

FORMAZIONE MOLINETTE

MODULO
MFM 007

LOCANDINA



Evento residenziale

**DIAGNOSTICA CLASSICA E TEST
MOLECOLARI PER PATOLOGIE
ONCOLOGICHE IN ANATOMIA
PATOLOGICA**



FATTORI PROGNOSTICI

ER PGR KI-67 HER-2

L'IMMUNOISTOCHIMICA

Procedura che utilizza anticorpi per la ricerca di antigeni tissutali/cellulari specifici.

Fattori che influenzano una reazione di Immunostochimica

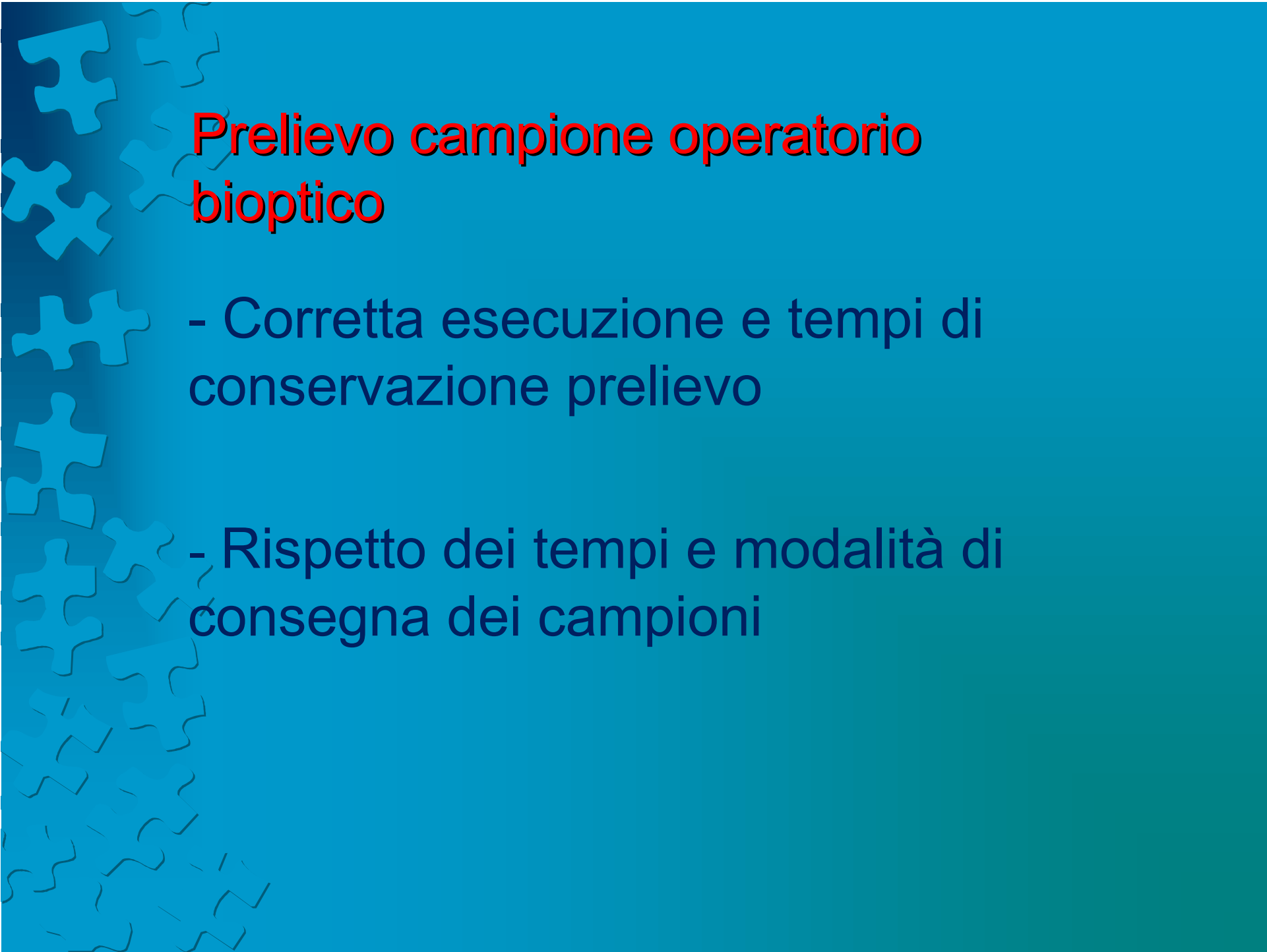
Variabili Preanalitiche e Analitiche

Variabili Preanalitiche

```
graph TD; A[Variabili Preanalitiche] --> B[Prelievo campione]; A --> C[Anatomia Patologica];
```

**Prelievo
campione**

**Anatomia
Patologica**



Prelievo campione operatorio bioptico

- Corretta esecuzione e tempi di conservazione prelievo
- Rispetto dei tempi e modalità di consegna dei campioni

Anatomia Patologica

