

Ine Elise Steinbakken og Tonje Skaaland

## **Optimalisering av protokoll for immunhistokjemisk farging med anti-SOX10**

## **Optimization of protocol for immunohistochemical staining with anti-SOX10**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Jostein Halgunset

Mai 2019



Ine Elise Steinbakken og Tonje Skaaland

# **Optimalisering av protokoll for immunhistokjemisk farging med anti-SOX10**

## **Optimization of protocol for immunohistochemical staining with anti-SOX10**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Jostein Halgunset  
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioingeniørfag





## Forord

Denne oppgaven er gitt av Institutt for bioingeniørfag, Fakultet for naturvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, og er utført ved Enhet for immunhistokjemi, Avdeling for patologi ved St Olavs hospital.

Vi vil takke Spesialbioingeniør ved Enhet for immunhistokjemi, avdeling for patologi på St. Olavs hospital Lise Eid Wålberg for veiledning, opplæring, støtte og hjelp.

Takk til Professor i morfologi, Overlege i patologi ved St. Olavs hospital Jostein Halgunset for god veiledning gjennom prosjektet.

Vi vil også takke Overlege ved Avdeling for patologi, St Olavs hospital Tor Vikan Rise for konsultasjoner og for teoriehjelp under prosjektet.

Takk til Oda Torbjørnsen, Tor Erik Skaaland og Stian Krabbe for grammatisk og strukturell veiledning.

En siste takk går til alle ansatte ved Enhet for immunhistokjemi, Avdeling for patologi, St. Olavs hospital for hjelp og veiledning under laboratoriearbeidet.

## Sammendrag

Denne oppgaven er utført som et avsluttende prosjekt for bioingeniørutdanningen ved Institutt for bioingeniørfag, Fakultet for naturvitenskap, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Det praktiske laboratoriearbeidet i oppgaven innebar utprøving og optimalisering av protokoll for den immunhistokjemiske fargeanalysen med anti-SOX10. Utprøvingen utføres for at fargeanalysen skal kunne innføres i rutinediagnostikken ved Enhet for immunhistokjemi, Avdeling for patologi, St Olavs hospital.

Fargeanalysen ble utprøvd med forskjellige parametere for å bestemme hva som gir optimal fargekvalitet for anti-SOX10, og disse parameterne innebar valg av reagens og forskjellig forbehandlingstid. Det ble gjort ved bruk av et "Ready to use"-reagens og et konsentrat i ulike fortynninger. I tillegg ble analysen også utprøvd med flere variabler i form av varierende forbehandlingstid og tilleggs-trinn. Deretter ble den optimale protokollen etterprøvd ved å benytte en rekke vevspreparater med ulike diagnoser hvor det forventes både positive og negative resultat.

Under utprøvingen ble det vurdert at RTU-reagenset og konsentrat-fortynningen 1:50 ga best fargerresultat. Ettersom det er mer kostnadseffektivt å benytte RTU-reagenset, og dette reagenset gir gode fargerresultat, anses dette som det optimale reagenset for fargeanalysen. Det ble ikke observert noen nevneverdig reduisering i bakgrunnsfarge ved bruk av tilleggs-trinnene som hadde som hensikt å redusere bakgrunnsfarge. Det var heller ingen betydelig forskjell i fargerresultatet mellom de to ulike forbehandlingstidene ved vurdering av fargekvalitet. På grunnlag av dette ble det besluttet å benytte forbehandlingstiden på 32 minutter. Ved etterprøvingen av optimert protokoll var samtlige resultater og kontroller av god kvalitet, og ga forventet resultat.

Det ble konkludert at den optimale protokollen for immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 er å benytte RTU-reagenset med antistoffklon SP267, med en forbehandlingstid på 32 minutter og uten tilleggs-trinn, altså protokoll 1.

## Abstract

This thesis is completed as a final project for the Biomedical Laboratory Scientist education program at Department of Biomedical Laboratory Science, Faculty of Natural Sciences, Norwegian University of Science and Technology. The practical laboratory task in this thesis includes trials and optimization of the protocol for the immunohistochemical staining analysis with anti-SOX10. The task is performed in order to adopt the analysis as part of the routine diagnostics at Unit for Immunohistochemistry, Department of Pathology, St Olavs hospital.

The staining analysis was tested with several different parameters in order to achieve the optimized staining quality for anti-SOX10, such as which reagents were to be used and what length of pre-treatment time was to be used. This was done by using a “Ready to use”-reagent, and a concentrate in various dilutions. In addition, other variables were tested, including various lengths of pre-treatment time and different additional steps. Accordingly, the optimized protocol was verified by the usage of numerous tissue samples with various diagnoses where it is expected to be both positive and negative staining results.

During the trials it was evaluated that by usage of the RTU-reagent and the concentrate with the dilution of 1:50 gave the best staining result. Since the RTU-reagent is most cost effective it is therefore considered that this reagent is the best reagent for this analysis. There was not observed any mentionable reduction in background staining by usage of the different additional steps, which purpose it is to reduce this background staining. There was no significant difference for the staining quality when it came to the duration of the two different pretreatment times. Because of this, and the question of price, it was decided to make use of the pretreatment duration of 32 minutes. When the optimized protocol was verified all the staining results of the controls were of good quality and had their expected results.

In conclusion, the optimized protocol for immunohistochemical staining with anti-SOX10 is with usage of the RTU-reagent with the antibody-clone SP267, the pretreatment duration of 32 minutes, and no additional steps, accordingly protocol 1.

# Innholdsfortegnelse

FORORD.....	I
SAMMENDRAG .....	II
ABSTRACT.....	III
INNHALDSFORTEGNELSE .....	IV
1. INNLEDNING .....	1
1.1 BEGREPSAVKLARING.....	1
1.2 TUMORDIAGNOSTIKK .....	1
1.3 ENHET FOR IMMUNHISTOKJEMI.....	1
1.4 IMPLEMENTERING I LABORATORIET.....	2
1.5 OM SOX10 .....	2
1.5.1 <i>Transkripsjonsfaktoren SOX10</i> .....	2
1.5.2 <i>Reagenser for anti-SOX10</i> .....	3
1.6 HISTOLOGI I NORMALVEV SOM UTTRYKKER TRANSKRIPSJONSAKTØREN SOX10 .....	4
1.6.1 <i>Hud</i> .....	4
1.6.2 <i>Kolon</i> .....	5
1.7 DIAGNOSTIKK.....	6
1.7.1 <i>Malignt melanom</i> .....	6
1.7.3 <i>Schwannom og meningeom</i> .....	6
1.8 EKSISTERENDE ANALYSER FOR AKTUELLE KASUS .....	7
1.8.1 <i>S100</i> .....	7
1.8.2 <i>Melan-A</i> .....	7
1.8.3 <i>HMB45</i> .....	8
1.9 PROBLEMSTILLING .....	8
2. MATERIALE OG METODE .....	9
2.1 PRØVEMATERIALE.....	9
2.2 KONTROLL.....	9
2.3 UTSTYR.....	10
2.4 REAGENSER .....	10
2.5 PRINSIPP.....	10
2.5.1 <i>Fiksering</i> .....	10
2.5.2 <i>Forbehandling</i> .....	10
2.5.3 <i>Visualisering</i> .....	11
2.5.4 <i>Eliminering av bakgrunnsfarge</i> .....	12
2.6 FREMGANGSMÅTE.....	12
2.6.1 <i>Preparatfremstilling</i> .....	13
2.6.2 <i>Farging med konsentrat-fortynning</i> .....	13
2.6.3 <i>Etterbehandling</i> .....	14
2.6.4 <i>Optimalisering av protokoll</i> .....	14
2.6.5 <i>Etterprøving av optimert protokoll</i> .....	15
3. RESULTATER .....	16

3.1 KONTROLL.....	16
3.2 FØRSTE UTPRØVNINGSRUNDE .....	16
3.3 ANDRE UTPRØVNINGSRUNDE.....	19
3.4 TREDJE UTPRØVNINGSRUNDE.....	20
3.5 ETTERPRØVING AV OPTIMERT PROTOKOLL .....	22
4. DISKUSJON.....	24
4.1 KONTROLL.....	24
4.2 PRØVEMATERIALE.....	24
4.3 KOSTNADSEFFEKTIVITET .....	25
4.4 ANTISTOFFETS NØYAKTIGHET OG ROBUSTHET .....	25
4.5 NYTTEVERDI .....	26
4.6 KONKLUSJON.....	27
5. REFERANSER .....	28
6. VEDLEGG.....	30
6.1 VEDLEGG 1: FARGERESULTATER VED FØRSTE UTPRØVINGSRUNDE .....	31
6.2 VEDLEGG 2: FARGERESULTATER VED ANDRE UTPRØVINGSRUNDE.....	35
6.3 VEDLEGG 3: FARGERESULTATER VED TREDJE UTPRØVINGSRUNDE.....	36
6.4 VEDLEGG 4: FARGERESULTATER VED ETTERPRØVNING AV OPTIMERT PROTOKOLL .....	41
6.5 VEDLEGG 5: IMMUNHISTOKJEMI - UTPRØVING OG VALIDERING AV PRIMÆRANTISTOFF .....	42

## 1. Innledning

### 1.1 Begrepsavklaring

[1] SNOMED: Internasjonalt system for standardisert klinisk terminologi. Utviklet med hensikt om å skape en detaljert og strukturert dokumentasjon av pasientrelaterte data på tvers av ulike systemer (1). SNOMED benytter seg av kodene T-nummer og M-nummer, som henholdsvis representerer topografi og morfologi.

[2] SymPathy: Laboratoriedatasystem som brukes ved Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Her registreres og lagres all informasjon om prøver som behandles ved avdelingen.

[3] NordiQC: “Nordic immunohistochemical Quality Control” er en internasjonal kvalitetssikringsorganisasjon for immunhistokjemiske fargeanalyser. Organisasjonen tilbyr forslag til protokoller, vevskontroller og videre relevant informasjon om betingelser rundt immunhistokjemiske fargeanalyser til laboratorier. NordiQC er akkreditert etter ISO 15189 (2).

