

# LABORATORIO DI IMMUNOISTOCHEMICA

## PROCEDURE OPERATIVE STANDARD

---

Tutto il personale che accede al Laboratorio di Immunoistochimica deve essere informato sui potenziali rischi, istruito sulle procedure operative in modo da operare correttamente e deve attenersi rigorosamente alle procedure descritte.

---

### Chi può accedere

L'accesso ai laboratori è consentito al personale docente, al personale tecnico di laboratorio, ai dottorandi, assegnisti, contrattisti, tesisti e agli studenti. Questi ultimi sono ammessi in laboratorio solo in presenza di un docente.

---

### Prima di entrare in laboratorio

- Indossare camice pulito o casacca/pantalone tipo "green" pulito; il camice o il green non vanno indossati in aree diverse da quella del laboratorio.
- Raccogliere i capelli se lunghi.

---

# In laboratorio

- È vietato mangiare, bere, fumare, manipolare lenti a contatto e applicare cosmetici.
- È proibito pipettare con la bocca - utilizzare solo pipettatrici automatiche.
- Le superfici di lavoro vanno pulite all'inizio e alla fine del lavoro e immediatamente dopo incidenti di versamento di materiale, utilizzando il disinfettante disponibile sul bancone di lavoro.
- Tutto il materiale utilizzato deve essere smaltito nei specifici contenitori dei Rifiuti Speciali, secondo quanto indicato dal personale responsabile del controllo.
- Tutte le operazioni di preparazione degli anticorpi e dei reagenti di incubazione devono essere condotte sotto cappa aspirante.
- È proibito l'uso di pipette di vetro e di vetreria (sono preferibili quelli di plastica monouso), con esclusione dei vetrini per microscopio.
- Prima di manipolare una qualsiasi sostanza o prodotto chimico, leggere sempre attentamente l'etichetta e predisporre le necessarie misure di sicurezza.
- Evitare l'utilizzo di sostanze i cui recipienti non riportano una chiara indicazione del contenuto. I materiali pericolosi sono normalmente contrassegnati da un simbolo (posto sull'etichetta della confezione originale) indicante la natura del pericolo.
- Tutto il personale è responsabile del mantenimento del proprio laboratorio in condizioni di pulizia e di ordine e dello smaltimento sicuro di prodotti chimici, solventi, ecc.
- Tutto il personale è responsabile della sicurezza e dell'assenza di contaminazione delle proprie apparecchiature e delle proprie zone di lavoro.

---

## Procedure standard di colorazione immunohistochimica

Per ogni reazione, fare riferimento al protocollo specifico di ogni anticorpo utilizzato. Di seguito viene riportato brevemente un protocollo standard

- Sparaffinare le sezioni
- Bagno in H<sub>2</sub>O distillata
- Se richiesto dall'anticorpo, procedere allo smascheramento dell'antigene
  - preparare la vaschetta contenente TRIS-EDTA pH9 1:10 e verificare pH (eventualmente aggiustare)
  - preriscaldare la vaschetta al microonde alla max potenza x 2 min

- mettere i vetrini nella vaschetta CALIBRATI (sempre un totali di 10) alla minima potenza
  - togliere i vetrini dal microonde e lasciare raffreddare
- Bagno in H<sub>2</sub>O distillata
- Blocco della perossidasi endogena
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluita 1:10 (25 ml soluzione commerciale in 250 ml H<sub>2</sub>O distillata) x 5 minuti
- Bagno in H<sub>2</sub>O distillata
- Bagno in tampone TBS lavoro 1:10 sull'agitatore x 10 min
  - 25ml TBS 10x in 250 ml H<sub>2</sub>O distillata
- Anticorpo primario (1-2h a RT, camera umida oppure over night a 4°C)
  - Vedere le diluizioni per i rispettivi anticorpi
- Sciacquare i vetrini direttamente nella camera umida
- Bagno in tampone TBS lavoro sull'agitatore per almeno 5 min
- Anticorpo secondario biotinilato universale per 15 min a temperatura ambiente, in camera umida
- Sciacquare i vetrini direttamente nella camera umida
- Bagno in tampone TBS lavoro sull'agitatore per almeno 5 min
- Streptavidina per 15 min
- Sciacquare i vetrini direttamente nella camera umida
- Bagno in tampone TBS lavoro sull'agitatore per almeno 5 min
- Cromogeno (AEC o DAB)
  - Tempo di incubazione: variabile; controllare l'andamento della reazione al microscopio
- Sciacquare i vetrini direttamente nella camera umida con H<sub>2</sub>O
- Bagno in H<sub>2</sub>O distillata per 2 min
- Ematossilina per 1.5 min; tempo di incubazione: variabile; controllare l'andamento della reazione al microscopio
- Differenziare in H<sub>2</sub>O di fonte
- Montare in montante acquoso per AEC o con mounting medium per DAB

---

## Dopo la procedura di colorazione immunohistochimica

- Sciacquare la vetreria utilizzata e porla ad asciugare negli appositi spazi.
- Pulire e ordinare il bancone di lavoro del laboratorio.
- Dopo la rimozione e la eliminazione dei guanti negli appositi contenitori, lavarsi le mani prima di uscire dal laboratorio.