

Single, Duplex und Multiplex

Immunhistochemie-Etablierung und Validierung

- gleichmäßige Schnittdicke 1-4 μm beachten
!Einfluss auf die Färbeintensität!
- Streckbad: frisches, sauberes Wasser
- geschnittenes, aufgezoogenes Gewebe
nicht länger als 1-2 Wochen auf OT lagern
- Objektträger (Qualität, Beschichtung)
können zu ungleichmäßigen Färbungen,
Artefakten, Hintergrundfärbungen
beitragen(!)
- SOP dringend empfohlen



Nein!
Aber: Unterschiede
wahrnehmen und
Färbeprotokoll
validieren!

Epitopdemaskierung (*Retrieval*)

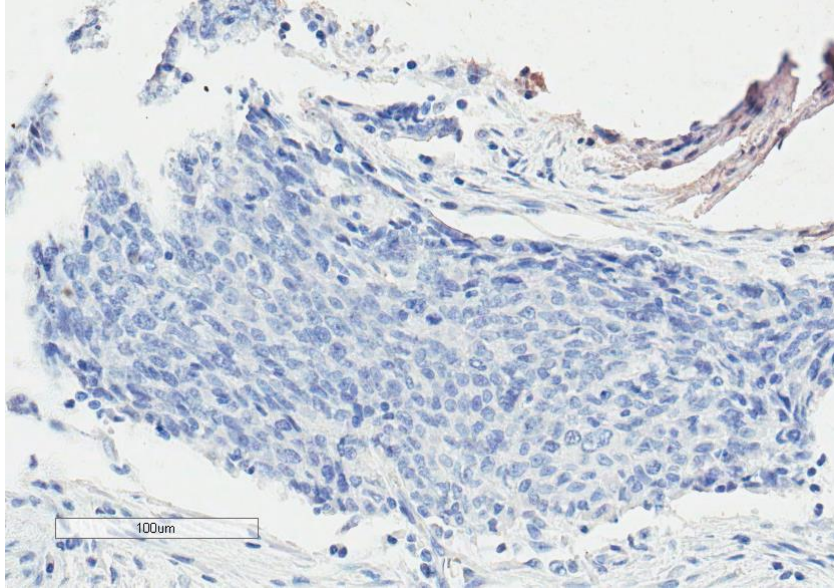
- Problem 1: zu kurze effektive HIER-Dauer
 - **Temp.** 95-99 °C und **Dauer** i.d.R. 20 - 40 min*
- Problem 2: falscher HIER-**Puffer**
 - ca. 90% aller Antikörper färben sensitiver bei alkalischer HIER-Pufferlösung (z.B. Trilogy = Tris/EDTA-Rezept pH8; Declere=Citrat pH6)
- Problem 3: nicht standardisierte HIER-Methode
 - z.B. Schwankungen der Temp.

HIER: *Heat-Induced Epitope Retrieval*

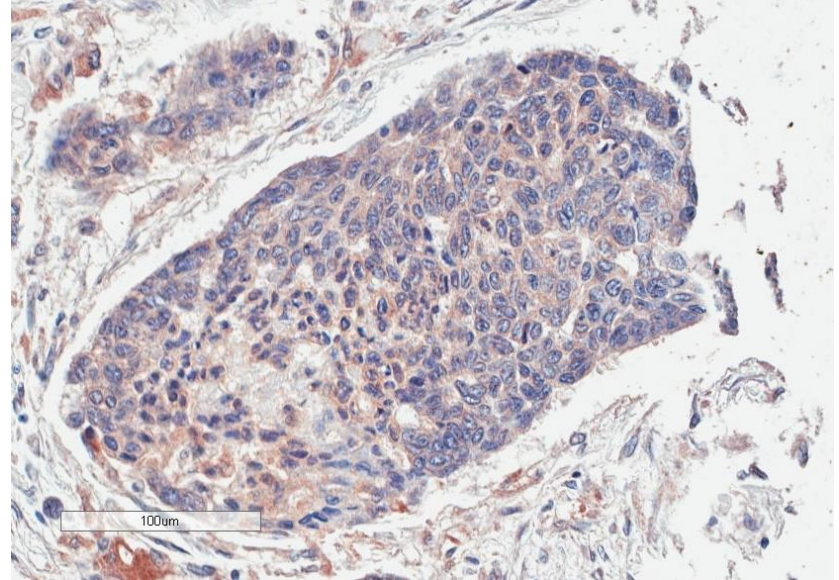
* alkalische HIER-Puffer mit kürzerer optimaler Dauer (15-30 min)

Epitopdemaskierung (*Retrieval*)

- Wasserbad (computergesteuert: PT-Modul)
- Dampfgarer
- Autoklav
- Dampfdrucktopf
- Mikrowelle (Standardisierung problematisch: !Six Sense!)
- **Temperatur- und Zeitkontrolle(!)**
 - geeichtes Thermometer verwenden
- Morphologie-Erhalt
- Standardisierung besonders wichtig



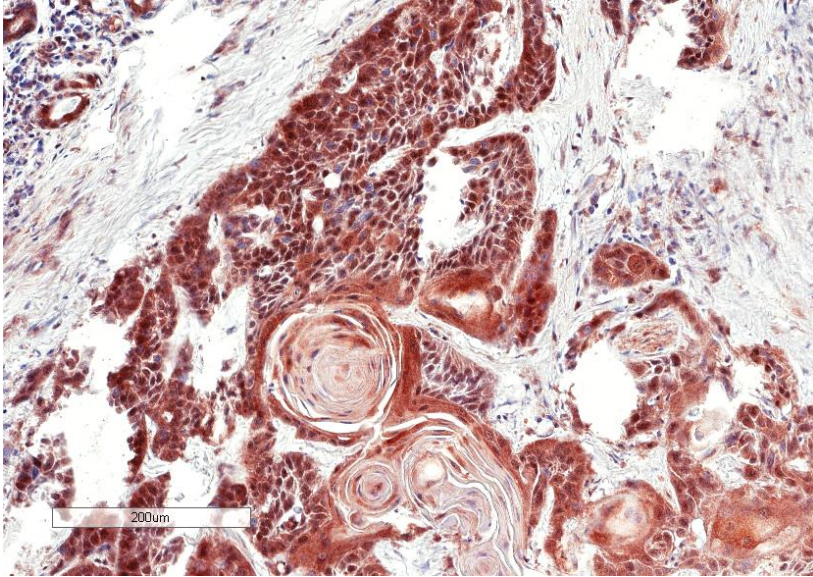
(li) negatives Färbergebnis bei Trocknung der Schnitte für 2h bei 58°C (falsch negativ)



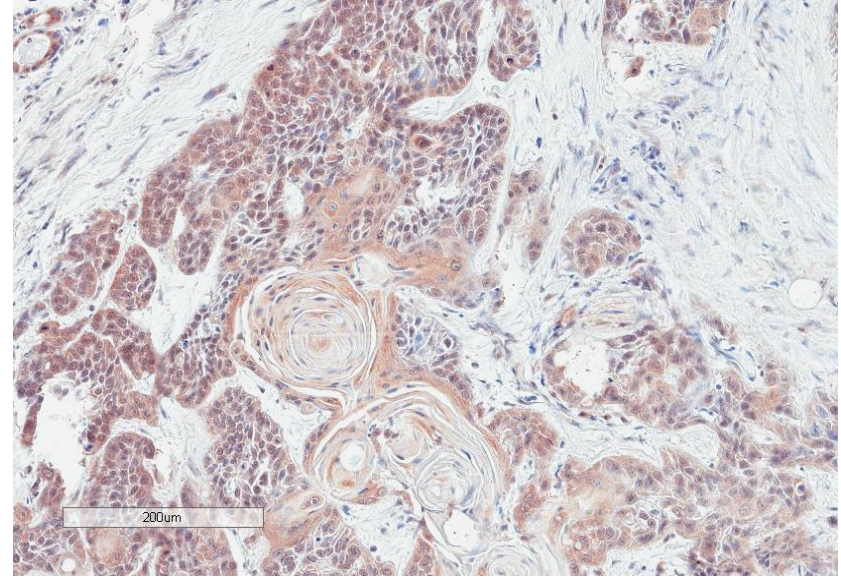
(re) Trocknung der Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur

Etablierung Blockierung

20x magnification

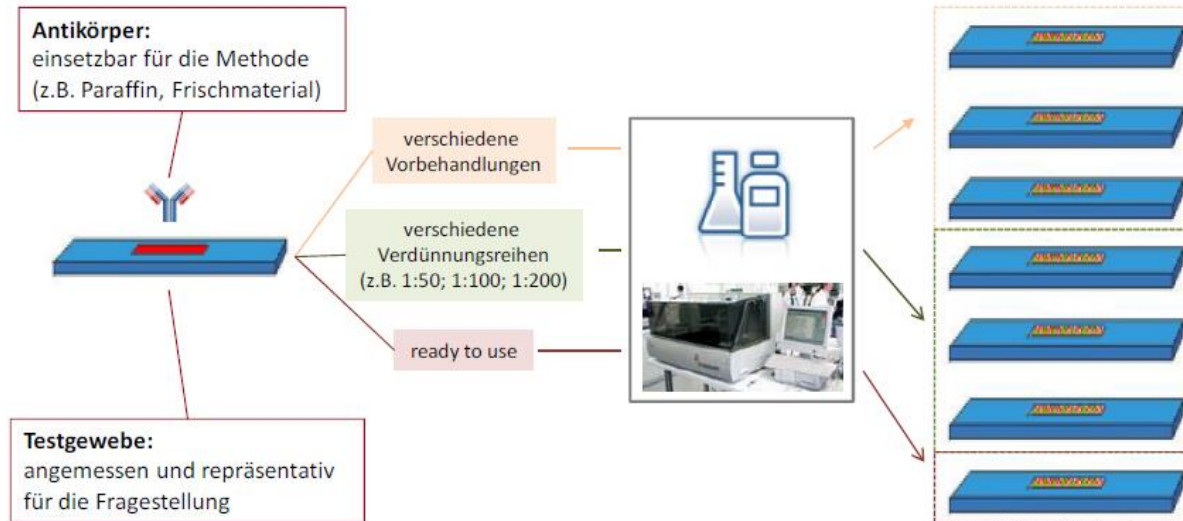


(li) 20 min

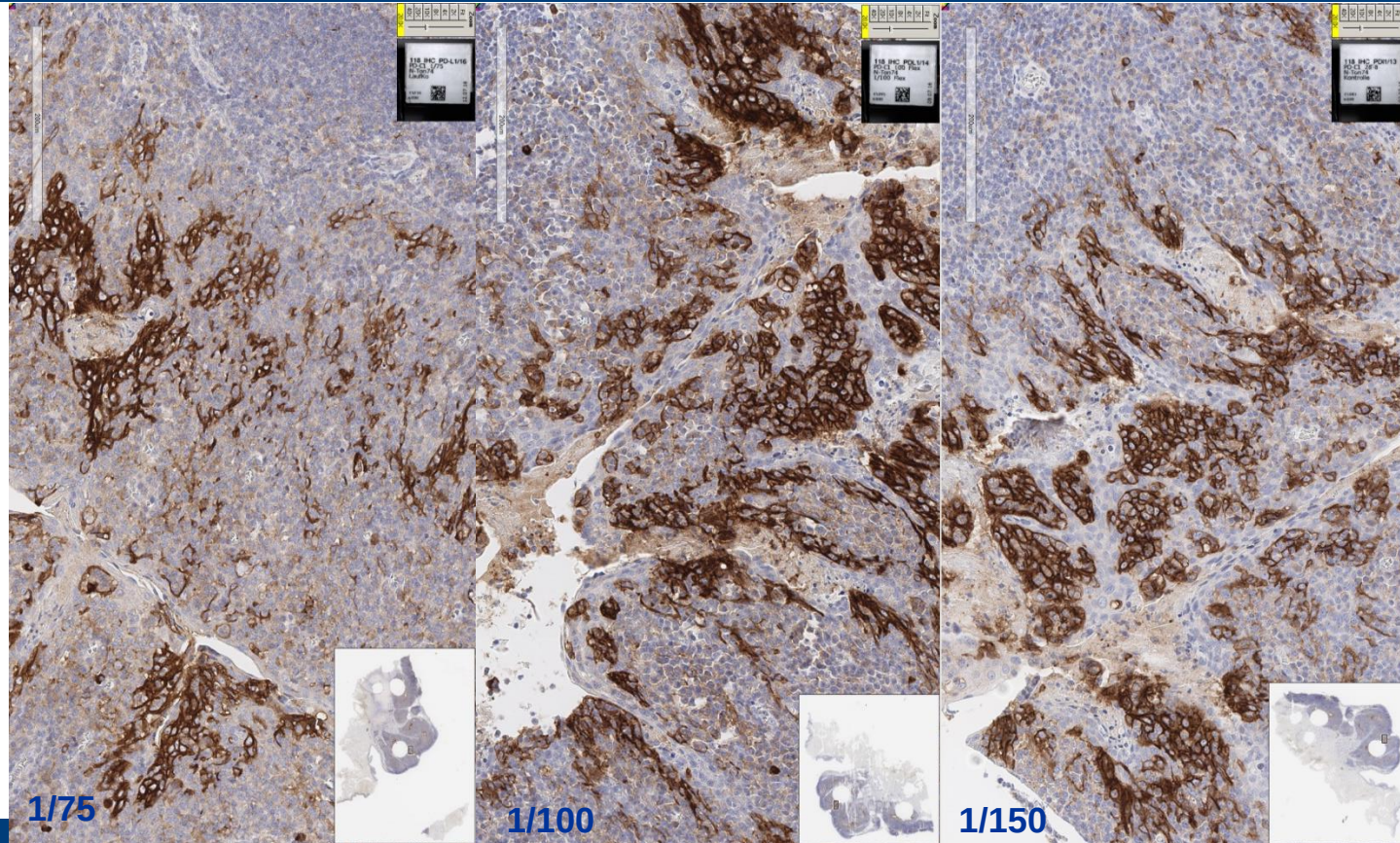


(re) 30 min

Blockierung der unspezifischen Bindungen mit Ziegenserum

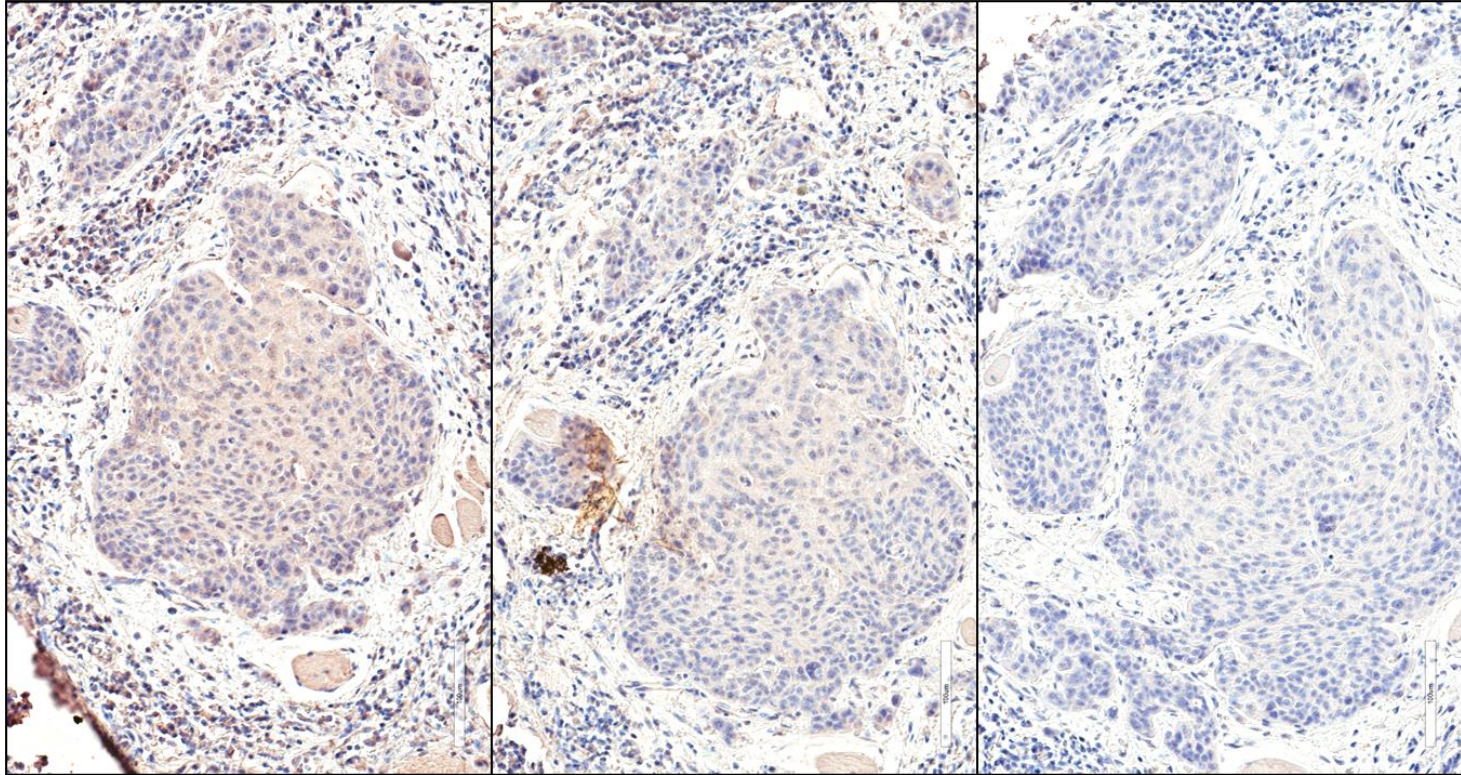


Protokoll Dako Austostainer Link48
N-Ton 74 Laufkontrolle
20x magnification



Etablierung Primärantikörper Verdünnungsmedium

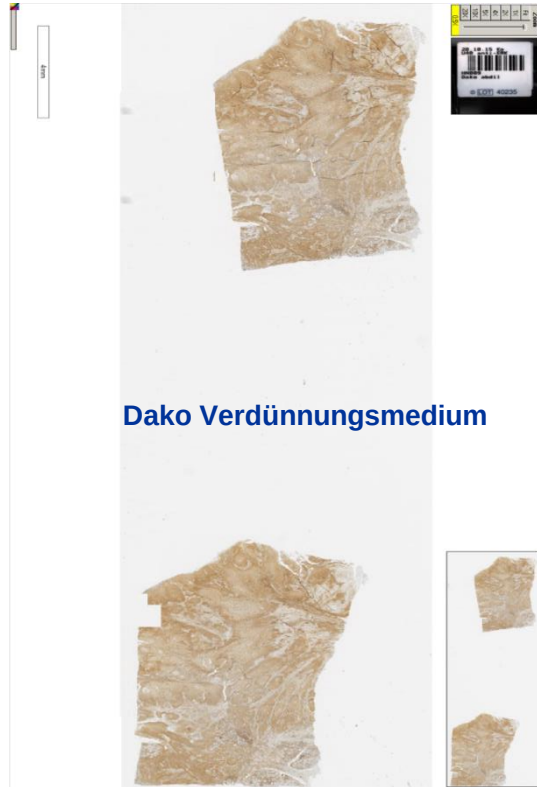
20x magnification



(links) Verdünnung 1:25, (Mitte) 1:50, (rechts) 1:100 in Antikörperverdünnungsmedium Dako