### 1.2 Tumordiagnostikk

Immunhistokjemi er en histologisk fargeteknikk som visualiserer spesifikke vevskomponenter i vevsprøver ved hjelp av antistoff. Teknikken er særs nyttig ved klassifisering og diagnostisering av ulike tumorer, og den har derfor fått en viktig rolle i dagens histologiske tumordiagnostikk. Immunhistokjemisk farging påviser antigener som er spesifikke for vevet tumoren har utgått fra, eller antigener som uttrykkes av kjente kreftcelletyper. Stadig flere måter å påvise ulike antigener gjør det enklere for patologer å diagnostisere et bredt spekter av tumorer. Påvisning av ulike antigener utføres ved å benytte antistoffer som har spesifikk binding til antigenene, og en metode som visualiserer antigen-antistoff-bindingen.

### 1.3 Enhet for immunhistokjemi

Enhet for immunhistokjemi er en del av Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Enheten har i dag rundt 160 immunhistokjemiske undersøkelser på repertoaret (3). Til sammen har enheten fem automatiserte immunhistokjemiske fargeinstrumenter, alle av typen BenchMark Ultra fra Ventana.

## 1.4 Implementering i laboratoriet

Immunhistokjemi er et felt under rask utvikling, og det tas stadig i bruk nye antistoffer i laboratoriet. Når laboratoriet implementerer nye antistoffer må antistoffene utprøves først. Utprøvingen innebærer at protokollen for immunhistokjemisk fargning med det nye antistoffet optimaliseres spesifikt for dette laboratoriet. Optimalisering gjøres for å innstille fargeanalysen med de parameterne som gir best mulig fargekvalitet, og som samsvarer med anbefalinger fra NordiQC [3] og ansvarlig lege. De ulike parameterne innebærer valg av antistoffklon, valg av forbehandling av preparatet og konsentrasjon av primærantistoff (4).

Monoklonale antistoff blir produsert ved å immunisere dyr, for eksempel kaniner. Etter immunisering hentes det ut B-celler fra den immuniserte kaninen, og cellene dyrkes videre i laboratoriet for produksjon av det ønskede antistoffet. B-cellene som hentes ut gir opphav til unike cellelinjer, og det er disse cellelinjene som avgjør hvilken klon antistoffet er. Valg av antistoffklon påvirker den immunhistokjemiske fargingens nøyaktighet og robusthet. Nøyaktighet er et mål på hvor godt antistoffet er til å påvise akkurat den epitopen som ønskes visualisert, og sier noe om antistoffet spesifisitet (4). Robusthet indikerer hvor mye variasjon som kan forventes i resultatet grunnet ytre faktorer. Dette vurderes ut ifra hvor sensitiv fargingen er og hvor mange av de antigene-strukturene i vevet som blir visualisert av immunhistokjemisk farging (4).

Når den optimerte protokollen for immunhistokjemisk farging med nytt antistoff er tilpasset laboratoriet må den etterprøves. Etterprøving gjøres for å forsikre at den optimerte protokollen er egnet for diagnostisk bruk ved laboratoriet, og utføres ved å farge ulike typer vev og diagnoser med den optimerte protokollen. Diagnosene som benyttes har ulik grad av ekspresjon av epitopen som den immunhistokjemiske fargeanalysen visualiserer. På denne måten kan det stadfestes om fargeanalysen er nøyaktig og robust for forskjellige typer prøvemateriale, og at analysen er egnet til å synliggjøre også svakt positive resultater (4).

## 1.5 Om SOX10

### 1.5.1 Transkripsjonsfaktoren SOX10

“Sry-related HMG-Box gene 10”, forkortet til SOX10, inngår i en familie av transkripsjonsfaktorer kalt SOX. Denne familien er viktig for dannelsen av vev og organer i fosterstadiet (5). Spesifikt har transkripsjonsfaktoren SOX10 en essensiell rolle for dannelse

og overlevelse av schwannske celler og melanocytter. Transkripsjonsfaktoren SOX10 finnes i kjernen til schwannske celler ved perifere nerveceller, i kjernen til melanocytter i hud, og kjernen til i myoepitelceller i svette- og spyttkjertler (6). Transkripsjonsfaktoren SOX10 finnes også i normal tarm, som en del av nervene i det enteriske nervesystemet. I tumorer som utgår fra celler som normalt uttrykker transkripsjonsfaktoren SOX10, vil det bli uttrykt den samme transkripsjonsfaktoren. Sådant muliggjøres diagnostisering av tumorer bestående av SOX10-positive celler ved bruk av immunhistokjemisk farging med anti-SOX10.

### 1.5.2 Reagenser for anti-SOX10

NordiQC har gjennomført en undersøkelse som tar for seg hvilket anti-SOX10 klon som har best spesifisitet ved immunhistokjemisk farging av transkripsjonsfaktoren SOX10. I denne undersøkelsen viste det seg at de monoklonale antistoffklonene SP267 og EP268 var blant de antistoffene med best spesifisitet (7).

Anti-SOX10 klon SP267 er produsert som et “ready to use”-reagens, som heretter er forkortet til RTU. RTU-reagenset er laget spesifikt for farging på Benchmark Ultra med “OptiView DAB IHC Detection Kit” fra Ventana som deteksjonskit (avsnitt 2.5.3). Anti-SOX10 klon EP268 er et konsentrat, som er laget slik at det kan benyttes ved flere systemer og i flere konsentrasjoner. Dette muliggjør at laboratorier som ikke benytter BenchMark Ultra og “OptiView DAB IHC Detection Kit” i sin diagnostikk kan bruke dette antistoffet.

Produsenten av antistoffet anbefaler å benytte konsentratet i en fortytning mellom 1:50 og 1:200 (8). Samlet kostnad for immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 ved hjelp av “OptiView DAB IHC Detection Kit” på BenchMark Ultra er 89,41 kroner for RTU-reagenset, og 163,83 kroner og 78,16 kroner for henholdsvis konsentratet med fortytningen 1:50 og 1:200.

Under utprøving av nytt antistoff der et konsentrat blir benyttet, bør det etableres en “cut-off”-grense. Dette er en grense som sier noe om ved hvilken antistoffkonsentrasjon et fargerresultat kan bli tolket som negativt selv om det er positive celler tilstede i vevet. “Cut-off”-grensen etableres ved å fortynne konsentratet så mye at det blir vanskelig å skille positivt og negativt fargede celler under mikroskopering. Fortyningene for konsentratet lages med fortynningsløsningen, “Antibody Diluent” ved hjelp av Fortynningsformelen (formel 1). Fortynningsformelen viser at stoffmengden av oppløst stoff er lik før og etter fortytning.

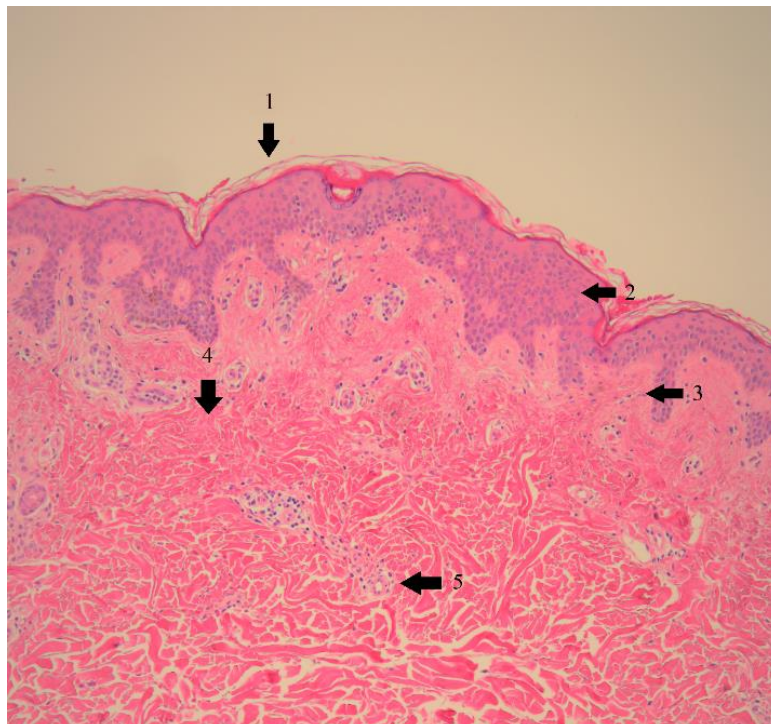
$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (1)$$



## 1.6 Histologi i normalvev som uttrykker transkripsjonsfaktoren SOX10

### 1.6.1 Hud

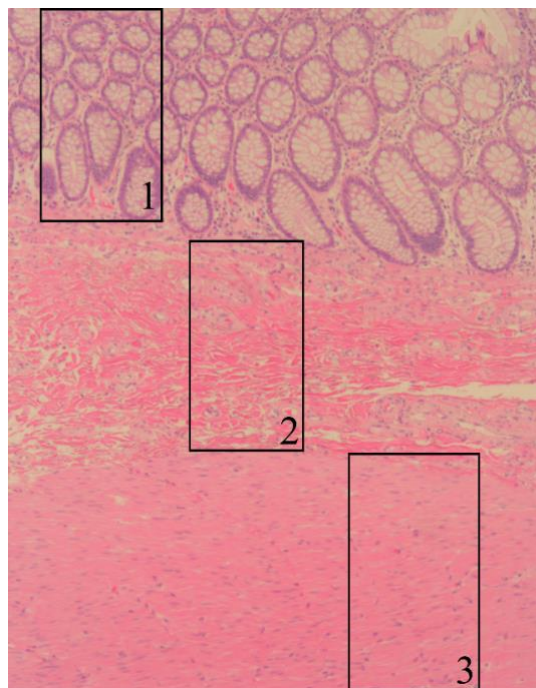
Huden, cutis, dekker kroppens ytre overflate og er kroppens største organ. Dens oppgave er blant annet å beskytte kroppen mot ytre påvirkninger, samt å regulere kroppstemperaturen. Huden er bygd opp av to lag, epidermis og dermis. Epidermis er et flerlaget epitel. Nederst er et basallag med basalceller, deretter tornlaget, så kornlaget og øverst ligger hornlaget. Når basalcellene gjennomgår mitose vil noen av cellene skyves opp mot overflaten og danne det flerlagete plateepitelet. Under utskyvningen modnes cellene, og de vil samtidig produsere kreatin. De ytterste cellelagene i epidermis består av døde, forhornete, keratiniserte celler (se figur 1). I det basale cellelaget i epidermis er det også melanocytter. Melanocytter er celler som danner pigmentet melanin og cellene finnes primært i huden. En tumoraktig ansamling av melanocytter i epidermis kalles nevus, eller på folkemunne: føflekk. Dermis er et fibrøst bindevev som ligger under epidermis (figur 1) og som inneholder blod- og lymfeårer, nervevev, hårsekker og talg- og svettekjertler. I kjertlene finnes blant annet myoepitel-celler (figur 1). Disse kan kontrahere for å skille ut sekret fra kjertelen. Kjertlene kan strekke seg ned til subcutis. Subcutis ligger under dermis, og består av løst fibret bindevev og fettvev (9).



