



AF **BIOANALYTIKER ULRIK CHRISTIANSEN**  
KLINISK BIOKEMISK AFDELING, BISPEBJERG HOSPITAL

**BIOANALYTIKER, ANNA ANDERSEN**  
PATOLOGISK AFDELING, RIGSHOSPITALET

# Flouescens in situ Hybridisering (FISH)

## Reducering af omkostningerne med 90 %

**Udgangspunktet for vores professionsbachelorprojekt var, at en FISH-analyse på Rigshospitalets patologiafdeling kostede over 450 kr. Vi ville undersøge om omkostningerne til analysen kunne reduceres. Ved at modificere protokollen opnåede vi en besparelse på 90 % uden at gå på kompromis med sensitiviteten og specificiteten.**

FISH kan påvise genetiske abnormaliteter ved at visualisere specifikke DNA-sekvenser. Til at påvise den ønskede sekvens anvendes en fluorescensmærket probe, der er komplementær til det givne DNA. Princippet er, at DNA i cellen denatureres, hvorefter proben kan hybridisere til DNA. På den måde kan genet, sekvensen eller kromosomet visualiseres i et fluorescens-mikroskop, (se figur 1).

Metoden er meget specifik, men på grund af de anvendte reagenser er analysen også meget dyr. På Rigshospitalets patologiafdeling anvendes reagenser og protokol fra DAKOs "Histology FISH Accessory Kit" til alle DAKO-prober, hvilket betyder en omkostning pr. analyse på 455 kr. (se fig. 2). I vores projekt forsøger vi at nedsætte omkostningerne på to måder, dels ved at afprøve tre modificerede forbehandlinger, der er uafhængige af Histology FISH Accessory kittet og dels ved at fortynde proben.

På Rigshospitalets patologiafdeling anvendes til HER-2 FISH-analyse et kit (Dako kode K5331), der både indeholder HER2-proben og reagenserne fra Histology FISH Accessory kittet. De eneste reagenser, der opbruges i dette kit, er proben og pepsin, hvilket betyder, at der er et overskud af pretreatmentbuffer, vaskebuffer og stringensvaskebuffer.

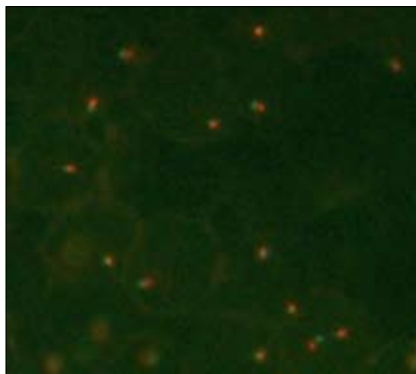
Hvis en modificeret forbehandling uden pepsin kan erstatte standardforbehandlingen, kan de overskydende reagenser fra HER2-kittet anvendes, hvilket nedsætter omkostningerne med 41% (se figur 2). For at kompensere for den udeladte pepsin undersøger vi effekten af forlænget kogetid samt en anden kogebuffer. Den mest anvendte buffer til immunhistokemiske analyser er Tris-EGTA-buffer (TEG), og derfor er det oplagt også at bruge den til FISH. Derudover undersøger vi, om det er muligt at fortynde proben med en kommerciel fortyndingsbuffer t-Den-

Hyb-2 fra Insitus. Dette vil kunne nedsætte omkostningerne yderligere, (se figur 2).

### Metode

Vi har valgt at udføre forsøget på formalinfikseret, paraffin-indstøbt væv. Ved test af en modificeret forbehandlingsmetode anvendes væv fra raske tonsiller fikseret i henholdsvis 24, 48 og 72 timer. Til samtlige forsøg anvender vi MYC-proben (Dako). Til afprøvning af den modificerede metodes diagnostiske værdi sammenlignes med standardmetoden på væv fra tre patienter med kendt translokation, t(8:14).