- - **Riduzione** : E' importante che lo spessore del campione non superi i 3 mm per favorire la fissazione omogenea.
- - **Processazione** : E 'la procedura di fissazione attraverso strumenti specifici (Processatori) fase più critica della fase pre-analitica
- - **Inclusione** : Inclusione in paraffina dei campioni precedentemente fissati
- - **Taglio al microtomo** : Importanza della complessità e dello spessore della sezione (0,5 μ m)



Variabili Analitiche

- **Scelta Immunocoloratore**
- **Smascheramento antigenico**
- **Anticorpo Primario**
- **Sistema di rivelazione**

Immunocoloratori

Semiautomatici.

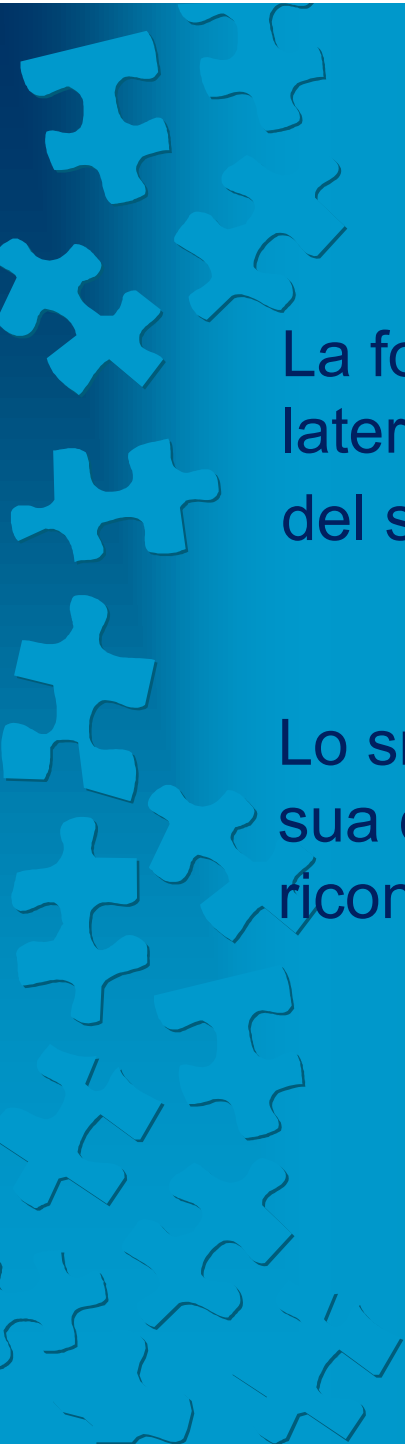
- Autostainer (Dako)



Automatici:

- Benchmark XT/ULTRA (Roche)
- BondMax (Leica)





La formalina induce una reticolazione tra le catene laterali delle proteine impedendo così il riconoscimento del sito antigenico da parte dell'anticorpo primario.

