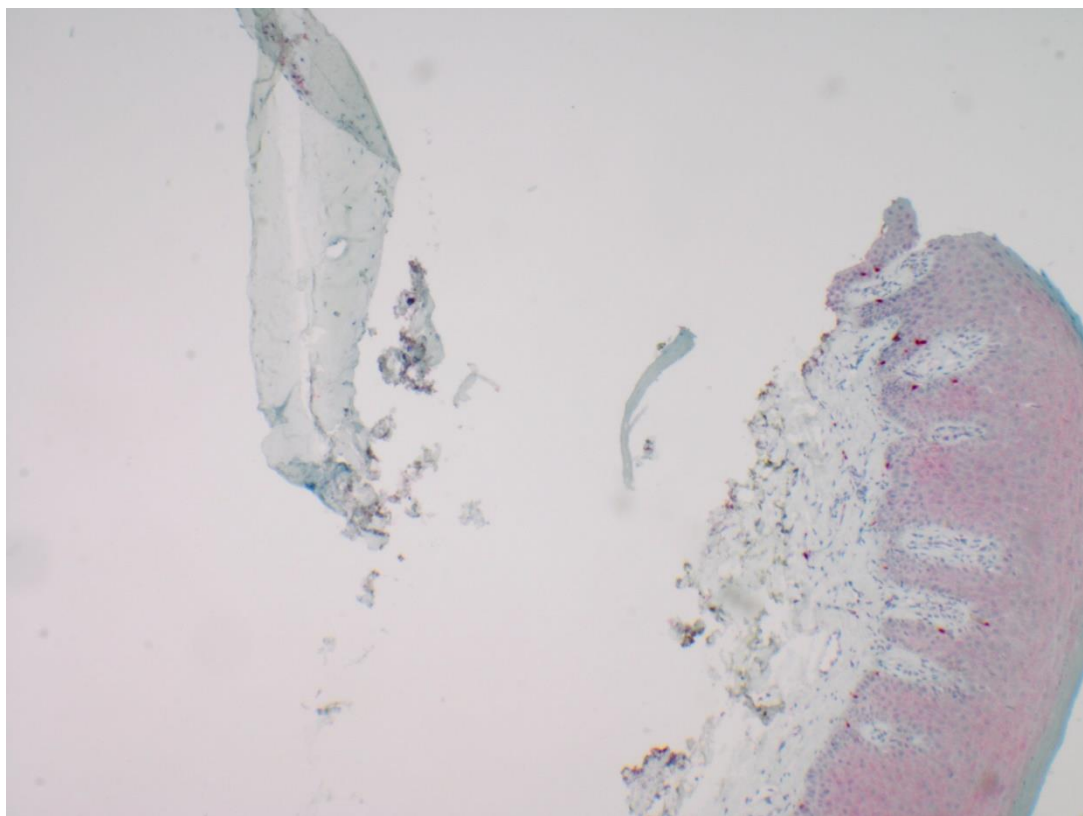
b.v.: S-100 is een sensitive, maar geen specifieke marker voor melanomen

De diagnostische sensitiviteit en specificiteit worden berekend a.d.h.v. het aantal “echte” en “vals” positieve/negatieve cases

