

# Immuncytokemi på serøse effusioner

Bachelorprojekt viser, at det er muligt at reducere udredningstiden for cancermetastaser i pleura eller ascites effusioner (væske udtaget fra henholdsvis lungehulen og abdomen) med en dag og opnå et lige så brugbart eller bedre resultat ved indførelse af immuncytokemi (ICC) på serøse effusioner. Endvidere kan brugen af ICC reducere omkostninger for immunfarvning.

## ABSTRACT:

Formålet med bachelorprojektet var at undersøge muligheden for at erstatte immunhistokemi (IHC) med ICC på serøse effusioner med henblik på at reducere cancerudredningstiden uden større omkostninger for Patologisk Afdeling, Hillerød Hospital. (PHH) Som udgangspunkt blev der sammenlignet mellem IHC og ICC for de primære antistoffer: Calretinin, CK7, EP4, ER og TTF-1.

Sundhedsstyrelsen vurderer, at antallet af nye cancertilfælde i Danmark stiger med >1% om året, samt at en danskers risiko for at få en kræftdiagnose inden 75-års-alderen er 34%.<sup>8</sup> Cancerudredning og behandling er derfor et højt prioriteret emne blandt politikerne pga. de lange ventelister, denne stigning i nye cancertilfælde har forårsaget. Dette skyldes, at ventetiden kan forøge sygdomsudvikling, som i værste tilfælde kan nedsætte behandlings- og overlevelsesmulighederne. Politikerne har i denne forbindelse understreget, at cancer skal behandles som en akut sygdom, hvor undersøgelser og behandling skal iværksættes og gennemføres uden overflødig ventetid. Et pakkeforløb udarbejdet vha. den nationale kræftplan, som omfatter fastsat tidsforløb over udredning og behandling, skal således forhindre unødigt ventetid.<sup>6,7,8</sup>

Vi mener, at det er muligt at reducere cancerudredningstiden ved at anvende ICC farvning frem for IHC-farvning på serøse effusioner, idet ICC kun kræver fiksering og udstrykning af cytologisk materiale, før der kan påbegyndes immunfarvninger. Hvorimod IHC kræver fremstilling af koagel, fiksering, vævspræparering, indstøbning, skæring, smeltning af paraffin i varmeskab og forbehandling med Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) inden eventuelle immunfarvninger, som forlænger udredningstiden. Endvidere er det ikke altid muligt at fremstille et kunstigt koagel på de serøse effusioner pga. utilstrækkeligt materiale og manglende koagulation.

## METODER

Der blev indsamlet i alt 27 prøver fra pleura- og ascites-effusioner af mænd og kvinder i alderen 47 til 76 år. Disse blev sorteret ud fra patologens mikroskopisvar af oversigtfarvningerne Hæmatoxylin-Eosin (HE) og May-Gründwald Giemsa (MGG) på snit fra koagel. Heraf blev 8 prøver diagnosticeret positiv for malignitet for en eller flere af de benyttede primære antistoffer. Disse blev anvendt til ICC-farvning, herved sikres der mulighed for positiv reaktion. Endvidere blev enkelte prøver udvalgt ud fra de kliniske oplysninger i patientjournalen.

For at finde den rette fortynding til ICC blev der lavet fortyndingsrækker for de anvendte primære antistoffer uden forbehandling med HIER. Da størstedelen af antistofferne ikke bandt sig specifikt til de ønskede antigener, men der derimod forekom en del uspecifikke antistofadhæsioner ved denne me-

