

Pentalung-farvning med Multivision

Bioanalytiker har videreudviklet teknikken til udredning af lungecancer. Hvor de på Patologisk Institut i Holstebro tidligere farvede seks glas, kan de nu nøjes med to.

Patologisk Institut modtager dagligt store mængder af vævsprøver. De fleste vævsprøver modtages i 4% neutral buffet formaldehyd (NBF). Der modtages også ufikseret væv, såsom frysesnit, lymfeknuder og andet suspekt for lymfom samt nyrer. Vævet fikseres i minimum 1 døgn inden videre præparering natten over i en vævspræpareringsmaskine (Tissue-Tek VIP fra Sakura). Under denne proces forberedes vævet til indstøbning i paraffin. Efter indstøbning skæres 3,5 µm tykke snit.

Visse af vævsprøverne indeholder meget sparsomt materiale, heriblandt er lungebiopsier. Derfor har vi her på Patologisk Institut på Regionshospitalet Holstebro udviklet en ny teknik til lungecancerudredning, der både er nøjagtig, hurtig samt sparer på materialet.

Da vi dagligt skal skære mange paraffinsnit på meget sparsomt materiale, især lungebiopsier, beslutter vi os for at gennemføre et projekt med det formål at kombinere flere immunfarvninger på det samme paraffinsnit. Antallet af skårne paraffinsnit kan således reduceres, og vi vil derved have væv nok til alle de ønskede immunfarvninger, og evt. senere gen-tests. Helt konkret vil vi med en nyudviklet immuncocktail reducere antallet af glas. Fremover skal vi i stedet for 6 glas kun farve 2 glas, nemlig et til HE og et til immunhistokemi.

Jeg har valgt navnet Pentalung til den nye metode, dels fordi den består af 5 antistoffer, og dels fordi den retter sig specifikt mod ikke-småcellede lungekarcinomer.

Sammen med patolog Jess Pilgaard har jeg indkørt ”Pentalung”, som består af antistofferne p63, CK 5, CK 14, TTF-1 og Napsin A. Vi finder hurtigt ud af, at metoden kan bruges i den daglige rutine.



**Af immunansvarlig bioanalytiker//
Jesper Lund Lauridsen
Patologisk Institut
Hospitalsenheden Vest
Regionshospitalet Holstebro**

Antistofferne

De 5 antistoffer er valgt, fordi de er egnede til at skelne mellem adenokarcinom og planocellulært karcinom, hvilket er afgørende for behandling af lungecancer. Vi udvælger ca. 10 forskellige blokke med lungevæv, og resultaterne er overbevisende. Med kun én farvning bestående af blå og røde farver kan vi påvise typen af lungekarcinom. Røde kerner (TTF-1) og blå cytoplasma (Napsin A) viser adenokarcinom, mens blå kerner (p63) og rødt cytoplasma (CK 5 + CK 14) viser planocellulært karcinom.

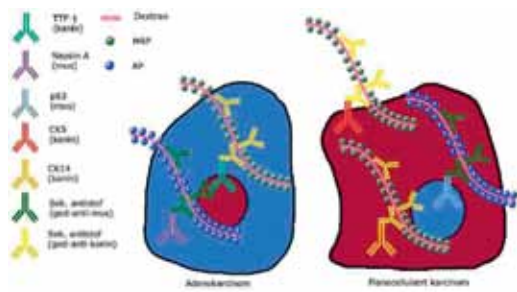
Se figur 1, 2, 3

Farvning

De daglige immunfarvninger udføres på Dako's Autostainer-Link 48, fordi det er et åbent system. Det er således muligt selv at bestemme, hvilke visualiseringssystemer man vil bruge. Dette er afgørende for at kunne udføre disse simultane cocktailfarvninger. Vores kvalitetskrav er god eller optimal score i NordiQC¹, hvilket opfyldes ved at bruge Dako's AutostainerLink 48. Samtidig opnås en rigtig god morfologisk gengivelse samt højere sensitivitet og lavere antistof-koncentration. Vi ved også baseret på erfaring fra NordiQC, at man fra denne platform kan køre alle antistoffer uden problemer. NordiQC er en kvalitetsorganisation, hvor vi 3-4 gange årligt får udført kvalitetstest af vores immunpåvisninger.

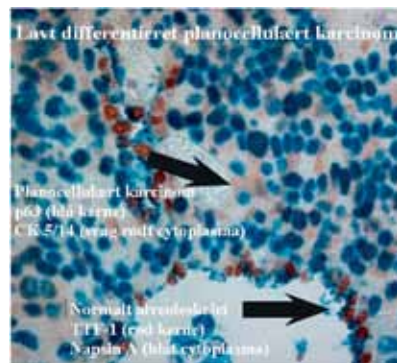
Paraffinsnittene skæres på en rotationsmikrotom indstillet på en tykkelse på 3,5 µm (1µ = 1:1000 millimeter) og bages efterfølgende 45 min i et 60° C varmeskab. Herefter forbehandles snittene i PT-Link fra Dako, i en 3-i-1 buffer. Her fjernes paraffinen i vævet og samtidigt demaskeres epitoperne. Herefter er snittet klar til den efterfølgende immunfarvning. Se nedenstående protokol.

