

Original

Valoración del sistema de polímeros de dextrano *EnVision* (PDE) en la detección inmunohistoquímica

J. Pardo Mindán, A. Panizo y L. Martínez

Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona.

SUMMARY

Background: A new immunohistochemical staining technique has been recently developed, based on a high molecular weight polymer conjugated with the secondary antibody and peroxidase. The aim of this report is the study of the sensitivity and use of this technique compared with streptavidin-biotin. Materials and methods: We used three tissue and formalin-fixed tumor blocks; 47 antibodies were studied. A comparison between streptavidin-biotin-peroxidase and the enhanced polymer system (EPOS) was conducted. In each case the intensity of the immunoreaction was evaluated semiquantitatively from 0 to +++, with + being acceptable and +++ excellent. Results: Among the 47 antibodies studied, 51% showed higher immunoreaction intensity when EPOS system was used; in 47% the immunoreaction was similar with both techniques; and only with CD15, the immunoreaction was better when streptavidin-biotin-peroxidase was used. These results were obtained with a double dilution of the primary antibody in an overnight incubation. Conclusions: This new polymer-based immunodetection method provides an easy, fast and sensitive tool for immunohistochemistry. Rev Esp Patol 1998; 31(1): 9-16.

Key words: Immunohistochemistry - *EnVision* - Streptavidin-biotin-peroxidase - Polymer

RESUMEN

Planteamiento: La técnica PDE de inmunohistoquímica desarrollada recientemente se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular conjugado con el anticuerpo secundario y la peroxidasa. El motivo de este estudio es la comparación de la sensibilidad y facilidad de uso con la técnica habitual de estreptavidina-biotina. Material y métodos: Hemos utilizado para el estudio tres bloques de distintos tejidos y tumores y 47 anticuerpos diferentes. De cada bloque o "salchicha multitejido" se realizó la técnica de inmunohistoquímica con el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa y con el nuevo sistema EPOS. Cada muestra se valoró semicuantitativamente de 0 a +++, según la intensidad, considerando como aceptablemente buena (+) y excelente (+++). Resultados: De los 47 anticuerpos estudiados, 24 (51%) se tiñeron más intensamente con la técnica EPOS, en 22 (47%) la tinción fue similar con ambas técnicas y con el anticuerpo anti-CD15 la inmunotinción fue más intensa con la técnica de estreptavidina-biotina. La mejoría de la técnica en más de la mitad de los anticuerpos se ha logrado utilizando al menos el doble de dilución con todos los anticuerpos. Conclusiones: Este nuevo sistema de inmunodetección basado en polímeros aporta una sustancial mejora en la técnica inmunohistoquímica en relación con la facilidad y rapidez de las diluciones empleadas. Rev Esp Patol 1998; 31(1): 9-16.

Palabras clave: Inmunohistoquímica - Estreptavidina-biotina-peroxidasa - *EnVision* - Polímero

INTRODUCCIÓN

Desde los primeros sistemas de detección de antígenos en inmunohistoquímica basados en el sistema peroxidasa-antiperoxidasa se han ido introduciendo nuevos métodos que han aumentado la sensibilidad, que se ha convertido, como predijeron muchos patólogos, en la técnica auxiliar más importante a la hematoxilina-eosina. Hasta ahora el método de avidina-biotina (1, 2) ha sido el más utilizado, pero no está exento de algunos inconvenientes como son la aparición de falsos positivos por la biotina endógena, principalmente en tejidos no fijados con formol. La recuperación antigénica con calor, por cualquier medio, aumenta los falsos positivos en relación con su eficacia, incluso en muestras fijadas con formol.

Recientemente se ha introducido un nuevo sistema de detección (3) basado en la utilización de un polímero de alto peso molecular, el dextrano, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de enzima (por ejemplo HRP, hasta 100 moléculas por cadena) y de anticuerpo secundario (hasta 20 moléculas por cadena). *EnVision* (PDE) teóricamente aumenta mucho la sensibilidad del método, permite realizar la tinción en un paso menos que las técnicas tradicionales de avidina-biotina y confiere una gran rapidez y simplicidad al método.

Con el fin de valorar esta técnica, hemos realizado un estudio comparativo del PDE con el sistema más tradicional de avidina-biotina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tejidos estudiados

Hemos utilizado para el estudio tres bloques de diferentes tejidos y tumores, montados siguiendo el método de la "salchicha" de Battifora (4). Todos los anticuerpos estudiados fueron positivos en al menos dos muestras incluidas en uno o varios bloques (todas las muestras procedían del Servicio de Anatomía Patológica de la Clínica Universitaria de la Universidad de Navarra).