*Figur 1: HE-farget preparat av normal hud, 1: Døde keratiniserte celler, 2: Epidermis, 3: Dermis, 4: Subcutis med fettvev og 5: Svettekjertel*

### 1.6.2 Kolon

Tykkertarmen, kolon, deles inn i fire avsnitt, den oppadstigende-, den tverrgående- og den nedstigende tykkertarmen, samt den S-formede delen. Disse partiene har likt utseende histologisk. Lagene som utgjør tarmen benevnes som mucosa, submucosa, muscularis og serosa (figur 2). Mucosa består av et epitellag, et bindevevslag og et tynt lag med glatt muskulatur. Epitelcellene er enlaget sylinderepitel. Epitelet folder seg slik at det dannes krypter mot lumen, og hvor det finnes begerceller som produserer et slim som smører tarmveggene (10). Bindevevslaget utenfor epitellaget inneholder kapillærer, nervefibrer, lymfevev og lymfeårer. Det tynne muskellaget som utgjør en del av mucosa ligger utenfor bindevevslaget. Utenfor mucosa er det et tykkere lag med løst bindevev som kalles submucosa (figur 2). Her er det blod- og lymfeårer som henger sammen med kapillærer inn i mucosa, hvor det også finnes nerveceller. Utenfor submucosa ligger det to muskellag, kalt muscularis (figur 2). Disse musklene har som oppgave å transportere tarminnholdet gjennom kanalen. Ytterst, i deler av tarmveggen ligger serosa. Serosa består av et tynt bindevevslag som er dekket av enlaget plateepitel (9). Nerver som er ledsaget av schwannske celler befinner seg i samtlige lag i tykkertarmen. De schwannske cellene ligger både spredt rundt i mucosa og submucosa og ved nervecellene som danner et nervelag mellom de to muskellagene i muscularis.



Figur 2: HE-farget preparat av normal kolon, 1: Mucosa, 2: Submucosa og 3: Del av muscularis

## 1.7 Diagnostikk

### 1.7.1 Malignt melanom

Malignt melanom er en malign tumor som vanligvis utgår fra melanocytter i huden, enten fra enkeltceller lokalisert i basallaget i epidermis, eller fra en eksisterende, godartet nevus (11).

Av alle typer tumorer som kan oppstå i hud er malignt melanom den mest dødelige (12).

Malignt melanom kan på diagnosetidspunktet være *in situ* eller invasiv. Ved *in situ* melanom befinner tumorcellene seg i epidermis, mens ved invasiv melanom strekker de seg helt ned i dermis, eller dypere (11). Mikroskopisk ses melanom som ansamlinger av irregulære melanocytter, enten i epidermis eller i både dermis og epidermis (13). De neoplastiske cellene er atypiske og pleomorfe, med store uregelmessige kjerner og tydelige nukleoler.

Tumorcellene kan være epiteloide eller spoleformede. Epiteloide celler er store, runde eller polygonale celler med mye eosinofilt cytoplasma (14). De spoleformede cellene har fått sitt navn fra deres karakteristiske form (10).

### 1.7.3 Schwannom og meningeom

Schwannom og meningeom er tumorer det kun påvises få tilfeller av i Norge hvert år. I følge SymPathy [2] var det under 40 tilfeller av schwannom og meningeom påvist ved St. Olavs hospital i 2018. Schwannom er vanligvis en benign tumor som består av neoplastiske schwannske celler i det perifere nervesystemet (12). Histologisk vil schwannom arte seg som en blanding av to vekstmønstre, hvor det ene mønsteret har høy celletetthet og det andre har lavere celletetthet (15). Meningeom er som oftest en benign tumor, som oppstår fra meningoteliale celler i hjernebinnen, altså i det sentrale nervesystemet (12). Histologisk kan meningeom sees som tumor med lappeformet struktur hvor cellene ofte sees i "virvler" (16). Schwannom oppstår vanligvis ekstrakranielt, og meningeom intrakranielt. Schwannom kan også i noen tilfeller oppstå intrakranielt dersom tumoren utgår fra proksimal del av de perifere nervene.

## 1.8 Eksisterende analyser for aktuelle kasus

Ved Enhet for immunhistokjemi, St. Olavs hospital, brukes det per dags dato flere analyser for å diagnostisere malignt melanom og schwannom. For å påvise malignt melanom kan immunhistokjemisk farging med anti-S100, anti-melan-A og HMB45 benyttes. Man kan påvise schwannom ved hjelp av farging med anti-S100. Overlege ved Avdeling for patologi ønsker å innføre farging med anti-SOX10 i tillegg til de førnevnte analysene, da SOX10 er en sikker analyse for diagnostisering av malignt melanom, og til differensiering mellom schwannom og meningeom.

### 1.8.1 S100

S100-protein er betegnelsen på en gruppe proteiner som er kalsiumbindende. Deres felles funksjon er ukjent, men proteinene deltar i en rekke cellulære prosesser. Celler som normalt inneholder S100-proteiner er melanocytter, schwannske celler og langerhanske celler, og S100-proteiner uttrykkes vanligvis i tumorer som utgår fra disse cellene. I tillegg er S100-proteinene ofte knyttet til utviklingen av visse krefttyper, slik at tumorer som utgår fra vev som normalt ikke uttrykker S100-proteiner likevel uttrykker S100-proteiner. (17).

I tilnærmet alle tilfeller vil malignt melanom og schwannom uttrykke S100-protein (18). Ved noen tilfeller kan anti-S100 farge metastaser av malignt melanom dårligere enn ved primærtumorer. I tillegg er anti-S100 en dårlig analyse for å skille mellom schwannom og meningeom da opptil 20-30% av meningeomer også uttrykker S100-protein og gir positiv reaksjon ved immunhistokjemisk farging med anti-S100 i form av cytoplasmafarge (6).

### 1.8.2 Melan-A

Proteinet melan-A er et melanocytært differensieringsantigen med ukjent biologisk funksjon. Dette proteinet uttrykkes i normale melanocytter og i 80-100% av maligne melanomer (18). Dermed kan man benytte seg av immunhistokjemisk farging med anti-melan-A til undersøkelser av primærtumorer og ved diagnostisering av metastaser fra malignt melanom. Undersøkelser utført for NordiQC viser derimot at immunhistokjemisk cytoplasmafarging med anti-Melan-A på metastaser fra malignt melanom kan gi dårlig fargekvalitet. Dette skyldes at tumor kan endre egenskaper når det metastaserer, og dette kan resultere i en reduksjon eller endring i de uttrykte antigenene. Fargede metastaser med færre og/eller endrede epitoper kan dermed tolkes som negative. Immunhistokjemisk farging med anti-Melan-A er mer spesifikk enn farging med anti-S100 og blir derfor ofte benyttet ved diagnostikk av malignt melanom (19).

### 1.8.3 HMB45

“Human Melanoma Black”, HMB45, er et monoklonalt antistoff som binder seg til melanosoms spesifikk antigen, MSA i cytoplasma (20). MSA er tilstede i pigmenterte tumorer, slik som malignt melanom. Normale melanocytter er HMB45 negative. HMB45 gir spesifikk og sensitiv påvisning av melanocytære tumorer, dette ved omtrent 95% av alle tilfeller, og ved 60-80% av alle tilfeller av metastaser fra malignt melanom (21).

## 1.9 Problemstilling

Forskning tyder på at immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 er en god analyse for å diagnostisere malignt melanom, samt å differensiere mellom schwannom og meningeom. I denne oppgaven skal vi optimalisere betingelsene for implementering av immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 til rutinediagnostikk. Problemstillingen for oppgaven er: *Ved hvilke parametere vil immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 gi optimal fargekvalitet ved Enhet for immunhistokjemi, St. Olavs hospital?*

## 2. Materiale og metode

### 2.1 Prøvemateriale

For immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 anbefales det å benytte formalinfiksert, parafininnstøpt vev (22). Prøvematerialet ble funnet frem ved hjelp av SNOMED-koder [1] i SymPathy. Deretter ble blokkene hentet fra arkiv og vurdert etter hvorvidt de inneholdt nok materiale for utprøvingen. Det ble benyttet flere prøver med samme diagnose, men fra ulike pasienter (tabell 1).