Etablierung Primärantikörper Verdünnungsmedium

0,4 magnification



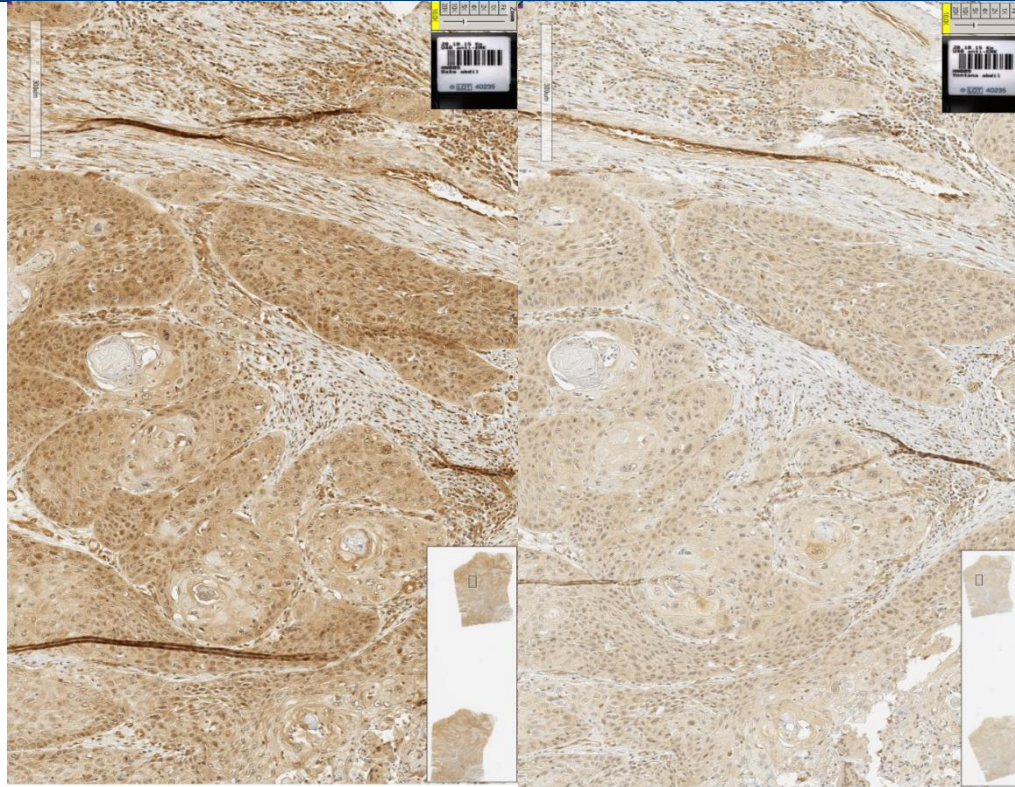
Dako Verdünnungsmedium



Ventana Verdünnungsmedium

Primärantikörper Verdünnungsmedium

10x magnification



Dako Verdünnungsmedium

Ventana Verdünnungsmedium



22C3

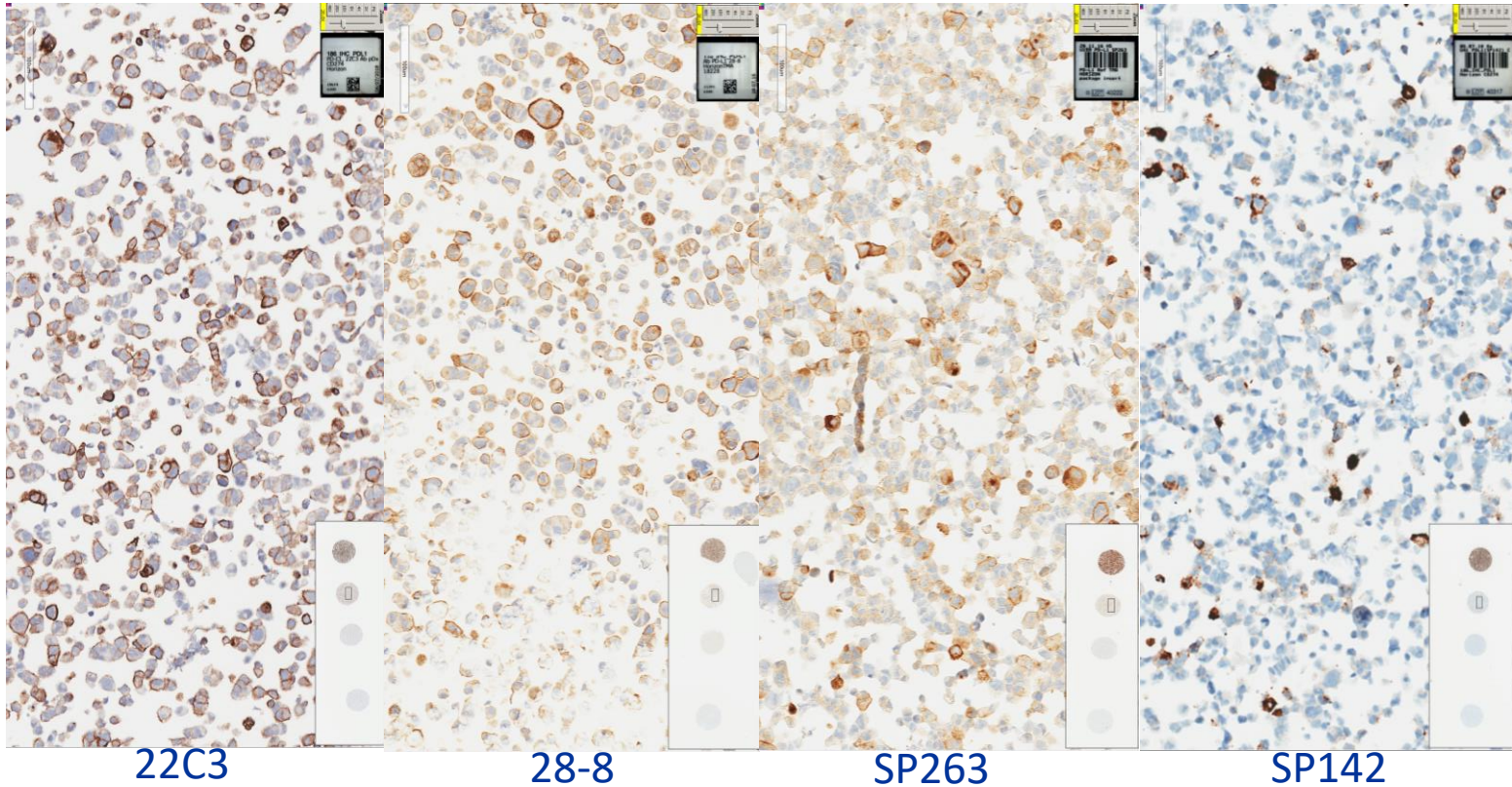
28-8

SP263

SP142

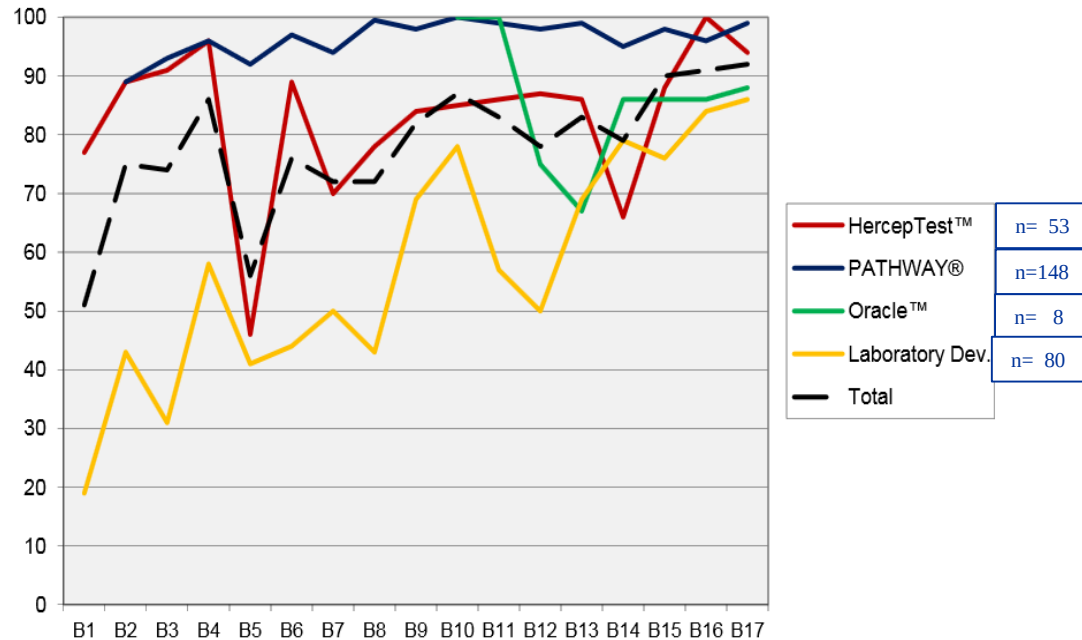
Etablierung Primärantikörper-Klon

20x magnification





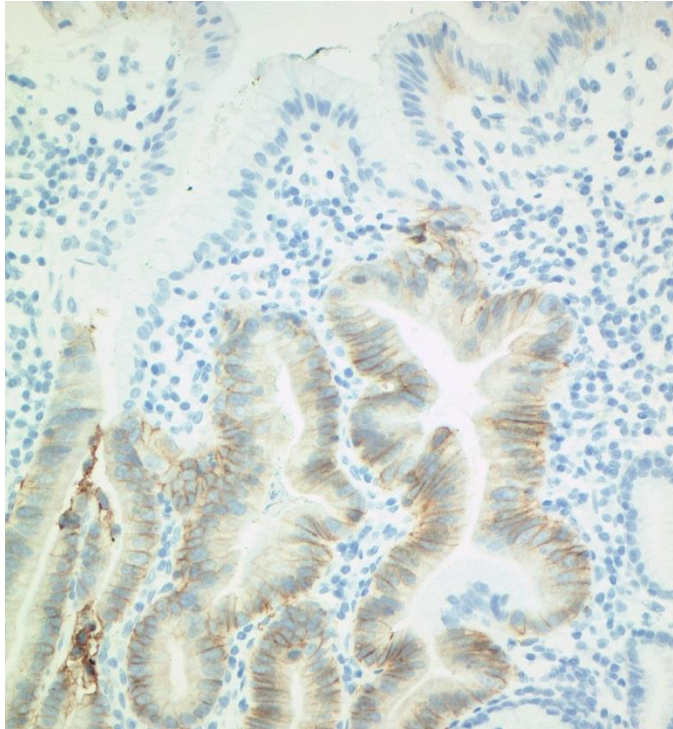
Nordic immunohistochemical Quality Control



