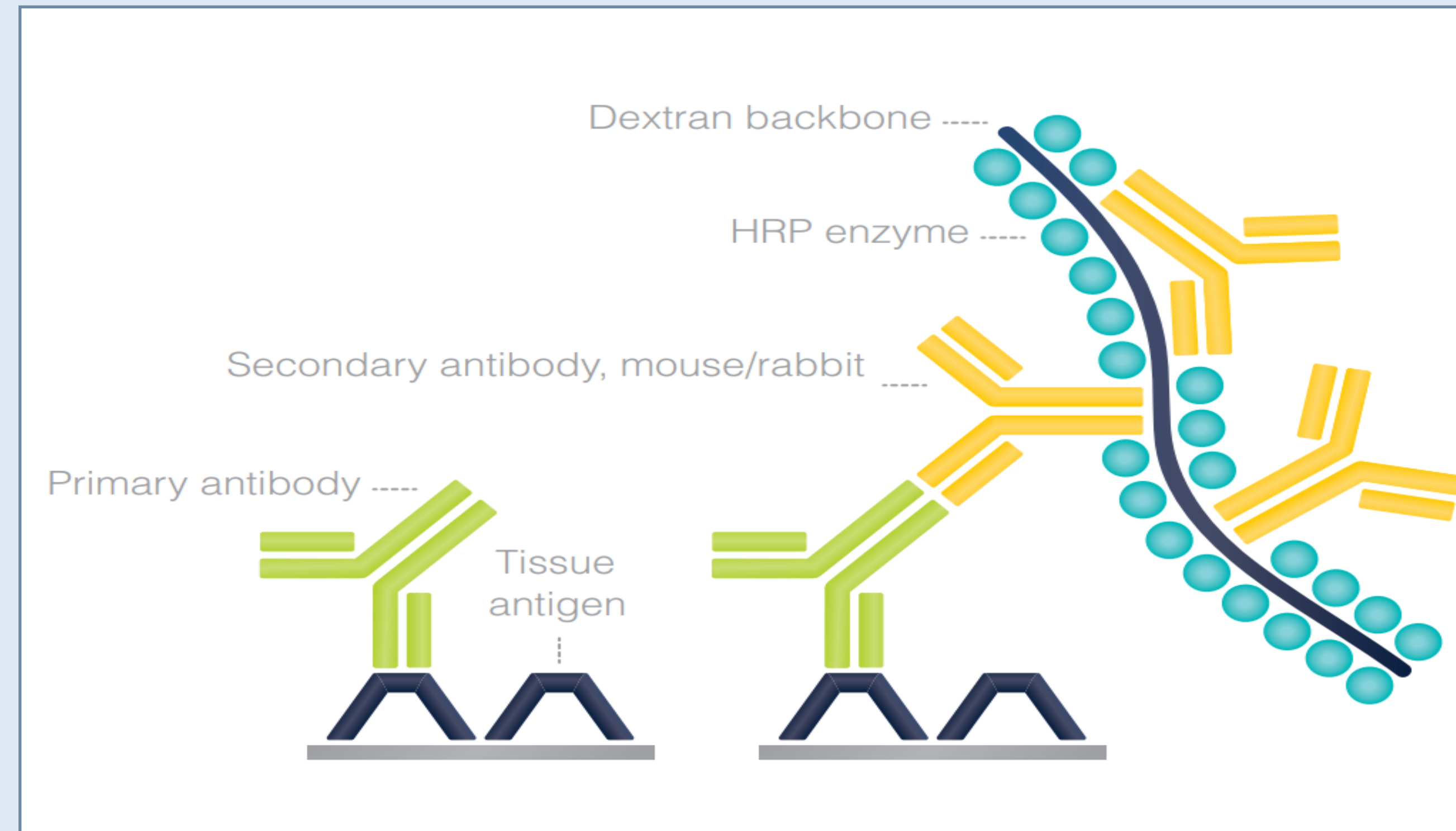


# Workflow optimalisatie van immunohistochemische kleuringen

Cédric Tielemans, Virga Jessa Hasselt, pathologische anatomie

## Introductie

In het laboratorium voor pathologische anatomie worden weefselcoupes gemaakt voor het diagnosticeren van allerlei ziektes en aandoeningen. Alle weefselcoupes worden standaard gekleurd met hematoxyline & eosine, deze gekleurde weefselcoupes worden microscopisch onderzocht, hierna zal de patholoog in functie van diagnose soms bepaalde immunohistochemische kleuringen aanvragen om tot een duidelijk, specifiek, beeld te komen. Alle uitgevoerde kleuringen werken met hetzelfde principe namelijk met 'labeled polymer detection'. Hierbij bindt een specifiek antilichaam aan het te onderzoeken weefsel, een gemeenschappelijk secundair antilichaam bindt aan elk specifiek antilichaam in het gamma. Dit secundair antilichaam is gelinkt via een dextran polymeer gelabeld met dit secundair antilichaam en meerdere enzymen. In het laboratorium zijn 2 Dako Omnis kleurtoestellen om deze kleuringen uit te voeren.



Figuur 1: twee-staps polymeer methode (EnVision)

(Bron: Petersen K, Peders HC. Detection methods. In: Taylor CR, Rudbeck L, editors. Immunohistochemical Staining Methods. Denmark: Dako; 2013. p. 81.)