Tabell 1: Benyttede prøver til utprøving

<b>Prøve-identifikasjon</b>	<b>Vev</b>	<b>Prøve-identifikasjon</b>	<b>Vev</b>
<b>1</b>	Hud + nevus	<b>12</b>	Paragangliom
<b>2</b>	Colon	<b>13</b>	Pleomorft adenom
<b>3</b>	Malignt melanom (metastase)	<b>14</b>	Pleomorft adenom
<b>4</b>	Schwannom	<b>15</b>	Nevroblastom
<b>5</b>	Hud + nevus	<b>16</b>	Nevroblastom
<b>6</b>	Hud + nevus	<b>17</b>	Synovialt sarkom
<b>7</b>	Malignt melanom (metastase)	<b>18</b>	Synovialt sarkom
<b>8</b>	Malignt melanom (metastase)	<b>19</b>	Ewing sarkom
<b>9</b>	Meningeom	<b>20</b>	Colon
<b>10</b>	Meningeom	<b>21</b>	Schwannom
<b>11</b>	Paragangliom	<b>22</b>	Schwannom

### 2.2 Kontroll

Under utprøvingen ble kontrollblokken Mb2 benyttet. Mb2 er en “Multitissue”-blokk som inneholder kjent materiale av lymfeknute med metastase fra malignt melanom, normal thyroidea, normal nyrebark og et papillært adenokarsinom i thyroidea.

## 2.3 Utstyr

- BenchMark Ultra, fra Ventana
- Mikrotom RM 2255, fra Leica
- Superfrost Objektglass, fra Thermo Scientific
- Oppleggsinstrument MicromCTM6 Cover Tek, fra Thermo Scientific
- Standard laboratorieutstyr ved Avdeling for patologi

## 2.4 Reagenser

- Anti-SOX10 SP267, fra Cell Marque
- Anti-SOX10 EP268, fra Cell Marque
- “Antibody Diluent”, fra Ventana
- “Antibody Diluent with Casein”, fra Ventana
- “OptiView DAB IHC Detection Kit”, fra Ventana
- Standard reagenser ved Enhet for immunhistokjemi

## 2.5 Prinsipp

### 2.5.1 Fiksering

Formalinfiksering er en gelerende fiksering som hindrer autolyse og forråtnelse av vevet, og denne typen fiksering bevarer vevets struktur, altså dets cellulære morfologi. Ved fiksering danner formalin bindinger med proteiner og nukleinsyrer i vevet for deretter å indusere kovalente kryssbindinger (23). Vevets proteiner danner flere ulike epitoper, og dermed blir epitopene maskert under denne type fiksering og den antistoffbindende aktiviteten i vevet blir gjort utilgjengelig (18). Dette gjør formalin til et godt fiksativ for immunhistokjemisk farging, fordi denne teknikken baserer seg på å visualisere de antistoffbindende strukturene.

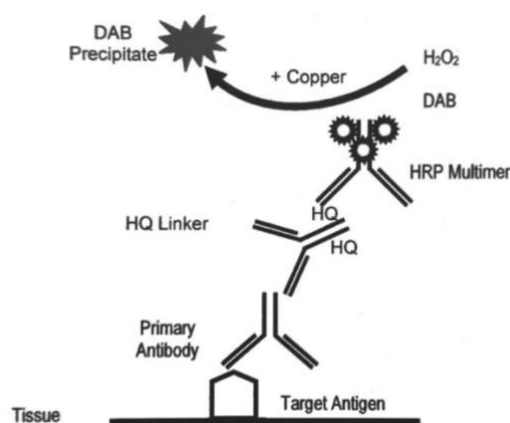
### 2.5.2 Forbehandling

Under forbehandling klargjøres vevet for immunhistokjemisk farging. Epitopene blir demaskert, og den antistoffbindende aktiviteten blir gjort tilgjengelig ved at de kovalente kryssbindingene som ble dannet under fikseringen brytes. På denne måten kan antistoffet bindes til epitopet og deretter bli visualisert. “Heat Induced Epitope Retrieval” forkortes til HIER, og er en forbehandlingsmetode som er utviklet for å demaskere formalinfiksert vev.

Under HIER vil en buffer kalt, “Cell Conditioner 1”, ved høy temperatur bryte kovalente bindinger (24). Denne prosessen kan under noen omstendigheter virke ødeleggende på vevet, spesielt for utilstrekkelig fiksert hud- og fettvev. I slike situasjoner har vevet blitt overbehandlet og det er en risiko for at den reelle vevsstrukturen ikke blir synlig. Lengden på forbehandlingen optimaliseres ved utprøving.

### 2.5.3 Visualisering

“OptiView DAB IHC detection kit” er et deteksjonskit som benytter en indirekte immunhistokjemisk fargemetode, og som fungerer i fem trinn. I første trinn benyttes en peroksidase-inhibitor som tilsettes før primærantistoffet. Peroksidase inhibatoren vil blokkere endogen aktivitet i vevet. I trinn to tilføres primærantistoffet enten via RTU-reagenset eller konsentrat-fortynning, hvor primærantistoffet binder seg til mål-epitopene, transkripsjonsfaktoren SOX10. Deretter i trinn tre tilføres et sekundærantistoff kalt “HQ linker” som vil binde seg til primærantistoffet (figur 3). I trinn fire vil “HRP Multimer” som er et enzymkonjugert tertiærantistoff binde seg til sekundærantistoffet, ettersom disse har affinitet til hverandre. Fargeutvikling foregår i trinn fem ved hjelp av enzymet HRP. Kromogenet 3,3'-Diaminobenzidin (tetrahydroklorid), heretter forkortet til DAB, og har ikke en naturlig egenfarge (figur 3) (25). DAB vil i kombinasjon med hydrogenperoksid,  $H_2O_2$ , og kobber omdannes til et brunt presipitat ved hjelp av pepperrotperoksidase, HRP. Alle cellene som uttrykker transkripsjonsfaktoren SOX10, og som har bundet anti-SOX10, vil markeres med en brun kjernefarge.



Figur 3: Prinsippet for visualisering ved bruk av “OptiView DAB IHC Detection Kit” (25)



#### 2.5.4 Eliminering av bakgrunnsfarge

Etter forbehandling er det ikke bare den ønskede antigene strukturen som har blitt demaskert, men også endogen aktivitet og andre epitoper. Endogen aktivitet kan sammen med DAB og HRP danne bakgrunnsfarge ved mikroskopering, og kan elimineres ved bruk av peroksidase-inhibitor (18). Andre epitoper kan være lik epitopen antistoffet er spesifikt for, og på denne måten danne antistoff-antigenbindinger i vevet som oppfattes som bakgrunnsfarge.

Eliminering av bakgrunnsfarge grunnet andre epitoper elimineres ved hjelp av et reagens som inneholder et protein, casein, som kan binde seg til andre epitoper og dermed blokkere disse. Dette reagenset heter "Antibody Diluent with Casein". Dette er prinsippet som ligger til rette for tilleggs-trinnet Casein som er benyttet under utprøvingen. Bakgrunnsfargen kan også elimineres ved å tilsette fortynnet konsentrasjon av sekundær- og tertiærantistoff slik at kun målepitopet visualiseres. Dette prinsippet benytter tilleggs-trinnet Fortynning under utprøvingen. Begge disse metodene vil hindre at antistoffet binder seg til noe annet enn den mente antigene strukturen og dermed også eliminere bakgrunnsfarge i vevspreparatet.

#### 2.6 Fremgangsmåte

Ved optimalisering av protokoll for immunhistokjemisk fargning med anti-SOX10 ble antistoffene utprøvd med forskjellige parametere i flere utprøvningsrunder og ulikt prøvemateriale. Parametere ble utprøvd ved hjelp av ulike protokoller og forbehandlingsmetoden HIER, og parametere innebar som følgende: to ulike antistoffreagenser, kort og lang forbehandlingstid, forskjellige konsentrat-fortynninger og bruk av tilleggs-trinn (tabell 2). De ulike protokollene ble opprettet etter fremgangsmåte i prosedyren "Immunhistokjemi - Utprøving og validering av primærantistoff" (vedlegg 5).

Tabell 2: Protokoller med forskjellige parametere

Protokoll	Reagens	Forbehandlingstid	Tilleggs-trinn
1	SP267 – RTU	32 minutter	-
2	SP267 – RTU	64 minutter	-
3	EP268 – Konsentrat	32 minutter	-
4	EP268 – Konsentrat	64 minutter	-
5	SP267 – RTU	32 minutter	Fortynning
6	SP267 – RTU	64 minutter	Fortynning
7	SP267 – RTU	32 minutter	Casein
8	SP267 – RTU	64 minutter	Casein

### 2.6.1 Preparatfremstilling

Første steg ved hver utprøvningsrunde var å skrive ut en spesifikk etikett for hvert preparat av prøvene med protokollene som skulle utprøves. Etiketten ble deretter festet til superfrost objektglass der snitt av Mb2-kontrollen allerede var festet på objektglasset. Superfrost objektglass er spesialglass som benyttes ved immunhistokjemi, fordi det har egenskaper som gjør at vevet fester seg bedre til objektglasset. Preparatene ble så snittet på en mikrotom som var innstilt til en tykkelse på 3,0 µm. Fra mikrotomet ble snittene overført til et vannbad med en temperatur mellom 42 og 44 grader, før snittene ble overført til superfrost objektglass med allerede tilfestet kontrollsnitt. Deretter ble preparatene bakt i varmeskap ved en temperatur på 60 grader i en time før de ble farget på instrumentet.

### 2.6.2 Farging med konsentrat-fortynning

Det ble laget ulike fortynninger av konsentratet før reagenset kunne benyttes til farging. Ved hjelp av fortynningsformelen (formel 1) ble det til sammen under hele utprøvingen laget fortynninger på 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 og 1:2000. Konsentrat-fortynningene ble manuelt pipettert på preparatene ved hver utprøvningsrunde der konsentratet ble benyttet. Fargeinstrumentet BenchMark Ultra ga varsel når pipetteringen skulle gjøres, og det ble pipettert 100µL konsentrat-fortynning på de respektive preparatene.