På figur 3 ses et flowdiagram over, hvilke forbehandlinger og fortyndinger der undersøges. Standardmetoden er farvet med grå baggrund. De forskellige kombinationer af forbehandlinger bygger altså på valget mellem 2 buffere (pretreatment og TEG) samt kogetider på enten 10 eller 20 minutter. Disse laves alle med ufortyndet probe. Når den



Figur 1. Splitsignalprobesæt med to prober (rød og grøn), der markerer de to områder på hver side af breakpoint i MYC-genet, hvor der ofte ses translokationen t(8:14) ved Burkitt's lymfom. Tonsil (normalt væv), x1000.

METODE	PRIS/GLAS	BESPARELSE
Standardmetoden, ufortyndet	455 kr.	-
Modificeret forbehandling, ufortyndet	270 kr.	41 %
Standardmetoden, fortyndet 1:10	229 kr.	50 %
Modificeret forbehandling, fortyndet 1:10	44 kr.	90 %

Figur 2: Oversigt over omkostninger pr. glas. Priserne er udregnet på grundlag af listepreiser for kit, probe og fortyndingsbuffer. Omkostninger til arbejds løn, øvrige materialer og reagenser er ikke medregnet. Alle priser er ekskl. moms.

optimale forbehandling er fundet, undersøges det, om probefortynding er mulig. Vi har med udgangspunkt i Insitus' produktinformation valgt at afprøve fortyndingerne 1:2, 1:5, 1:10 og 1:20.

Til sidst afprøves den valgte modificerede metode samt standardmetoden på patientmateriale. Hvis der ved standardmetoden ses hybridisering i størstedelen af kernerne samt translokationer, skal dette også kunne ses ved den modificerede metode.

### Vurderingsmetode

Til at vurdere hvilken forbehandling og fortynding der kan erstatte standardmetoden, anvender vi parametrene sensitivitet og specificitet. Hybridiseringsgraden, der er andelen af kerner med signal, anvendes som udtryk for sensitiviteten. Specificiteten vurderes ud fra mængden af baggrundsfarvning og uspecifikke bindinger.

### Resultater/Diskussion

#### Forbehandling

Ved standardmetoden fandt vi hybridiseringsgrader på 96–99 % (se figur 4). Der ses lavere hybridiseringsgrad ved alle de modificerede forbehandling, med undtagelse af forbehandling D, hvor hybridiseringsgraden er højere end standardmetoden. De nedsatte hybridiseringsgrader skyldes sandsynligvis, at vævet uden proteolytisk behandling med pepsin har nedsat permeabilitet,

hvilket besværliggør tilgangen af probe til DNA. Med kombinationen af længere kogetid og udskiftning af kogebuffer ser vi altså tendens til, at sensitiviteten øges.

Vi kender ikke det præcise indhold af pretreatmentbufferen fra kittet, men vi får oplyst, at pH er 6,55. Noget kunne altså tyde på, at pH har en effekt, da pH i TEG-bufferen er 9. Vurderet ud fra hybridiseringsgraden er det forbehandling D, der er det bedste alternativ til standardmetoden.

Specificiteten varierer ved de forskellige forbehandling. Højest specificitet ses ved standardmetoden samt ved forbehandling D. Ved de resterende modificerede forbehandling sås varierende mængder af uspecifikke reaktioner og baggrundsfarvning i form af plamager.

Ud over sensitiviteten og specificiteten vurderede vi også andre parametre, heriblandt signalintensiteten og morfologien. Signalintensiteten viste ligeledes tilsvarende eller bedre resultater med forbehandling D sammenlignet med standardmetoden. Vores største problem var morfologien, hvor der ved forbehandling D sås et noget sløret cellebillede. Dette kan skyldes, at pepsin er udeladt fra forbehandling. Pepsins effekt på vævet er, at protein fjernes (se figur 5).

