

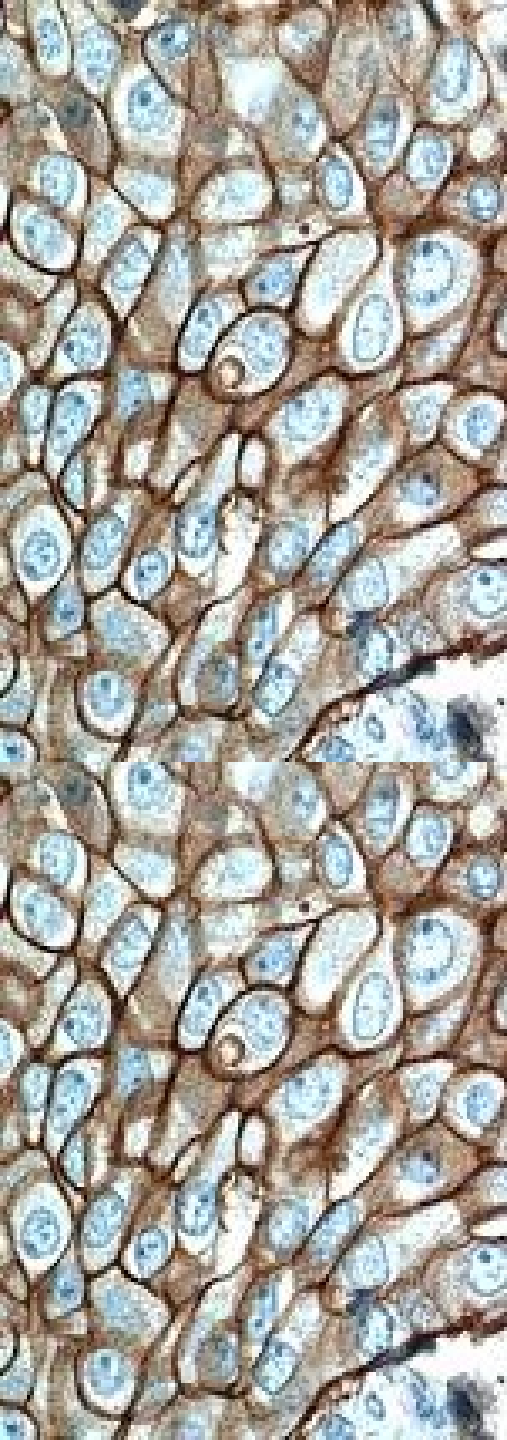
PADRONIZAÇÃO DE CONTROLES PARA USO EM IHC

XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE
HISTOTECNOLOGIA
FORTALEZA-CE



Tiago Giuliani

PPG Ciências Médicas UFRGS



Imunohistoquímica - IHC

Metodologia utilizada para localização de Antígenos específicos em tecidos ou células através da relação antígeno-anticorpo.

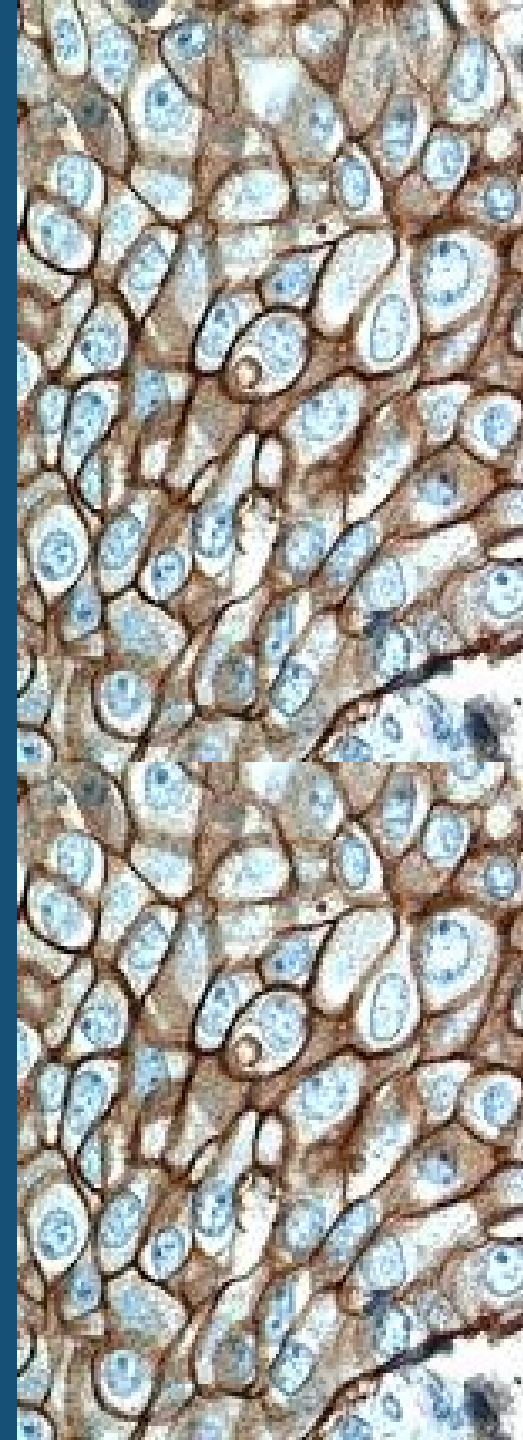
1940 -Coons et al desenvolveram a técnica de imunofluorescência para detectar antígenos em tecidos congelados.

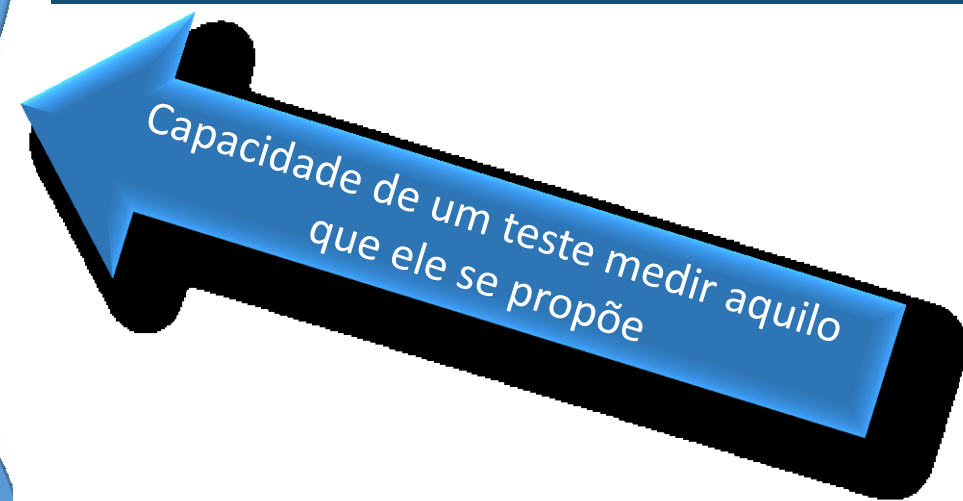
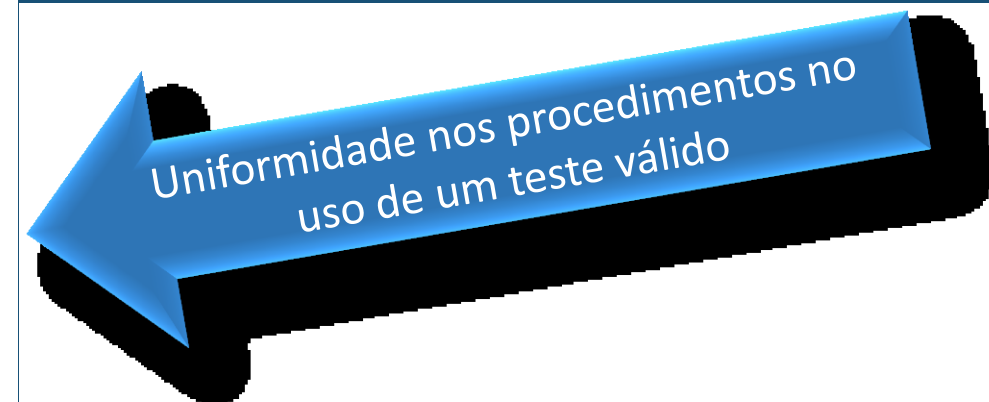
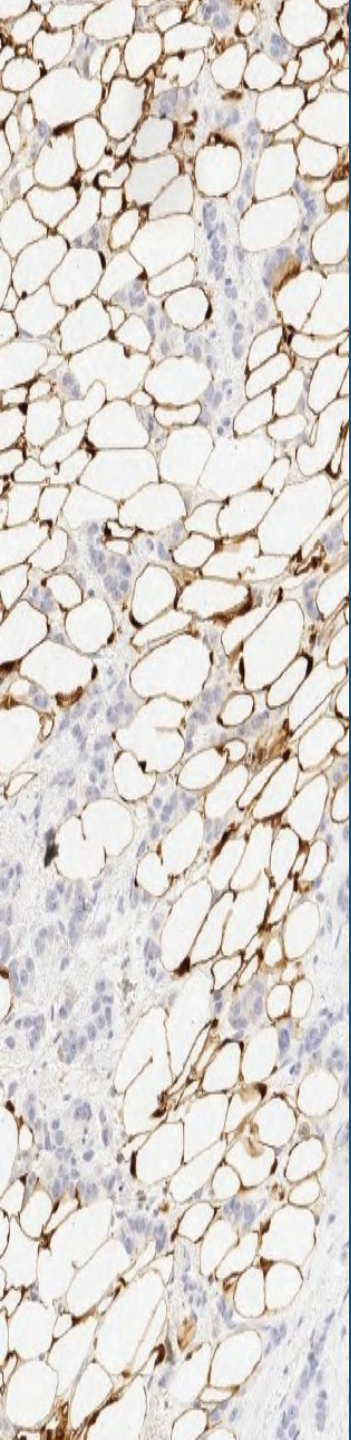
1974 - Taylor e Burns mostraram que era possível demonstrar alguns antígenos em tecido processados.

1975 - Köhler & Milstein desenvolveram os primeiros anticorpos monoclonais.