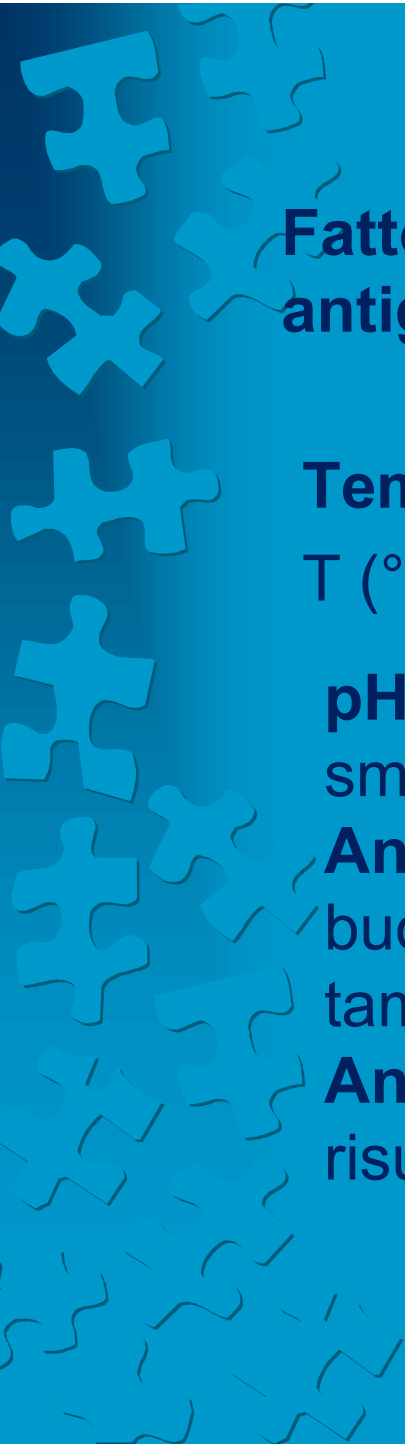
Lo smascheramento antigenico riporta la proteina alla sua conformazione nativa e quindi l'epitopo può essere riconosciuto.



Smascheramento antigenico

Digestione enzimatica
(Proteinasi K Pepsina, Tripsina)

Trattamento con il calore in :
tamponi Citrato pH 6
tamponi EDTA pH 8



Fattori che condizionano lo smascheramento antigenico in un mezzo

Temperatura / Tempo

$T (^{\circ}\text{C}) \times t (\text{min}) = \text{smascheramento antigenico}$

pH –Antigeni indifferenti al pH della soluzione smascherante

Antigeni nucleari (es. ki-67, PGR, ER...)

buoni o addirittura migliori risultati con tampone EDTA (pH 8)

Antigeni citoplasmatici (es. citocheratine) buoni risultati con tampone citrato

ANTICORPO PRIMARIO

Problemi con l'anticorpo primario

- scarsa sensibilità
- scarsa specificità
- diluizione non ottimale
- tipo di smascheramento
- tempo di incubazione insufficiente

Analytic standardization: antibody selection for ER/PGR testing

Gli anticorpi che soddisfano i criteri di validazione clinica

ANTICORPO	CLONE
ER	1D5 6F11 SP1 1D5+ER.2.123
PGR	1A6 1294 312
KI67	MIB-1
HER-2	HERCEPTEST 4B5

Diluizione dell'Ab primario:

Colorazione eccessiva (fondo)