## Probleemstelling

Er moet met een aantal parameters rekening gehouden worden wanneer een weefselcoupe op een kleurtoestel wordt gezet:

- De 'pre-treatment' van de coupes gebeurt met verschillende buffer oplossingen, hetzij, High en Low pH-buffer, deze hebben een pH van respectievelijk 12 en 7.
- De 'On-Board-Time' (OBT) is het aantal uur dat een fles reagens in het toestel zit, elk toestel houdt deze tijd individueel bij. Wanneer een reagens zijn maximale OBT heeft bereikt, wordt deze afgewezen door het kleurtoestel en is het reagens niet meer bruikbaar ongeacht het resterende volume.
- Er moet rekening gehouden worden met het verschil in prestatie en kwaliteit van een bepaalde kleuring over de verschillende kleurtoestellen.
- Het gebruik van verschillende automaten voor een dezelfde kleuring zorgt voor een 'cross tracking' van reagens volume, het resterend volume reagens wordt mogelijks verkeerd ingeschat.
- 'Sentinel' programma's zijn de biopsies van lymfeklieren afgenomen in de omgeving van maligne tumoren. Deze kleuringen zijn urgent en krijgen voorrang op andere weefseltypes.
- Reagens schuiven kunnen niet meer geopend worden wanneer in gebruik.