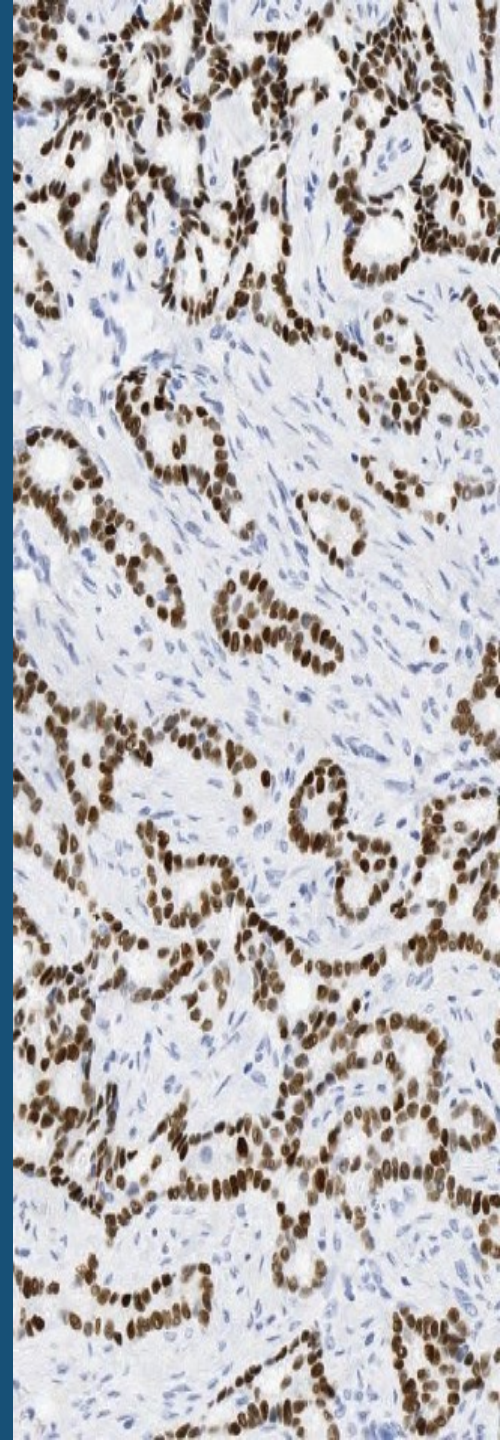
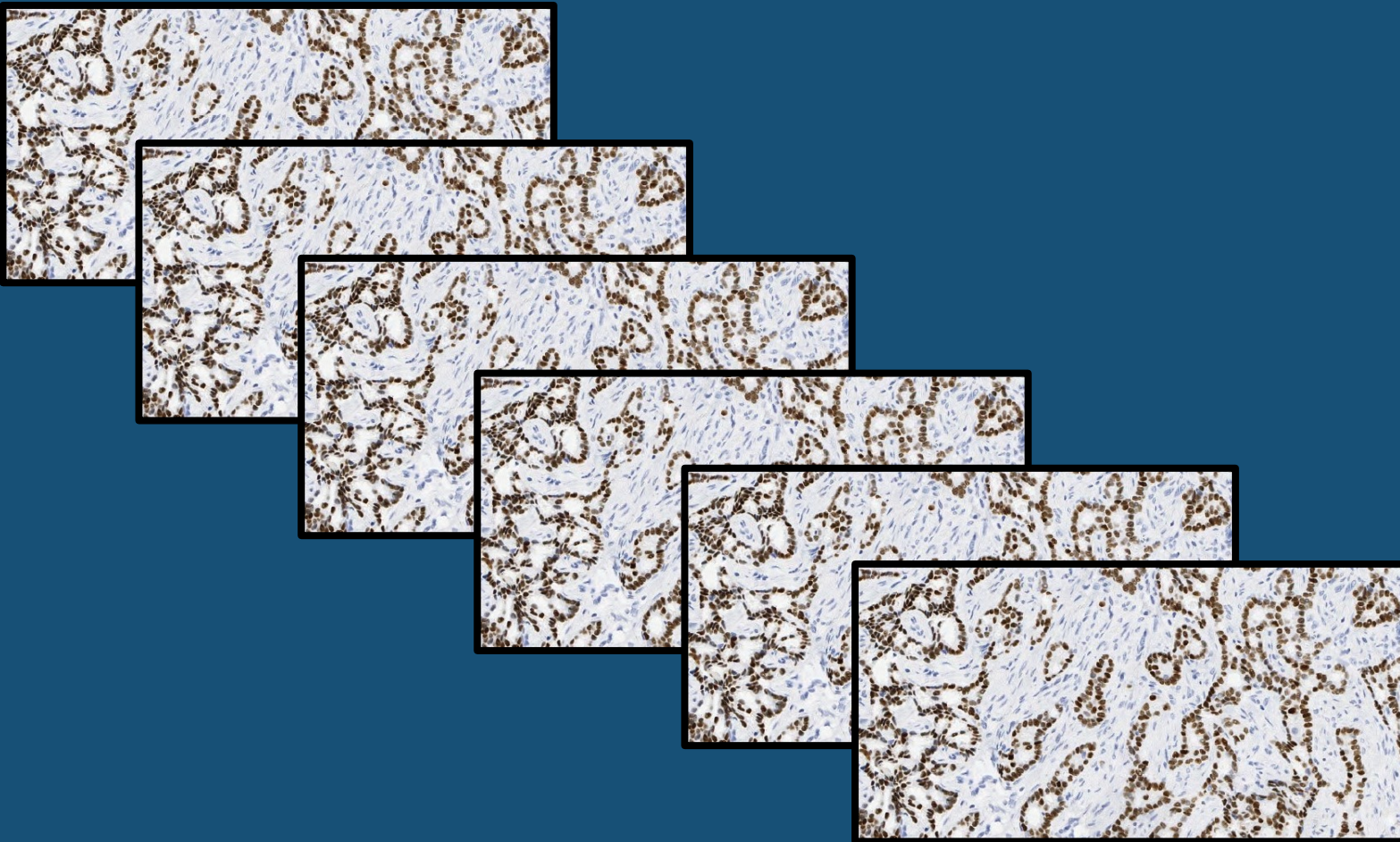
1990 - aplicação na patologia cirúrgica com o desenvolvimento da a enzima HRP.

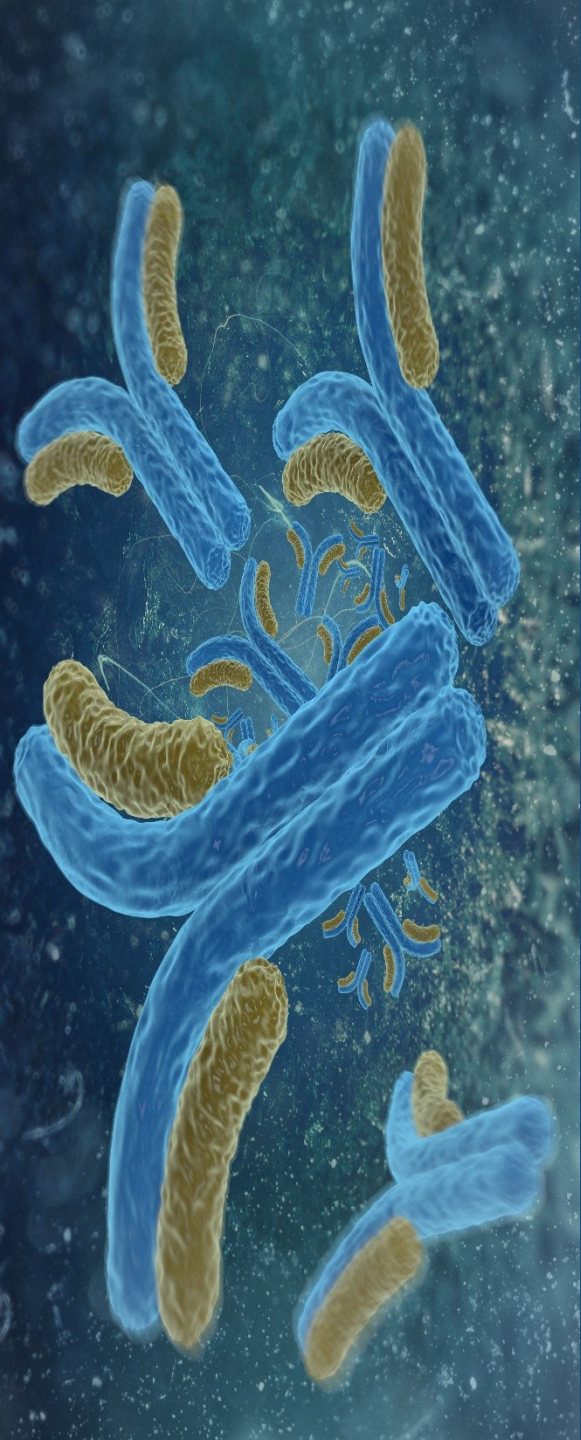
1991- introdução da Recuperação de antígenos pelo calor.





Reprodutibilidade



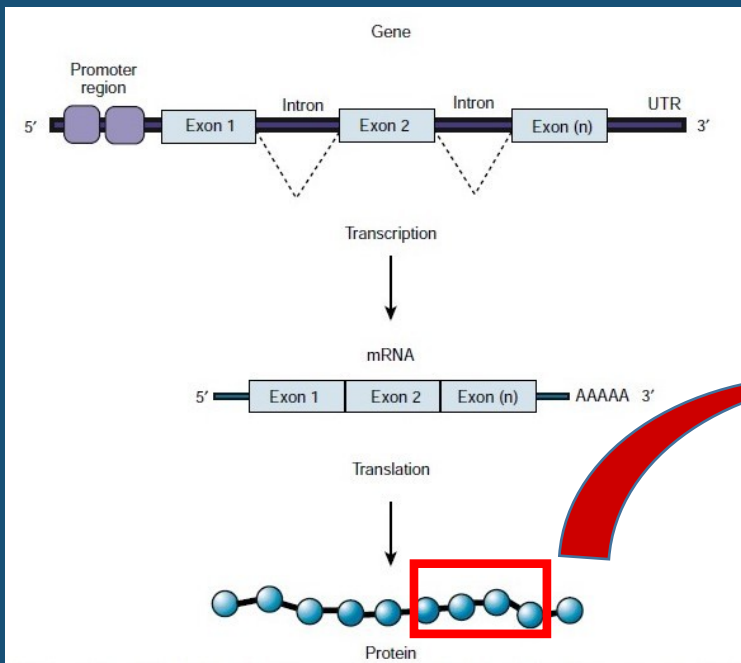


ANTÍGENO

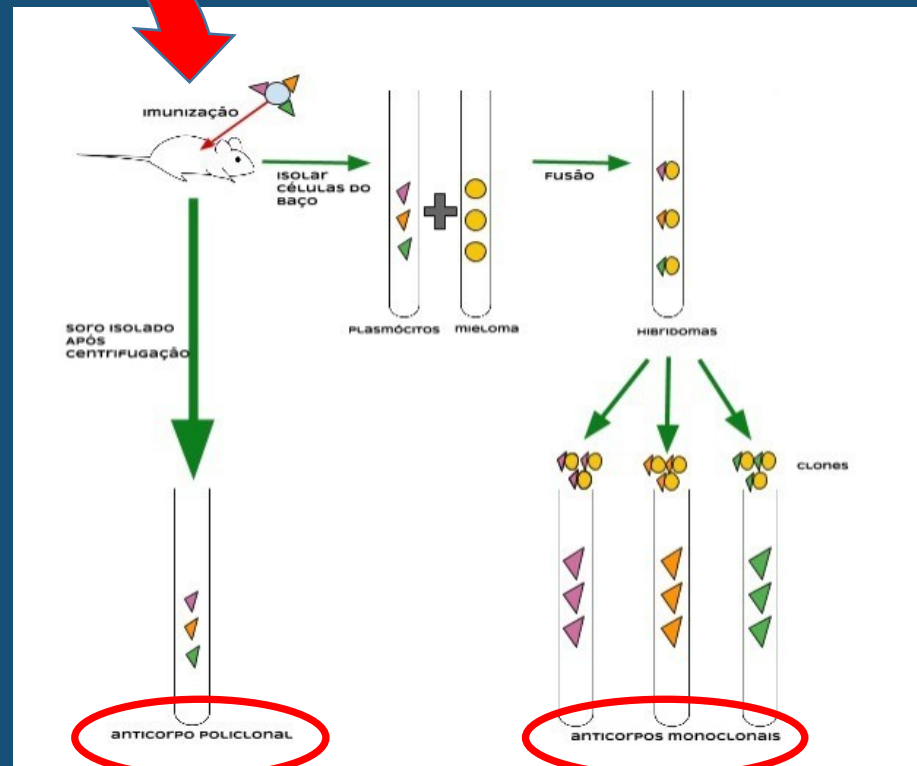
É uma molécula que induz a formação de anticorpos

ANTICORPO

São proteínas que atuam no sistema imunológico como defensoras
IgA IgD IgE IgG IgM



Fonte: Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications ,David J. Dabbs.—3rd ed.