### 2.6.3 Etterbehandling

Etter farging på BenchMark Ultra ble preparatene etterbehandlet. Under farging på dette instrumentet blir preparatene dekket av en beskyttende oljefilm, og må derfor vaskes manuelt med en detergent. Deretter ble preparatene kontrastfarget manuelt med hematoxylin ved å dyppe dem i fargeløsningen i 20 sekunder, for så å skylle dem i vann i 3 minutter. Videre ble preparatene dehydrert i alkohol og klarnet i Tissue Clear. Dehydreringen ble gjort ved å dyppe preparatene i alkohol i økende konsentrasjon fra 80% etanol, via 96% etanol til to bad med absolutt alkohol, i 10 sekunder per bad. Preparatene sto så i tre bad med Tissue Clear i ett minutt per bad. Montering av preparatene ble gjort ved at et stativ med preparatene ble ført inn i oppleggingsinstrumentet for montering av dekkglass. Til slutt ble preparatene lagt ut på et brett, tørket i varmeskap i 10 minutter, og mikroskopert for en kvalitetsvurdering.

### 2.6.4 Optimalisering av protokoll

For alle de tre utprøvningsrundene ble ulike prøver, protokoller og fortynninger benyttet (tabell 3). Etter hver utprøvningsrunde ble preparatene vurdert med hensyn på fargekvalitet, og det ble besluttet av spesialbioingeniør hvilke parametere som skulle utprøves videre. Hver prøve under utprøvningsrundene ble farget ved hjelp av samtlige protokoller og fortynninger vist i tabell 3.

Tabell 3: Prøver og protokoller farget ved hver utprøvningsrunde

Utprøvningsrunde	Prøve (tabell 1)	Protokoll (tabell 2)	Fortynning
1	1-4	1 og 2	RTU
		3 og 4	1:50, 1:100, 1:200 og 1:500
2	1-4	3	1:25, 1:1000 og 1:2000
3	5-7	1, 2, 5 og 6	RTU
		3 og 4	1:50
	8	1, 2, og 5-8	RTU
		3 og 4	1:50

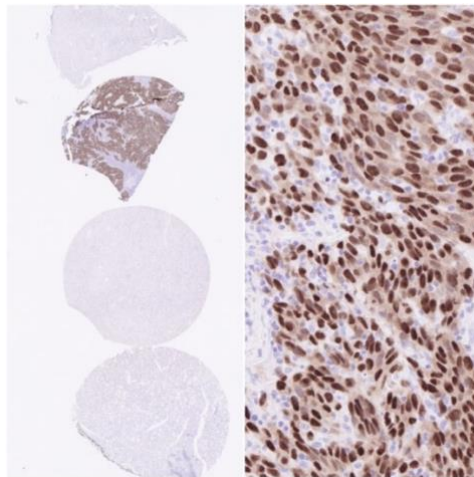
### 2.6.5 Etterprøvning av optimert protokoll

Den antatt optimaliserte protokollen ble etterprøvd ved farging med anti-SOX10 av prøvene 9-22 (tabell 1). Etterprøvingen ble utført ved bruk av RTU-reagenset, en forbehandlingstid på 32 minutter og ingen tilleggs-trinn. Diagnosene som ble farget ble bestemt av ansvarlig lege, og er diagnoser som er både kjent SOX10-negativ og -positiv.

### 3. Resultater

#### 3.1 Kontroll

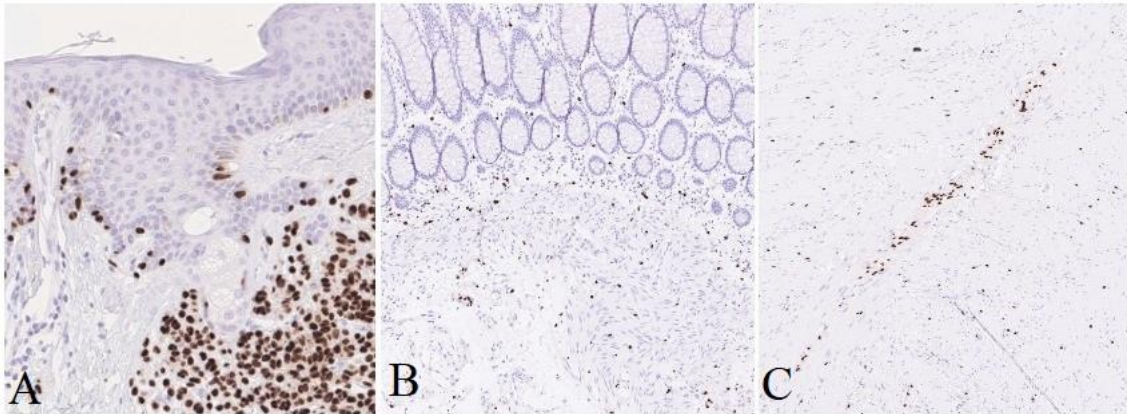
Ved mikroskopering av kontrollene var det maligne melanomet farget brunt med anti-SOX10 på samtlige Mb2-kontroller, mens normal thyroidea, normal nyrebark og papillært adenokarsinom var ufarget (figur 4). Dermed kan samtlige farginger godkjennes.



*Figur 4: Fra venstre: Mb2-kontroll farget med anti-SOX10, og nærbilde av tumorvev med malignt melanom.*

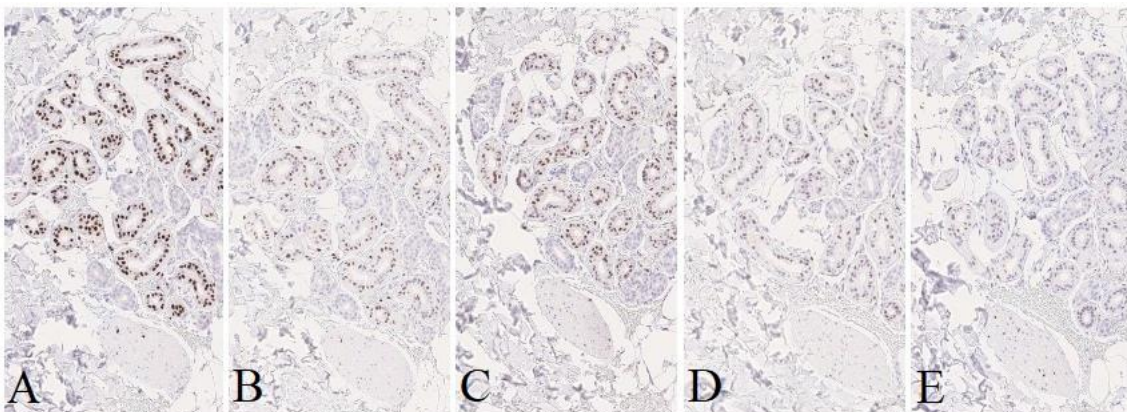
#### 3.2 Første utprøvningsrunde

I figur 5 vises hud og kolon, representert ved henholdsvis prøve 1 og 2. I hudprøven har melanocytter og myoepitelceller blir synliggjort som A i figur 5 med immunhistokjemisk farging med anti-SOX10. Ved farging av tykktarm, som sees som B og C i figur 5, blir schwannske celler påvist både i mucosa og muscularis. De resterende cellene blir farget med kjernefargen hematoxylin. Denne figuren illustrerer resultater som er videre beskrevet i vedlegg 1.



*Figur 5: A: Hud med brune SOX10-positive melanocytter i epidermis og nevus, B: mucosa og submucosa i kolon og C: muscularis i kolon, begge med brune SOX10-positive schwannske celler.*

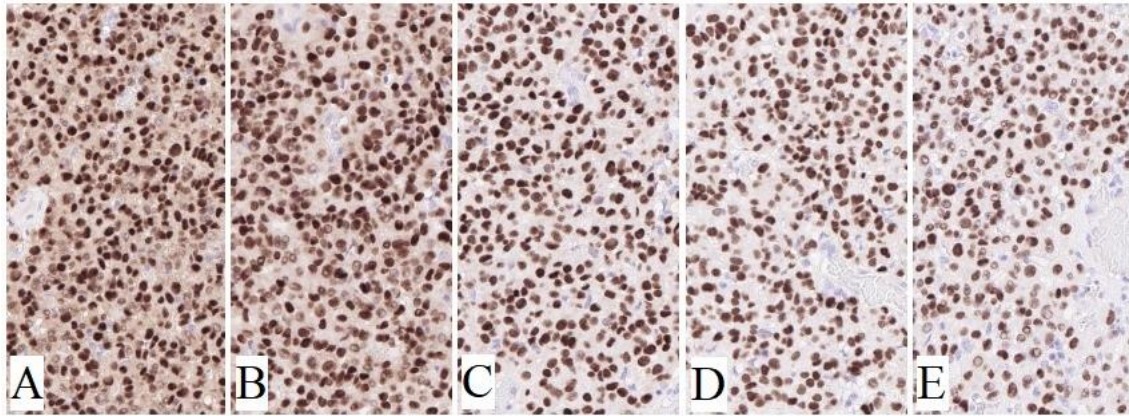
Figur 6 viser en hudprøve, prøve 1, hvor myoepitelceller i svettekjertler er farget brune med anti-SOX10 (vedlegg 1). Det omliggende vevet som er negativt for SOX10 er synliggjort ved hjelp av kontrastfarging med hematoxylin.



*Figur 6: Myoepitel i svettekjertler i hud farget med A: RTU-reagens og konsentrat-fortynningene B: 1:50, C: 1:100, D: 1:200 og E: 1:500. Her sees de SOX10-positive cellene med brune cellekjerner.*

Figur 7 visualiserer en metastase fra et malignt melanom, prøve 3, der de SOX10-positive tumorcellene og det omliggende vevet er farget likt som ved figur 6 (vedlegg 1).