Antisueros

En total se estudiaron 47 anticuerpos, cuya procedencia y concentración para las técnicas de estreptavidina-biotina y PDE aparecen en la Tabla 1.

Técnica de estreptavidina-biotina

De cada bloque o "salchicha multitejido" se realizaron cortes de 4 μ de grosor y se practicó la técnica de inmunohistoquímica con el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa. La peroxidasa endógena se bloqueó mediante peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos y posterior lavado en TBS durante 5 minutos. Realizamos recuperación antigénica mediante calor con horno microondas (20 minutos a 750 W). En algunos casos, también se añadió previamente recuperación antigénica mediante tratamiento enzimático (tripsina al 0,1% durante 10 minutos). La incubación con los anticuerpos primarios a las diluciones indicadas en la Tabla 1 se realizó de forma automatizada. Como método de detección de la inmunorreacción empleamos un anticuerpo secundario biotinado y posteriormente el complejo estreptavidina-peroxidasa. Por último, revelamos la reacción con diaminobenzidina y contrastamos con hematoxilina de Harris o con verde-metilo, según el patrón de inmunorreactividad de cada anticuerpo.

Técnica PDE

Los primeros pasos de la técnica (bloqueo de la peroxidasa endógena y recuperación antigénica mediante microondas) son idénticos a los realizados en la técnica de estreptavidina-peroxidasa. El tiempo de incubación del anticuerpo primario es variable (si realizamos incubación durante toda la noche diluimos el anticuerpo al doble de lo normal). La incubación con los anticuerpos primarios a las diluciones indicadas en la Tabla 1 se realizó de forma automatizada mediante el sistema DOSS (Dako). Si empleamos una incubación corta de 2 horas utilizamos las mismas diluciones que en la técnica de estreptavidina-peroxidasa. Posteriormente se añade la solución de PDE y se incuba a temperatura ambiente durante media hora. Por último, tras lavar las preparaciones se añade la diaminobenzidina-plus y se contrasta la preparación mediante hematoxilina de Harris o verde-metilo.

Controles

Todos los procedimientos incluyeron controles positivos. Además se añadieron controles negativos, que en cada procedimiento fueron uno de los siguientes: suero de conejo no inmune como suero primario, omisión del

Tabla 1. Anticuerpos, origen y diluciones de los diferentes anticuerpos para las técnicas de estreptavidina-biotina y PDE utilizados en este estudio.

Anticuerpo	Dilución avidina-biotina	Procedencia	Dilución PDE
ALC	1/800	Dako	1/1600
Amiloide AA	1/200	Dako	1/500
bcl-2	1/100	Dako	1/200
AE3/AE1	1/200	Dako	1/400
CA125	1/1000	Novocastra	1/2000
Calcitonina	1/400	Biogenex	1/800
CAM 5.2	1/3	Beckton	1/6
CD3	1/3	Zymed	1/6
CD5	1/50	Novocastra	1/100
CD15	1/50	Beckton	1/100
CD20	1/800	Dako	1/1600
CD30	1/120	Dako	1/400
CD34	1/200	Dako	1/500
CD57	1/200	Atom	1/400
c-erbB-2	1/400	Dako	1/800
Ciclina	1/50	Novocastra	1/100
CK34BE12	1/50	Dako	1/100
CK19	1/3	Biogenex	1/6
CK20	1/100	Biogenex	1/200
c-myc	1/500	Novocastra	1/1000
Cromogranina	1/800	Dako	1/1600
Desmina	1/100	Dako	1/200
EMA	1/200	Dako	1/400
Estrógenos	1/200	Dako	1/400
FVIII	1/1000	Dako	1/2000
HMB45	1/100	Dako	1/200
HBsAg	1/500	Dako	1/1000
HBcAg	1/8000	Dako	1/20.000
Inhibina	1/400	Serotec	1/1000
kappa	1/500	Novocastra	1/1000
Ki-67	1/400	Zymed	1/800
Lambda	1/2000	Novocastra	1/4000
LMP-1 (EBV)	1/200	Novocastra	1/400
MB2	1/400	Biogenex	1/800
MSA	1/100	Enzo	1/200
Moc31	1/200	Dako	1/500
O13	1/15	Signet	1/50
Progesterona	1/100	Dako	1/200
Proteína Rb	1/50	Novocastra	1/100
PTH	1/3	Biogenex	1/6
p21 (WAF1)	1/50	Novocastra	1/100
p53	1/800	Dako	1/1600
PSA	1/10.000	Dako	1/20.000
Sinaptofisina	1/3	Labgen	1/6
S-100	1/1000	Dako	1/2000
Tiroglobulina	1/10.000	Dako	1/20.000
Vimentina	1/1000	Dako	1/2000

anticuerpo primario, o antisuero unido a biotina o PDE inadecuados.