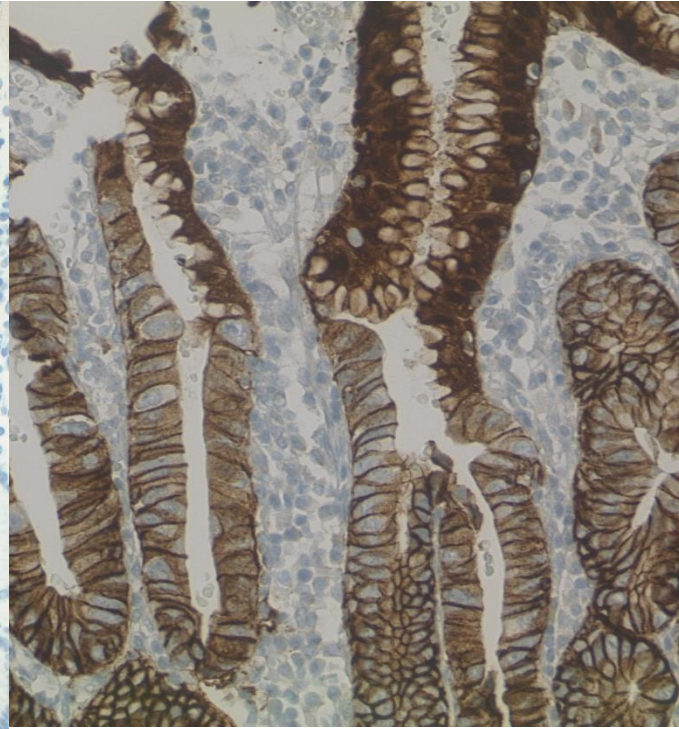
Etablierung Primärantikörper-Klon

20x magnification

Hercep Test



Ventana 4B5



Protokolle

Protokollberichte drucken

Protokollnutzung drucken

Übersicht: Protokolle

Protokolle verwalten

Protokolle erstellen / bearbeiten

Prozedur

ULTRA VENTANA PD-L1(SP263) Assay

☐ Filter verwenden

Filter bearbeiten

Protokoll-Schnellsuche

Suchen

Nummer	Name
112	PD-L1 SP263 IVD CE
113	PD-L1 neg. SP263 IVD CE

Protokollschritte für 112 PD-L1 SP263 IVD CE

☐ Nur registrierte Produkte auflisten

Suchen

Zoom

9

Speichern

Speicher...

Lösc...

Backen

Primär Antikörper

Negativkontrolle

Wenn kein Antikörper ausgewählt ist, ist die Standardeinstellung V-PDL1 (SP263) C für 16 Minuten.

Hämatoxylin II

1 Tropfen HEMATOXYLIN II auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.

Zusammenfassung		
Prozedur: ULTRA VENTANA PD-L1(SP263) Assay (v1.00.0001)		
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module		
TARGOS molecular pathology GmbH, Germaniastrasse 7 Kassel 34115		
Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
112	PD-L1 SP263 IVD CE	01.11.2016
1 Primär Antikörper [Ausgewählt] 2 Hämatoxylin II [Ausgewählt] 3 1 Tropfen HEMATOXYLIN II auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.		

Protokolle

Protokollberichte drucken

Protokollnutzung drucken

Übersicht: Protokolle

Protokolle verwalten

Protokolle erstellen / bearbeiten

Prozedur

ULTRA MSLN (SP74) Dx Assay

☐ Filter verwenden

Filter bearbeiten

Protokoll-Schnellsuche

Suchen

Nummer **Name**

102	MSLN (SP74) Dx
103	neg-MSLN (SP74) Dx
104	MSLN (SP74) Dx_8min_counter

Protokollschritte für 102 MSLN (SP74) Dx

☐ Nur Registrierte Produkte Auflisten Suchen

Zoom **Speichern** **Speicher...** **Lösch...**

- ☒ **Backen**
 - ✓ Erwärme Objektträger auf **60 °C** und inkubiere für [**32 Minuten**] (**Backen**)
 - [**Erhitzungsbedingungen – 60 °C**]
- ☒ **MSLN (SP74) Dx - 8 Minuten**
 - ✓ 1 Tropfen **HEMATOXYLIN II** auftragen, Coverslip auftragen, und für [**4 Minuten**] inkubiere
 - [**Empfohlene Einstellung für Hämatoxylin II: 4 Minuten**]
 - ✓ 1 Tropfen **BLUING REAGENT** auftragen, Coverslip auftragen, und für [**4 Minuten**] inkubiere
 - [**Empfohlene Einstellung für Bluing Reagent: 4 Minuten**]

Zusammenfassung

Prozedur: ULTRA MSLN (SP74) Dx Assay (v1.00.0186)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

TARGOS molecular pathology GmbH, Germaniastrasse 7 Kassel 34119

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
102	MSLN (SP74) Dx	27.03.2018

- 1 Backen [Ausgewählt]
- 2 Erwärme Objektträger auf 60 °C und inkubiere für [32 Minuten] (Backen)
- 3 MSLN (SP74) Dx - 8 Minuten [Ausgewählt]
- 4 1 Tropfen HEMATOXYLIN II auftragen, Coverslip auftragen, und für [4 Minuten] inkubieren.
- 5 1 Tropfen BLUING REAGENT auftragen, Coverslip auftragen, und für [4 Minuten] inkubieren.

Report

PD-L1 IHC 28-8 (PD-L1 IHC 28-8 pharmDx)

OT Protokoll 1  PD-L1 IHC 28-8 Präparat FFPE Entparaffinierung ☒ Demaskierung PD-L1 IHC 28-8 TRS

	Code-Nr.	Reagenz	Volumen	Inkubation
1		Buffer		0
2	SK005	PD-L1 28-8 Block	150	5
3		Buffer		0
4	SK005	Ab PD-L1 28-8	150	30
5		Buffer		0
6	SK005	PD-L1 28-8 Linker	150	30
7		Buffer		0
8	SK005	PD-L1 28-8 Visualization	150	30
9		Buffer		0
10		Buffer		5
11	SK005	PD-L1 28-8 DAB+ Sub-Chromo	150	5
12	SK005	PD-L1 28-8 DAB+ Sub-Chromo	150	5
13		Buffer		0
14	SK005	PD-L1 28-8 DAB Enhancer	150	5
15		Buffer		0
16	SM806	FLEX Hematoxylin	150	7
17		DI Water		0
18		Buffer		5
19		DI Water		0

- Beurteilung der Färbung durch den Pathologen/Laborleiter
 - Plausibilitätsprüfung (zytoplasmatisch, membranös, nukleär)
- Evtl. Verbesserungen vornehmen
 - dabei Varianten nacheinander testen
 - nur 1 Parameter ändern
 - Variationen in einem Lauf an einem Tag (Ak-Verdünnung)
 - „Feinschliff“