Fonte: <https://pathologika.com/imuno-histoquimica/anticorpos-munoglobulinas/producao-de-anticorpos-monoclonais-e-policlonais/>



IHC



```
graph TD; IHC[IHC] --> FPA[Fase Pré Analítica]; IHC --> FA[Fase Analítica]; IHC --> FPA2[Fase Pós Analítica];
```

Fase Pré Analítica

- Tempo de isquemia
- Fixação
- Processamento histológico

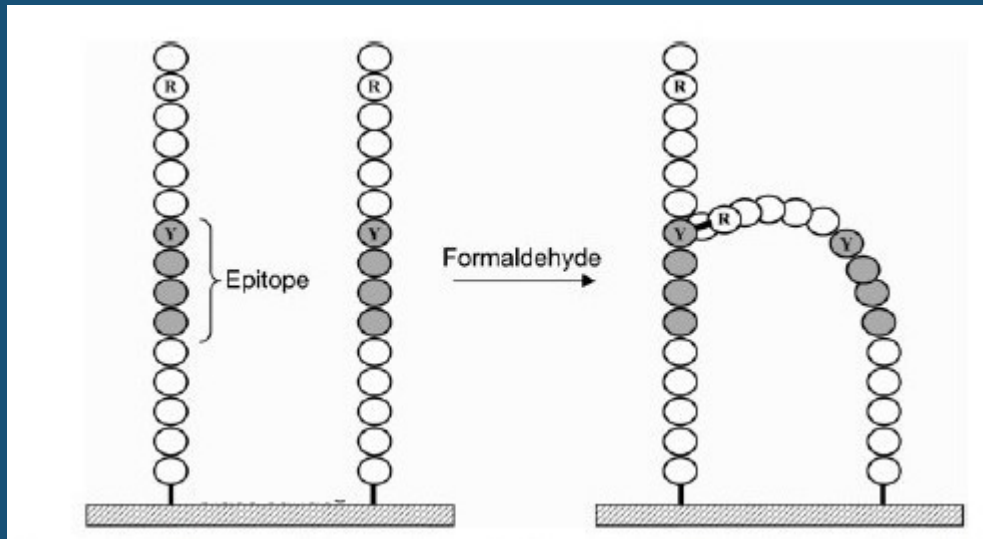
Fase Analítica

- Preparo da lâmina
- Recuperação Antigênica
- Bloqueios endógenos
- Aplicação do Ac 1º
- Aplicação sistema de detecção
- Aplicação do cromógeno
- Finalização da lâmina

Fase Pós Analítica

- Avaliação do controles
- Interpretação do exame
- Liberação do laudo

Recuperação Antigênica



Fonte: Antigen Retrieval Immunohistochemistry Based Research and Diagnostics Shan-Rong Shi and Clive R. Taylor

Digestão Enzimática	• A subdigestão resulta em coloração fraca. • A digestão excessiva pode produzir coloração falso positiva, alto background e dano tecidual. • Favorável para demonstração de Ig e C em bx renais.
Panela de pressão	• O aquecimento é mais uniforme do que os outros métodos. • Maiores vantagens para Ag nucleares
Banho Maria	• Menos prejudicial ao tecido devido a temperatura ficar abaixo do ponto de ebulição. • O tampão não evapora.
Microondas	• Aquecimento irregular. • Ag nucleares podem exigir maiores tempos
Steammer	• Aquecimento menos eficiente do que micro-ondas e panela de pressão. • Tempos superiores a 40min são exigidos. • Menos prejudicial aos tecidos.

Fonte: Theory and practice of Histological Techniques, Bancroft's, 8rd ed, 2019

Soluções de Recuperação Antigênica

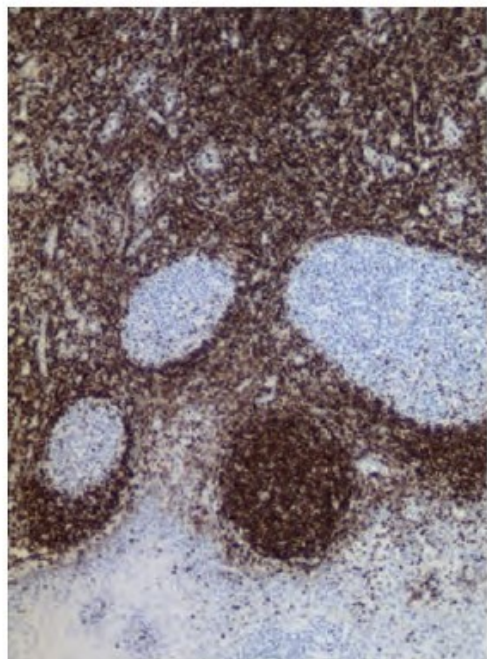


Figure 8.1 B) Anti-BCL2 1:200 with pH 9.0 retrieval.

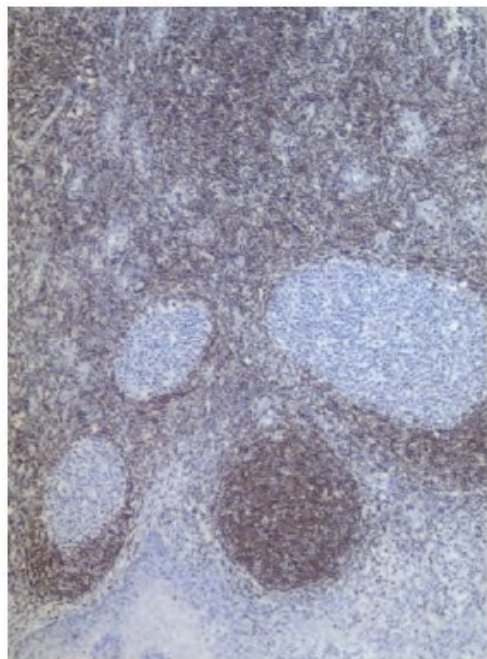
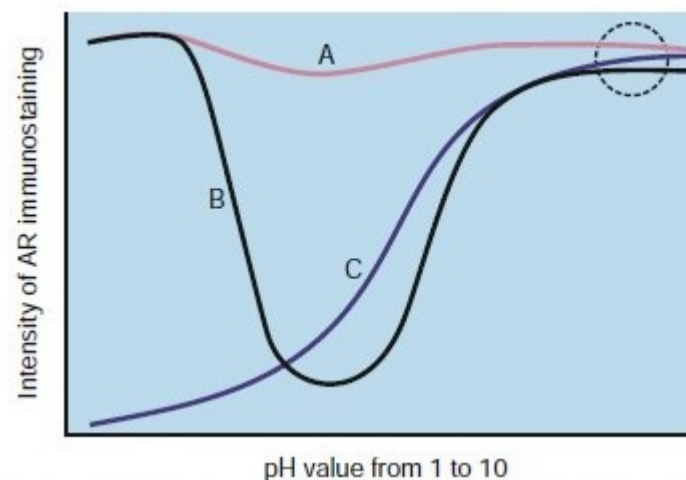


Figure 8.1 A) Anti-BCL2 1:200 with pH 6.1 retrieval.

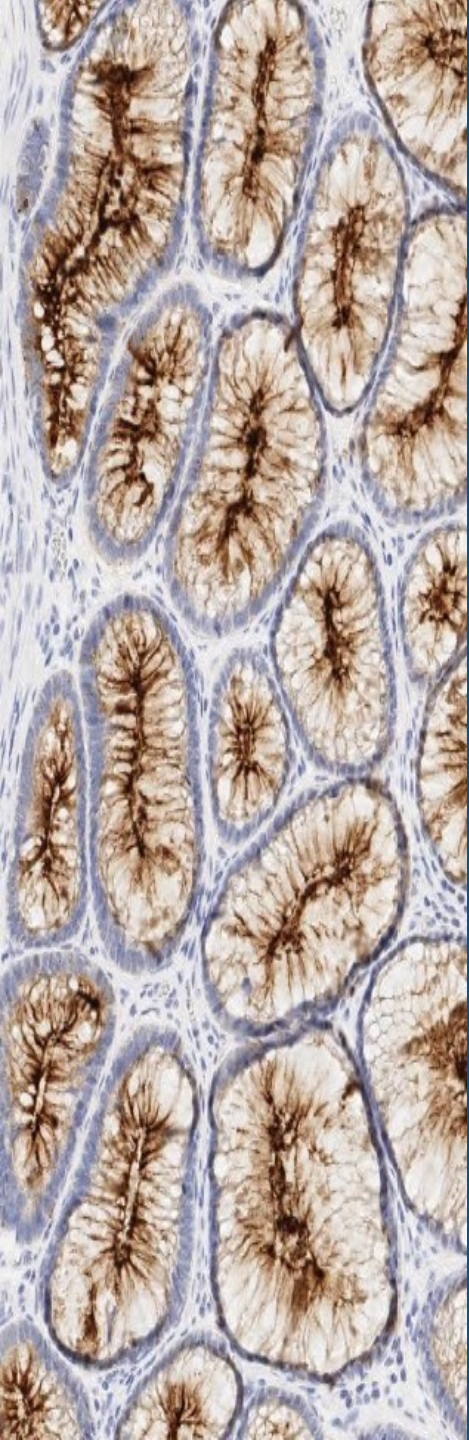
Fonte: Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Sixth Edition, Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company, 2013

- Solução Citrato pH 6
- Solução Citrato-EDTA pH 6,2
- Solução EDTA pH 8
- Solução Tris-EDTA pH 9
- Solução TBS pH 9
- Solução Tris pH 10

- Qualidade dos Reagentes
- Qualidade da água
- Aferição do pH com uso de peagâmetro

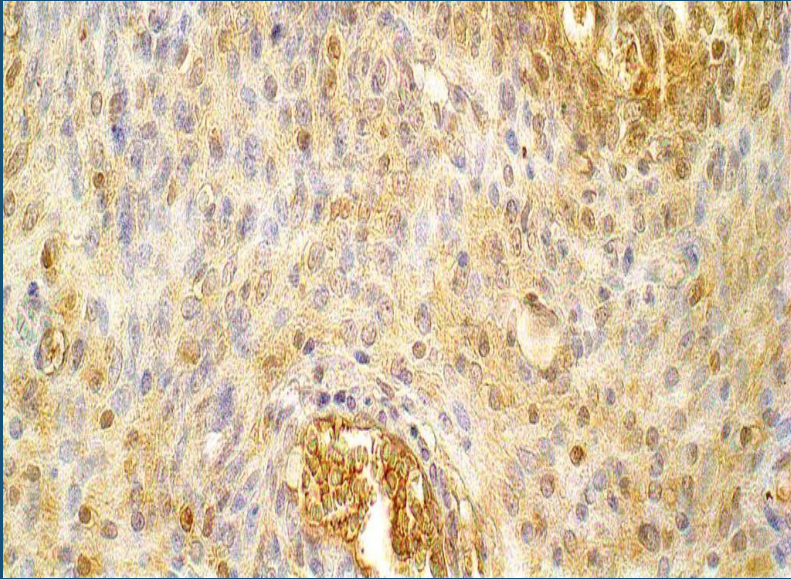


Fonte: Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications, David J. Dabbs.—3rd ed.

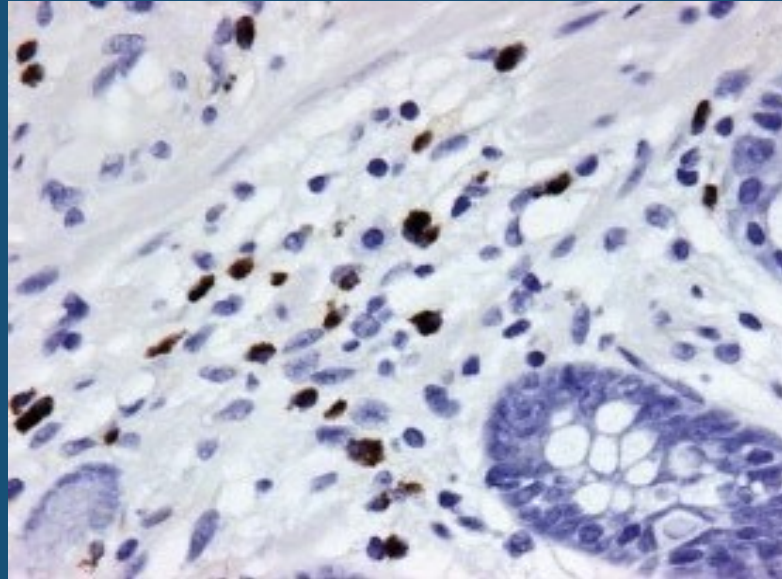


Bloqueios Endógenos

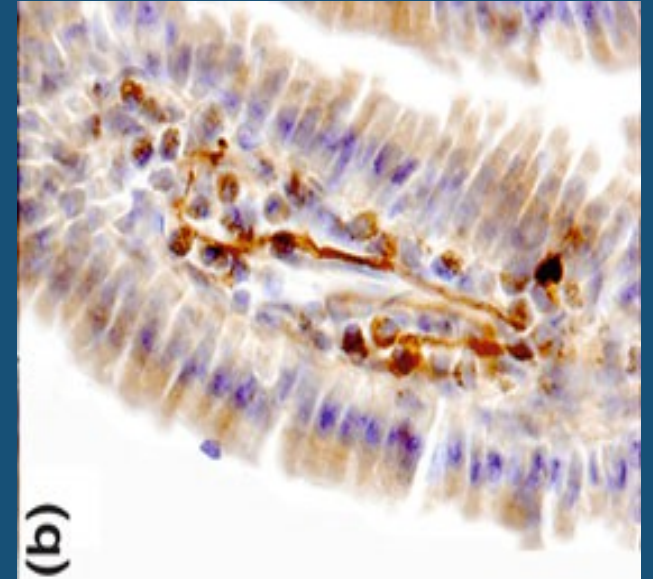
Biotina	Fígado, rim, TGI, pulmão, baço, cérebro	Avidina
Fosfatase Alcalina	rim, fígado, medula óssea, ovário, bexiga, glândulas salivares, placenta.	Levamisol
Peroxidase	Hemácias, leucócitos	H ₂ O ₂
Ligações Não-específicas	Tecido conjuntivo, tecido epitelial e tecido adiposo.	Soro Normal



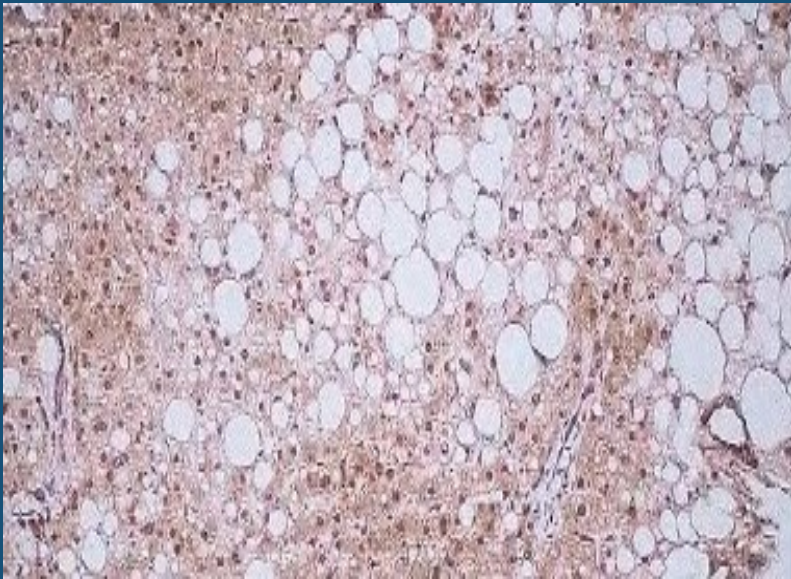
Fonte:Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications ,David J. Dabbs.—3rd ed.



