

AF:  
ALAA AHMEDFagansvarlig bioanalytiker  
for mikrotomi, Afdeling for  
Patologi, Rigshospitalet

KIRAN ALI MIRZA

Bioanalytiker, Afdeling for  
Allergi, Hud- og Kønssyg-  
domme, Gentofte Hospital

SAMAH ASSI

Bioanalytiker, Afdeling for  
Patologi, Rigshospitalet

BONNIE SVENDSEN

Fagansvarlig bioanalytiker  
for kompleks udskæring,  
Afdeling for Patologi,  
Rigshospitalet

FILIS NECIP

BLS, bioanalytikerunderviser,  
Afdeling for Patologi,  
RigshospitaletCAMILLA CHRISTINE  
QVISTBLS, MpEd, bioanalytikerun-  
derviser, Afdeling for  
Patologi, Rigshospitalet

# Et grønnere afkalkningsmiddel til afkalkning af knoglemetastaser

**F**or at støtte op om den grønne omstilling har Afdeling for Patologi, Rigshospitalet, gennemført det første projekt for at reducere brugen af skadelige reagenser i det histologiske speciale.

I forbindelse med bachelorprojekter i efteråret 2022 greb Afdeling for Patologi, Rigshospitalet, den grønne tankegang og udarbejdede sammen med bioanalytiker Samah Assi og Kiran Ali Mirza bachelorprojektet, der fik titlen "Et grønnere afkalkningsmiddel til afkalkning af knoglemetastaser". Projektet afprøvede et nyt og grønnere afkalkningsmiddel til knoglemetastaser. Reagen-set MOL-DECALCIFIER fra Milestone er i skrivende stund afprøvet, valideret og klar til implementering ultimo sommer 2023.

## Baggrund for projektet

De danske hospitaler skal være grønne fyrtårne, og deres CO<sub>2</sub>-udledning skal reduceres med hele 75 pct. inden 2030, hvoraf de sidste 50 pct. sker gennem en aktiv regional indsats (1).

Som en del af den bredere grønne omstilling har alle regioner desuden fokus på bæredygtighed ved at minimere spild og stille flere grønne krav til indkøb. Også Danske Bioanalytikere arbejder for, at sundhedsvæsnet reducerer sit CO<sub>2</sub>-aftryk med 70 pct. frem mod 2030 (2-4).

Histopatologisk undersøgelse af knoglevæv er ofte en vanskelig opgave på grund af den komplexe struktur af knoglevæv, vanskeligheden ved kompleks udskæring og forskellene i vævsbehandling sammenlignet med andet væv (5,6). Knoglerne er en hyppig lokalisering for metastaser fra divergerende tumortyper. Afkalkning er derfor påkrævet, inden udskæring, videre analysering og diagnostik kan finde sted. Afkalkning kan dog potentielt føre til uhensigtsmæssige udfordringer, idet morfologi, antigenicitet og DNA-kvalitet bliver ændret ved brug af rutinemæssige afkalkningsmidler – myresyre-formalin-blanding (7-10).

Myresyre/formalin er klassificeret som værende giftigt, farligt og ætsende. Grundet sit indhold af

formalin er det desuden klassificeret i henhold til CLP-forordningen som: Acute Tox. 3 (H301, H311, H331), Skin Corr. 1B (H314), Skin Sens 1 (H317), Mut2 (Mistænkt for at forårsage genetiske defekter – H341) og Carc. 1B (Kan fremkalde kræft – H350).

Ifølge Miljø- og Fødevareministeriet skal "Brugen af formaldehyd [...] begrænses, fordi stoffet ved et lavt niveau af eksponeringsdampe medfører øjen- og luftvejsirritation, og langvarig eksponering på højere niveau kan medføre kræft i luftvejene" (11). Afdeling for Patologi har grundet ovenstående et generelt ønske om at reducere brugen af formalin i laboratoriet, og med fokus på grøn omstilling i regionen og på hospitaler er ønsket kun blevet forstærket.

Firmaet Milestone har udviklet et afkalkningsmiddel, MOL-DECALCIFIER, som er EDTA-baseret (der normalvis er en meget langsommelig afkalkningsproces (6)). Firmaet hævder dog, at MOL-DECALCIFIER er lige så hurtigt som myresyre, samtidig med at det optimerer resultaterne i forbindelse med molekylærpatologiske analyser. Endvidere er MOL-DECALCIFIER en del af Milestones kampagne "Histology Goes Green Milestone products for a safer, environmental-friendly histology laboratory" – en kampagne, der fokuserer på et grønnere, mere sikkert og miljøvenligt histologilaboratorium (12). MOL-DECALCIFIER er til forskel fra myresyre/formalin ikke klassificeret som værende farligt iht. CPL-forordning (13).