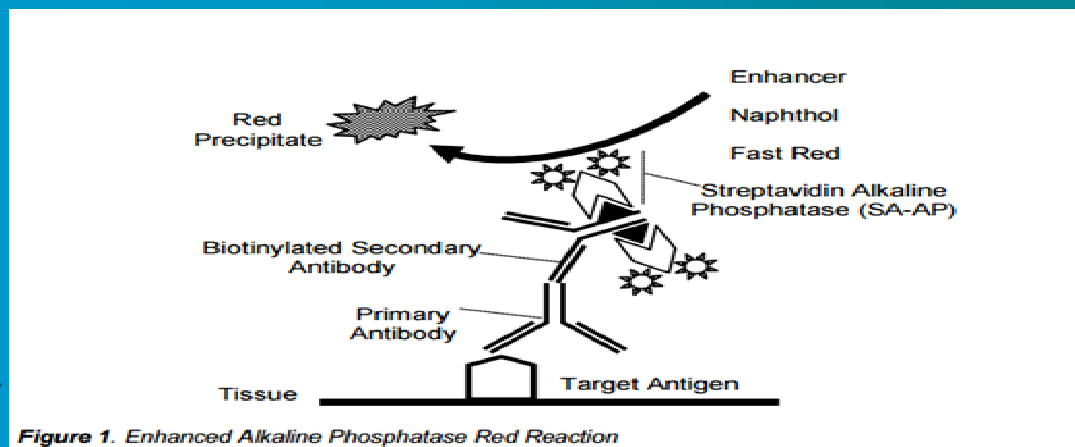
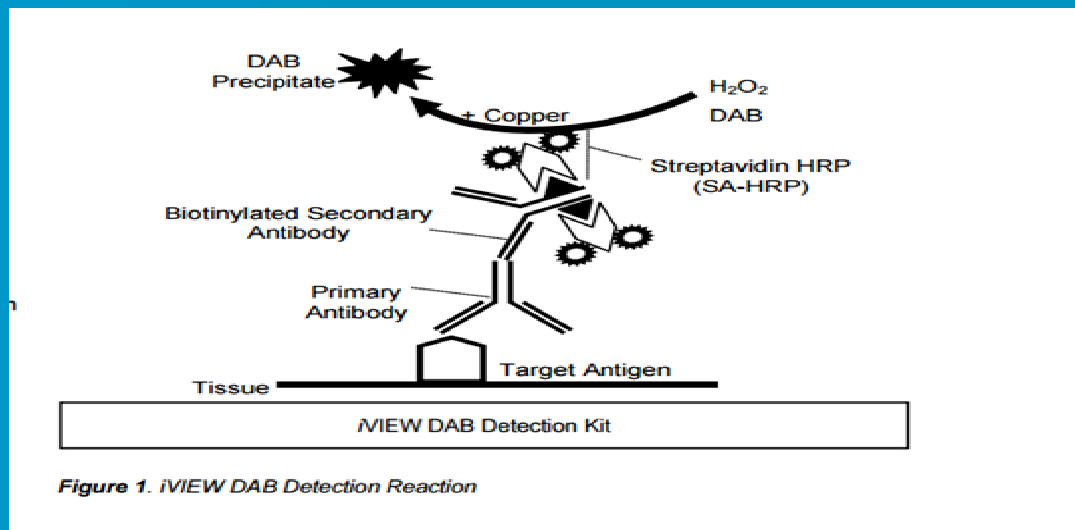
- Aumentare la diluizione dell'Ab
- Diminuire (t) lo smascheramento antigenico