Estudio de las preparaciones

El estudio fue realizado por dos patólogos (J.P. y A.P.). La lectura se realizó en un microscopio bicabezal, por el sistema ciego (es decir, que al valorar las muestras desconocíamos la técnica seguida para su realización). Cada muestra se valoró semicuantitativamente de 0 a +++, según la intensidad, considerando como aceptablemente buena (+) y excelente (+++).

RESULTADOS

De los 47 anticuerpos estudiados, 24 (51%) se tiñeron más intensamente con la técnica PDE (Tabla 2 y Figs. 1-3), en 22 (47%) la tinción fue similar con ambas técnicas (Tabla 3 y Fig. 4), y con el anticuerpo CD15 la inmuno-

tinción fue más intensa con la técnica de estreptavidina-biotina (Tabla 4 y Fig. 5).

Prácticamente en todos los casos desapareció el fondo, lo que facilitó en gran manera la interpretación de los resultados.

La mejoría de la técnica en más de la mitad de los anticuerpos se ha logrado utilizando al menos el doble de dilución con todos los anticuerpos, en un protocolo de incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche.

También hemos logrado estos resultados al variar el protocolo de incubación del anticuerpo primario y emplear solamente 2 horas de incubación. En este caso, realizamos las mismas diluciones que con el método de estreptavidina-biotina. La ventaja de este protocolo es el significativo ahorro de tiempo que se logra, ya que en aproximadamente 5 horas se pueden tener las preparaciones según los métodos establecidos en nuestro laboratorio.

DISCUSIÓN

Los métodos inmunohistoquímicos son adecuados para el diagnóstico anatomopatológico y para la investigación. Desde su introducción de la PAP (5) la técnica ha ido mejorando continuamente: el método de la PAP fue muy utilizado por tener una gran sensibilidad y facilidad de acceso a los reactivos (6). La introducción de la tripsinización, al tratamiento con detergente y la osmicación sirvieron para intensificar la tinción; sin embargo, los resultados no fueron totalmente satisfactorios (7). La técnica de la avidina-biotina y su variante estreptavidina-biotina aumentó la sensibilidad de la PAP debido a que permitía la formación de grandes complejos que contenían numerosas moléculas de peroxidasa (7).

La técnica PDE se basa en el aumento de la señal en estudios inmunoenzimáticos con el uso de conjugados poliméricos (3). Esta técnica puede utilizarse en material fresco intraoperatorio y rápidamente obtener resultados (menos de 10 minutos), con anticuerpos como ALC, citoqueratina (8), PCNA y ki-67 (9).

La técnica PDE es especialmente útil para realizar dobles tinciones (10), ya que amplifica significativamente la señal o inmunorreactividad de los anticuerpos

Tabla 2. Anticuerpos con que mejoró la inmunotinción con el método PDE sobre avidina-biotina.

Anticuerpo	Método avidina-biotina	Método PDE
ALC	++	+++
bcl-2	++	+++
c-erbB-2	+	++
CD5	++	+++
CD20	++	+++
c-myc	+	+++
Cromogranina	++	+++
Ki-67	++	+++
MSA	++	+++
Moc31	++	+++
Progesterona	++	+++
Proteína Rb	++	+++
MB2	++	+++
LMP-1 (EBV)	++	+++
Amiloide AA	++	+++
CA125	++	+++
p21 (WAF1)	+	++
Kappa	+	++
CK20	++	+++
Inhibina	+	++
CK34BE12	++	+++
CK19	++	+++
HBsAg	++	+++
HBcAg	++	+++