Afdeling for Patologi, Rigshospitalet, har ud fra et sundhedsmaessigt synspunkt og med fokus på grøn omstilling i laboratoriet valgt at undersøge, hvilken betydning anvendelse af MOL-DECALCIFIER har på bevarelse af vævsmorfologi, histokemiske-/immunhistokemiske analyser og DNA-kvalitet samt det samlede diagnostiske billede i forbindelse med afkalkning af knoglemetastaser sammenlignet med myresyre.

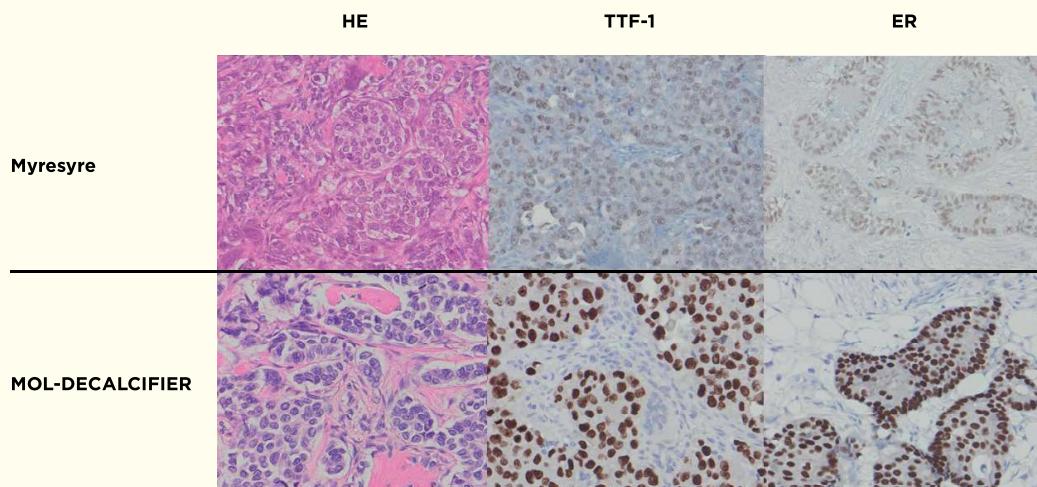
## Metodedesign og resultater

Skiver af knoglevæv fra 10 patienter blev afkalket i hhv. MOL-DECALCIFIER og myresyre i KOS mikrobølgeovn ved temperaturen 37 °C.

# FAGLIG

Figur 1

Billeder af snit fra knoglemetastase afkalket med henholdsvis myresyre og MOL-DECALCIFIER. Snit er farvet med HE og immunhistokemiske markører anti-TTF1 og anti-ER. Alle billeder er 400 x forstørrelse.



Den gennemsnitlige afkalkningstid for knoglevæv i henholdsvis myresyre og MOL-DECALCIFIER blev beregnet. Efterfølgende blev skiverne af knoglevæv udskåret til i alt 28 mindre knoglestykker (24 fra spongiøst knoglevæv/tumorvæv og 4 fra kompakt knoglevæv), vævspræpareret og paraffinindstøbt. Efterfølgende blev der udført mikrotomi og eksemplarisk udvalgte histologiske analyser (HE og ALCVG), immunhistokemiske analyser (PAX8, HER2, TTF1, ER og CK7) og molekylærpatologiske analyser (Specimen Control Size Ladder fra Invivoscribe, Inc.).

Ud af de i alt 28 knoglestykker var 24 optimale i forhold til mikrotomi og videre analyser. Mikroskopisk vurdering af knoglevævet blev foretaget blindet og uafhængigt af 2 bioanalytikere og 2 overlæger med speciale i ortopædisk patologi igennem scoreskema.

Den gennemsnitlige afkalkningstid var 6,6 dage i myresyre og 7,7 dage i MOL-DECALCIFIER.

Resultaterne for vurderingen af knoglevæv afkalket i MOL-DECALCIFIER fik markant bedre score ift. bevarelse af morfologi og HE-farvning sammenlignet med afkalkning i myresyre.

Resultaterne for specialfarvning ALCVG viste ingen forskel i farveresultater mellem de to afkalkningsmidler.

Resultater for immunhistokemiske farvninger viste statistisk signifikant større andel af optimale farveresultater i knoglemetastaser afkalket med MOL-DECALCIFIER sammenlignet med myresyre.

Specimen Control Size Ladder viste, at knoglevæv afkalket med MOL-DECALCIFIER alle indeholdt min. 300 bp., hvilket er minimumsindhold til udførelse af molekylærpatologiske analyser. Knoglevæv afkalket med myresyre blev alle vurderet uegnede til molekylærpatologiske analyser.