Dako Autostainer Link

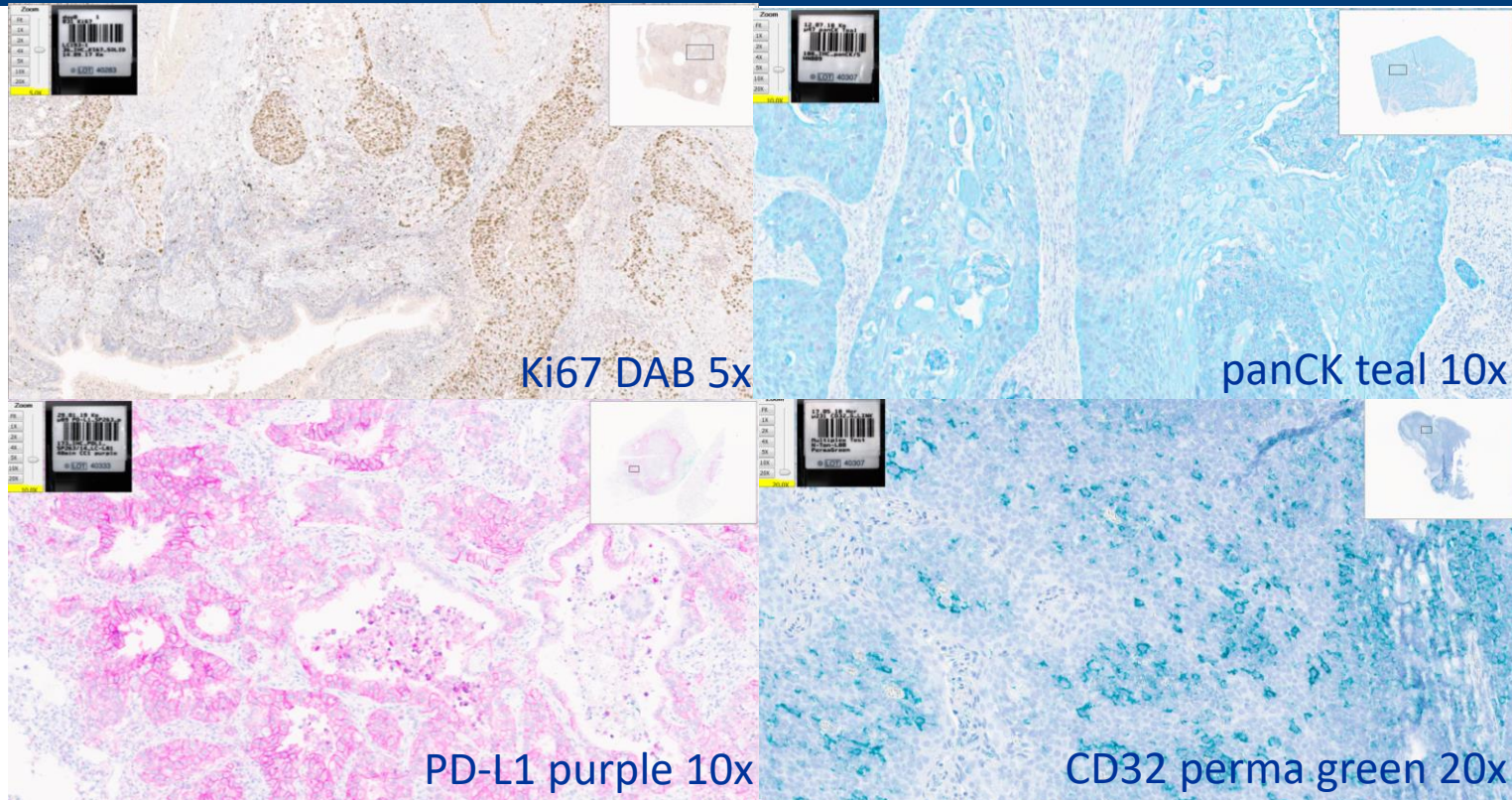
Dako Omnis

Ventana BenchMark ULTRA

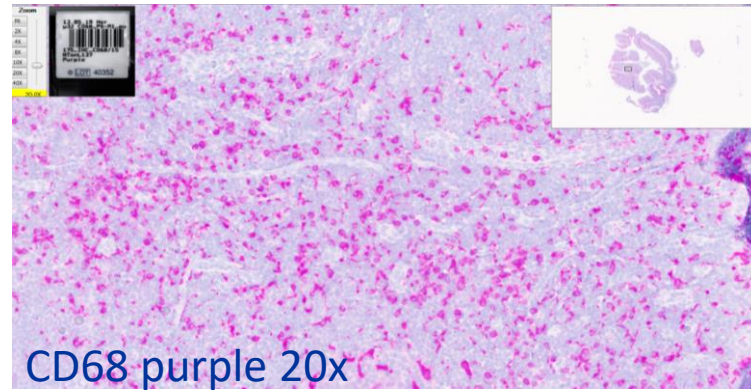
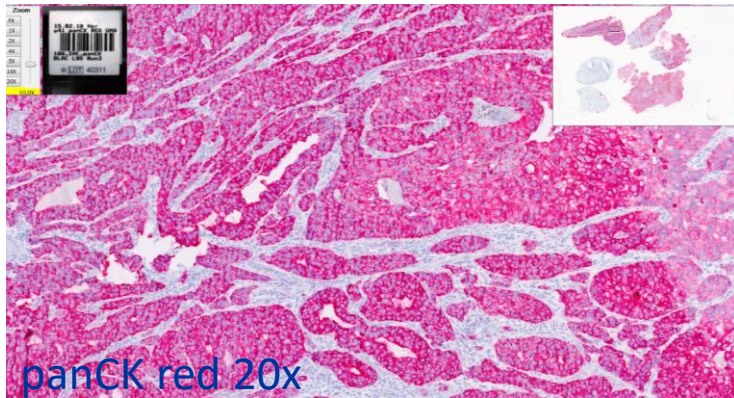
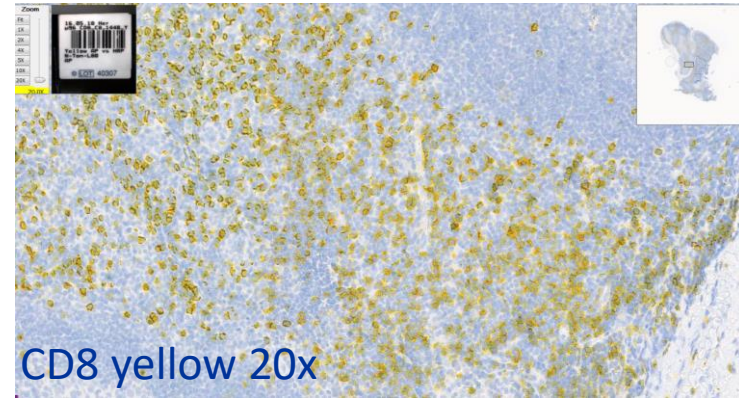
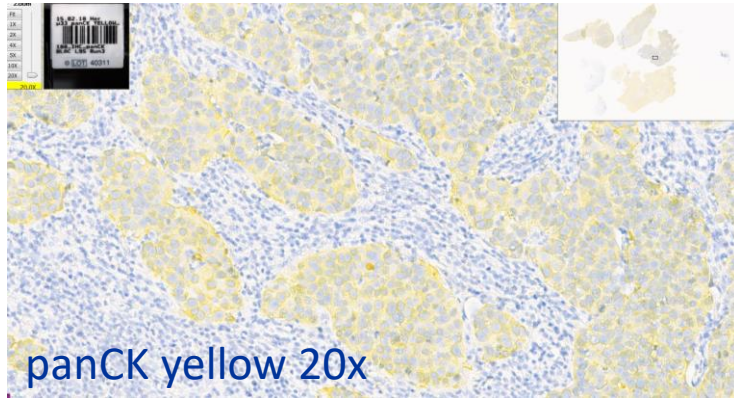
Leica Bond III