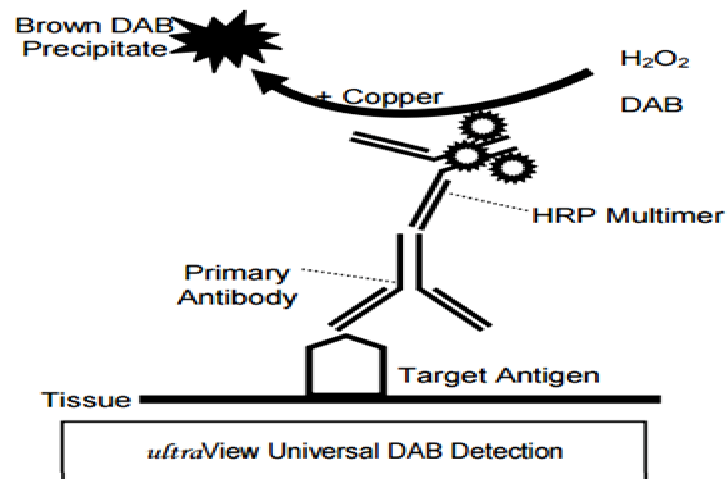
Colorazione debole

- Aumentare la concentrazione dell'Ab
- Aumentare (t) smascheramento antigenico

Utilizzare un sistema di rivelazione più sensibile

Sistemi di rivelazione Ultrabenchmark Roche





Ultraviewdab

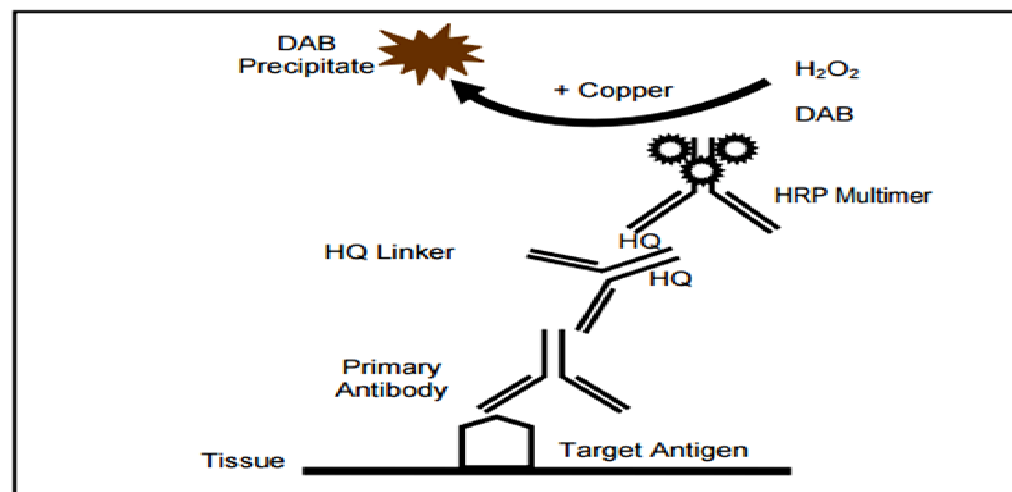


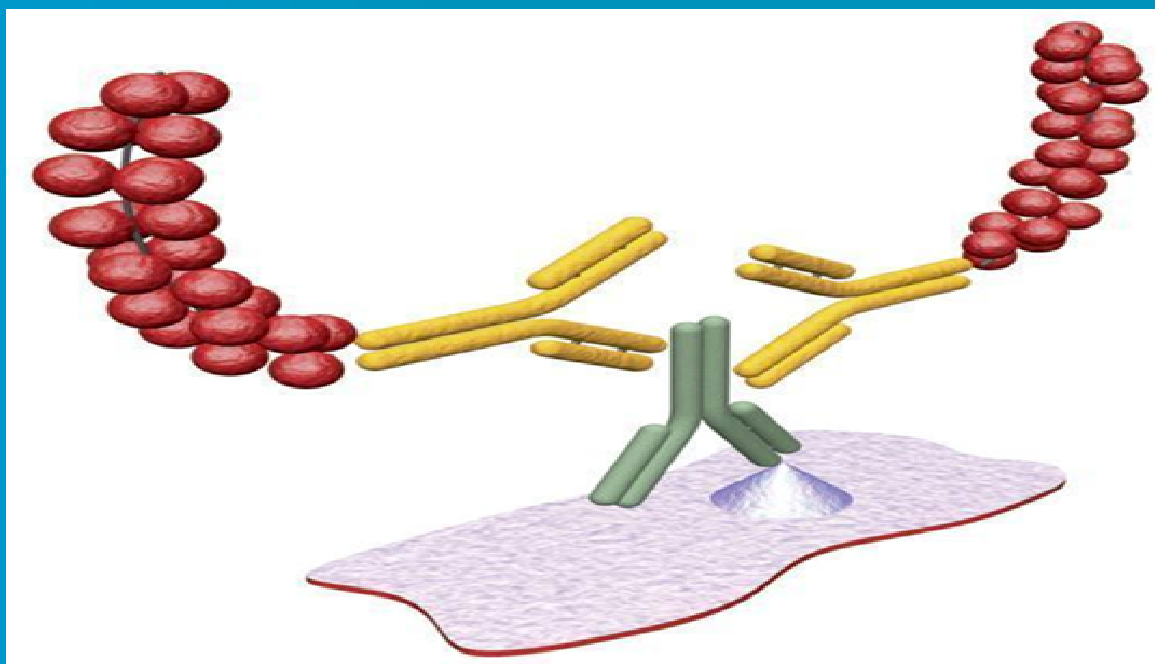
Figure 1. OptiView DAB IHC Detection Kit

Optiviewdab

Sistemi di rivelazione

Immunocoloratori BOND LEICA

Polymer Refine Detection



Protocolli

Stampare i protocolli

Stampa utilizzo dei
protocolli

Visualizzare i protocolli

Gestione protocolli

► Crea / Modifica
protocolli

Procedura

U ultraView DAB

☒ Procedure di filtro

Modificare I...