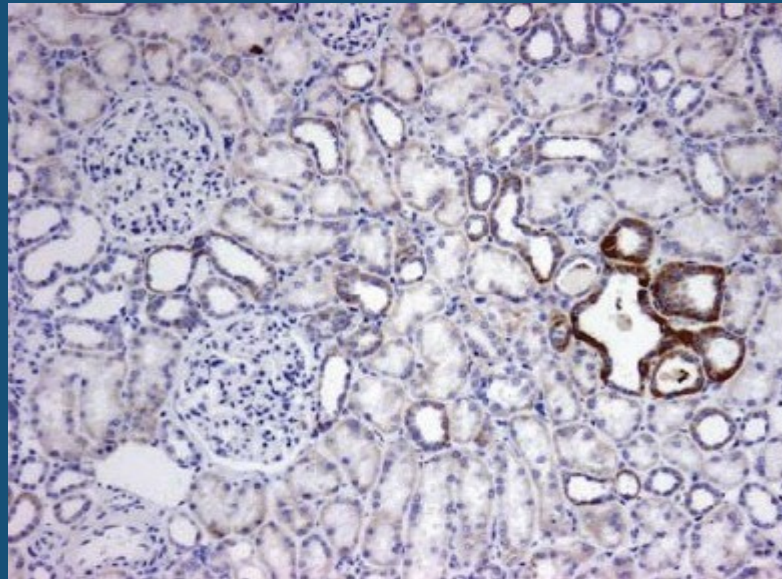
Fonte:Theory and practice of Histological Techniques, Bancroft's, 8rd ed,2019



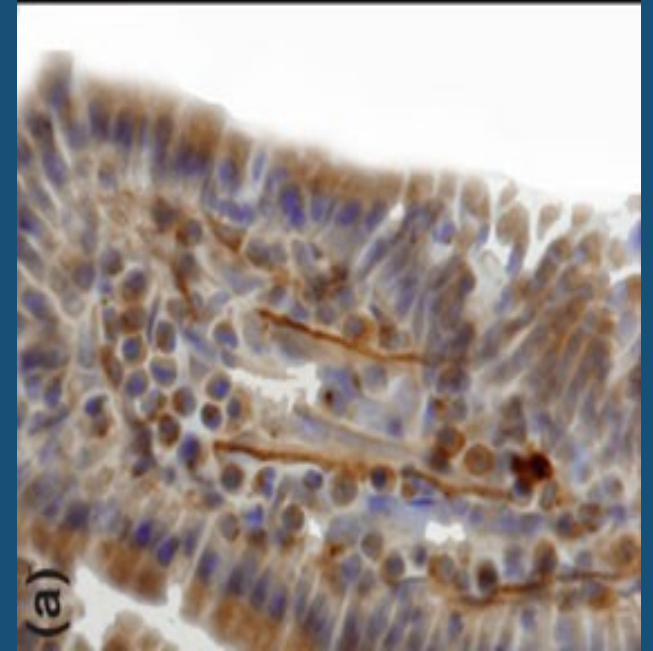
(b)



Fonte:Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications ,David J. Dabbs.—3rd ed.



Fonte:Theory and practice of Histological Techniques, Bancroft's, 8rd ed,2019



(a)

Fonte:Immunohistochemistry: Essential Elements and Beyond, Alexander E. Kalyuzhny

Anticorpos

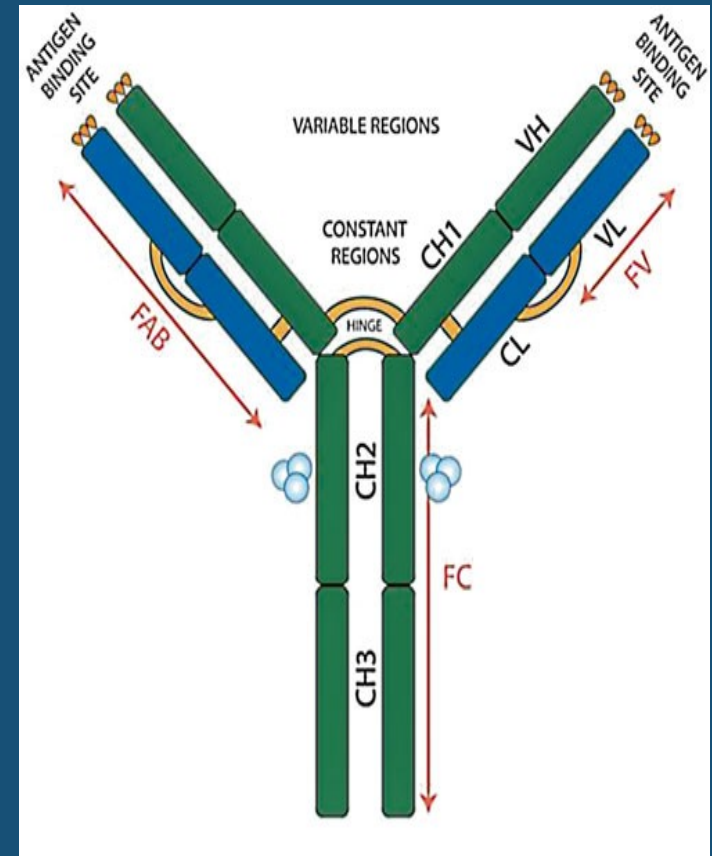
- Ligam-se a um determinate antigênico – epítopo
- São produzidos em várias espécies de animais (camundongo, rato, coelho, cabra, ovelha)

Monoclonal

- Reage com um alvo antigênico
- + específicos

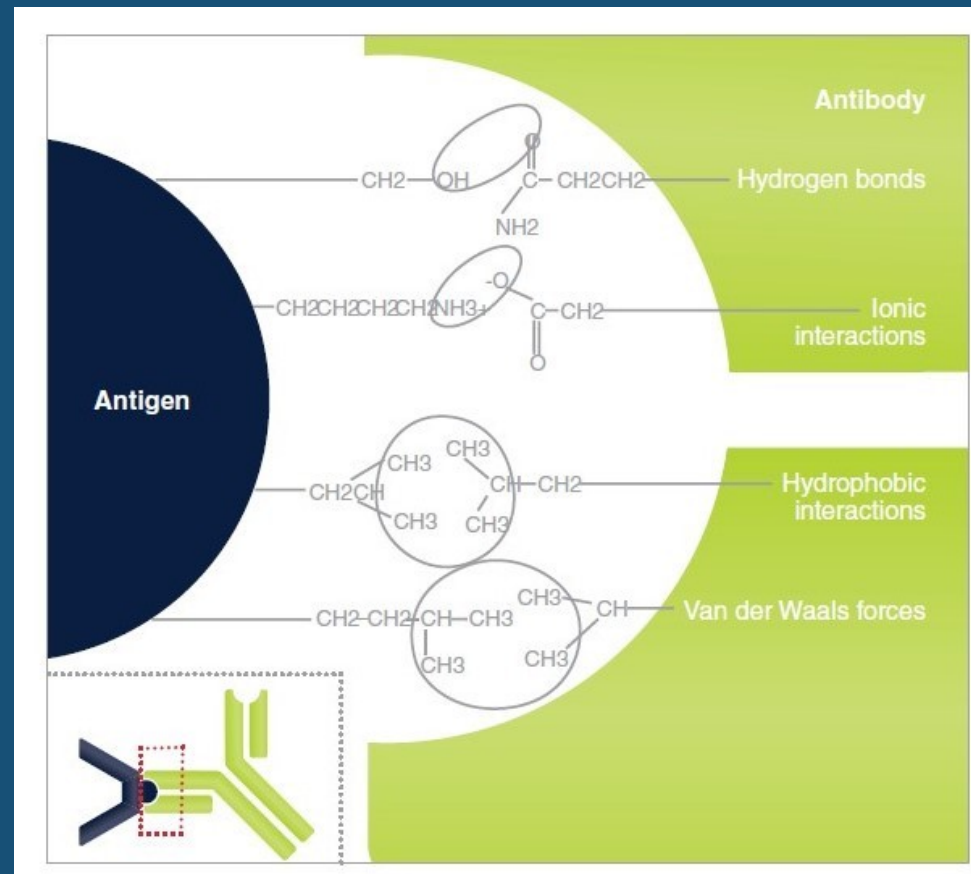
Policlonal

- Reage com vários alvos antigênicos
- + sensíveis

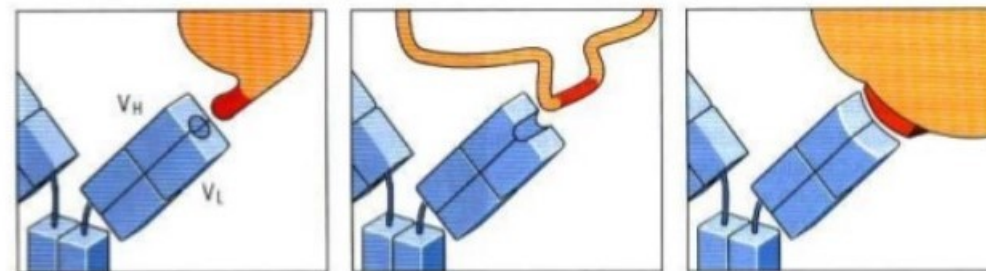


Interação Ag-Ac

- Especificidade
- Compatibilidade
- pH do meio
- Proporção Ag-Ac



Fonte: Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Sixth Edition, Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company, 2013



Fonte: <http://pt.slideshare.net/gildocrispin/antigeno>

Compatibilidade

- Anticorpo primário x espécie a ser testada

Antibody	Dog	Cat	Mouse	Rat	Monkey	Rabbit	Chicken	Cattle	Horse	Sheep	Shrew	Hamster	Guinea Pig	Pig	Lizard	Fish
ACTH (polyclonal)																
Actin, Muscle Specific (HHF35)																
Actin, Smooth Muscle (1A4)																
Alpha-Fetoprotein (polyclonal)																
Androgen Receptor (SP107)																