¹ NordiQC, opstod i 1999 i de nordiske lande, med henblik på kvalitetskontrol. Der er ca. 3-4 kørsler årligt. NordiQC er blevet en organisation, der nu dækker det meste af verden med kvalitetskontrol. Der er nu ca. 270 deltagende laboratorier fordelt på 40 lande. I 1999 deltog der mellem 4-55 laboratorier fra DK, N, S og FIN.



FIGUR 1

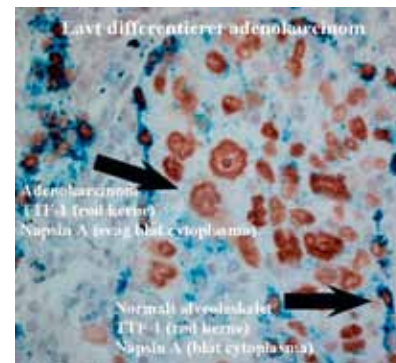
KILDE: BIOANALYTIKERSTUDERENDE LISA GJELSTRUP KRISTENSEN



FIGUR 2

KILDE: PRÆPARAT FRA PATOLOGISK INSTITUT REGIONSHOSPITALET HOLSTEBRO. LUNGEBIOPSI FARVET MED PENTALUNG X 40.

FOTO: JESPER LUND LAURIDSEN.



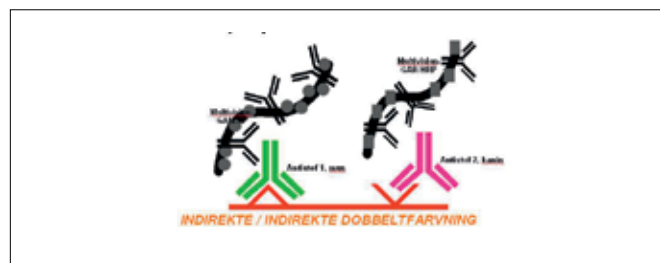
FIGUR 3

KILDE: PRÆPARAT FRA PATOLOGISK INSTITUT REGIONSHOSPITALET HOLSTEBRO. LUNGEBIOPSI FARVET MED PENTALUNG X 40.

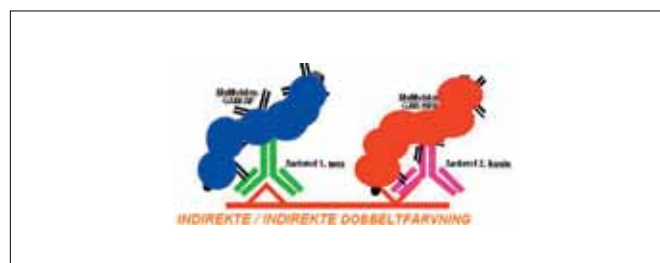
FOTO: JESPER LUND LAURIDSEN.

PENTALUNG-PROTOKOL

1. H ₂ O ₂ Block	10 min.
2. Buffer rinse	
3. Pentalung Cocktail	30 min.
4. Buffer rinse	
5. MultiVision Polymer	20 min.
6. Buffer rinse	
7. LVBlue	10 min.
8. Buffer rinse	
9. LVRed	10 min.
10. Buffer rinse	
11. Mayers sure hæmalun	3 min.
12. Rinse H ₂ O	
13. 96% alc.	1½ min
14. 4 x 99% alc.	1½ min
15. Montering med dækglassfilm	



I 7. og 9. trin tilføres chromogenerne LVBlue og LVRed, hvor henholdsvis AP og HRP virker som enzymer i farvestof reaktionerne. Ved bundet AP udfældes et blå produkt og ved bundet HRP udfældes efterfølgende et rødt produkt.

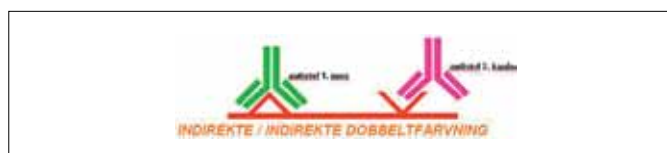


Visualisering til cocktails:

Multivision: TL-012-MARH, MV Polymer Mouse Blue, Rabbit Red.

Mekanismen ved Pentalung-protokollen:

Vævet er illustreret ved den røde streg med og , der symboliserer forskellige vævsantigener/epitoper. Der tilsættes en cocktail af antistof rettet mod flere forskellige vævsepitoper. I cocktailen findes antistof produceret i henholdsvis mus (grøn) og kanin (pink).



I 5. trin i protokollen tilsættes MultiVision Polymer GAM/AP (Goat Anti Mouse) og GAR/HRP (Goat Anti Rabbit). Ged anti mus koblet Alkalisk Phosphatase (GAM/AP) binder til mus antistof/antigen kompleks. Ged anti kanin koblet Peroxidase (GAR /HRP) binder til kanin antistof/antigenkompleks.