#### Fortynding

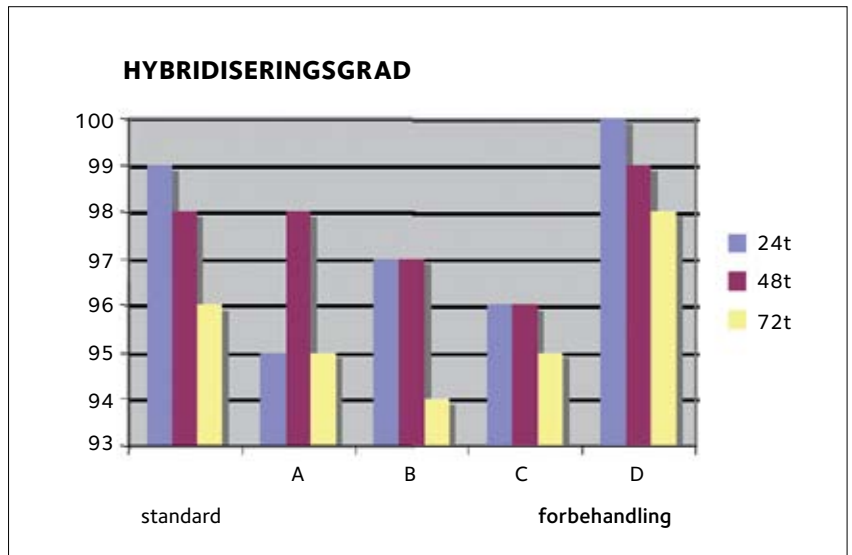
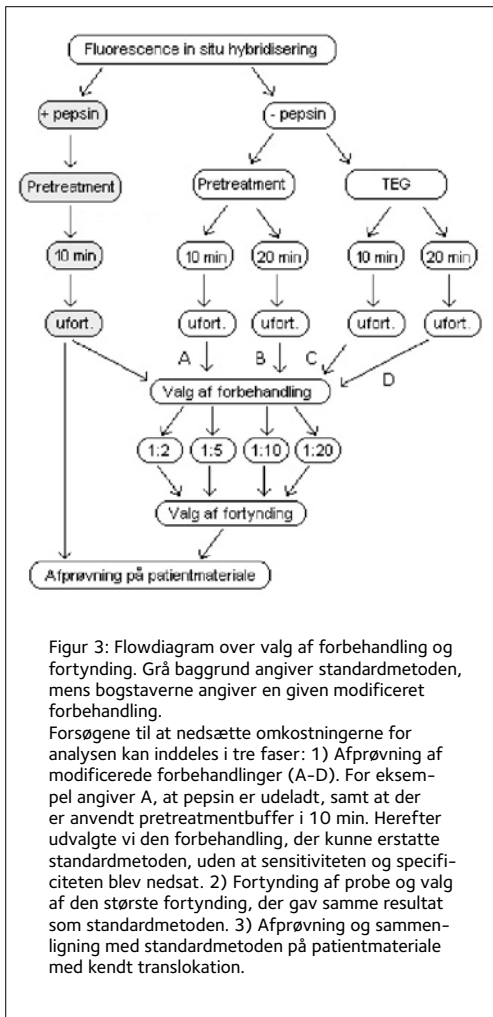
Forbehandling D er den modificerede forbehandling, der i forhold til stan-

dardmetoden giver størst hybridiseringsgrad, signalintensitet og specificitet. Vi vælger derfor at lave fortyndingsforsøg med væv forbehandlet efter denne metode samt med standardmetoden. Vi har fundet, at ved standardmetoden er det muligt at fortynde proben 5 gange, uden at specificiteten og sensitiviteten nedsættes. Det er derimod muligt at fortynde op til 10 gange ved anvendelse af forbehandling D.