## Grønt alternativ og diagnostisk kvalitet

Både fikseringstiden og de anvendte afkalkningsmidler spiller en stor rolle for morfologien i og kvaliteten af de histologiske snit og nøjagtigheden af resultaterne. I vores undersøgelse blev knoglevæv i myresyre afkalket gennemsnitligt 1 dag hurtigere end knoglevæv i MOL-DECALCIFIER. Dog blev der observeret markant dårligere bevarelse af morfologi, dårligere farve- og IHC-resultater samt resultater af molekylærpatologiske analyser, der ikke skyldes en patologisk tilstand, men udelukkende skyldes det anvendte afkalkningsmiddel.

Det er derfor en vurderingssag, hvorvidt hastighed eller mulighed for mere detaljeret diagnostik er at foretrække. Det vurderes dog, at den ekstra tid, der skal anvendes ved afkalkning i MOL-DECALCIFIER, er ubetydelig, idet det samlede diagnostiske billede bliver markant forbedret. En mere targeteret udredning og dermed nøjagtig diagnostik for patienter med knoglemetastaser er herved mulig. Det er især relevant ved asymptomatiske tilfælde (14).

Producenten af MOL-DECALCIFIER har valgt at fokusere på at producere produkter, som er grønner, sikre og mere miljøvenlige i de histologiske laboratorier, enten ved at sikre formindskelse af farlige kemikalier eller udskifte disse med mere miljøvenlige kemikalier (12).

MOL-DECALCIFIER, der som nævnt er EDTA-baseret, er både et mere sikkert reagens for personale og et mere miljøvenligt reagens sammenlignet med myresyre/formalin (13). Ved en snarlig implementering af MOL-DECALCIFIER vil Afdeling for Patologi kunne være med til at flytte fokus på sikkerhedskultur og grøn omstilling i laboratoriet fra at være reaktiv til at være proaktiv. Alt dette samtidig med at vi skal sikre høj diagnostisk kvalitet, optimal analysetid og sikkert arbejdsmiljø. □





Bioanalytiker Alaa Mohamad Ahmad i gang med udskæring af knogle indeholdende knoglemetastase. Scanninger har forinden vist, at der er metastaser i knoglen, som derfor er amputeret. Efter amputationen kan man finde ud af, hvilken type cancer, det drejer sig om, og om den har spredt sig uden for knoglen. Med det nye middel, kan Afdeling for Patologisk også udføre molekylærdiagnostik af vævet og finde targeteret behandling og prognose.

## KILDER

1. Regionh.dk: kortlink.dk/2kkqy
2. Regioner.dk: kortlink.dk/2kfssr
3. Regioner.dk: kortlink.dk/2kfss
4. <https://dbio.dk/klima>
5. Tompala Vinod Kumar, Leela Lavanya Gadam, Ogirala Smyrna and Divya Uppala. Decalcification – The Path to Hard Tissue Visualization. Actascientific.com: kortlink.dk/2kfst
6. Güll, M., Bayat, N., Güll, S., Hüz, M., Yıldız, A., Otlu, A.: A Comparison of Three Different Agents of Decalcification for a Histological Examination of Bone Tissues. Journal of Turgut Ozal Medical Center 2014;21(4): 274-9.
7. van Es SC, van der Vegt B, Bensch F, Gerritse S, van Helden EJ, Boon E, Angus L, Overbosch J, Menke-van der Houven van Oordt CW, Verheul HM, van Herpen CML, Jager A, Oosting SF, de Vries EGE, Schröder CP. Decalcification of Breast Cancer Bone Metastases With EDTA Does Not Affect ER, PR, and HER2 Results. Am J Surg Pathol. 2019 Oct;43(10):1355-1360. doi: 10.1097/PAS.0000000000001321. PMID: 31283631.
8. Bussolati G, Leonardo E. Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. J Clin Pathol 2008;61:1184-1192.
9. Gruchy JR, Barnes PJ, Dakin Hache KA. CytoLyte(R) fixation and decalcification pretreatments alter antigenicity in normal tissues compared with standard formalin fixation. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2015;23:297-302.
10. Schrijver WA, van der Groep P, Hoefnagel LD, Ter Hoeve ND, Peeters T, Moelans CB, van Diest PJ. Influence of decalcification procedures on immuno-histochemistry and molecular pathology in breast cancer. Mod Pathol. 2016 Dec;29(12):1460-1470. doi: 10.1038/modpathol.2016.116. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27562496.
11. Miljøstyrelsen: kortlink.dk/2kfssu
12. Histology Goes Green. Milestone products for a safer, environmental-friendly histology laboratory. Mygreenlab.org: kortlink.dk/2kfsv
13. Safety Data Sheet MSDS007-006, MOL-DECALCIFIER, Milstone, Revision Date: 2020-11-10.
14. Tsukamoto, S.; Kido, A.; Tanaka, Y.; Facchini, G.; Peta, G.; Rossi, G.; Mavrogenis, A.F. Current Overview of Treatment for Metastatic Bone Disease. Curr. Oncol. 2021, 28, 3347-3372. Doi.org: kortlink.dk/2kfsw