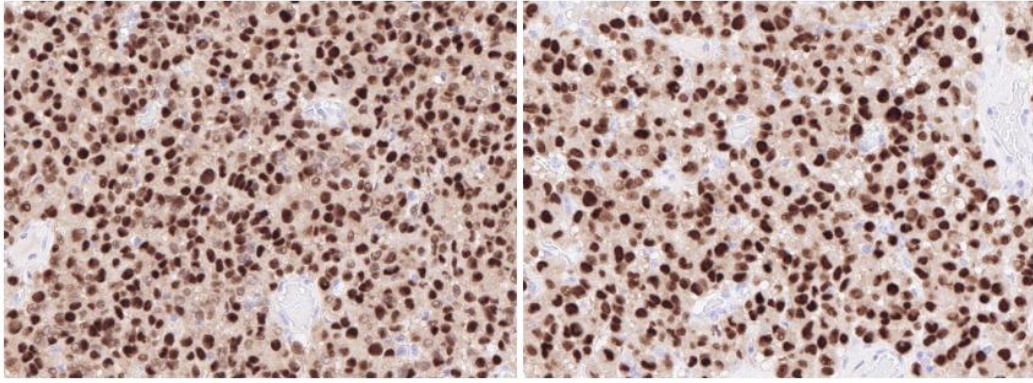




*Figur 7: Metastase av malignt melanom farget med anti-SOX10 ved bruk av A: RTU-reagens og konsentrat-fortynningene B: 1:50, C: 1:100, D: 1:200 og E: 1:500. Her sees de SOX10-positive tumorcellene som brune.*

For prøvene 1-4 (tabell 1) ble melanocytter og myoepitel i hud, schwannske celler i kolon og tumorcellene i schwannom og malignt melanom visualisert ved hjelp av anti-SOX10 (vedlegg 1). Det ble observert at samtlige prøver var SOX10-positive uavhengig av type protokoll, men det ble derimot observert variasjoner i fargerresultatene for de forskjellige protokollene og fortynningene (vedlegg 1). For samtlige prøver med både kort og lang forbehandlingstid viste farging med RTU-reagenset og konsentrat-fortynning 1:50 og 1:100 et sterkt positivt resultat. For de resterende prøvene ved bruk av fortynning 1:200 og 1:500, var resultatet også positivt ved begge forbehandlingstidene (figur 6 og 7). I tillegg ble det observert at myoepitelceller i hud var den mest ømfintlige celletypen for farging med anti-SOX10, siden fargerresultatene tydelig varierte ved forskjellige konsentrasjoner. Det ble også observert at konsentrat-fortynning 1:100 ga et svakere resultat enn ved fortynning 1:50, noe som gjør fortynning 1:100 og lavere mindre egnet til farging med anti-SOX10.

I figur 8 synliggjøres SOX10-positive tumorceller i et malignt melanom fra prøve 3. De resterende kjernene er farget blå ved hjelp av hematoxylin. For farging ved hjelp av både protokoll 1 og 2 observeres det en del bakgrunnsfarge i cytoplasmaet tilhørende de SOX10-positive cellene. Resultatet for prøve 3 er videre beskrevet i vedlegg 1.

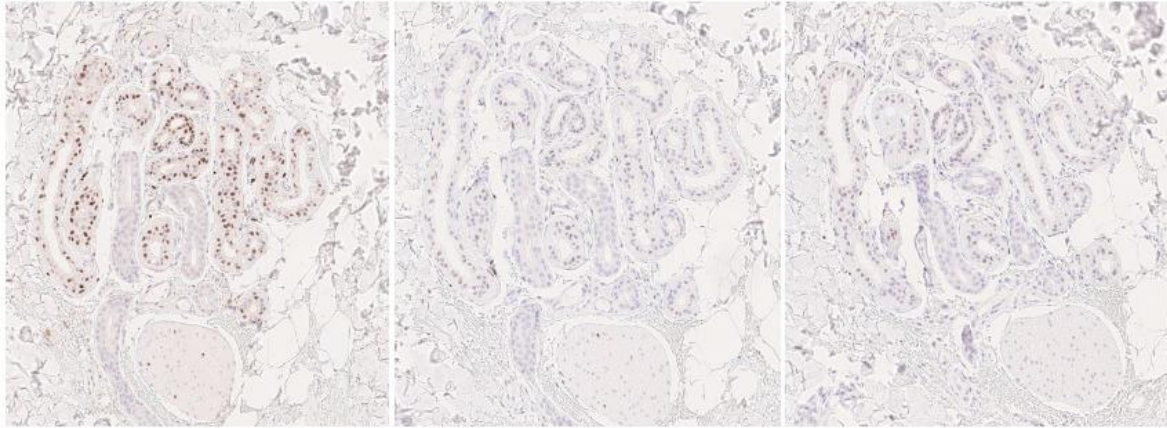


*Figur 8: Fra venstre: Metastase av malignt melanom farget med protokoll 1 og 2 (tabell 2).  
Tumorcellene er farget brune med anti-SOX10.*

### 3.3 Andre utprøvningsrunde

Figur 9 viser prøve 1 der myoepitel i svettekjertler visualiseres med farging med anti-SOX10. Prøvene i andre utprøvningsrunde er farget ved hjelp av protokoll 3 med flere fortyninger, henholdsvis 1:25, 1:1000 og 1:2000. Ved farging med disse fortyningene har cellekjernene i myoepitelet blitt farget brune, og de resterende kjernene har blitt farget blått. For farging med fortykning 1:2000 er det derimot problematisk å skille cellekjernene i myoepitel fra det resterende vevet, og denne konsentrat-fortynningen kan dermed betraktes som en “cut-off”-grense (figur 9). Det ble også observert at det ikke var noen nevneverdig forskjell mellom fortykningene 1:25 og 1:50. Konsentrat-fortynningen 1:50 ble betraktet som den fortyningen som gav likest resultat med RTU-reagenset, uavhengig av forbehandlingstid. Fargerresultatene for andre utprøvningsrunde sees i vedlegg 2.

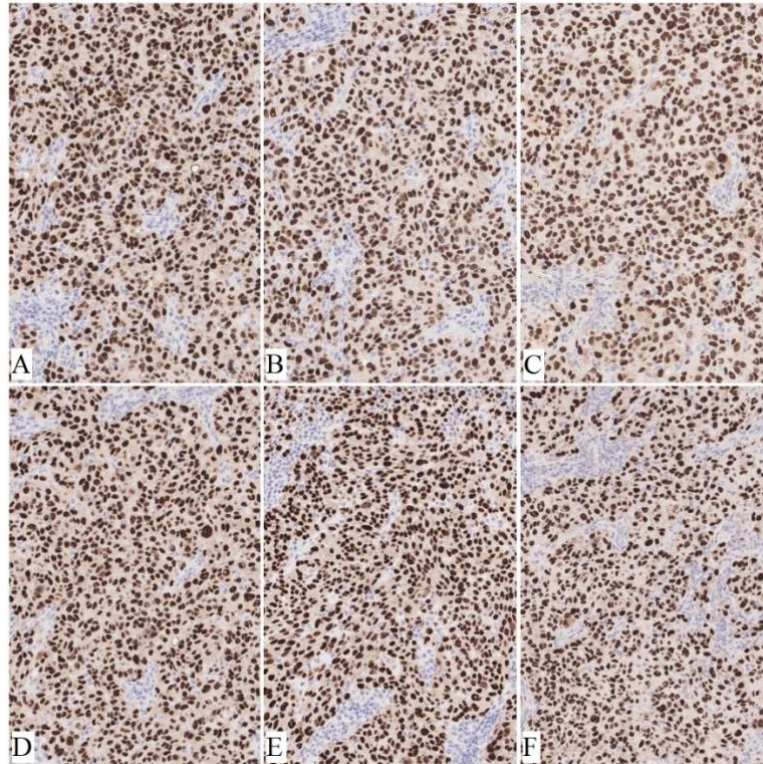




*Figur 9: Fra venstre: Svettekjertler i subcutis farget brune med anti-SOX10 ved bruk av henholdsvis konsentrat-fortynningene 1:25, 1:1000 og 1:2000.*

### 3.4 Tredje utprøvningsrunde

Prøvene 5-8 er i tredje utprøvningsrunde farget ved bruk av protokollene 1-6, hvilket inkluderer kort og lang forbehandlingstid med bruk av RTU-reagenset, konsentratet i fortynning 1:50 og protokoller som inneholder RTU-reagenset med tilleggs-trinnet Fortynning (tabell 3). Prøve 8 ble i tillegg til dette farget ved bruk av to protokoller som inneholder RTU-reagenset med tilleggs-trinnet Casein. Under samtlige farginger ble de SOX10-positve cellekjernene farget brune med en viss grad av bakgrunnsfarge i tilhørende cytoplasma (figur 10). Denne figuren illustrerer fargerresultater fra tredje utprøvningsrunde, for videre resultater fra denne utprøvningsrunden i vedlegg 3.

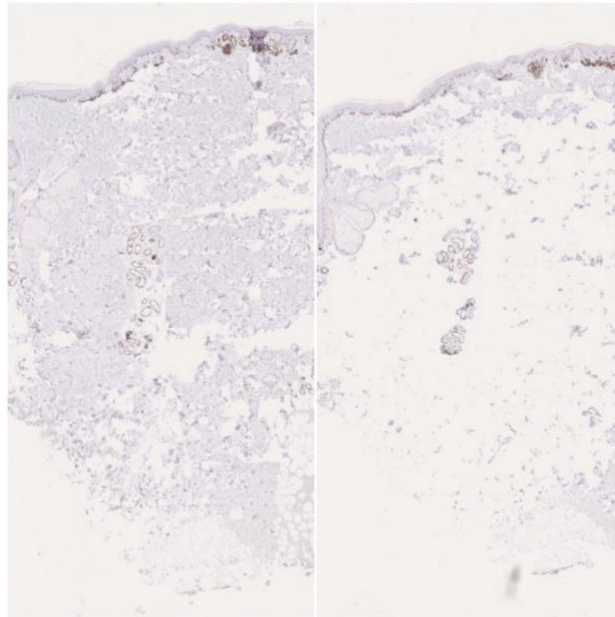


*Figur 10: Metastase av malignt melanom i lymfeknute farget med protokoll A: 1: RTU kort forbehandlingstid, B: 5: RTU kort forbehandlingstid med tilleggs-trinnet Fortynning, C: 3: konsentrat- fortynning 1:50 kort forbehandlingstid, D: 2: RTU lang forbehandlingstid, E: 6: RTU lang forbehandlingstid med tilleggs-trinnet Fortynning og F: 4: konsentratet-fortynning 1:50 lang forbehandlingstid (tabell 2). For samtlige illustrasjoner i figuren sees de SOX10-positive tumorcellene som brune kjerner.*

Under mikroskopering av preparatene farget ved tredje utprøvningsrunde ble det ikke observert noen betydelig forskjell på preparatene farget med og uten tilleggs-trinnene Fortynning og Casein (vedlegg 3). Det ble derfor besluttet å ikke gå videre med disse tilleggs-trinnene. Ved sammenligning av fargerresultatene ved tredje og de tidligere utprøvningsrundene ble det observert at RTU-reagenset og konsentratet i fortynningen 1:50 ga relativt like resultat (figur 10).