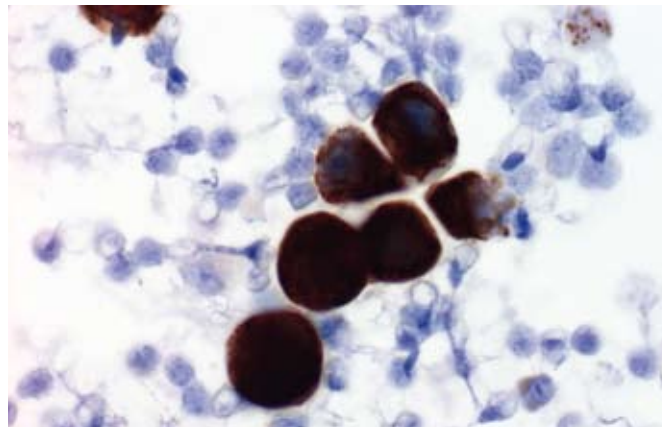
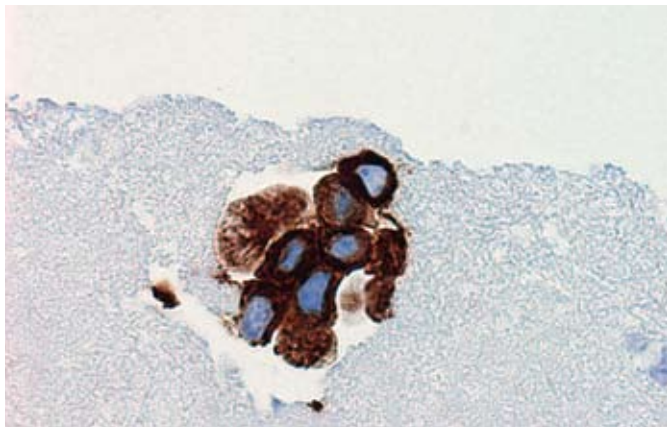


Af bioanalytiker //  
**Christina Thomasen**  
Klinisk Genetisk Afdeling, Hæmatologisk/  
Onkologisk Sektion, Rigshospitalet



og bioanalytiker //  
**Louise Valstedgård**  
Patologisk Afdeling, Hillerød Hospital

Vejledere:  
Kliniske: Therese Lauritzen og Marianne Brandt, Hillerød Hospital, Patologisk Afdeling.  
Bioanalytikeruddannelsen Kbh: Merete Ringsholt



## SAMMENLIGNING AF SNIT FRA KUNSTIGT KOAGEL MED CELLEUDSTRYGNINGER PÅ CYTOSPIN FOR ANTISTOFFET CK7

Påvisning af CK7-positive cytoplasma-antigener i snit fra kunstigt koagel med antistoffet CK7 ved IHC-farvning. Antigen-antistof-adhæsionen synliggøres vha. DAKO's indirekte polymerforstærkningsteknik, som udfælder et brunt tungtopløseligt produkt.

Påvisning af CK7-positive cytoplasma-antigener i celleudstrygninger udført vha. cytospin ved ICC-farvning. Antistoffet CK7 er fortyndet med 75% i forhold til IHC-farvning uden synlig forskel i farveintensiteten. Antigen-antistof-adhæsionen synliggøres vha. DAKO's indirekte polymerforstærkningsteknik, som udfælder et brunt tungtopløseligt produkt.

tode, blev der derfor lavet yderligere fortyndingsrækker med HIER som forbehandling. Kogningstiden blev reduceret til 8 min. i forhold til de oprindelige 15 min. ved IHC-farvning.

Fortyndingsrækkerne blev ved Calretinin, CK7, EP4, ER og TTF-1 lavet ud fra den optimale fortynding til IHC på PHH, hvor disse blev fortyndet med henholdsvis 0%, 25%, 50% og 75%.

Til fremstilling af celleudstrygninger til ICC blev der anvendt Shandon Cytospin4 (Thermo electron corporation) til de CytoRich Red (AX-LAB A/S, BD Diagnostics, TriPath Imaging Inc.) fikserede effusioner. Ved fremstilling af koagel til IHC blev koagulationsprincippet anvendt, efterfulgt af vævsfremføring på VIP.