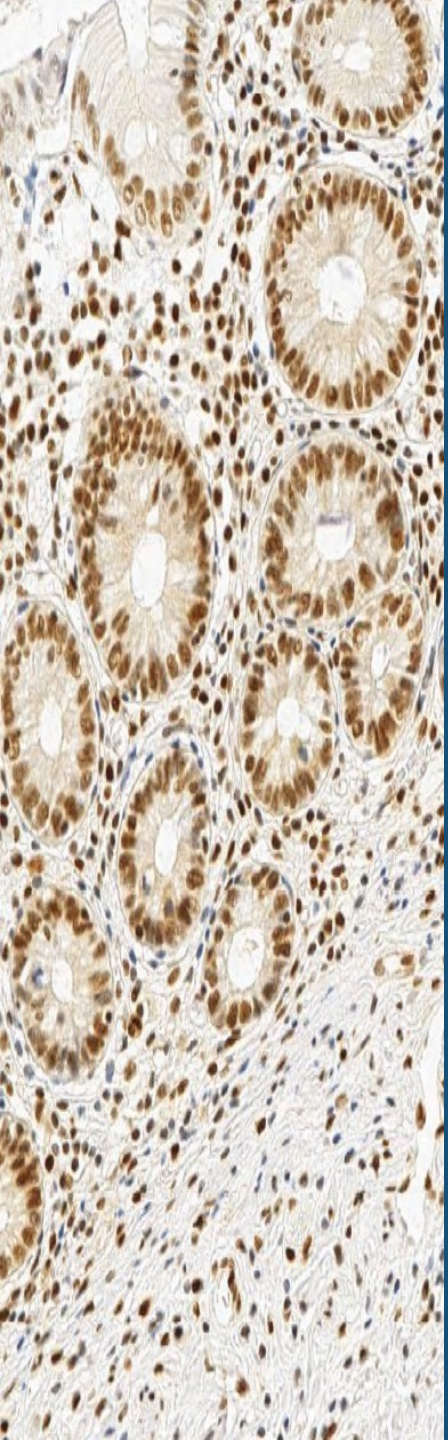
Fonte: www.cellmarque.com/cms/cross-reactivity.php

Aplicação

- Aplicação técnica adequada

#	Product Name	Application	Reactivity
2586	PCNA (PC10) Mouse mAb	WB IP IHC IF F ChIP	H, M, R, Mk, B, Pg
9849	Phospho-Histone H3 (Mitotic Marker) Antibody Sampler Kit		
9449	Ki-67 (8D5) Mouse mAb	WB IP IHC IF F ChIP	H
9129	Ki-67 (D3B5) Rabbit mAb	WB IP IHC IF F ChIP	H, M, R
12202	Ki-67 (D3B5) Rabbit mAb (Mouse Preferred; IHC Formulated)	WB IP IHC IF F ChIP	M
9027	Ki-67 (D2H10) Rabbit mAb (IHC Specific)	WB IP IHC IF F ChIP	H

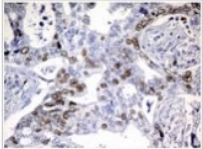
Fonte: www.cellsignal.com/browse/primary-antibodies?Ntt=ki67&N=102236+4294956287&Ntk



View All (58)

OriGene Technologies

Ki67 rat monoclonal antibody, clone OTI5D7 (formerly 5D7)



Applications:	Immunohistochemistry (IHC)
Reactivity:	Human (Hu)
Quantity:	100 ul

Reviews: ★★★★★

Citations: 📖 (1)

Anticorpo monoclonal
Produzido em Rato
Reatividade para Humano

Anti-Ki67



Applications:	Immunohistochemistry (IHC)
Reactivity:	Hu, Dg, Sh
Conjugate/Tag:	Unconjugated
Quantity:	1 ml

Reviews: ★★★★★

Citations: 📖

Anticorpo monoclonal
Produzido em ????
Reatividade para Humano, cachorro e
ovelha

Country Availability	all
BioSite Brand	Optibodies
Clone	BS4
Clone Type	monoclonal
Control Tissue	Tonsil, appendix, colon
Description	Anti-Ki67, mouse monoclonal - Optibodies
Supplier	Nordic BioSite
CE/IVD	true
Notes	Ki67, also known as MKI67, is aprototypic cell cycle related nuclear protein, expressed by proliferating cells in all phases of the active cell cycle (G1, S, G2 and M phase). It is absent in resting (G0) cells. Ki67 antibodies are useful in establishing the cell growing fraction in neoplasms (immunohistochemically quantified by determining the number of Ki67 positive cells among the total number of resting cells = Ki67 index). In neoplastic tissues the prognostic value is comparable to the tritiated thymidine labelling index. The correlation between low Ki67 index and histologically low grade tumours is strong. Ki67 is routinely used as a neuronal marker of cell cycling and proliferation
Alias Names	MKI67

Alias Names	MKI67
Protocol	suitable for IHC-P,IHC-Fr
Source / Host	mouse
Species Reactivity	human, sheep/ovine, dog/canine
Storage	Store at 4°C
Substrate / Buffer	TRIS with 0.03% sodium azide, pH7,2
Technical Specifications	Control: Tonsil, appendix, colon
UniProt Number	P46013
Product Page Updated	2019-02-20T14:36:52.701Z

Anticorpo monoclonal (BS4)
Produzido em camundongo
Reatividade para Humano, cachorro
e ovelha

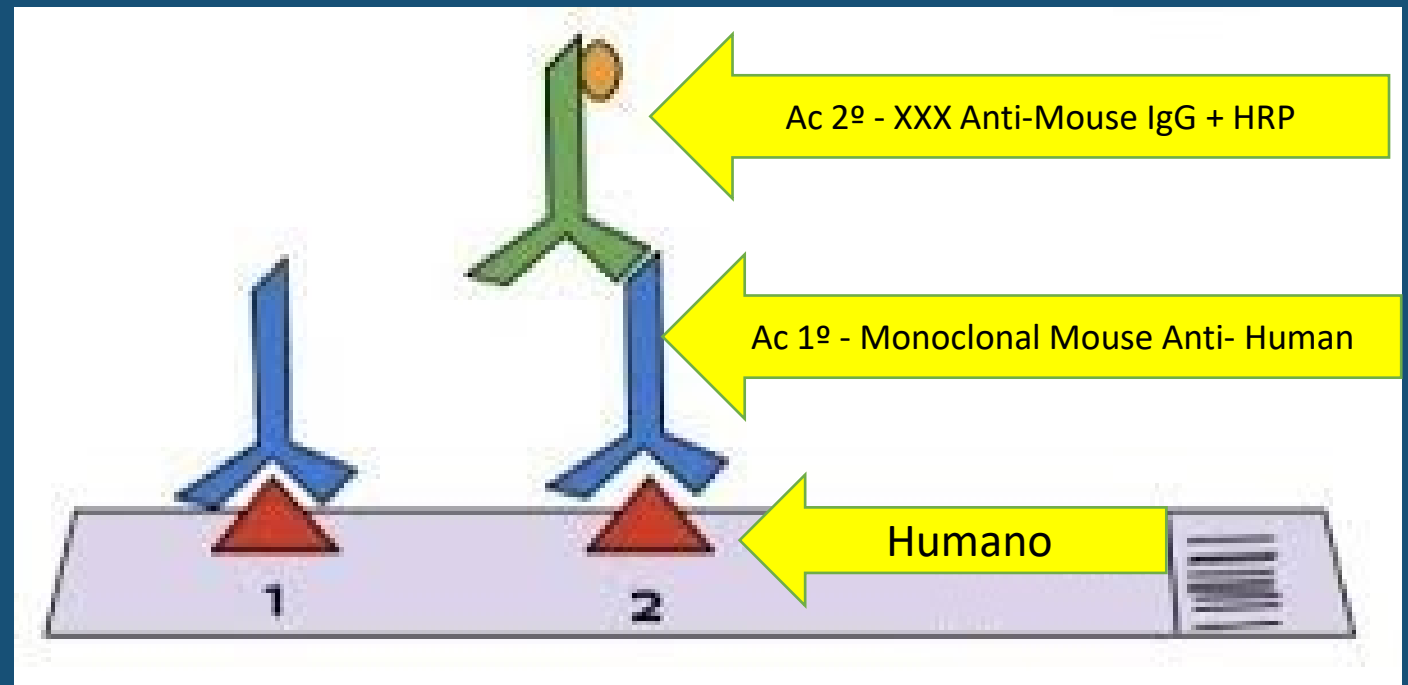
Anticorpo secundário - Sistemas de Detecção

- Anticorpos secundários conjugados com biotina, polímero ou enzimas - HRP & PA
- Devem ser compatíveis com o anticorpo primário e não reativo com a espécie em teste

Intended Use

For *in vitro* diagnostic use.

  Detection Systems are used for the visualization of mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies 
 Polymer  DAB (Polymer) contain component reagents of these systems and are intended for use in the procedure described below. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.



Product Description

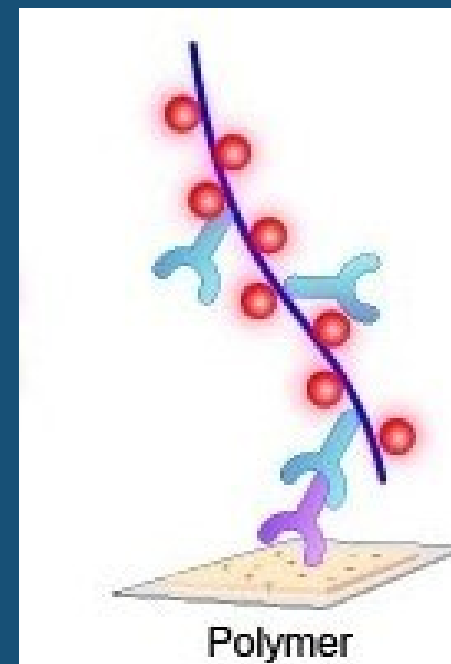
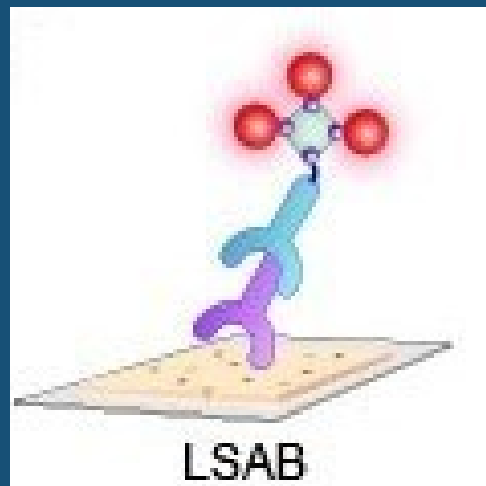
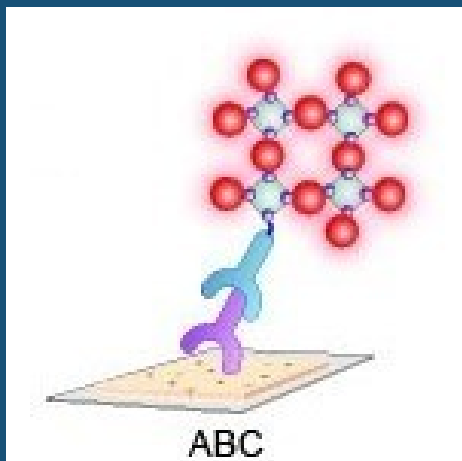


Affinity purified **goat anti-mouse IgG (H&L)** antibody is conjugated to calf intestinal **alkaline phosphatase**. This product has been optimized for use as a secondary antibody in Western blotting and ELISA applications.

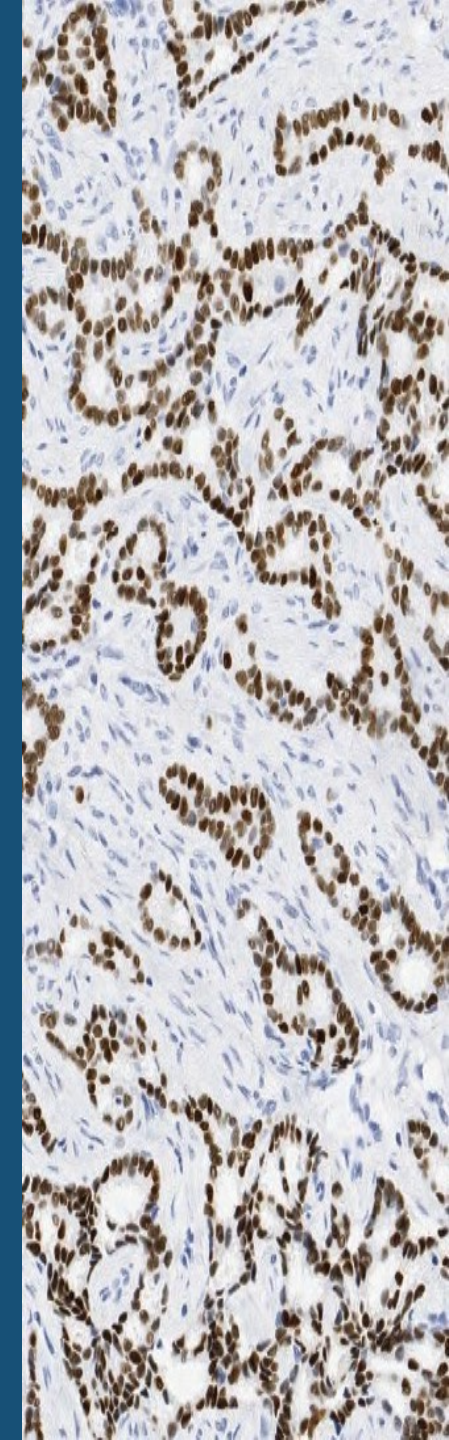
Product Description



Affinity purified **horse anti-mouse IgG (heavy and light chain)** antibody is conjugated to **horseradish peroxidase(HRP)** for chemiluminescent detection. This product is thoroughly validated with CST primary antibodies and will work optimally with the CST western immunoblotting protocol, ensuring accurate and reproducible results.