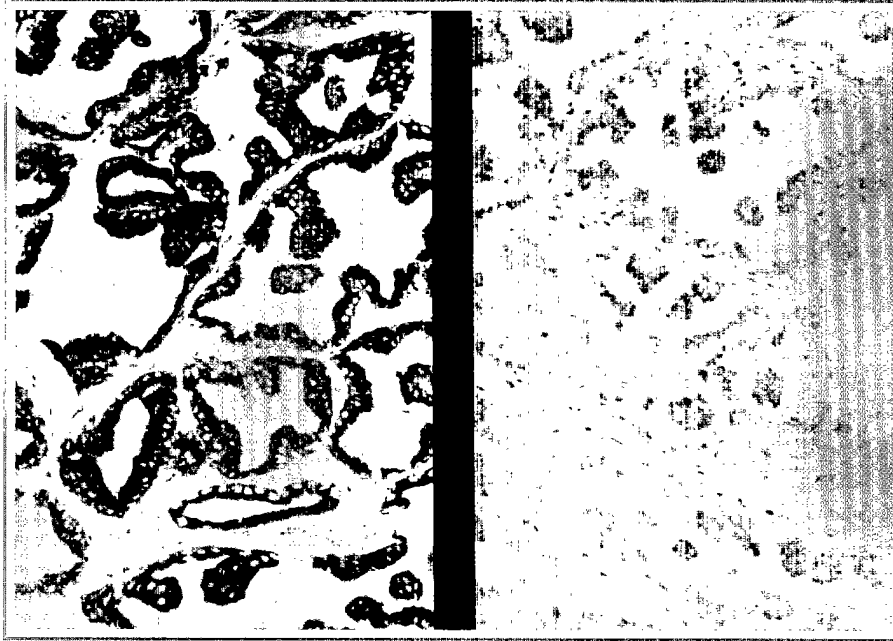


Figura 1. Adenocarcinoma papilar tratado con anticuerpos anti c-myc (izqda.: técnica PDE; dcha.: estreptavidina-biotina).

primarios empleados. Puede optimizarse hasta con cuatro anticuerpos, si bien debe tenerse en cuenta que, dado el gran tamaño y conformación de la molécula empleada, se pueden enmascarar o bloquear epítopos antigénicos.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la técnica PDE es más sensible y produce menos fondo que los métodos de avidina-biotina, incluso a concentraciones subóptimas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (11). Las ventajas más importantes de

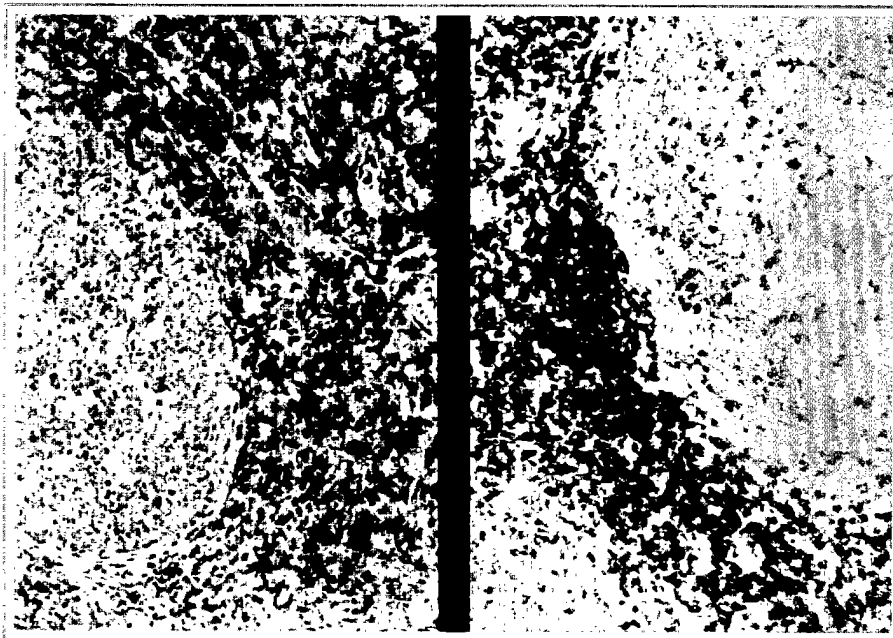


Figura 2. Ganglio linfático tratado con anticuerpo anti-CD5 (izqda.: técnica PDE; dcha.: estreptavidina-biotina).