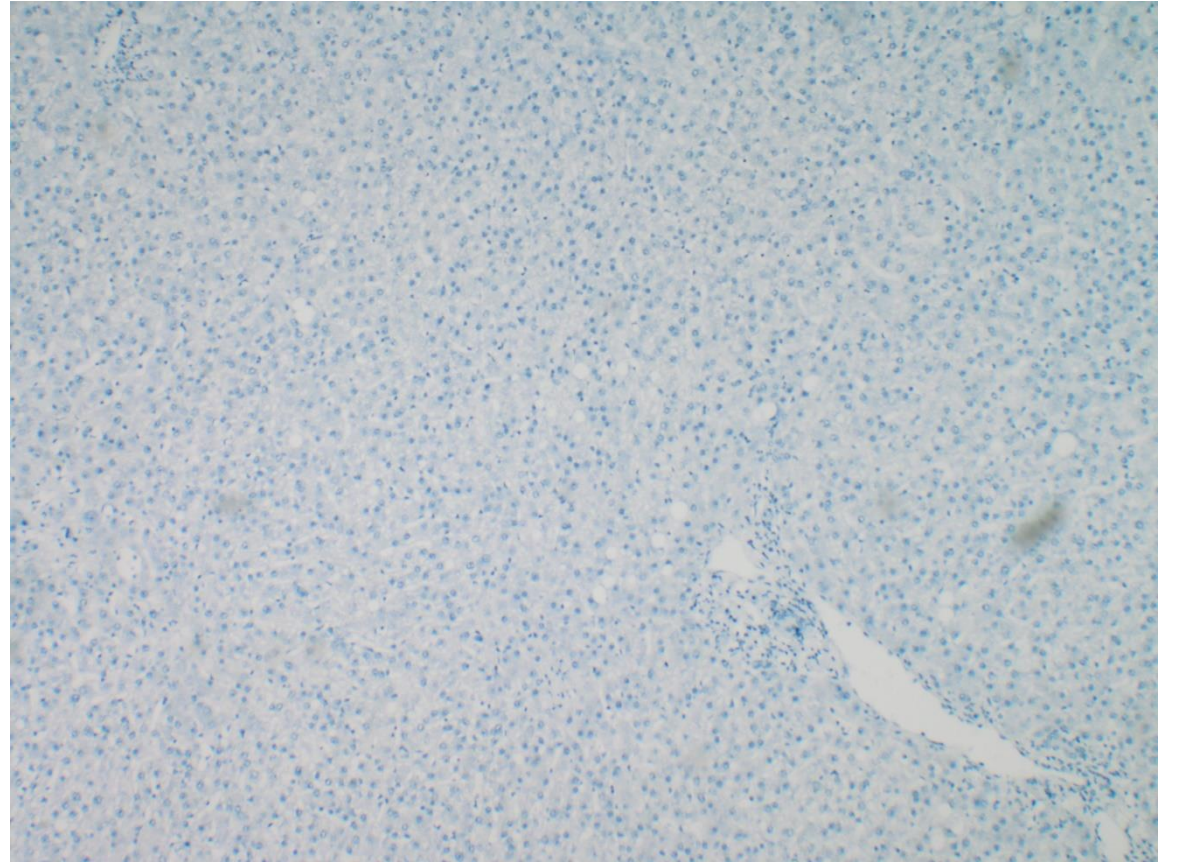
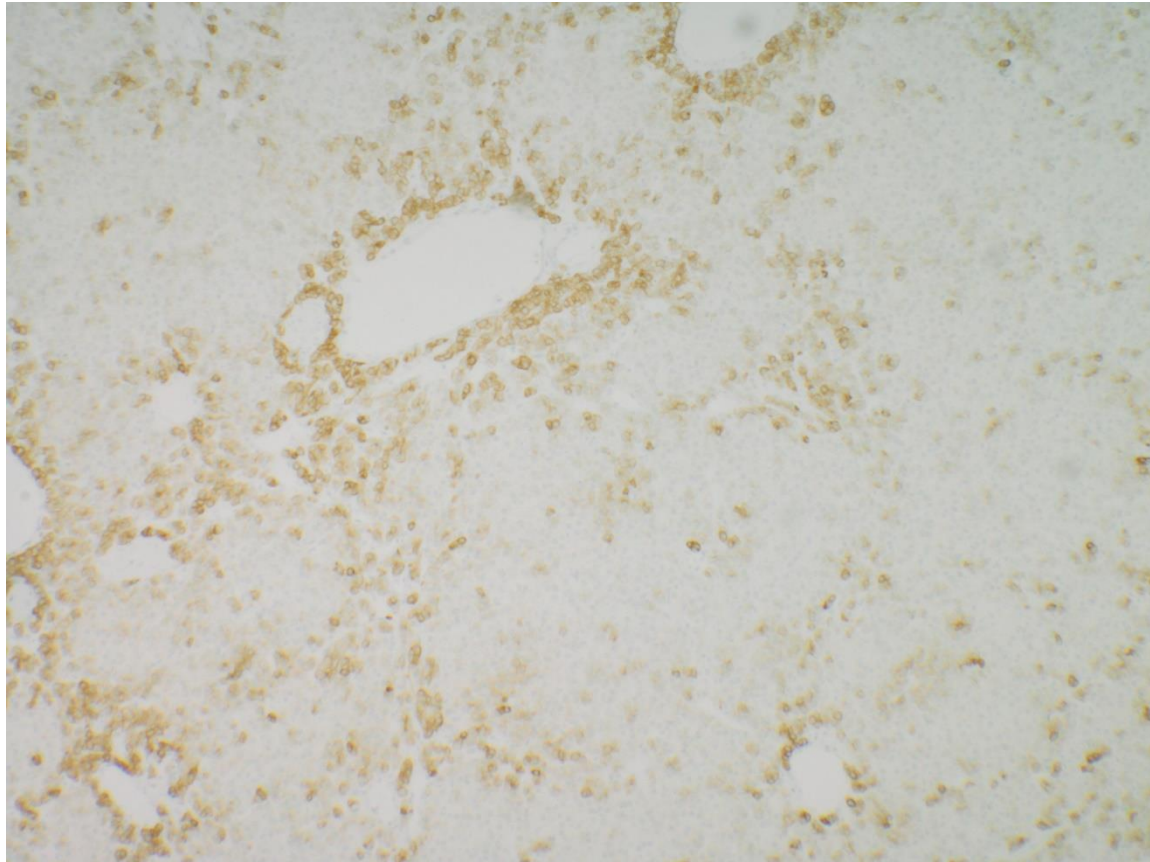
Wat te doen wanneer de positieve controle negatief is:

- doorgeven aan de lab. assistent dat die bepaling niet ingezet moet worden, dit mag zodra er uitgezocht is wat de oorzaak is van de negatieve aankleuring
- prepkits controleren:
 - leeg, verstopt, was de “kamer” van de prepkits wel gevuld met ab, functioneert de prepkits goed
- bij de “niet ready-to-use” antilichamen, check de expire date en/of de aanmaak datum/ verdunnings
- detectie-kit controleren, is er nog wel reagentia in de prepkits
- rapport uitprinten en bekijken of er b.v. landingszones waren
- bepaling opnieuw inzetten

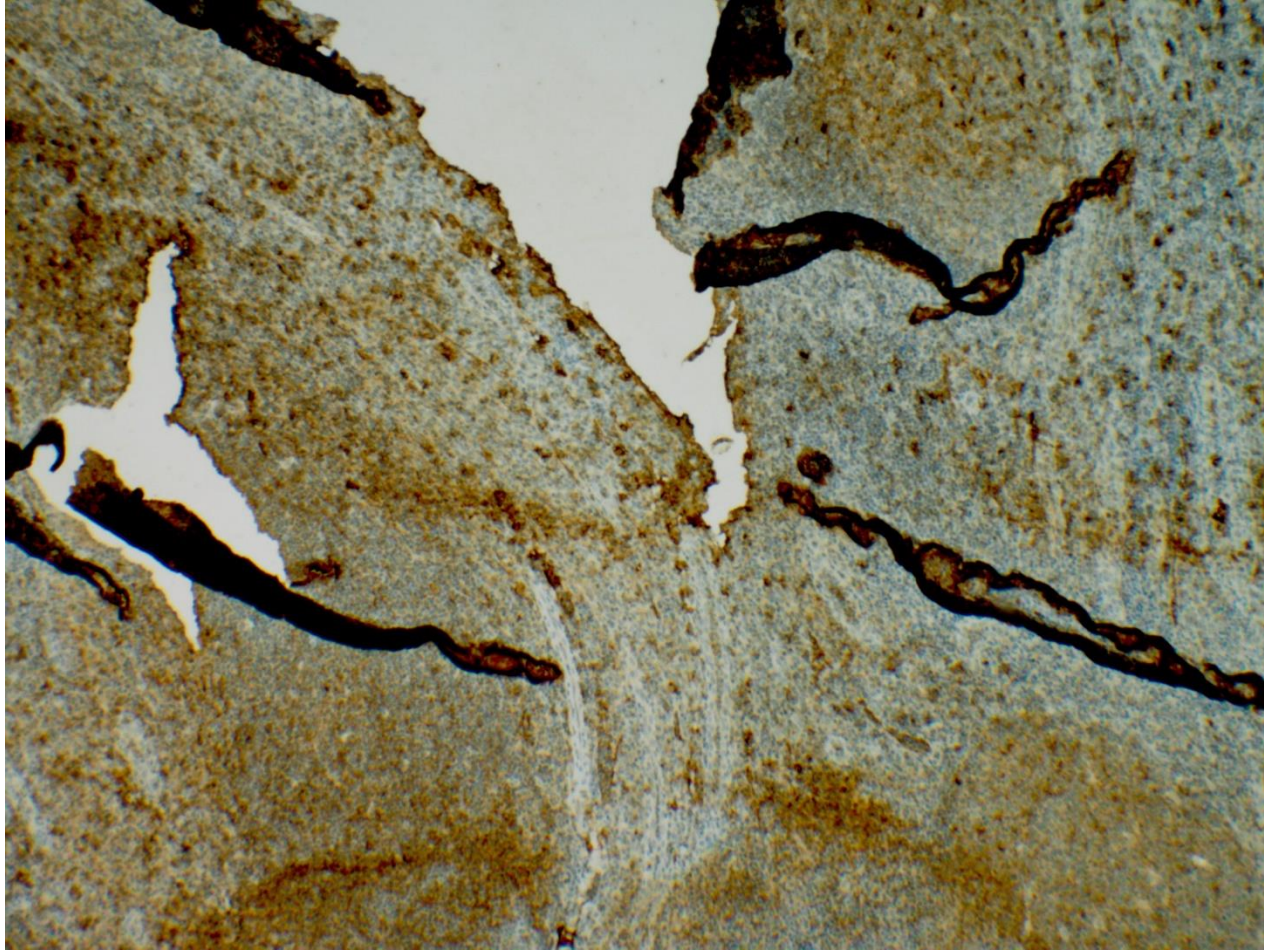
Microscopisch beoordelen van de IHC-ICC resultaten