- **Sensibilidade** – capacidade/quantidade relativa de Ag que uma técnica é capaz de detectar
- Devem ser aplicados em temperatura ambiente.

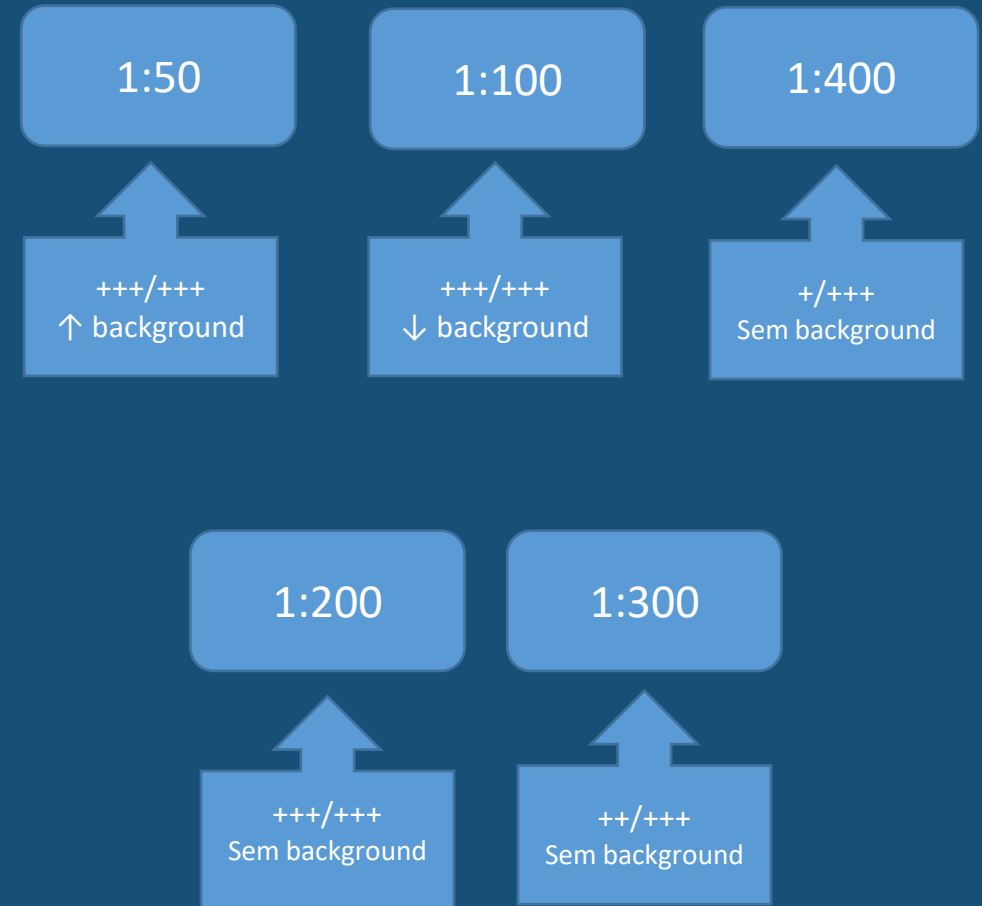
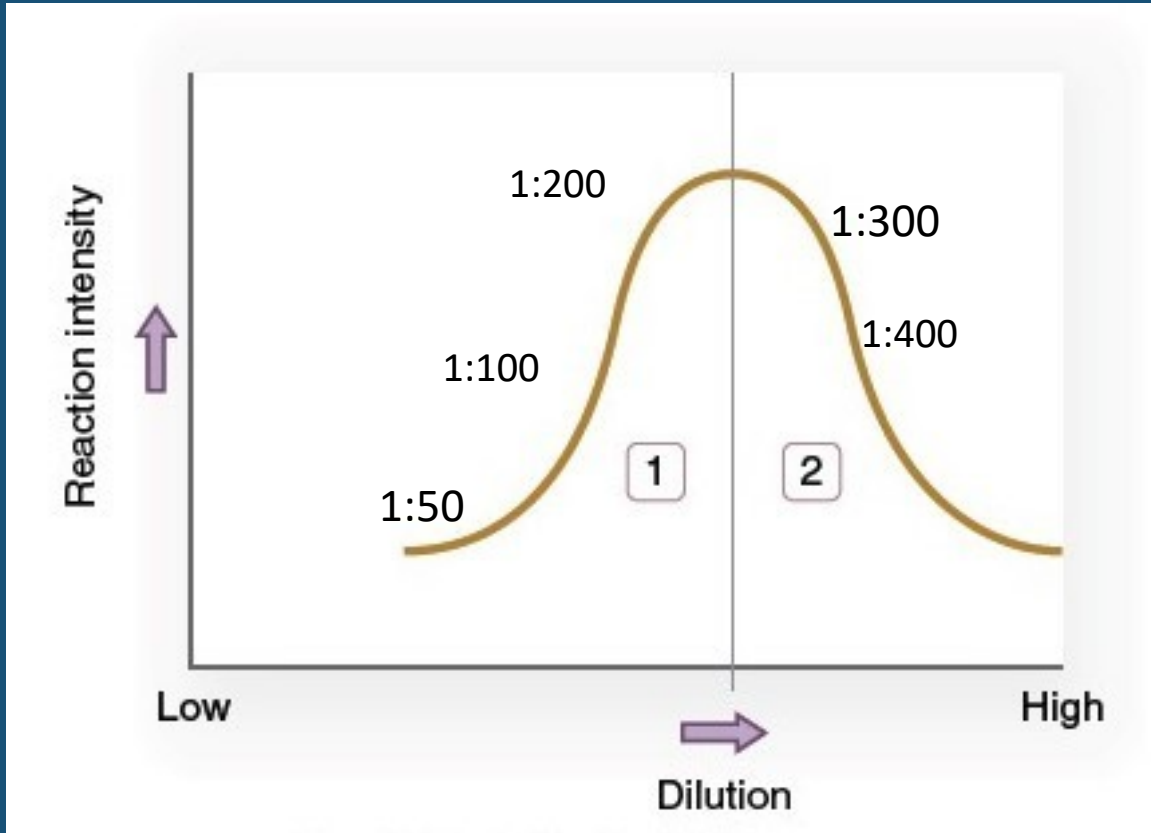


Aplicação de Anticorpos primários

- Armazenamento – recomendação do fabricante
- Registro Anvisa – IVD
- Diluição
 - Temperatura ambiente
 - Diluentes comerciais
 - Homogeneização
- Pipetas
 - Calibradas
 - Compatível ao volume
 - Técnica correta para pipetagem

Model	Volume range
P2	0.1-2 µl
P10	0.5-10 µl
P20	2-20 µl
P50	5-50 µl
P100	10-100 µl
P200	20-200 µl
P1000	100-1000 µl
P5000	500-5000 µl
P10ml	1-10 ml

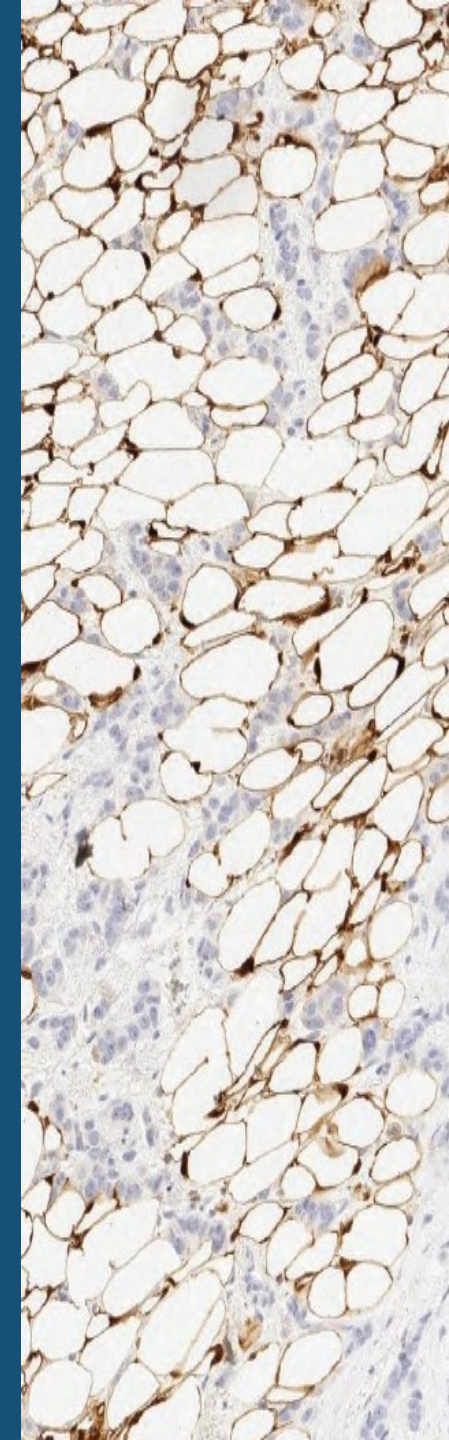
Diluição ideal – coloração específica com o menor background (coloração de fundo)

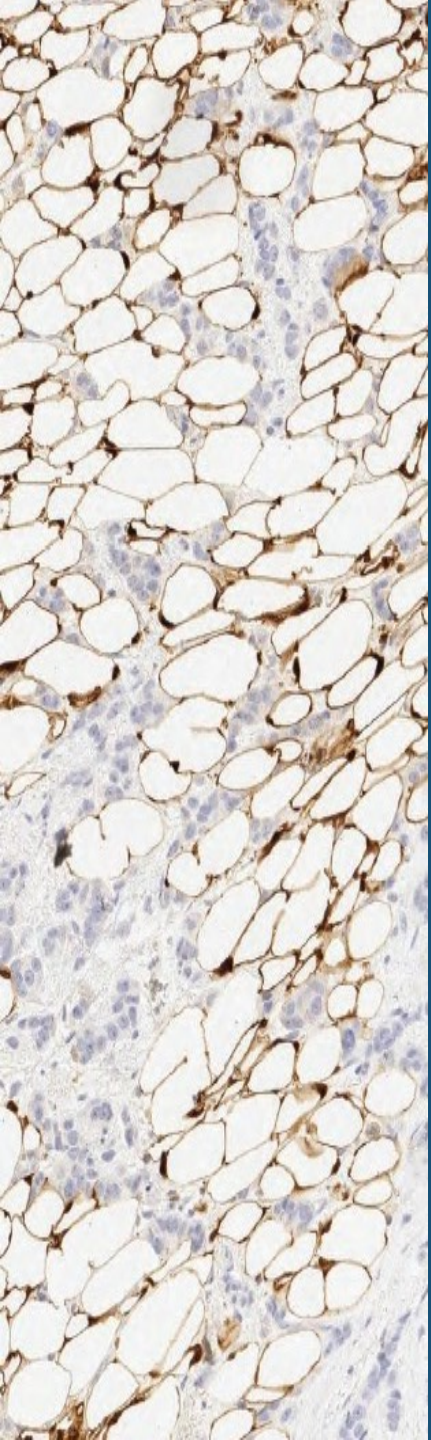


Efeito prozona - Alta concentração de anticorpos em relação ao antígeno

RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO PARA ANTICORPOS/IHC

ANTICORPO	CLONE	MARCA/REFERÊNCIA
APRESENTAÇÃO/VOLUME	CONCETRAÇÃO	ESPÉCIE/REATVIDADE
PADRÃO DE MARCAÇÃO	DATA DE RECEBIMENTO	DATA DE VALIDAE
CONTROLE POSITIVO/NEGATIVO		





Controles

- Validam a reação garantindo uma interpretação adequada.
- Validam os resultados.
- Validam a qualidade do protocolo aplicado.
- Auxiliam na avaliação de variações de cada execução
- Devem estar na mesma lâmina teste.