Monoplex



Quelle: Targos

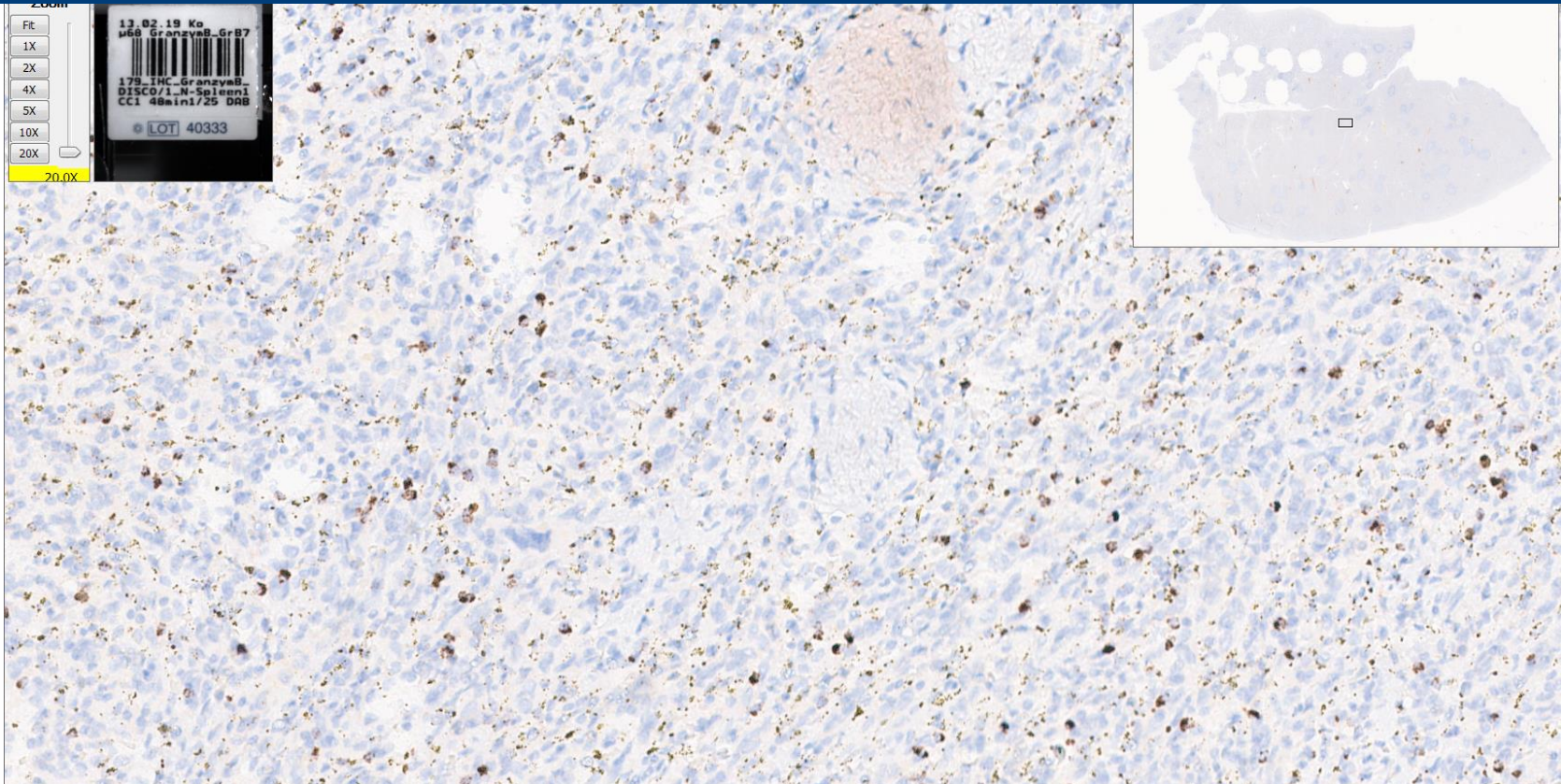


Quelle: Targos

Monoplex normale Milz

Granzym B DAB

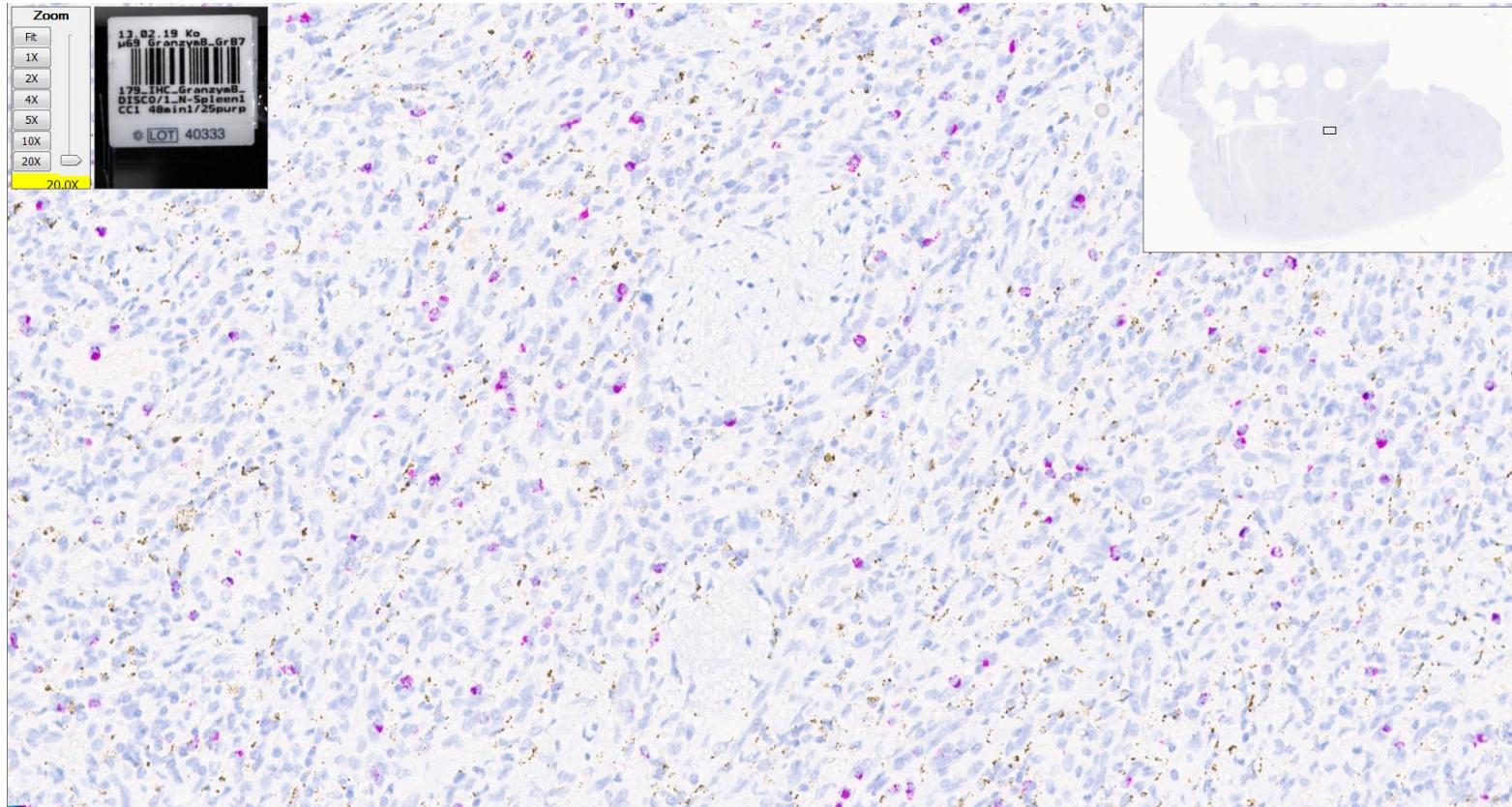
20 x



Monoplex normale Milz

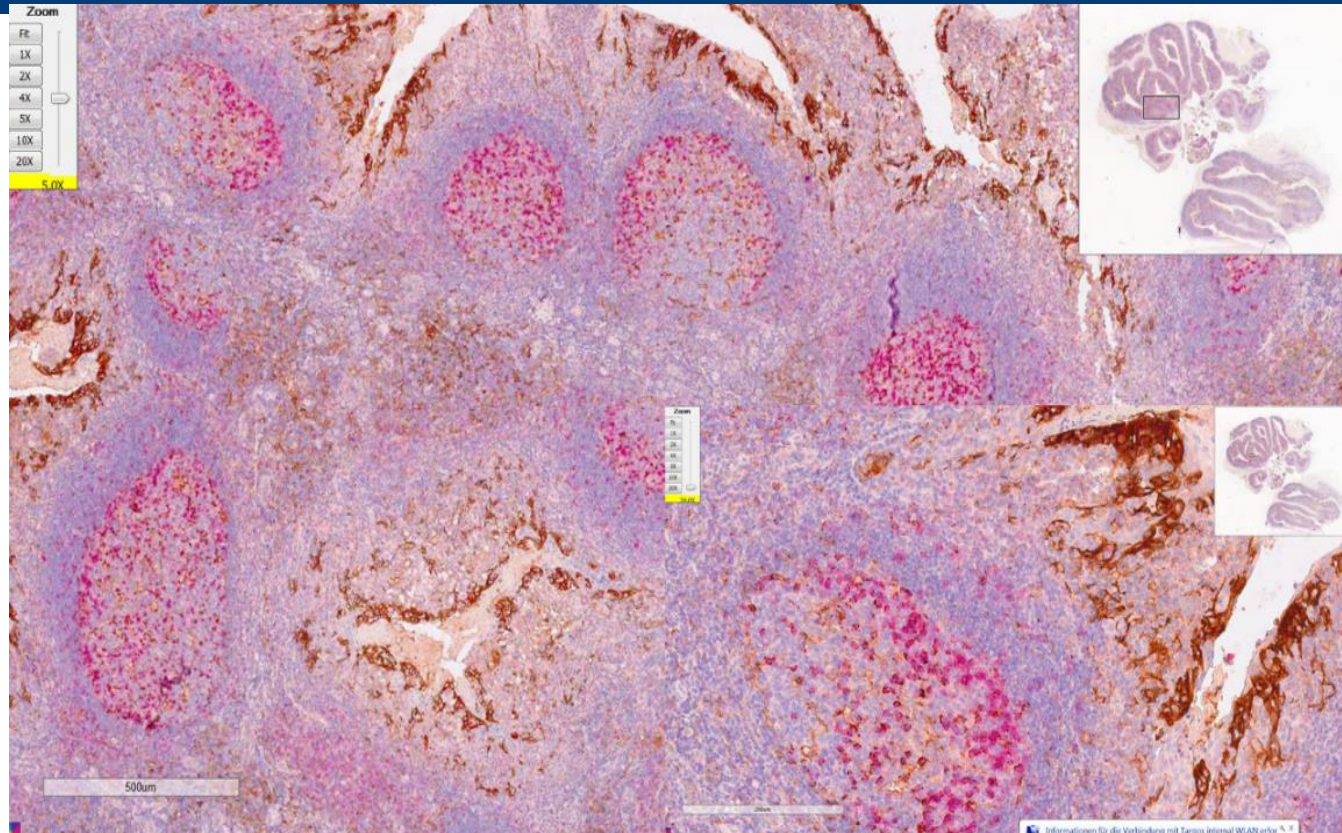
Granzym B purple

20 x

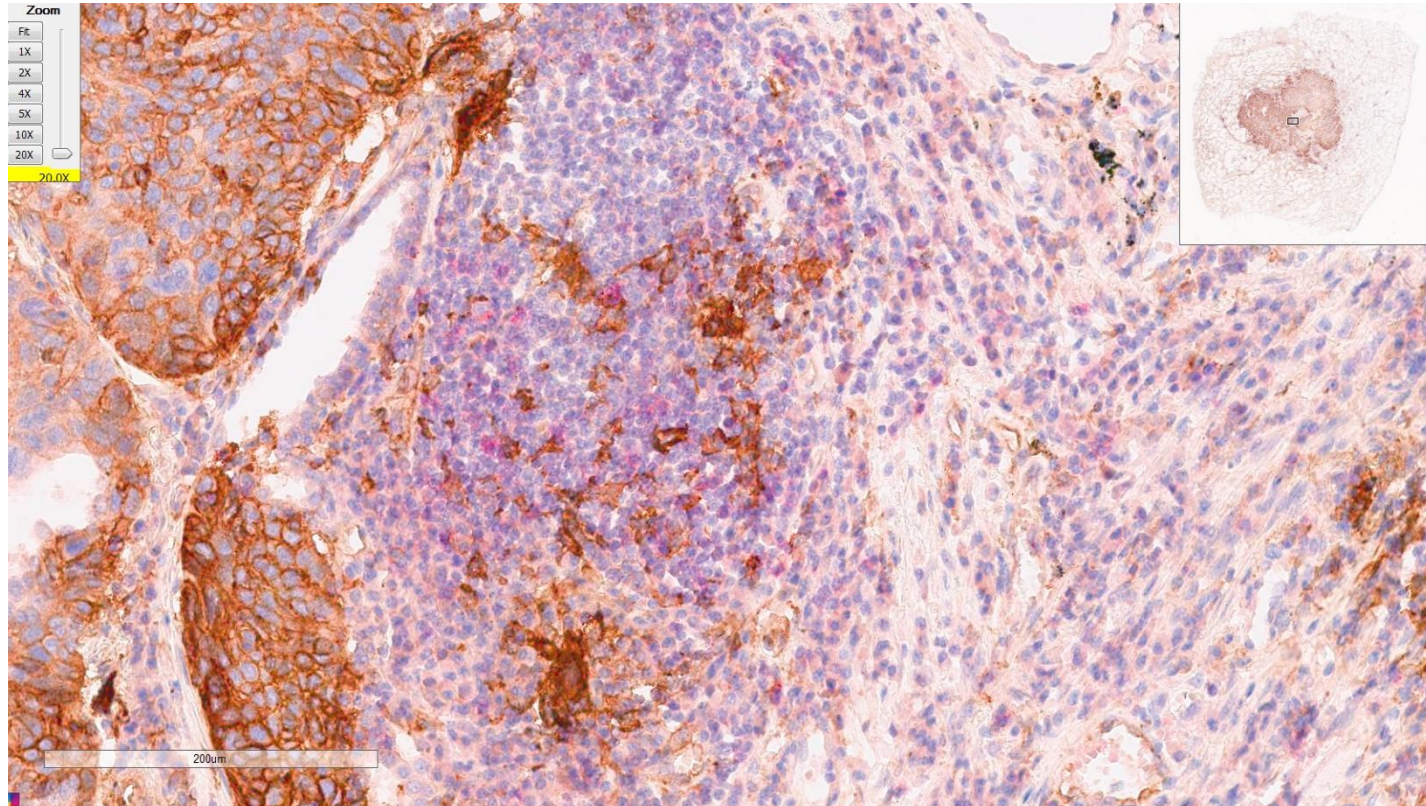


Duplex Färbungen

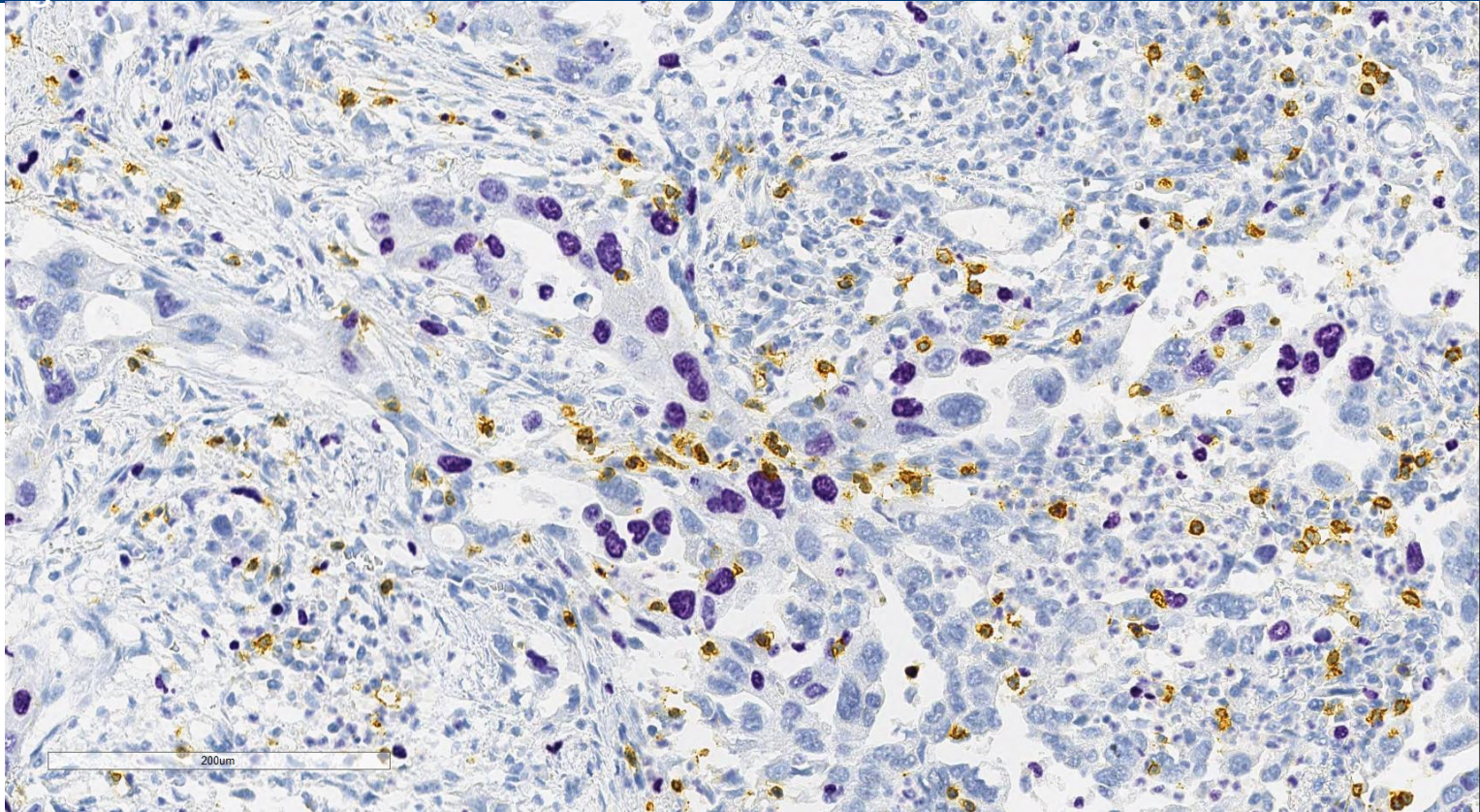
Duplex Färbung PD-L1 (DAB)/PD1(RED) Tonsille 5x magnification



Duplex Färbung PD-L1(DAB)/PD1(RED)
Lungenkarzinom LC-L92
20x magnification



Duplex
ki67 (purple) / CD8 (yellow) Duplex Färbung
20x magnification



Quelle: Targos

Protokolle

- Protokollberichte drucken
- Protokollnutzung drucken
- Übersicht: Protokolle
- Protokolle verwalten
- Protokolle erstellen / bearbeiten

Prozedur
 RUO DISCOVERY Universal
☐ Filter verwenden **Filter bearbeiten**

Protokoll-Schnellsuche
 Suchen **Suchen**

Nummer	Name
341	FL FoxP3_CD8_panCK_CD25 40min
342	PDL1(P)_CD68(Y)_CD3(G)
343	CD3(G)_PDL1(DAB)_CD68(P)
344	CD3(G)_PDL1(P)_CD68(DAB)_ampli

Protokollschritte für 343 CD3(G)_PDL1(DAB)_CD68(P)
☐ Nur Registrierte Produkte Auflisten Suchen **Zoom** 9 **Speichern** **Speicher...** **Lösc...**

- BlueMap
- ☒ **Detektkit Forschung**
 - ☒ **Use RB for 1st Detection**
 - ✓ Hand Apply (**Forschung Nr.1**), and Incubate for [**1 Stunde**]
 - ☐ Use EZ Prep for 1st Detection