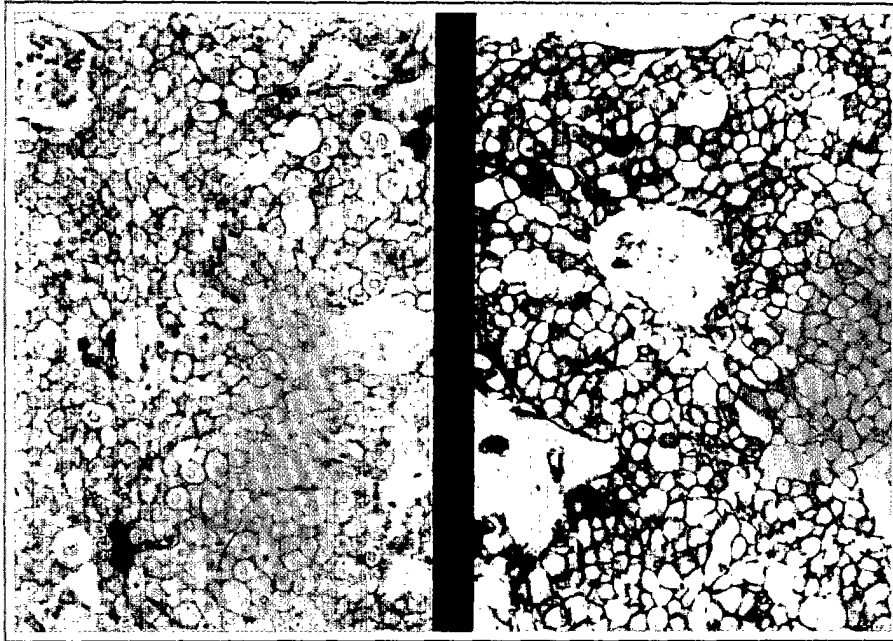


Figura 3. Carcinoma de mama positivo para anticuerpos anti-c-erb-2. Nótese la nitidez de la membrana citoplasmática (izqda.: técnica PDE; dcha.: estreptavidina-biotina).

esta técnica fueron la desaparición de falsos positivos por la biotina endógena (que permite la utilización casi sin límite de los métodos de recuperación antigénica), la disminución del tiempo y complejidad y su menor coste.

En algunos casos nosotros hemos utilizado diluciones del anticuerpo primario de más del doble, sin que en la mayoría de ellas hayamos llegado a la concentración ideal, lo que obviamente representa un ahorro. Es nece-

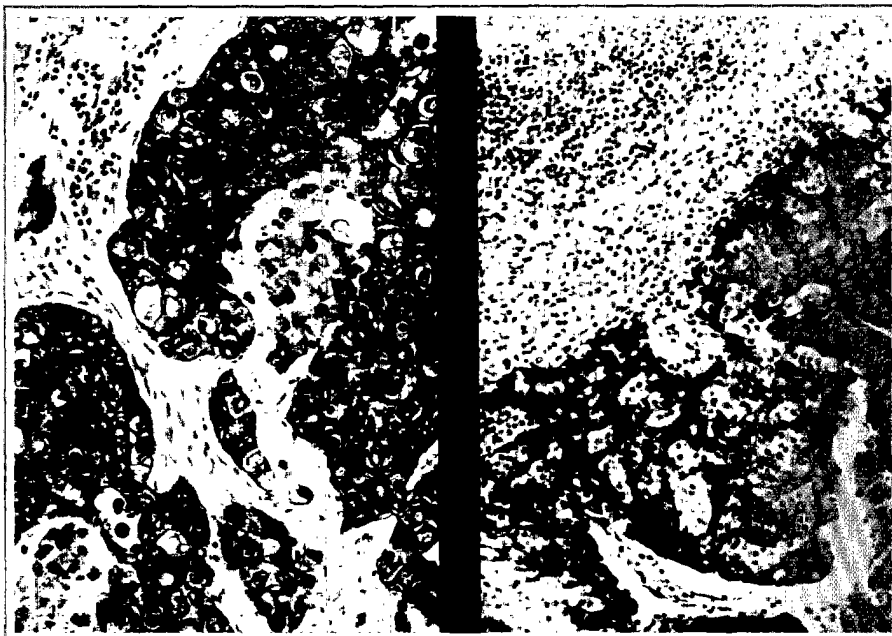


Figura 4. Carcinoma positivo para citoqueratina AE3-AE1. Nótese la intensidad de la tinción con ambas técnicas (izqda.: técnica PDE; dcha.: estreptavidina-biotina).

Tabla 3. Casos en que no hubo diferencias notables entre las técnicas de avidina-biotina y PDE.

Anticuerpo	Método avidina-biotina	Método PDE
AE3/AE1	+++	+++
CAM 5.2	+++	+++
Desmina	+++	+++
p53	+++	+++
PSA	+++	+++
Sinaptofisina	+++	+++
S-100	+++	+++
Vimentina	+++	+++
O13	+++	+++
CD34	++	++
Ciclina	++	++
FVIII	+	+
Lambda	++	++
Calcitonina	+++	+++
CD3	+++	+++
PTH	++	++
CD57	++	++
CD30	+++	+++
Tiroglobulina	+++	+++
EMA	+++	+++
Estrógenos	+++	+++
HMB45	+++	+++

Tabla 4. Anticuerpos con que mejoró la inmunotinción con el método avidina-biotina sobre PDE.