Controle Reagente Negativo

Controle Reagente Negativo

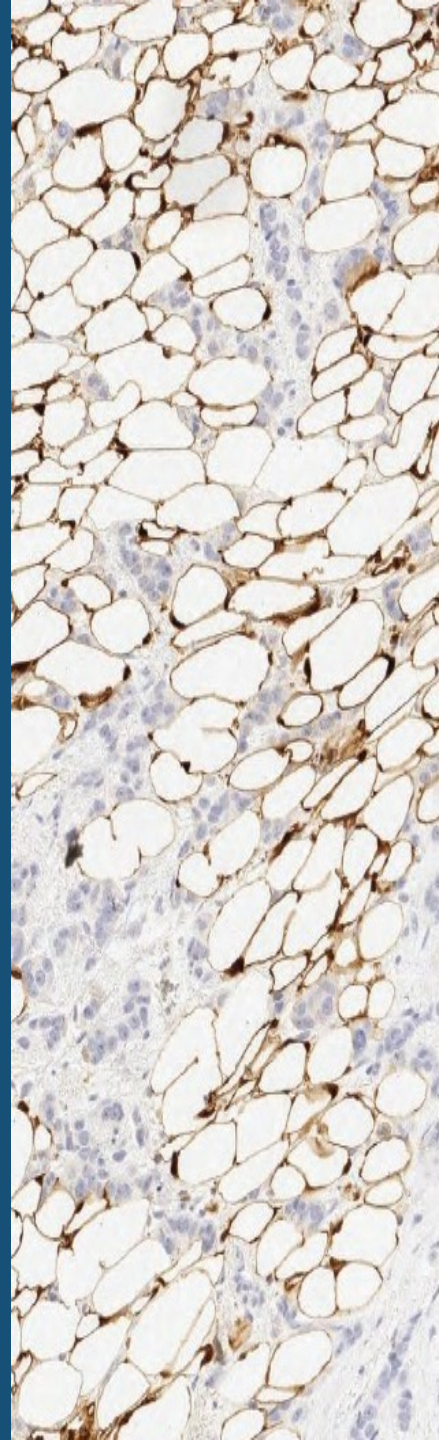
- Avalia a especificidade do anticorpo primário.
- Avalia reação falso positiva.
 - Substituição Ac 1º por Imunoglobulina não específica ao tecido teste (mesma classe e espécie do Ac 1º)

Reagent provided

Ready-to-use mouse negative control antibody cocktail of mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgM provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Controle Negativo Tecidual

- Avalia a especificidade do anticorpo primário.
 - Incubação com Ac2º + substrato avalia ligação inespecífica causada por outras fontes.
 - Suspeita de coloração presente por enzima pode ser confirmado pela aplicação do substrato no tecido.

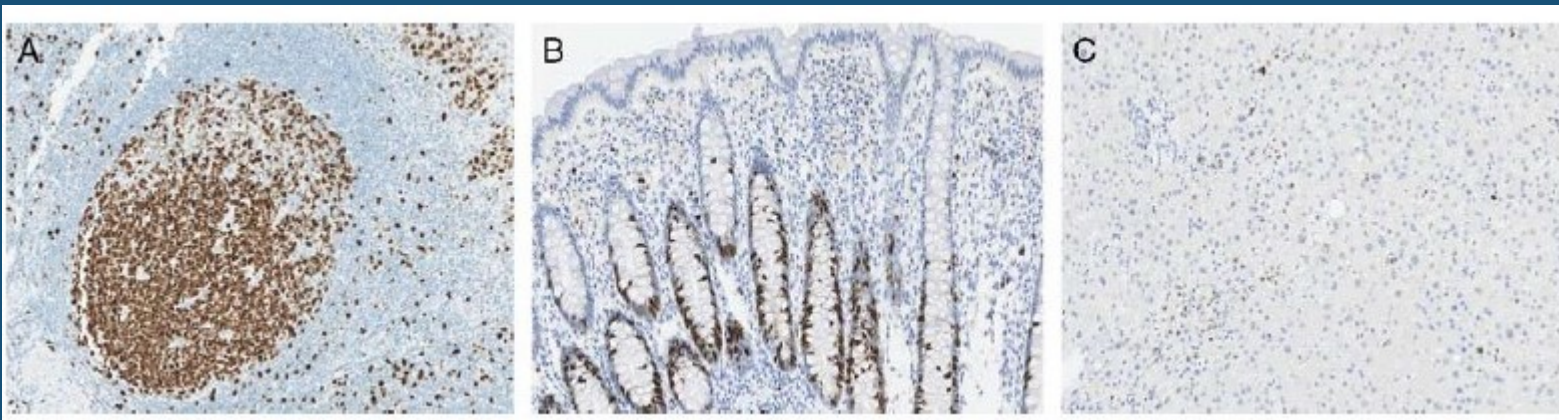


Controle Positivo

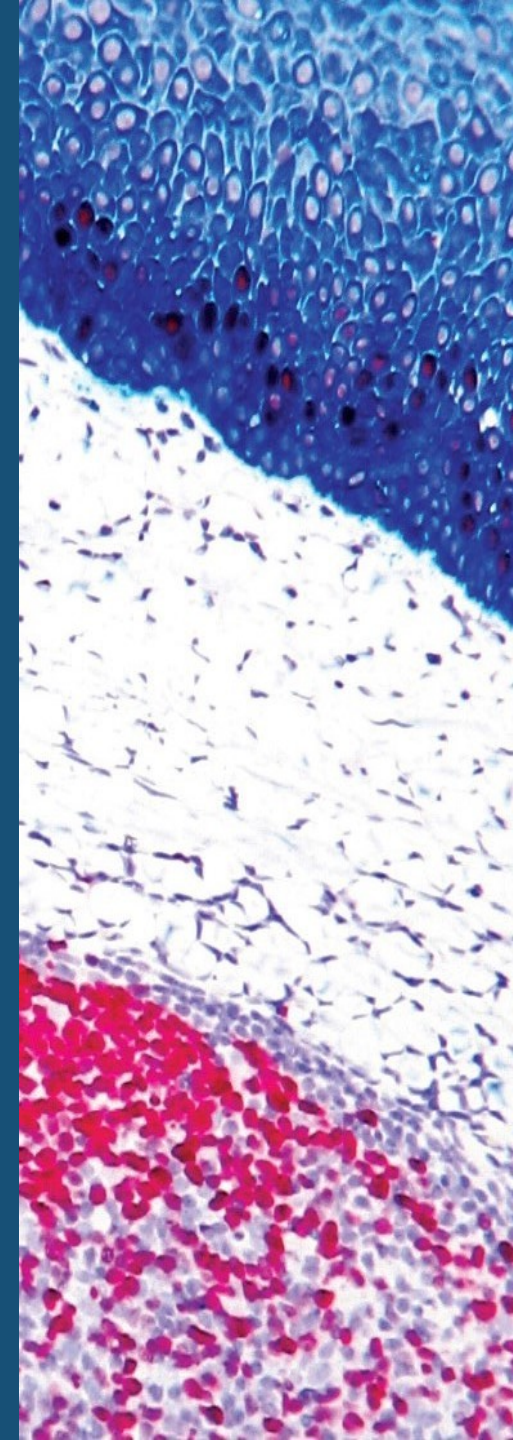
- Tecido com o Ag específico em nível conhecido, relevante e estável.
- Avalia o desempenho correto do protocolo.
- Deve ser aplicado tecidos com alta e baixa expressão.

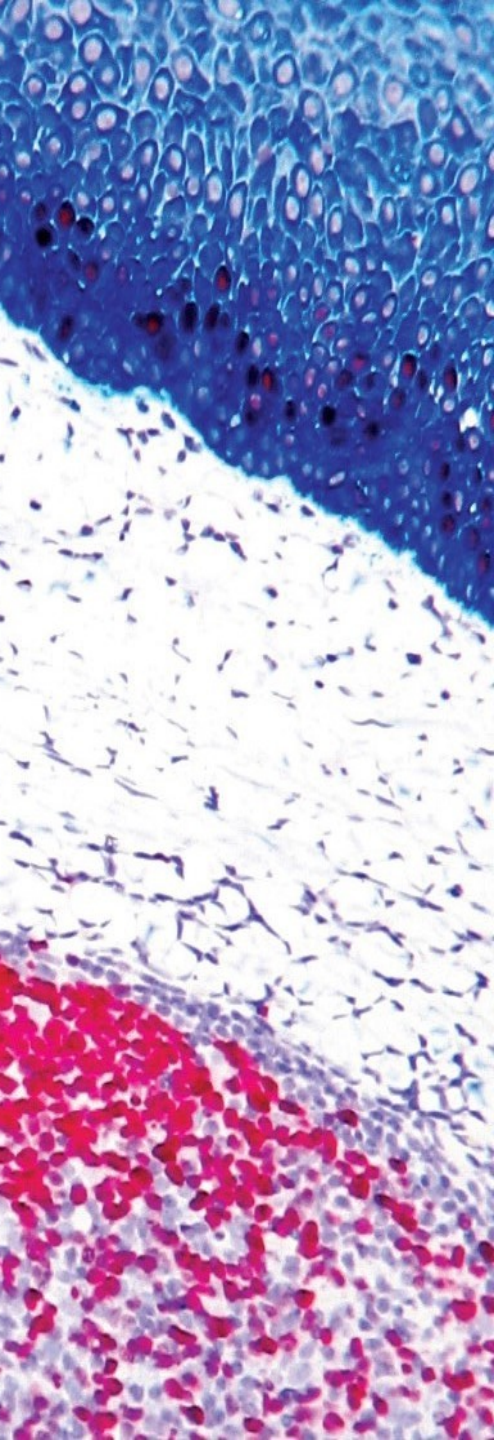
Positive control

WB: HeLa and Ramos cell lysates. IHC-P: Human tonsil, colon, ovarian carcinoma, squamous cell carcinoma of cervix and colonic adenocarcinoma tissues. ICC/IF: HeLa, HT-29 cells, HAP1 cells.
Flow Cyt: Ramos cells.



- Amostras tumorais nem sempre têm o complemento completo do Ag e alguns tumores apresentam distribuição heterogênea.
- Diluições que identificam células normais podem ser muito diluídas para demonstrar as células tumorais.
- Dê preferência a utilização de TMAs.
- Sempre que possível, selecionar amostras com conhecimento do tempo de fixação e qualidade no processamento.



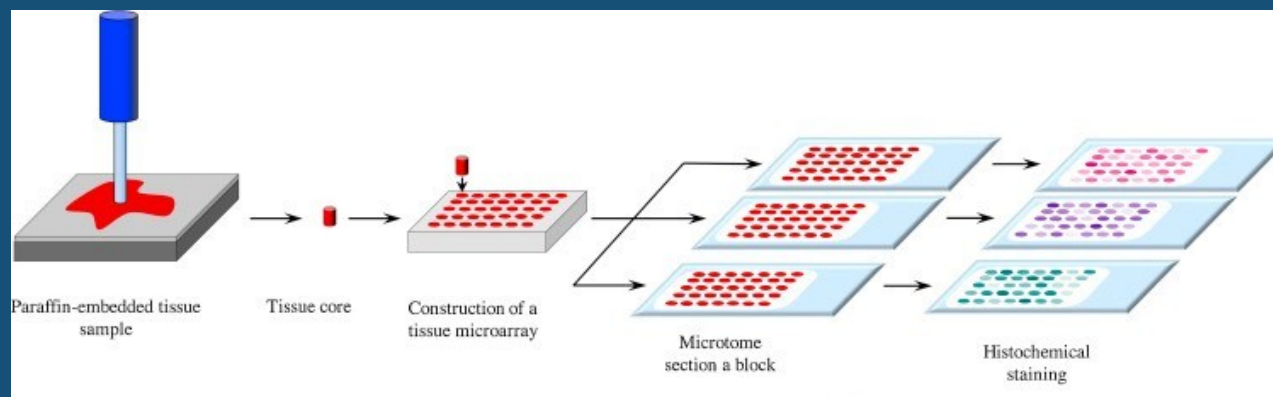


Estudo Normal

Tecido	N.º corados (+)	N.º total	Observações
Hipófise	0	1	
Testículos	1	1	Células germinativas +
Tiróide	0	1	
Mama	0	1	
Baço	0	1	
Amígdala	0	1	
Tímo	0	1	
Medula óssea	0	1	
Pulmão	1	1	Epitélio brônquico +
Coração	0	1	
Esófago	0	1	

Estudo de Tecidos com Doença

Tecido	N.º corados (+)	N.º total	Observações
Carcinoma da próstata	20	20	
Neoplasia intra-epitelial da próstata de elevado grau	9	9	
Carcinoma ductal da mama in situ	8	9	
Carcinoma ductal invasivo da mama	8	9	
Carcinoma do endométrio	3	6	
Carcinoma do ovário	3	6	
Carcinoma urotelial	3	6	
Carcinoma da próstata metastático	1	1	

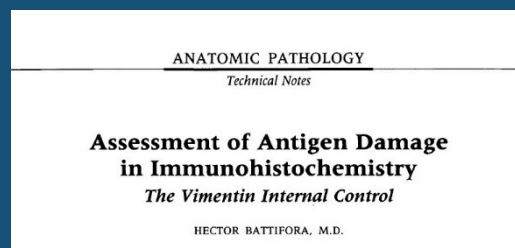


Parecer 33 da SBP

Consulta: Normas para Utilização de Blocos de Parafina para Controle de outras Colorações.