 - ☐ Automated Open Detection
- ☒ **Dual Sequence**
 - ☒ **Antikörper Denaturierung**
 - ☐ Antibody Denature CC2-1
 - ☒ **Volume Adjust**
 - ✓ **Erwärme Objektträger auf [95 °C] und inkubiere für [12 Minuten] (Denaturation #2)**
 - ☐ DS Pretreatment
 - ☐ Doppelfärbung Option
 - ☐ Doppelfärbung A/B Block
 - ☐ DS Inhibitor
 - [**DISC Inhibitor will not be applied**]
 - ☐ DS ISH
 - ☒ **Doppelfärbung Antikörper**
 - ☐ DS Antibody Manual Application
 - ☐ Doppelfärbung Antikörper Blockierung
 - ☐ Disable heat for DS Antibody
 - ☐ DS High Temp Ab incubation
 - ✓ Objektträger-Temperatur von [**36 Grad C**] auf **Sehr niedrige Temperaturen** (**Doppelfärbung Primär Antikörper**) erhöhen
 - ☐ Doppelfärbung Erweiterte Ak Inkubation
 - ✓ 1 Tropfen [**V-PDL1 (SP263) C**] (Doppelfärbung Antikörper), und für [**16 Minuten**] inkubieren.
 - ☐ Disable heat for 2nd Fixative
 - ☐ DS Post-Antibody Fixative
 - ☐ DS Antikörper-Amplifikation

Erwärme Objektträger auf [95 °C] und inku...

Temperatur

60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
61 °C	71 °C	81 °C	91 °C
62 °C	72 °C	82 °C	92 °C
63 °C	73 °C	83 °C	93 °C
64 °C	74 °C	84 °C	94 °C
65 °C	75 °C	85 °C	95 °C
66 °C	76 °C	86 °C	
67 °C	77 °C	87 °C	
68 °C	78 °C	88 °C	
69 °C	79 °C	89 °C	

OK **Cancel**

Erwärme Objektträger auf [95 °C] und inku...