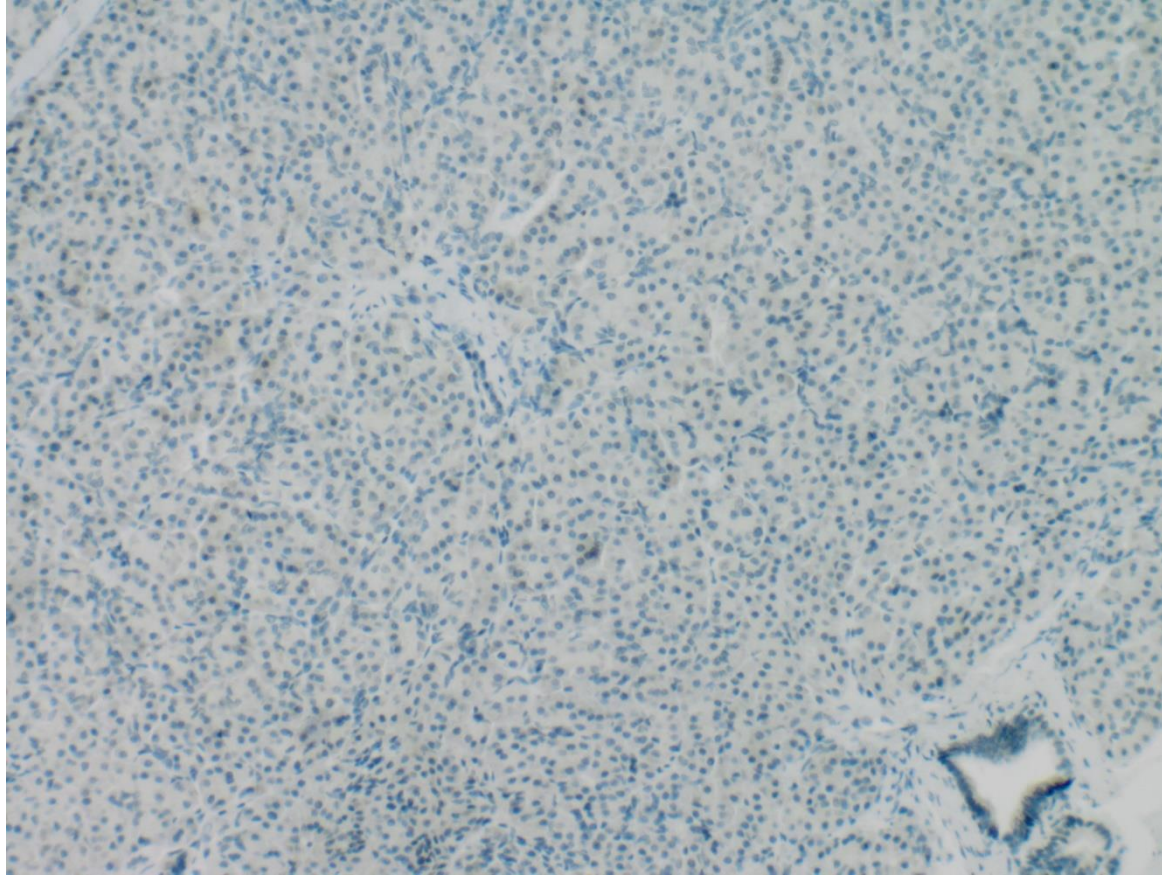
Keratine 8/18



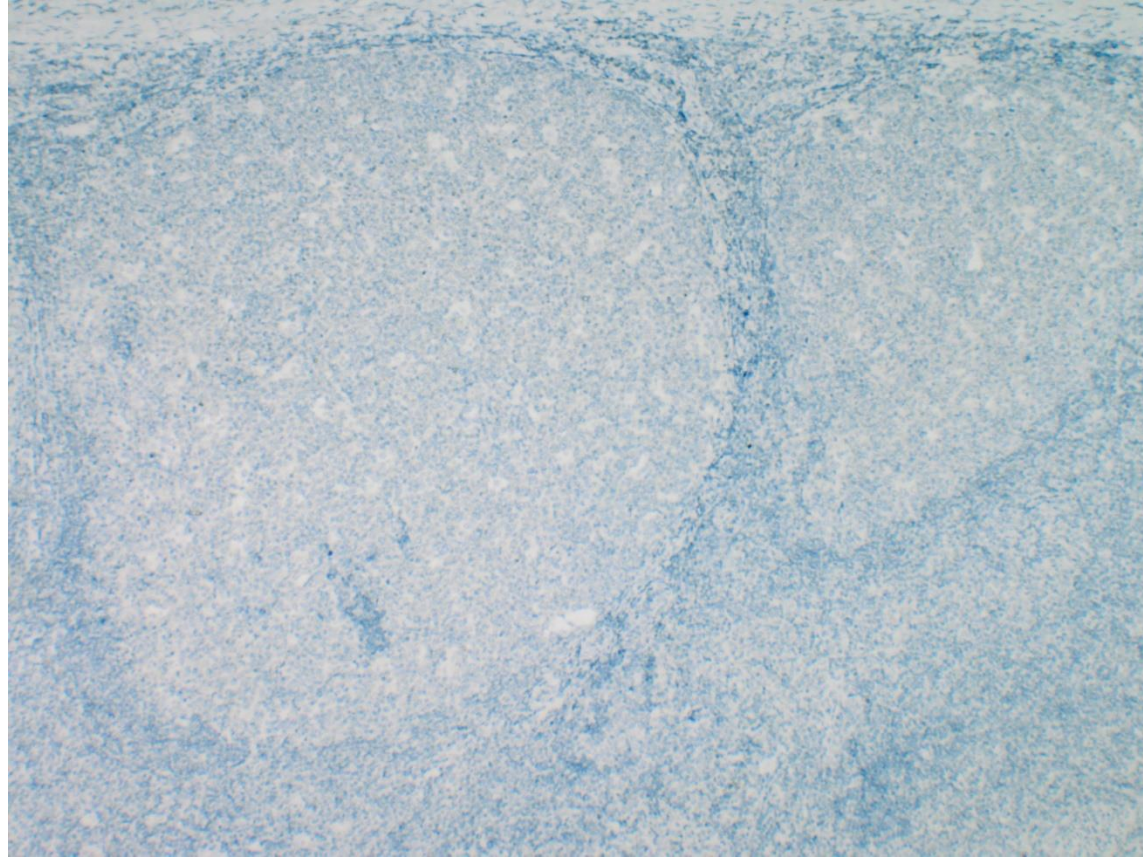
D2-40



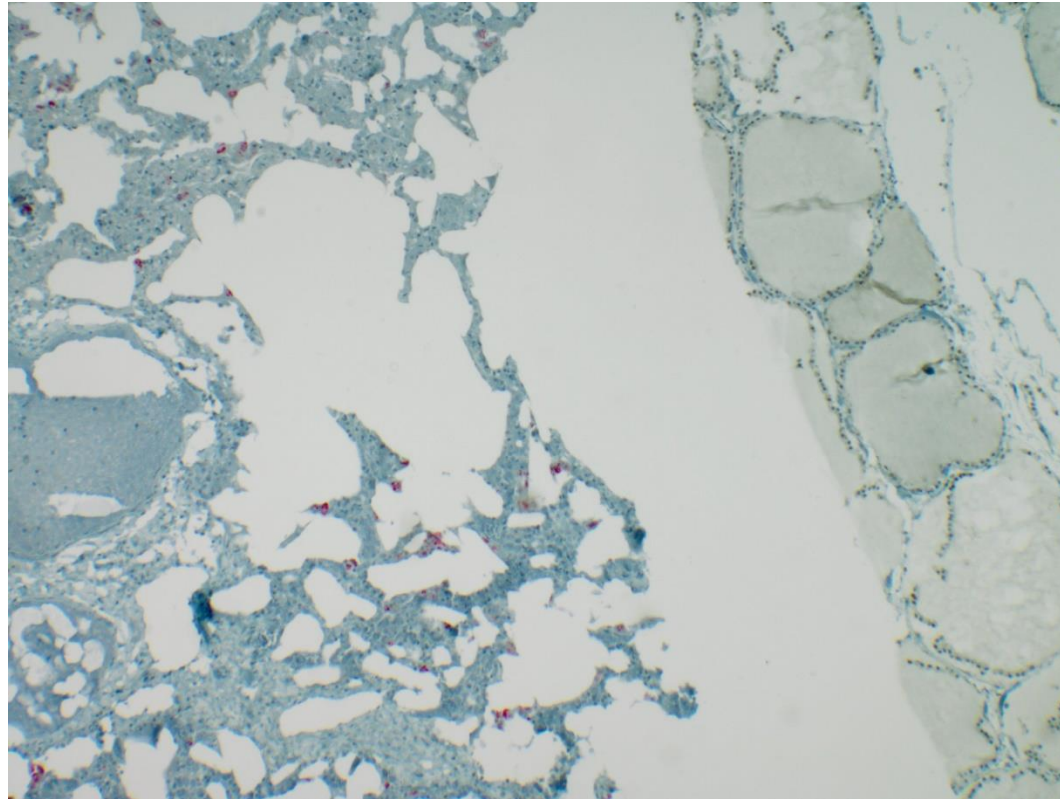
CDX2



CD45



TTF1 / Napsin



Scoren van IH bepaling

Vermelding wordt gedaan in qaplab

Score 2 (deze wordt niet apart gescoord): geen bijzonderheden. IH bepaling is goed

Score 0: geen aankleuring van de positieve controle coupe. IH bepaling niet goed

Score 3: te sterke aankleuring met achtergrond aankleuring. IH bepaling niet goed