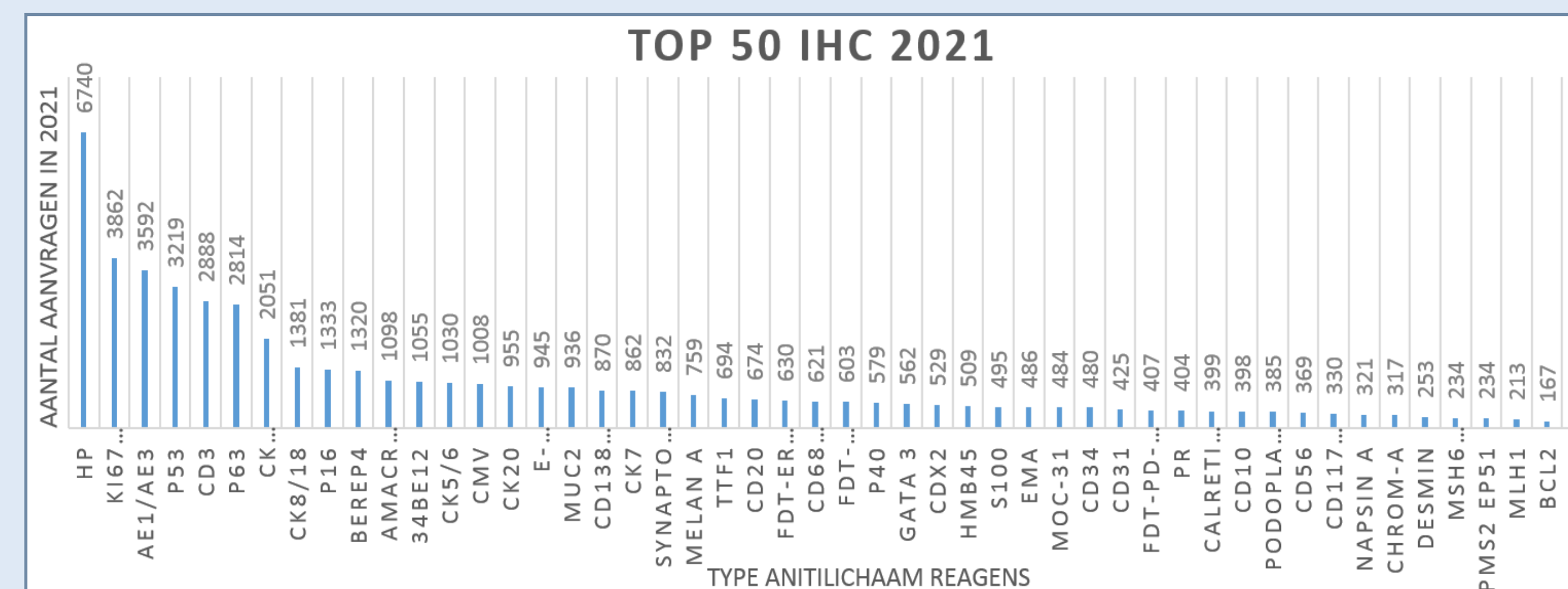
## Methode

Een vast panel van reagens samenstellen voor elke Dako Omnis waarvan niet wordt afgeweken in de dagelijkse manier van werken is een behaalbare oplossing voor enkele van deze problemen. Om dit panel samen te stellen wordt uitgegaan van frequentie van aanvraag, urgentie, kwaliteit en type protocol. Om de optimalisatie te kunnen schatten wordt een frequentietabel gemaakt van alle aanvragen in 2021. Er wordt nu een verdeling gemaakt van alle verschillende IHC reagens over de 2 toestellen op basis van frequentie van aanvraag, prestatie van kleuring, mogelijkheid op 'batch testen'.

Aan beide Omnis toestellen wordt een kleur toegewezen (blauw en groen) met elk hun eigen set reagentia. De blauwe Omnis heeft het volledig aanbod aan antistof reagens, de groene Omnis heeft een beperkte reeks antistof reagens.