Inden immunfarvning forbehandles snittene med HIER i henholdsvis pH6 for EP4 og pH9 for Calretinin, CK7, ER og TTF-1. Til immunfarvning anvendes DAKO's indirekte polymerforstærkningsteknik. Ved IHC medtages en kendt positiv kontrol af histologisk materiale. Ligeledes medtages der ved ICC-farvning en kendt positiv kontrol og kendt negativ kontrol af cytologisk materiale for hvert antistof samt en negativ kontrol af cytologisk materiale for detektionssystemet. Alle er udvalgt ud fra patologens mikroskopisvar af koaglet ved IHC-farvning.

Til beregning af økonomien blev de kommercielle priser eksklusive moms indsamlet. Disse er efterfølgende anvendt til beregning af pris per præparat ved henholdsvis ICC- og IHC-farvning. Der undlades priser for fælles anvendte apparaturer og reagenser. Ved beregning af bioanalytikerens arbejdstid er der estimeret, hvor meget "hands on-time" der er ved fremstilling af præparat til henholdsvis IHC og ICC. Timelønnen er beregnet ud fra en nyuddannet bioanalytiker ifølge dbio's lønoverenskomst oktober 2007.

## VURDERINGSMETODE

Specificiteten for antigenisiteten blev vurderet ud fra følgende kriterier; 0: ingen antigenisitet, 1: svag antigenisitet, 2: moderat antigenisitet, 3: optimal antigenisitet. Endvidere blev der noteret overfarvning samt forekomst af uspecifikbinding, som klassificeres med plus ved fund og minus uden fund.

## RESULTATER/DISKUSSION

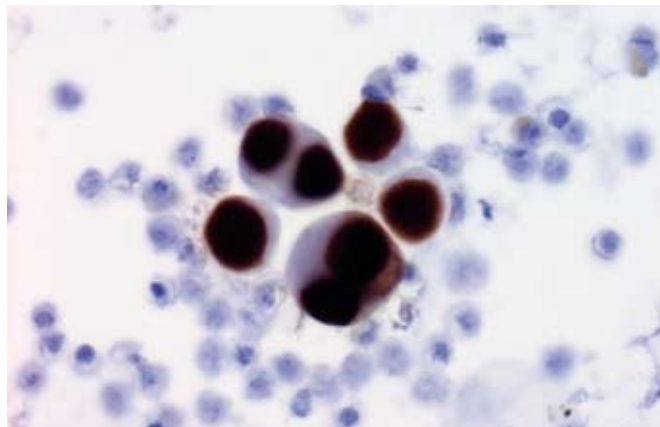
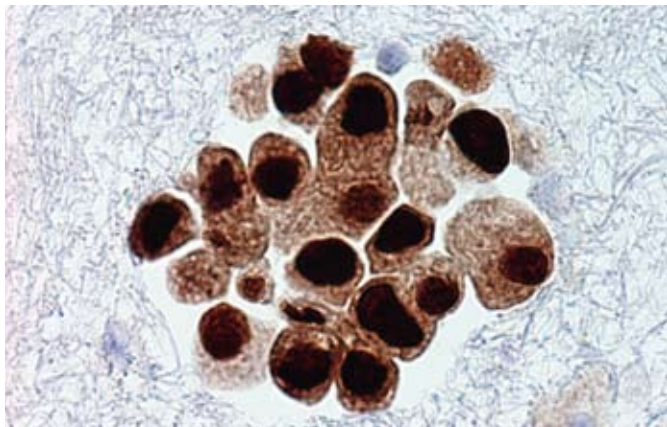
Ved fortyndingsrækkerne uden HIER-forbehandling blev der påvist en specifik antistofadhæsion ved antistoffet EP4, men ved de øvrige antistoffer fremkom der en uspecifik antistofadhæsion, som blev elimineret ved brug af HIER-forbehandling.