Ricerca veloce protocollo

Trova

ER



Numero	Nome
302	BERE-P4
56	EMERINA
473	ER SP1
475	ER SP1 PER DOPPIA

Fasi protocollo per 473 ER SP1

☐ Elencare solo prodotti registrati

Trova

ER SP1



Zoom

9

Salvare

☐ Asciugatura

☐ Non-Paraffina

☒ Sparaffinatura

[Imposta temperatura predefinita a 72 °C]

✓ Riscaldare vetrino a [72°C] da Temperature del mezzo (Sparaffinatura)

☐ Sparaffinatura estesa

☐ Pretrattamento

☐ Pre-Fixative

☒ Cell Conditioning

☒ ULTRA Conditioner #1

[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]

[Imposta temperatura predefinita a 95 °C]

✓ Riscaldare i vetrini a [95°C] e incubare per 8 minuti (Cell Conditioner 1)

☒ 20 minuti di ULTRA CC1

☒ 36 minuti di ULTRA CC1

[RIDOTTO]

☐ 52 minuti di ULTRA CC1

☐ Enzima

☐ Fissativo

☐ Opzione

☐ Temperatura di incubazione dell'anticorpo

☐ Titolazione

☐ NeuVision Blocking Reagent

☒ Anticorpo

✓ Dispensare una aliquota di [ER (SP1)] (Anticorpo), aggiungere Coverslip e incubare per [0 ore 32 min]

☐ Post Fissazione

☐ Amplificazione

☐ ultraWash

Protocolli

Stampare i protocolli

Stampa utilizzo dei
protocolli

Visualizzare i protocolli

Gestione protocolli

► Crea / Modifica
protocolli

Procedura

U ultraView DAB

☒ Procedure di filtro

Modificare l...

Ricerca veloce protocollo

Trova PGR



Numero	Nome
75	PgR noSP
441	PGR1A6

Fasi protocollo per 441 PGR1A6

☐ Elencare solo prodotti registrati

Trova

PGR 1A6



Zoom

9

Salvare

Salvare c...



Cancel...



Asciugatura



Non-Paraffina



Sparaffinatura

[Imposta temperatura predefinita a 72 °C]

✓ Riscaldare vetrino a [72°C] da Temperature del mezzo (Sparaffinatura)



Sparaffinatura estesa



Pretrattamento



Pre-fixative



Cell Conditioning



ULTRA Conditioner #1

[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]

[Imposta temperatura predefinita a 95 °C]

✓ Riscaldare i vetrini a [95°C] e incubare per 8 minuti (Cell Conditioner 1)



20 minuti di ULTRA CC1



36 minuti di ULTRA CC1

[RIDOTTO]



52 minuti di ULTRA CC1



Enzima



Fissativo



Opzione



Temperatura di incubazione dell'anticorpo



Titolazione



NeuVision Blocking Reagent



Anticorpo

✓ Dispensare una aliquota di [PREP KIT 92] (Anticorpo), aggiungere Coverslip e incubare per [0 ore 32 min]



Post Fissazione



Amplificazione



ultraWash

IL CICLO PDCA

Plan: Pianificare, stabilire gli obiettivi e i processi necessari da raggiungere.

- Riproducibilità (R): e Ripetibilità (r): dei test

Do: Dare attuazione ai processi

- Utilizzo dei Ctr + e Ctr-

Check: Monitorare e misurare i processi

- Controllare e misurare le Non Conformità del processo

Act: Adottare azioni e processi per migliorare in modo continuo le prestazioni e i processi

- Controlli Di Qualità Interni (CQI) ed Esterni (VEQ)



Grazie a tutti per l'attenzione