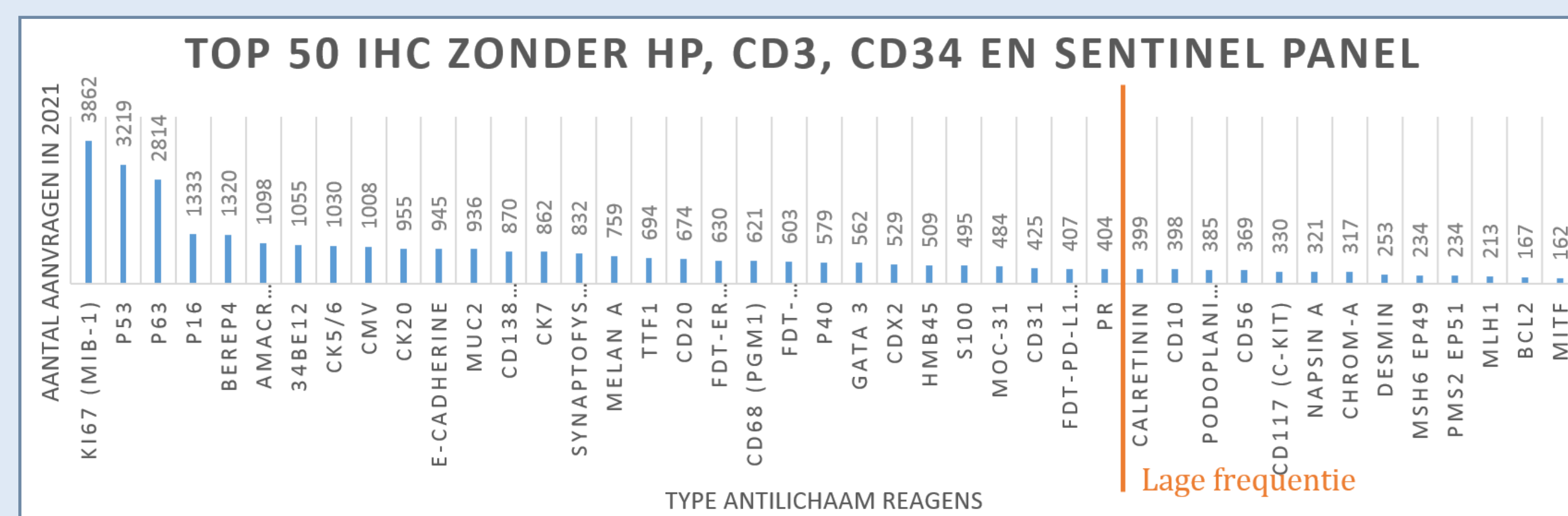
## Resultaten

Uit het jaartotaal blijkt dat er in 2021 51.914 IHC kleuringen werden aangevraagd. De meest aangevraagde kleuringen zijn HP, Ki-67, AE1/AE3, p53 en CD3.



Figuur 2: Top 50 aangevraagde immunohistochemische kleuringen in 2021

Wanneer HP, CD3, CD34 en 'sentinel' panel samen met de beter presterende kleuringen enkel op de Dako Autostainer worden gezet en vermeden worden op de Dako Omnis, zouden er op de Omnis 17.618 minder aanvragen per jaar komen. Dit zijn gemiddeld 63 testen minder per dag. Dit verschil houdt meer plaats over voor kleuringen met lage frequentie. Op basis van deze grafiek wordt een vast panel samengesteld.



Figuur 3: Top 50 aangevraagde immunohistochemische kleuringen in 2021 met grens van lage frequentie (zonder HP, CD3, CD34 en 'sentinel panel')

De top 30 wordt nu standaard geladen op de groene Dako Omnis, de top 20 wordt geladen op blauwe Dako Omnis. Dit laat in totaal 50 plaatsen over voor specifieke antistoffen. De zeldzaamste kleuringen worden op de blauwe Dako Omnis geladen.

## Conclusie

Voor optimalisatie wordt geopteerd voor een vaste verdeling van primaire antistof reagens over de verschillende kleurtoestellen voor de gevraagde IHC kleuringen. Het vaste panel voor beide, per kleur verdeelde, Dako Omnis toestellen wordt als volgt ingesteld.

Table 1: vast reagens panel van primaire antilichamen voor immunohistochemische kleuringen voor blauwe Dako Omnis

	1	2	3	4	5	6
A	EnvSub	Ki67	E Cad			
B	EnvPerox	P53	Muc2			
C	HTX	P63	CD138			
D	EnvDAB+	P16	CK7			
E	SulfAcid	BEREP4	SYN			
F	EnvHRP	AMACR	MELA			
G	EnvMLink	34BE12	TTF1			
H	EnvRlink	CK5/6	CD20			
I	EXTRA REAGENS	CMV	FDT-ER			
J	EXTRA REAGENS	CK20	CD68			

Oranje vak = vrije plaats voor reagentia met lage aanvraag frequentie

Table 2: vast reagens panel van primaire antilichamen voor immunohistochemische kleuringen voor groene Dako Omnis

	1	2	3	4	5	6
A	EnvSub	Ki67	E Cad	FDT		
B	EnvPerox	P53	Muc2	P40		
C	HTX	P63	CD138	GATA3		
D	EnvDAB+	P16	CK7	CDX2		
E	SulfAcid	BEREP4	SYN	HMB45		
F	EnvHRP	AMACR	MELA	S100		
G	EnvMLink	34BE12	TTF1	MOC31		
H	EnvRlink	CK5/6	CD20	CD31		
I	EXTRA REAGENS	CMV	FDT-ER	PDL1		
J	EXTRA REAGENS	CK20	CD68	PR		

Oranje vak = vrije plaats voor reagentia met lage aanvraag frequentie

Rood vak = lage OBT, enkel voormiddag