Inkubationszeit

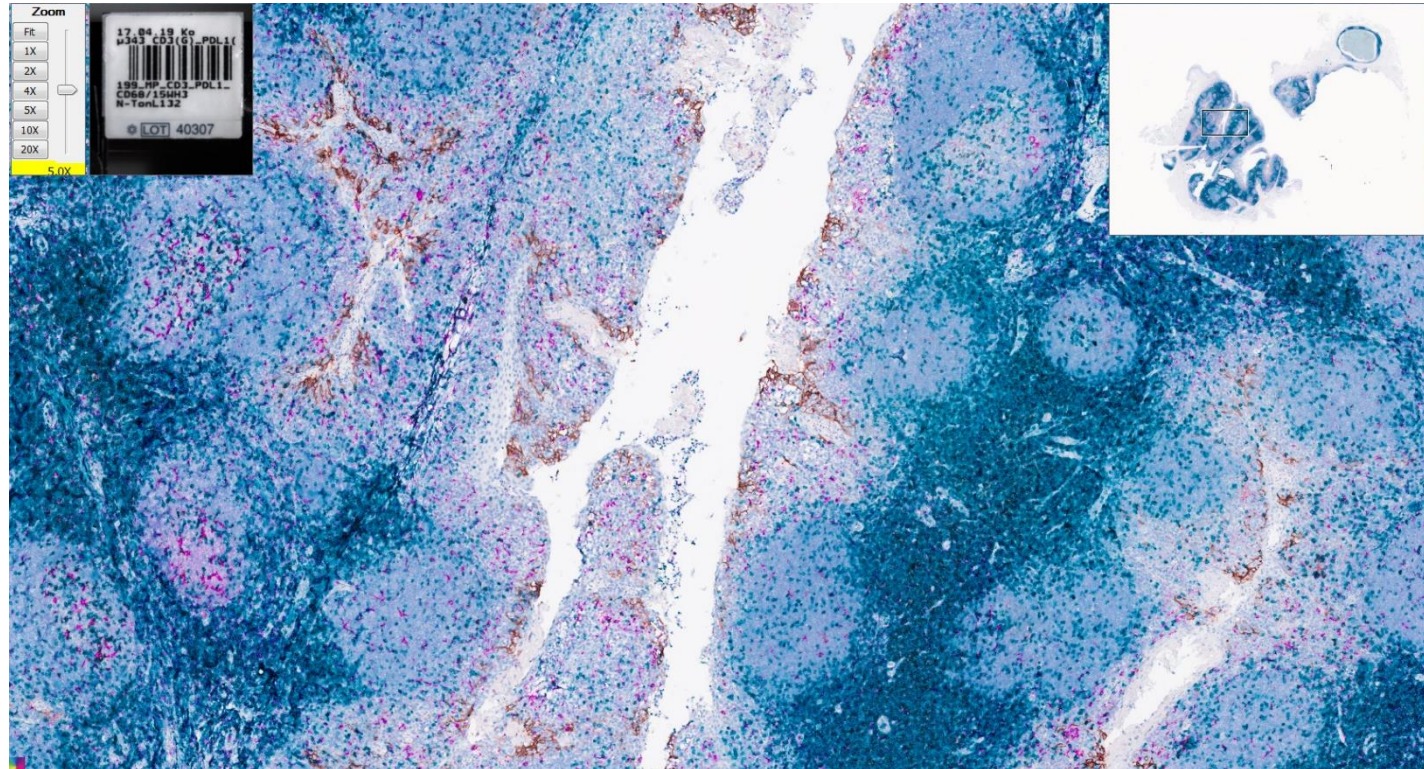
4 Minuten
8 Minuten
12 Minuten
16 Minuten
20 Minuten
24 Minuten
28 Minuten
32 Minuten

OK **Cancel**

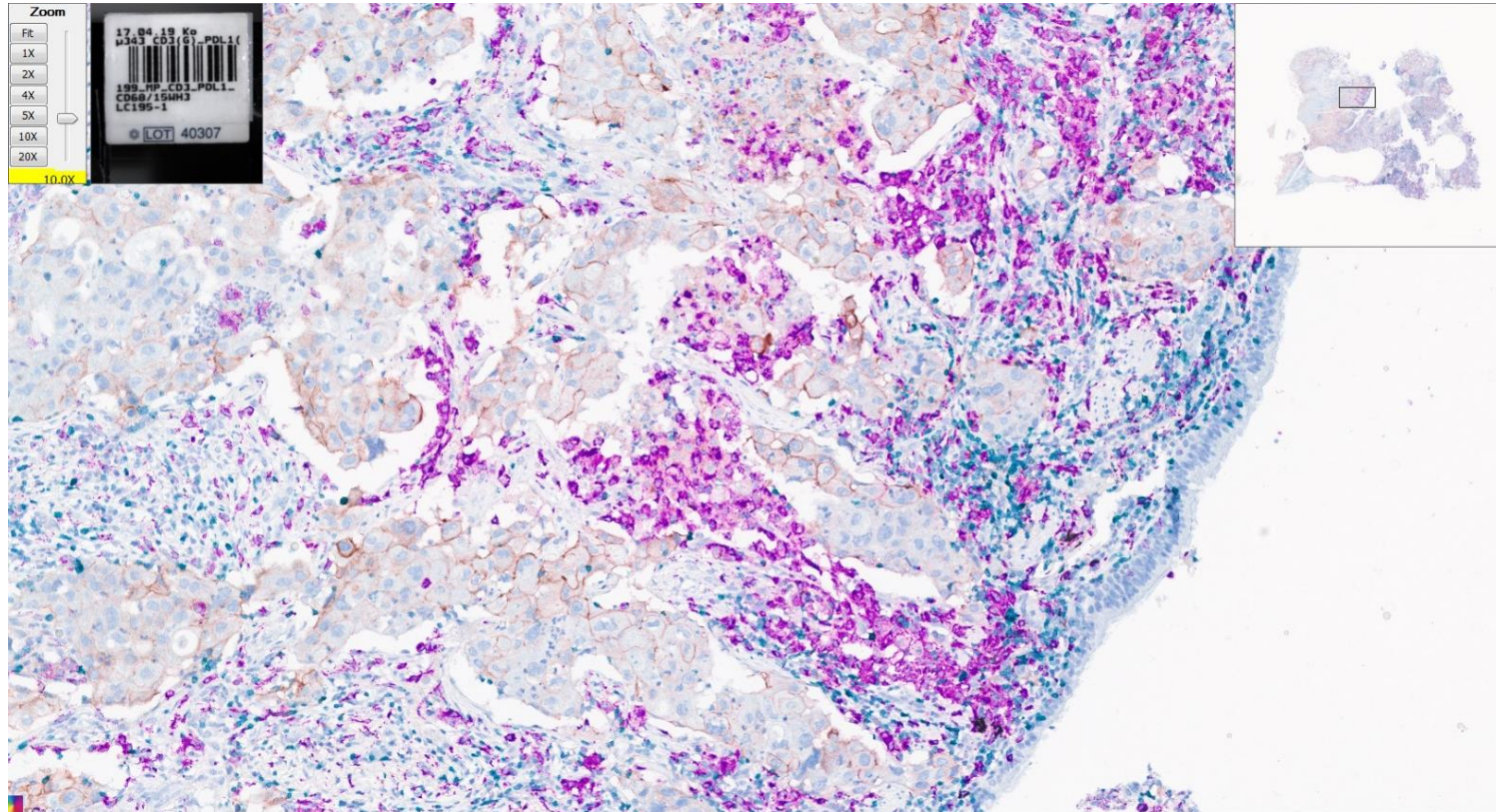
Multiplexing (IHC)



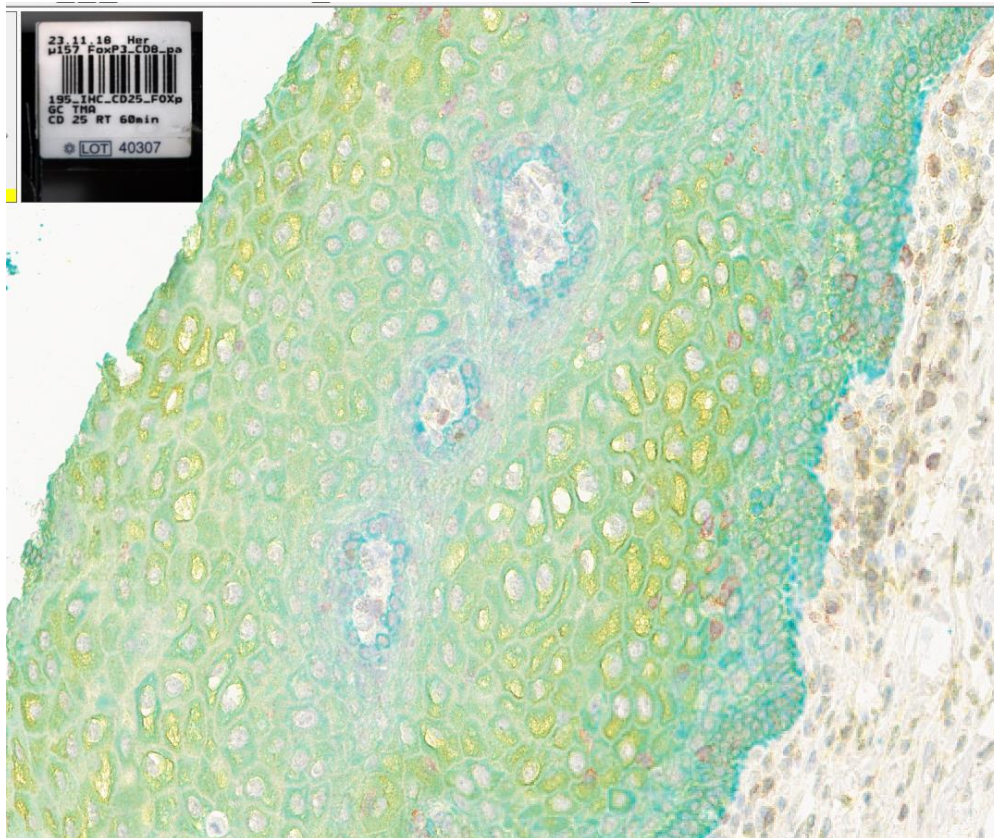
Triplex Färbung CD3/PD-L1/CD68 Tonsille 5x magnification



Triplex Färbung CD3/PD-L1/CD68 Lungenkarzinom 10x magnification



FOXP3(DAB)-CD8(P)-panCK(teal)-CD25(Y)
20x magnification



FOXP3(DAB)-CD8(P)-panCK(teal)-CD25(Y) 20x magnification