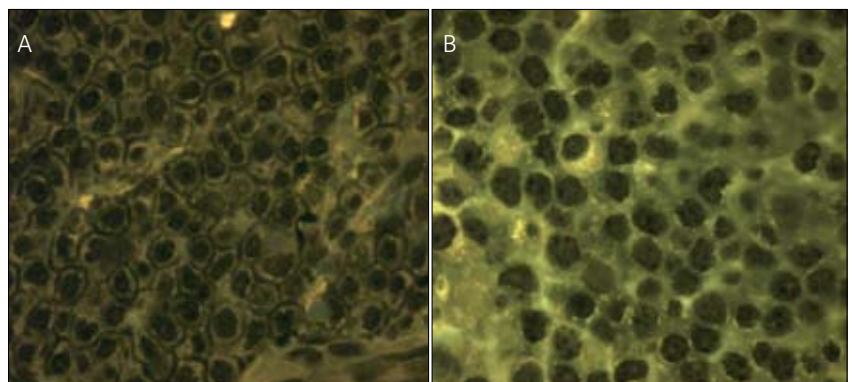
### Anvendelighed på Rigshospitalet og andre patologifdelinger

Den modificerede metode (D) har vist sig reproducerbar ved at give samme resultater i 5 analyseomgange. Den mulige besparelse på 90 % skal imidlertid ses i forhold til de udgifter, der er forbundet med indkøring af en ny metode. Ved ændring af forbehandling skal proceduren testes på mange forskellige væv og med flere forskellige typer af prober. Fortynding af prober kræver, at en given fortynding testes på de typer af væv, der almindeligvis undersøges. Dette kan således ske for en probe ad gangen, mens en ændring af forbehandling vil kræve test af samtlige prober. Hele proceduren er krævende tidsmæssigt og økonomisk, og det er også årsagen til, at hverken den modificerede forbehandling eller fortynding af proberne endnu anvendes rutinemæssigt på patologifdelingen på Rigshospitalet.

For andre patologifdelinger vil den største økonomiske gevinst selvfølgelig



Figur 4. Hybridiseringsgrader ved de forskellige forbehandling.



Figur 5: A. HE-snit af tonsil med forbehandling efter standardmetoden (Flourescensmikroskop x4000). B. HE-snit af tonsil med forbehandling D (Flourescensmikroskop x4000). Lysende områder er protein.



**ORDFORKLARING**

**Probe**

Fragmet af DNA, der er komplementært til det stykke DNA, man ønsker at undersøge. Det medfører, at proben kun kan binde det specifikke stykke DNA, der har samme nukleotidopbygning. Fragmenterne er opbygget af fluorescensmærkede nukleotider og er typisk 100-1000 basepar lange.

**Denaturering**

Denaturering af DNA er en strukturel ændring forårsaget af udefrakommende påvirkninger. I vores tilfælde medfører opvarmning af DNA, at hydrogenbindingerne mellem enkeltstrengene brydes, og DNA bliver enkeltstrengt.

**Hybridisering**

Kaldes også annealing. Når temperaturen sænkes, kan proberne binde (hybridisere) til de komplementære sekvenser på det enkeltstrengede DNA.

**Proteolytisk behandling**

Behandling med enzymer, der nedbryder protein. Et af de mest anvendte proteolytiske enzymer er pepsin.

**Pepsin**

Pepsin nedbryder peptidbindinger i proteiner, primært ved carboxylsyrer i aromatiske aminosyrer som for eksempel tyrosin. I formalinfixeret væv betyder det, at peptidbindinger i nærheden af methenbroer ødelægges. Effekten af dette er, at permeabiliteten i vævet og dermed tilgængeligheden til DNA øges. Pepsin kan i vores tilfælde udelades, fordi vi skaber permeabilitet i vævet ved at anvende en anden kogebuffer samt en forlænget kogetid.

opnås ved både at modificere forbehandlingen og fortynde proberne. Vi finder det hensigtsmæssigt at starte med at fortynde prober med t-DenHyb-2, da dette ikke kræver et stort indkøringsarbejde. Samtidig er besparelsen ved fortynding af prober lidt større end besparelsen ved at ændre forbehandlingen. Ønsker man så at nedsætte omkostningerne til analysen yderligere, kan forbehandlingen modificeres. Derudover skal en ændring også tilpasses lokale forhold på afdelingerne, således at den diagnostiske anvendelighed opretholdes. Efter denne indkøring vil besparelserne dog være store.