Figur 11 fremstiller prøve 1 som er en hudprøve behandlet med ulike forbehandlingstider ved bruk av protokoll 1 og 2. Her sees melanocytene i epidermis og som del av nevus som brune, likt som ved figur 5, i tillegg til at myoepitelet i dermis er farget brunt. Cellekjernene til det omliggende vevet er farget blått med hematoxylin. Ved kort forbehandlingstid har noe av strukturen i dermis forsvunnet, mens ved lang forbehandlingstid har store deler av strukturen

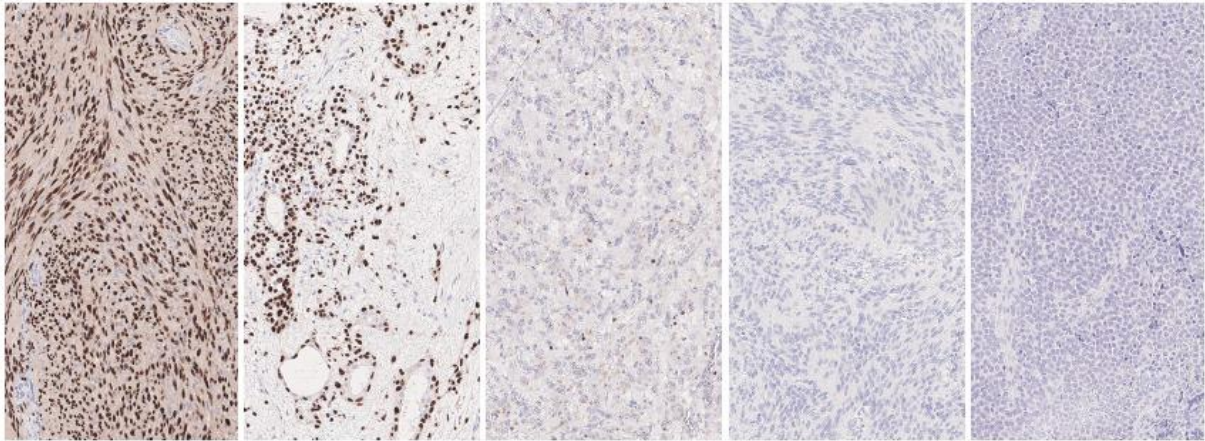
forsvunnet. Det ble også observert at fargerresultatene ved bruk av de to ulike forbehandlingstidene så relativt like ut i fargeintensitet (figur 10). På grunnlag av resultatene illustrert i figur 10 og 11 ble det besluttet å gå videre med den korte forbehandlingstiden på 32min. De resterende resultatene for tredje utprøvningsrunde er beskrevet i vedlegg 3.



*Figur 11: Fra venstre: Hud farget med protokoll 1 og 2 (tabell 2). De SOX10-positive melanocytene er farget brune med anti-SOX10.*

### 3.5 Etterprøving av optimert protokoll

For etterprøvingen av den optimale protokollen, protokoll 1, ble prøve 9-22 (tabell 1) farget med anti-SOX10. Figur 12 illustrerer resultatene for et utvalg av diagnosene som ble farget i etterprøvingen, de fullstendige resultatene sees i vedlegg 4. Schwannom og pleomorft adenom ble positivt farget med anti-SOX10. Schwannom er SOX10-positiv ettersom tumor består av schwannske celler, og pleomorft adenom er SOX10-positivt da tumor består av myoepitelceller. De schwannske cellene i normal kolon ble også positivt farget. De resterende diagnosene ga et negativt fargerresultat, og ble kun farget med kontrastfargen hematoxylin (figur 12).



*Figur 12: Fra venstre: Schwannom, pleomorft adenom, paragangliom, meningeom og Ewing sarkom.  
De SOX10-positive cellene er farget brunt.*



## 4. Diskusjon

### 4.1 Kontroll

For å vurdere en prøve farget immunhistokjemisk med anti-SOX10 må den tilhørende Mb2-kontrollen godkjennes. Kontrollen farges på samme objektglass som prøven slik at en sikrer at både prøven og kontrollen går gjennom en identisk farging. Ettersom kontrollmaterialet er kjent vil dens fargerresultat kunne vurderes som en sikkerhet for fargingen, så lenge Mb2-kontrollen får det forventede fargerresultatet kan prøven vurderes. Om kontrollen ikke er farget riktig må det lages et nytt preparat av prøven som farges på nytt. På grunnlag av de godkjente kontrollene under utprøvingen vurderes fargingen som vellykket, og alle resultatene kan vurderes til å ha høy pålitelighet. Derfor vil man med sikkerhet kunne konkludere at cellekjerner som farges brune med anti-SOX10 reelt uttrykker denne transkripsjonsfaktoren. Med grunnlag i en godkjent kontroll kan også negative resultater utgis som reelt negative.

### 4.2 Prøvemateriale

I lys av den gjennomgatte utprøvingen kan det stilles spørsmål om man har dekket et stort nok spekter av diagnoser. Under selve utprøvingen ble det kun benyttet metastase av malignt melanom, schwannom og normal hud og kolon. Derfor kan det vurderes om grunnlaget for å påstå at farging anti-SOX10 gir positive fargerresultat for alle diagnosene som uttrykker transkripsjonsfaktoren SOX10, hadde vært større dersom det hadde blitt farget vevsmateriale med flere diagnoser. Ettersom det ble gjennomført en etterprøving av fargingen med anti-SOX10 med et større utvalg diagnoser, der alle diagnosene ble farget som forventet, kan det konkluderes at denne usikkerheten ikke er reell. Dette på tross av at det fortsatt gjenstår diagnoser som ikke har blitt undersøkt i henhold til anbefaling fra NordiQC.

Det ble kun benyttet prøvemateriale av metastase av malignt melanom, schwannom, normal hud og normal kolon under utprøvingen, men disse diagnosene ble hentet fra prøver av forskjellige pasienter. På denne måten har den samme diagnosen blitt utprøvd med ulikt prøvemateriale i flere prøverunder. På grunnlag av dette kan det påstås med stor sikkerhet at fargeanalysen er egnet for alle de utprøvde diagnoser og generelt andre SOX10-positive diagnoser. Når materialet ga forventet resultat ved samtlige utprøvningsrunder, kan materialet vurderes som representativt for utprøvingen av fargeanalysen med anti-SOX10.

Under utprøvingen ble det ikke farget paralleller av prøvene ved hjelp av samme protokoll. Dersom dette hadde blitt gjennomført ville fargeresultatene kunne vurderes som godkjente med et sikrere grunnlag. Grunnet den høye prisen på analysen ble det vurdert av spesialbioingeniør ved laboratoriet at farging med flere paralleller med samme protokoll ikke var nødvendig. Vurderingen ble gjort på grunnlag av at en godkjent Mb2-kontroll er en god indikator på at hver enkelt farging er god.

#### 4.3 Kostnadseffektivitet

Ved implementering av nye analyser er det ønskelig at den optimerte protokollen er kostnadseffektiv både med tanke på økonomi og tid. Under den andre utprøvingen ble det observert at RTU-reagenset og konsentratet med fortynningen 1:50 ga fargeresultat mest i samsvar med anbefalingen fra NordiQC. I tillegg var dette de resultatene som ga den fargeintensiteten som ansvarlig lege ønsket å benytte. Videre under tredje utprøvningsrunde ble det derfor utprøvd videre om det var en forskjell i resultat ved bruk RTU-reagenset eller konsentrat-fortynningen 1:50. Ingen betydelig forskjell ble observert, og på grunnlag av dette ble protokollen som benyttet det billigste antistoffet valgt, altså RTU-reagenset.

Deretter ble det vurdert ved hvilken protokoll RTU-reagenset ga best resultat, altså lang eller kort forbehandlingstid. Under tredje utprøvningsrunde ble dette utprøvd, og det ble ikke observert en betraktelig forskjell mellom de ulike forbehandlingstidene. Kort forbehandlingstid er gunstig siden hver prøve vil bli farget på kortere tid, og patologene kan dermed stille diagnose raskere enn ved bruk av lengre forbehandlingstid. I tillegg er kort forbehandlingstid mer skånsomt for hudprøver med mye fett, et prøvemateriale det ofte forventes å bruke anti-SOX10 på. Dermed ble det valgt å benytte protokollen med kort forbehandlingstid for RTU-reagenset.

#### 4.4 Antistoffets nøyaktighet og robusthet

For resultatene ved endt utprøving ble det vurdert i samråd med ansvarlig lege at det kun var de SOX10-positive tumorcellene, melanocytter og myoepitelceller i hud og schwannske celler i kolon som farges positivt ved bruk av anti-SOX10. Dette ble vurdert på grunnlag av vevets histologi og godt etablerte kunnskaper rundt dette. Det vurderes at bakgrunnsfargen som ble observert på de sterkt positive preparatene kun oppstår i cytoplasmaet til de SOX10-

positive cellene, og på denne måten vil bakgrunnsfargen trolig ikke føre til feil diagnostisering da kun de SOX10-positive cellene farges brune, dette også i tilfeller med høyt nivå av bakgrunnsfarge. Ettersom det kun var de forventede cellene som ble farget positivt og at bakgrunnsfargen ikke påvirket SOX10-negative celler, vurderes nøyaktigheten til den immunhistokjemiske fargeanalysen som meget god.