Resposta: SIM, mas recomenda que para a realização de controle de colorações ou de imunoistoquímica:

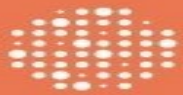
1. utilize-se, preferencialmente, blocos histológicos de casos cujos laudos foram emitidos há mais de cinco anos.
2. Havendo necessidade de utilização de bloco histológico mais recente, deve-se evitar o desgaste completo do tecido, pelo que desaconselha-se a utilização de bloco com amostra tecidual exígua.
3. Preservem-se as condições legais de utilização de material biológico estocado, ou seja:
 - * Que não se permita acesso aos dados de identidade do paciente que forneceu o material ou outras informações que possam vir a identificá-lo.
 - * Que o resultado das reações de controle não gere informações que possam resultar em benefícios ou riscos para o paciente ou seus familiares.



Vimentina

Avalia qualidade da fixação.

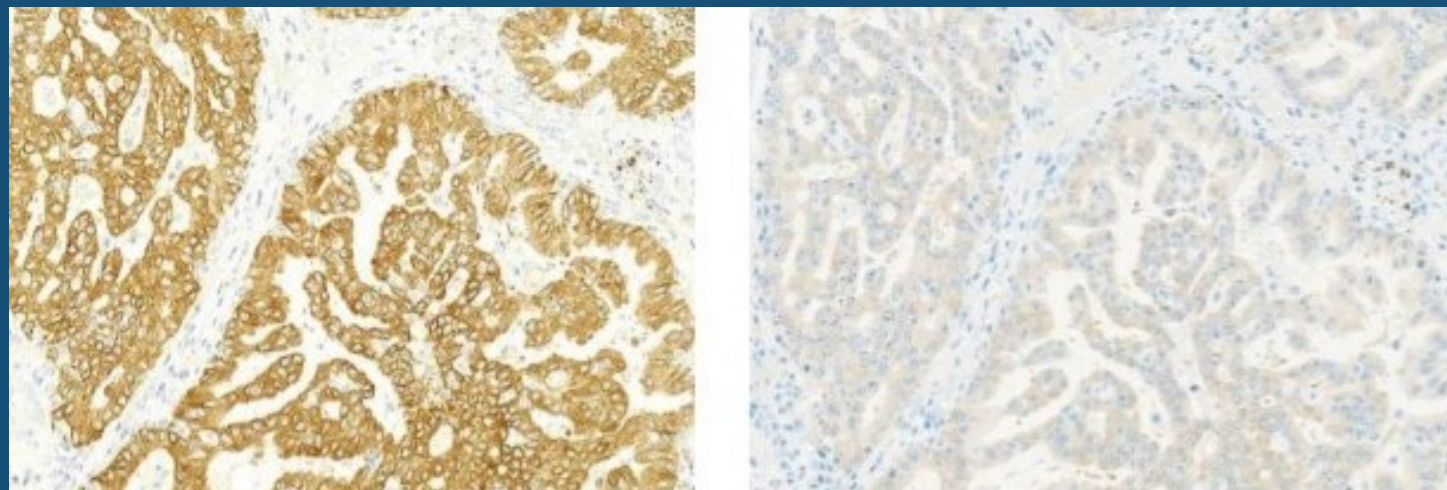
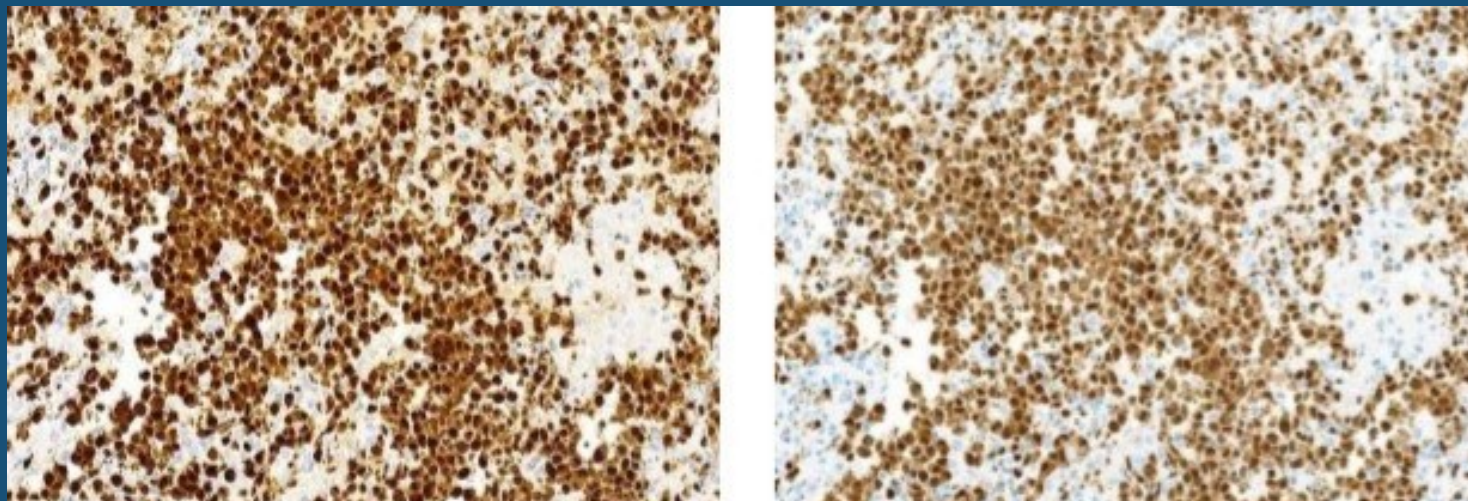
Está distribuída uniformemente nos tecidos (vasos e células estromais).



Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays

Summary of Recommendations

- ✓ Todos os testes devem ser validados antes de colocar na rotina (Recomendado)
- ✓ Atingir pelo menos 90% de concordância global entre o novo teste e o teste comparador ou os resultados esperados. Se inferior a 90% investigar a causa da baixa concordância. (Recomendado)
- ✓ Para validação analítica inicial de ensaios fatoriais não preditivos testar 10 amostras positivo e 10 amostras negativas. (Opinião de consenso de especialistas).
 - ✓ - O conjunto de validação deve incluir expressões de baixo e alta para os casos e deve abranger o intervalo esperado de resultados (níveis de expressão) para marcadores que são relatados quantitativamente. (Opinião de consenso de especialistas)
- ✓ Para testes preditivos testar mínimo de 20 casos positivos e 20 casos negativos. (Opinião de consenso de especialistas).
- ✓ Para marcadores com aplicação para ambos (Preditivo e não preditivo) validar como um marcador preditivo. (Recomendado).
- ✓ Quando possível utilizar tecidos processados com o mesmo método (fixação e processamento histológico) que o tecido teste.
- ✓ Se realizado em tecidos descalcificados testar um nº suficiente de casos para garantir que os ensaios atinjam os resultados esperados
- ✓ Quando um lote de reagente é inserido no serviço, confirmar o desempenho com um controle positivo e um controle negativo
- ✓ Quando for alterado diluição do anticorpo, fornecedor do anticorpo (mesmo clone), tempos de incubação ou recuperação antigênica, confirmar o desempenho com pelo menos 2 controles positivos e 2 controles negativos.
- ✓ Confirmar o desempenho dos testes sempre que qualquer um dos itens mudar:
 - ✓ Tipo de fixação
 - ✓ Método de recuperação (mudança de pH, plataforma de calor)
 - ✓ Sistema de detecção
 - ✓ Equipamento de processamento
 - ✓ Relocação do laboratório
 - ✓ O RT é responsável por determinar quantos marcadores preditivos, não preditivos e controle negativo devem ser testados.
- ✓
- ✓ Revalidar o teste quando mudar o clone.
- ✓ Documentar todas as avaliações e verificações em cumprimento dos requisitos regulamentados e de acreditação.



https://www.proteinatlas.org/

THE HUMAN PROTEIN ATLAS

MENU HELP NEWS

SEARCH¹

vimentin
e.g. RBM3, insulin, CD36

Search Fields »

TISSUE ATLAS

CELL ATLAS

PATHOLOGY ATLAS

https://www.biocompare.com/

Biocompare
The Buyer's Guide for Life Scientists

Welcome Guest Sign In Register | Subscribe eNewsletters | Submit Review

Products Articles Videos Write a Review More

Search Biocompare Search

Use Biocompare to Explore, Learn, Decide

Search for products and services in All of Biocompare Search

Browse Products and Services

Antibodies Browse Antibodies, Secondary Abs	Chemicals and Reagents Substrates, Dyes, Inhibitors	Molecular Biology Cloning, PCR, Electrophoresis, CRISPR
Assay Kits ELISA Kit Search, ELISA Kits	Immunochemicals Cytokines/Chemokines, IHC	Protein Biochemistry Proteomic Tools, Western Blotting
Biomolecules Proteins, Peptides, Enzymes	Lab Automation Dispensers, Washers, Handlers	Gene Expression qPCR, Microarrays, RNAi, RNA-Seq
Bio-Imaging / Microscopy Gel Imaging, Microscopes	Lab Equipment Mass Spec, Refrigeration, Imaging	Services Antibody Services, Peptide Synthesis
Cell Biology Cell Analysis, Cytometers, Cell Counters	Cell / Tissue Culture Media, Cells, Culturing Equipment	Translational Research In Vivo Imaging, Live Cell Imaging
Molecular Diagnostics	Drug Discovery and Development	Chromatography

Popular Product Categories

- Antibodies
- ELISA Kits
- Biomolecules
- Assay Kits
- Cells & Microorganisms
- Chromatography & Separation
- Flow Cytometers
- Thermal Cyclers
- Microscopes / Cell Imagers

https://www.biocompare.com/Antibodies/

Biocompare
The Buyer's Guide for Life Scientists

Welcome Guest Sign In Register | Subscribe eNewsletters | Submit Review

Products Articles Videos Write a Review More

Search Biocompare Search

Products > Products > Antibodies

Find Products Here

- Search Antibodies
- Secondary Antibodies
- Search Secondary Antibodies
- Recombinant Antibodies
- Trial Size Antibodies
- Apoptosis Antibodies
- Epitope Tag and Fusion

Antibodies

The Biocompare Antibody Search Tool lets researchers search over 3 million antibodies from hundreds of antibody suppliers quickly and easily. Query the antibody database by target antigen, species reactivity, host, conjugate or application. Compare antibodies from different companies side by side to find the one that best suits your research needs. Target your searches using the drop down menus to find reactivities, host species, applications and conjugates. To further target your searches use the "antigen" option (the default option is "keyword"); this will specifically limit your results to those antibodies that have matching antigen fields.

Check out Biocompare's documentary, "[Reproducibility Issues in Life Science Research: Antibody Validation Challenges](#)". Members of the research community including researchers, antibody manufacturers, journals, and scientific societies come together to discuss the factors contributing to this important issue and possible solutions. Visit our [Reproducibility Website](#) to learn more.

Antibody Search ☒ Keywords ☐ Antigen ☐ Clone Number

Search



Muito Obrigado!

Um ótimo congresso à todos!!!!

tgiulianni@yahoo.com.br
51 99149 2130