Anticuerpo	Método avidina-biotina	Método PDE
CD15	+++	++

sario realizar un estudio formal económico sobre si el precio de todo el resto de reactivos representa un ahorro real que añadir a las claras ventajas técnicas.

En conclusión, la técnica PDE representa un avance en la calidad de los métodos de inmunohistoquímica, un ahorro de anticuerpos primarios y de tiempo necesario para su realización, e incluso puede llevarse a cabo en biopsias intraoperatorias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.* J Histochem Cytochem 1979; 27: 1131-1139.
2. Hsu S, Raine L, Fanger H. *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.* J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-580.

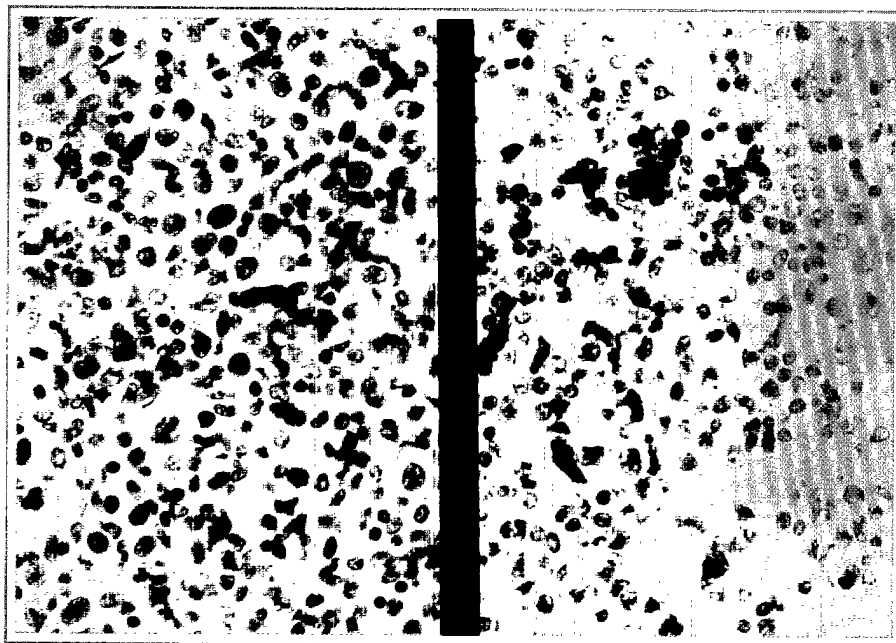


Figura 5. Linfoma no hodgkiniano con células sueltas positivas para CD15. La tinción es ligeramente más nítida con la técnica de estreptavidina-biotina (dcha.) que con PDE (izqda.).

3. Bisgaard K. Polymeric conjugates for enhanced signal generation in enzyme immunoassays. Scand Soc for Immunol. XXIVth Annual Meeting. Aarhus, 1993.
4. Battifora H. *The multitumor (sausage) tissue block: Novel method for immunohistochemical antibody testing*. Lab Invest 1986; 55: 244-248.
5. Sternberg LA. Immunocytochemistry. Prentice-Halls, Iagewood Cliffs, NJ 1978.
6. Heyderman E. *Immunoperoxidase technique in histopathology applications, methods and controls*. J Clin Pathol 1979; 32: 971.
7. Hsu SM, Ree HJ. *Self-sandwich method: An improved immunoperoxidase technique for the detection of small amounts of antigens*. Am J Clin Pathol 1980; 74: 32-40.
8. Chilosi M, Lestani M, Pedron S y cols. *A rapid immunostaining method for frozen sections*. Biotechnic Histochem 1994; 69: 235-239.
9. Tsutsumi Y, Serizawa A, Kawai K. *Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and ki-67 antigen: Application to intra-operative frozen diagnosis*. Pathol International 1995; 45: 108-115.
10. Van der Loos C, Naruko T, Becker AE. *The use of enhanced polymer one-step staining reagents for immunoenzyme double-labeling*. Histochem J 1996; 28: 709-714.
11. Heras A, Roach CM, Key ME. *Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry*. Meeting of the Academy of Pathology, Toronto, March 1995.