Ved fortyndingsrækkerne med HIER-forbehandling ved antistofferne CK7 og TTF-1 blev der observeret en klar mulighed for at benytte en større fortynding på ICC. Disse kunne fortyndes med 75% uden reduktion i farveintensiteten. Ved de øvrige antistoffer blev der ikke observeret mulighed for yderligere fortynding. Den manglende specifikke antistofadhæsion uden HIER kan skyldes, at epitoperne er maskerede, muligvis pga. den naturlige tertiære struktur i proteinerne eller formaldehyden i fikseringsmidlet CytoRich Red. Den positive reaktion med EP4 uden HIER kan formentlig skyldes, at membran-antigenerne er mere tilgængelige for antistoffet, da antigenerne ikke er isoleret i kerne og cytoplasma.

## Gennemgang af resultater

### for IHC- og ICC-farvning på prøvemateriale

Hvorvidt det er muligt at opnå et lige så brugbart eller bedre resultat ved ICC frem for rutine IHC på serøse effusioner ved brug af antistofferne Calretinin, CK7, EP4, ER og TTF-1 er forsøgt bevist ved resultaterne i tabel 1. Generelt ses der ikke den store



**SAMMENLIGNING AF SNIT FRA KUNSTIGT KOAGEL MED CELLEUDSTRYGNINGER PÅ CYTOSPIN FOR ANTISTOFFET TTF-1**

Påvisning af TTF-1-positive kerne-antigener i snit fra kunstigt koagel med antistoffet TTF-1 ved IHC-farvning. Antigen-antistof adhæsionen synliggøres vha. DAKO's indirekte polymerforstærkningsteknik, som udfælder et brunt tungtopløseligt produkt.

Påvisning af TTF-1-positive kerne-antigener i celleudstrygninger udført vha. cytospin ved ICC-farvning. Antistoffet TTF-1 er fortyndet med 75% i forhold til IHC-farvning uden synlig forskel i farveintensiteten. Antigen-antistof-adhæsionen synliggøres vha. DAKO's indirekte polymerforstærkningsteknik, som udfælder et brunt tungtopløseligt produkt.

forskel mellem IHC-farvning og ICC-farvning på de serøse effusioner.

Ved Calretinin og EP4 er det svært at vurdere resultaterne, idet der kun er et fåtal af prøver. Dog ses der ved Calretinin en bedre morfologi og antigenicitet i udstrygninger udført vha. cytospin end i koagel, hvilket gør det lettere og mere sikkert at diagnosticere ud fra. Årsagen til den svagere antigenicitet i koagel kan skyldes snittykkelsen samt lokalisationen af epitoper i blokken. Ligeledes ses der betydeligt mere uspecifik binding i koagel kontra cytospin. Endvidere ses der en svag positiv antigenicitet og dårlig morfologi i cytospin ved EP4, hvor der forekom et negativt resultat i koaglet. Grunden til dette er formentlig autolyse af cellerne<sup>3</sup> eller fortyndingsfaktoren. Dog var der en del generende uspecifik antistofadhæsion i cytospin. Dette kan evt. afhjælpes ved inkubation med Human IgG inden primær antistof.<sup>45</sup> Ved CK7 ses der en bedre morfologi i koagel end i cytospin og omvendt en bedre antigenicitet i cytospin end i koagel.

Morfologien i koagel og cytospin for ER vurderes begge til at være optimal. Ses der bort fra prøve 21, stemmer antigenisiteten overens for både koagel og cytospin. Prøve 21 afviger, da der ikke ses en reaktion i ICC, dette skyldes sandsynligvis præanalytiske fejlkilder.