Cocktails

Vi kører i dag rutinemæssigt 10 forskellige cocktails, med et spænd fra 2 og op til 6 forskellige antistoffer. Her er det meget vigtigt at udvælge antistofferne/klonerne, så reaktionsmønstret kan tolkes korrekt uden større besvær. Vi holder os så vidt muligt til de antistoffer/kloner, vi har i huset i dag, da det er disse, vi har optimale resultater med i vores single immunfarvninger. Det kan dog blive nødvendigt at finde et tilsvarende antistof, der er produceret i et andet dyr.

Det visualiseringssystem, vi bruger til immuncocktails, er rettet både mod mus og kanin. Museantistoffer bliver blå i resultatet, og kaninantistoffer bliver røde. Hvis der f.eks. er 2 antistoffer rettet mod kerner i samme cocktail, skal de helst have hver sin farve. Derfor vælges et antistof, der er rettet mod mus (blå) og et antistof rettet mod kanin (rød).

DANDIAG

EFTERÅRSKAMPAGNE PÅ SARTORIUS BIOHIT PIPETTER

**PROLINE PLUS
5-PACK**



"Proline Plus 5-Pack" ordre nummer: LH-728654

Pris **7.425,00 kr. eks. moms**

Proline Plus Pipette 0,5-10 µl

Proline Plus Pipette 10-100 µl

Proline Plus Pipette 20-200 µl

Proline Plus Pipette 100-1000 µl

Proline Plus Pipette 500-5000 µl

Optifit Tips 0,5-200 µl (1x96 tips)

Optifit Tips 0,5-200 µl Refill Tower (10x96 tips)

Karrusel Stand & Elbow Pad

Perioden **15.08 - 31.10.2013**

eLINE VED KØB AF:
2 STK. - 20% RABAT
3 STK. - 25% RABAT



Perioden **01.09 - 30.11.2013**

Kampagnepriserne kan ikke
kombineres med anden rabat

Dandiag A/S | Mårkærvej 9
2630 Tåstrup | T: 4343 3057
www.dandiag.dk
dandiag@dandiag.dk

FAGLIG //

I de tilfælde, hvor vi har 6 forskellige antistoffer, er de valgt ud fra, hvilket væv/celler de reagerer med.

Det er en fordel, at immuncocktailen kan anvendes på vævet uanset patientens køn. Derfor skal der ved sammensætning af antistoffer i en immuncocktail også tages højde for, at nogle organer er kønsspecifikke.

De to antistoffer rettet mod henholdsvis AR (Androgen Receptor) for mænd og ER (Estrogen Receptor) for kvinder reagerer næsten identisk i henholdsvis prostata og uterus/ovarium. Antistofferne findes i vores cocktail Hexarec, der anvendes til diagnostik af tumor i rectum med ukendt udgangspunkt. Ved tolkning af immunreaktionen er det patientens køn, der afgør mulighederne for diagnosen.

COCKTAILS MED 2 ANTISTOFFER:

CK 8/18, Ki-67

Melan A, Ki-67

CD 3, Ki-67

CD 20, Ki-67

P504s, AR (Androgen Receptor)

COCKTAILS MED MERE END 2 ANTISTOFFER:

Pentalung: Napsin A, TTF-1, p63, CK 5, CK 14

Hexarec: CK 20, CDX-2, ER (Estrogen Receptor), AR (Androgen Receptor), CK 7, CK 5/6

Triprosta: 34βE12, p63, P504s

Trihud: Melan A, Ki-67, CD 31

Bladmusk: Desmin, 34βE12 el. CK 8/18

Fordele ved cocktails

- Der opnås en mere sikker diagnostik, idet man vurderer de forskellige immunreaktioner på et og samme snit. Når man farver ét snit pr. antistof, kan cellebilledet variere, da der er tale om flere niveauer.
- Tidsforbruget mindskes til mikroskopi (50-70% mindreforbrug).
- Der spares på materialet, således at flere analyser og gentests er muligt.
- Der spares på reagenser og antistoffer (ca. 36% i udgift).
- Arkivbehovet bliver mindre

Vores projekt har vist, at vi ved hjælp af Pentalung kan diagnosticere og klassificere non-småcellede/ikke neuroendokrine lungetumorer som enten planocellulært karcinom eller adenokarcinomer ved 5 antistoffer på et snit. I dag er Pentalung nu rutinefarvning ved en lang række vurderinger af lungecancer. Jeg udvikler stadig nye cocktails og arbejder nu på en cocktail til påvisning af ukendt udgangspunkt for adenokarcinom. Denne cocktail skal især anvendes på koagelmateriale fra pleuravæsker, da der til tider er meget sparsomt materiale, og det er derfor endnu engang vigtigt at spare på materialet. ▣

DYREBARE VÆVSSTYKKER

I lungecancerudredning er de vævsstykker bioanalytikerne får at arbejde med ultra små. På lungeafdelingen udtages biopsierne med nåle, der oftest kun er 1,2 mm. Lungen kan klappe sammen, hvis der udtages væv med en større nål, og for en patient, der i forvejen har nedsat lungefunktion, kan en sammenklappet lunge være fatalt.