Ifølge Gong et al.<sup>2</sup> er det påvist, at immunfarvning med kernemarkører giver en signifikant lavere farveintensitet i celleudstrygninger end på snit fra koagel ved maligne effusioner. Dette understøttes af ovenstående resultater i tabel 1, idet antigenisiteten for ER i prøve 22 og 21 har en svagere eller manglende antigenicitet i forhold til de tilsvarende snit fra koagel. Den svagere antigenicitet kan muligvis skyldes, at antistoffet skal penetrere gennem flere membraner, før den når de

**TABEL 1:  
VURDERING AF IHC- OG ICC-FARVNING PÅ INDSAMLEDE PRØVER**

Prøve	Antistof	IHC (koagel)			ICC (cytospin)		
		M	A	U	M	A	U
17	Calretinin	3	3	+	3	3	-
25	Calretinin	2	1	+	3	3	+
5	Calretinin	0	0	-	0	0	-
12	CK7	2	2	-	3	3*	+
14	CK7	3	3	+	1	2	+
17	CK7	3	3	-	3	3*	+
18	CK7	3	3	+	2	3	-
20	CK7	2	2	+	2	2	+
25	CK7	3	2	+	2	2	+
5	CK7	0	0	-	0	0	+
19	CK7	0	0	-	0	0	+
14	EP4	0	0	-	1	1	+
5	EP4	0	0	-	0	0	+
12	ER	3	1	-	3	3	+
17	ER	3	2	-	3	2	-
21	ER	3	1	+	0	0	-
22	ER	3	2	-	3	1	-
5	ER	0	0	+	0	0	-
19	ER	0	0	-	0	0	-
18	TTF-1	3	3	+	3	3	-
20	TTF-1	3	3	-	3	3	-
5	TTF-1	0	0	-	0	0	-

M: MORFOLOGI, A: ANTIGENISITET, U: USPECIFIK ANTISTOFADHÆSION,

\* OVERFARVNING



**TABEL 2: SAMLET PRIS PER PRÆPARAT FOR IHC OG ICC:**

IHC	ICC	% besparelse <sup>b</sup>
Anti-Calretinin 231,73kr	Anti-Calretinin 163,81kr	29,3%
Anti-CK7 130,49kr	Anti-CK7 61,99kr	52,5%
Anti-EP4 267,39kr	Anti-EP4 166,17kr	37,9%
Anti-ER 160,01kr	Anti-ER 92,09kr	42,4%
Anti-TTF-1 136,74kr	Anti-TTF-1 65,77kr	51,9%

b: % BESPARELSE FOR ICC I FORHOLD TIL IHC

specifikke antigener i kernen, hvorimod kernen ved snit fra koagel er gennemsåret. Ligeledes nævner Gong et al.<sup>2</sup> og Jensen et al.<sup>3</sup>, at fiksativet kan have stor betydning for antigenisiteten for kernemarkører specielt for ER. Ifølge Gong et al.<sup>3</sup> er det blevet påvist i flere studier, at formaldehydfikseret materiale fra serøse effusioner medfører en signifikant bedre antigenisitet end ved ethanolfiksering for ER. Der kan herved konstateres ud fra den svagere eller manglende ER-farvning i prøve 21 og 22, at fikseringsmidler og fikseringstider spiller en vigtig rolle i tabet af antigenisitet ved kernemarkører.

De bedste resultater ved ICC i forhold til IHC er opnået ved TTF-1, hvor både morfologien og anti-genisiteten er optimal ved begge metoder. Disse observationer modsiger ovenstående udsagn, idet cytopspin havde en tilsvarende antigenisitet i forhold til koagel. Dette påviser muligvis, at anti-TTF-1 er en kraftig kernemarkør, og at det muligvis ikke er alle kernemarkører, der giver svagere reaktion i forhold til koagel. På figur 1 sammenlignes enkelte eksempler af IHC kontra ICC.

### Omkostninger ved IHC kontra ICC

Ved brug af DAKO Autostainer til ICC-farvning vil omkostningerne per præparat kunne reduceres med 29,3-52,5% i forhold til IHC for PHH set ud fra tabel 5, specielt for CK7 og TTF-1, hvor der ses en halvering i prisen ved brug af ICC. Årsagen til dette er, at antallet af apparaturer, reagenser og bioanalytikerarbejdstid er væsentligt lavere ved ICC, samt at det er muligt at fortynde de primære antistoffer CK7 og TTF-1 med 75% i forhold til IHC.

### ANALYSETID VED IHC KONTRA ICC

Ved udregning af tidsforbrug blev alle præanalytiske fremstillingsprocesser for begge metoder lagt sammen, som det ses i tabel 3. Sammenholdes dette for henholdsvis IHC og ICC, ses der en væsentlig reduktion ved fremføring af præparat til ICC-farvning i forhold til IHC, som i rutinen på HHP betyder en reduktion i analyssetiden for cancer på serøse effusioner med en dag.

### KONKLUSION

Det er muligt at nedsætte udredningstiden for cancer med en dag og opnå et lige så brugbart eller bedre resultat ved indførelse af ICC på DAKO Autostainer på PHH. Ligeledes forekom der en reduktion i omkostningerne for alle de primære antistoffer ved brug af ICC frem for IHC, idet forbruget af apparaturer og reagenser er billigere, samt at bioanalytikerarbejdstiden er kortere.

**TABEL 3: PRÆANALYTISK TIDSFORBRUG INDEN IMMUNFARVNING**

	Immunhistokemi	Immuncytokemi
Tidsforbrug inden immunfarvning	20 timer 25½ min.	2 time ½ min.

### PERSPEKTIVERING

Ved indførelse af ICC på de serøse effusioner bør det undersøges, hvorvidt det er muligt at halvere centrifugeringstiden og fikseringstiden i CytoRich Red med henblik på at fremskynde processen. Ligeledes bør det undersøges, hvorvidt der med fordel kan anvendes proteaseforbehandling ved anti-EP4 med henblik på at påvise demaskerede epitoper.

Set ud fra patientens synspunkt ville det være en klar fordel at indføre skiftende arbejdstider evt. flekstid for bioanalytikerne og patologerne ved indførelse af ICC, således at patienten kan få svar samme dag. Dette kan gøres ved at immunfarve om eftermiddagen med efterfølgende mikroskopering og svarudgivelse samme dag. □

### Referencer:

- 1 Fetsch, P, et al., *Immunocytochemistry in Effusion Cytology: A Contemporary review*, Cancer cytopathology, 2001 May;93:293-308
- 2 Gong, Y et al., *Immunocytochemistry of serous effusion specimens: a comparison of ThinPrep vs cell block*. Diagnostic cytopathology, 2003 Jan;28(1):1-5
- 3 Jensen M.L. et al., *Immunocytochemical Staining of Smears and Corresponding Cell Blocks From Serous Effusions: A Follow-up and Comparative Investigation*, Diagnostic cytopathology, 1996; 15:33-36
- 4 Oertel J. et al., *Immunocytochemical methods in haematology and oncology*, J Cancer Res Clin Oncol, 2000 Jan; 126:425-440
- 5 Vyberg M., *Anvendt Immunhistokemi*, 6. udgave, Bioanalytikeruddannelsen København, 2005
- 6 Kræftplan 2 [hjemmeside på internettet] København: Sundhedsstyrelsen [lokaliseret d. 28. marts 2008] Tilgængelig på [www.sst.dk/publ/publ2005/plan/kraeftplan2/kraeftplan2.pdf](http://www.sst.dk/publ/publ2005/plan/kraeftplan2/kraeftplan2.pdf)
- 7 Kræftpatienter dør på ventelister [hjemmeside på internettet] København: Kræftens Bekæmpelse [lokaliseret d. 27. marts 2008] Tilgængelig på [www.cancer.dk/Forskning/Nyheder/ventelister+patient+doer.htm](http://www.cancer.dk/Forskning/Nyheder/ventelister+patient+doer.htm)
- 8 Kræftplan 2 [hjemmeside på internettet] København: Sundhedsstyrelsen [lokaliseret d. 28. marts 2008] Tilgængelig på [www.sst.dk/publ/publ2005/plan/kraeftplan2/kraeftplan2.pdf](http://www.sst.dk/publ/publ2005/plan/kraeftplan2/kraeftplan2.pdf)