Ved utprøvingen gir fargingen positive resultater ved både høye og lave fortynninger av antistoffet, og ble observert ved at konsentratet måtte fortynnes mye før det oppsto en betydelig forskjell i fargeintensiteten på preparatet. Dette betyr at til og med ved små konsentrasjoner av antistoffet en synlig kjernefarge i de SOX10-positive cellene på preparatet observeres, og det har i denne sammenheng blitt etablert en høy “cut-off”-grense. Det ble ikke observert en betydelig forskjell i fargeintensiteten ved de to forskjellige forbehandlingstidene eller ved tilleggs-trinnene Fortynning og Casein. Analysen har ikke blitt utprøvd på andre instrumenter enn BenchMark Ultra fra Ventana. Dette anses som unødvendig ettersom laboratoriet ved Enhet for immunhistokjemi ved St. Olavs hospital ikke skal benytte analysen på andre instrumenter eller ved manuell farging. Flere av laboratoriepersonellet ved enheten farget preparater med analysen anti-SOX10 under utprøvingen, noe som ikke ga avvikende resultater. Til sammen har ingen av disse ytre faktorene påvirket fargerresultatene nevneverdig, og dermed vurderes analysens robusthet som meget god.

#### 4.5 Nytteverdi

Alle immunhistokjemiske analyser kan utføres samtidig på BenchMark Ultra, og dermed vil ikke tilføring av en ekstra analyse føre til lengre svartid. Dette gjør det mulig for laboratoriet å tilby et større spekter av analyser som har til hensikt å sikre korrekt diagnostisering uten at det belaster pasienten.

Immunhistokjemisk farging med antistoffene anti-S100, anti-Melan-A og HMB45 kan være mindre egnet til påvisning av metastaser av malignt melanom siden tumorcellene kan se annerledes ut enn sitt opprinnelige utseende i primærtumorer. Malignt melanom utgår fra melanocytter som uttrykker transkripsjonsfaktoren SOX10 og vil derfor bli farget med anti-SOX10 på tross av at metastasen kan ha endret uttrykk. Ettersom anti-SOX10 er godt egnet til undersøkelser av både metastaser og primærtumorer av malignt melanom, vil det være hensiktsmessig å benytte denne analysen i tillegg til de cytoplasmaspesifikke fargeanalysene for farging av maligne melanomer.

Immunhistokjemisk farging med anti-S100 skiller ikke i alle tilfeller mellom schwannom og meningeom. I tilfeller der schwannom oppstår intrakranielt er det utfordrende å skille mellom disse to tumortypene. Schwannom vil være SOX10-positive, da de utgår fra schwannske celler, i motsetning til meningeom som utgår fra meningoteliale celler som er SOX10-negative.

Ved å bruke de etablerte analysene anti-S100, anti-Melan-A og HMB45 i samspill med anti-SOX10 kan patologer få et sikrere grunnlag for å kunne diagnostisere schwannom og malignt melanom. De etablerte cytoplasmaspesifikke analysene har ulik sensitivitet, men er spesifikke for ulike tumorer. Ved å benytte flere analyser sammen, vil man kunne utnytte styrkene til de forskjellige analysene.

#### 4.6 Konklusjon

Den immunhistokjemiske fargingen med anti-SOX10 ga under utprøvingen positive resultater der dette var forventet, selv ved svært høye fortyninger. Det ble derfor konkludert at anti-SOX10 er et nøyaktig antistoff med god robusthet. Fargerresultatene ble vurdert med hensyn på anbefalinger fra NordiQC og ansvarlig lege. På grunnlag av resultatene fra utprøvingen anses protokoll 1 (tabell 2) som den optimale protokollen for farging med anti-SOX10 ved Enhet for immunhistokjemi, St. Olavs hospital. Analysen kan derfor innføres i rutinediagnostikken deres. Protokoll 1 omfatter parameterne kort forbehandlingstid på 32 minutter, bruk av RTU-reagens med antistoff klon SP267 og ingen tilleggs-trinn.



## 5. Referanser

1. Direktoratet for e-helse. SNOMED CT [Internett]. ehelse.no. 2019 [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://ehelse.no/standarder-kodeverk-og-referanse katalog/helsefaglige-kodeverk/snomed-ct>
2. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. About NordiQC [Internett]. nordiqc.org. 2019 [sitert 21. mars 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.nordiqc.org/about.php>
3. St. Olavs Hospital. Avdeling for patologi [Internett]. stolav.no. 2018 [sitert 27. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/avdeling-for-patologi-#biopsi>
4. Clive R. Taylor, Lars Rudbeck, redaktører. Immunohistochemical Staining Methods. 6. utg. Danmark: Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company; 2013.
5. Genetics Home Reference. SOX10 gene [Internett]. ghr.nlm.nih.gov. 2016 [sitert 13. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SOX10>
6. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Biernat W, Czapiewski P, Kopczynski J, mfl. Sox10 – A marker for not only Schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue. A systematic analysis of 5134 tumors. Am J Surg Pathol. juni 2015;39(6):826–35.
7. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. Transcription factor SOX-10 (SOX10) [Internett]. nordiqc.org. 2016. Tilgjengelig på: [https://www.nordiqc.org/downloads/assessments/117\\_94.pdf](https://www.nordiqc.org/downloads/assessments/117_94.pdf)
8. Cell Marque. SOX-10 (EP268) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. 29. november 2017;2017(3.0NO):5.
9. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG. Menneskekroppen. 2. utg. Gyldendal akademisk; 2015.
10. Young B, Woodford P, O'Dowd G. Wheater's Functional Histology. 6. utg. Elsevier Health Sciences; 2014.
11. Hubert RJ, VanMeter KC. Gould's Pathophysiology for the Health Professions. 6. utg. 2018.
12. Carton J, Daly R, Ramani P. Clinical Pathology. Oxford University Press; 2007.
13. Young B, O'Dowd G, Stewart W. Wheater's Basic Pathology. 5. utg. Elsevier Health Sciences; 2011.
14. R. C. Curran JC. Curran's atlas of histopathology. 4. utg. Harvey Miller Publishers; 2000.
15. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto, Richard N. Mitchell. Robbins Basic Pathology. 8. utg. Elsevier Health Sciences; 2007.

16. Pathology Outlines. Meningioma [Internett]. pathologyoutlines.com. 2019 [sitert 5. april 2019]. Tilgjengelig på:  
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/cnstumormeningiomageneral.html>
17. Burtis CA, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7. utg. Elsevier Health Sciences; 2015.
18. Mogens Vyberg. Anvendt Immunhistokjemi. 6. utg. Bioanalytikerutdannelsen København; 2005.
19. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. MLA [Internett]. nordiqc.org. 2014 [sitert 18. mars 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.nordiqc.org/epitope.php?id=53>
20. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. MSA [Internett]. nordiqc.org. 2014 [sitert 20. mars 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.nordiqc.org/epitope.php?id=54>
21. Kapur RP, Bigler SA, Skelly M, Gown AM. Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes. J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc. februar 1992;40(2):207–12.
22. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. SOX10 [Internett]. nordiqc.org. 2018 [sitert 13. mars 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.nordiqc.org/epitope.php?id=94>
23. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. J Oral Maxillofac Pathol JOMFP. 2012;16(3):400–5.
24. John D Bancroft, Marilyn Gamble, redaktører. Theory and Practice of Histological Techniques. 6. utg. Philadelphia, USA: Elsevier Limited; 2008.
25. Ventana Medical Systems. OptiView IHC Detection Kit. 2011;2011(1010323NO Rev A):4.

## 6. Vedlegg

Vedlegg 1: Fargerresultater ved første utprøvningsrunde

Vedlegg 2: Fargerresultater ved andre utprøvningsrunde

Vedlegg 3: Fargerresultater ved tredje utprøvningsrunde

Vedlegg 4: Fargerresultater ved etterprøving av optimal protokoll

Vedlegg 5: Immunhistokjemi - Utprøving og validering av primærantistoff

## 6.1 Vedlegg 1: Fargeresultater ved første utprøvningsrunde

Under første utprøvningsrunde ble fire vevsprøver farget, med henholdsvis to forskjellige forbehandlingstider og reagenser. I tillegg blir samtlige prøver farget med forskjellige konsentrat-fortynninger ved bruk av konsentratet.

Prøve	Protokoll	Forbehandlingstid (min)	Fortynning	Fargeresultat
1	1	32	RTU	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	2	64	RTU	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	3	32	1:50	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	3	32	1:100	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	3	32	1:200	Positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	3	32	1:500	Positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	4	64	1:50	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	4	64	1:100	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	4	64	1:200	Positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel
1	4	64	1:500	Positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel

2	1	32	RTU	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler
2	2	64	RTU	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler
2	3	32	1:50	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler
2	3	32	1:100	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler
2	3	32	1:200	Positiv kjernefarge i schwannske celler
2	3	32	1:500	Positiv kjernefarge i schwannske celler
2	4	64	1:50	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler
2	4	64	1:100	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler
2	4	64	1:200	Positiv kjernefarge i schwannske celler
2	4	64	1:500	Positiv kjernefarge i schwannske celler
3	1	32	RTU	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
3	2	64	RTU	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma

3	3	32	1:50	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
3	3	32	1:100	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
3	3	32	1:200	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
3	3	32	1:500	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
3	4	64	1:50	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
3	4	64	1:100	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
3	4	64	1:200	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
3	4	64	1:500	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
4	1	32	RTU	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
4	2	64	RTU	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma

4	3	32	1:50	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
4	3	32	1:100	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
4	3	32	1:200	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
4	3	32	1:500	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
4	4	64	1:50	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
4	4	64	1:100	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
4	4	64	1:200	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
4	4	64	1:500	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler

## 6.2 Vedlegg 2: Fargerresultater ved andre utprøvningsrunde

Under andre utprøvningsrunde ble de samme prøvene som ble benyttet ved første utprøvningsrunde (vedlegg 1) videre utprøvd. Ved denne runden ble kun konsentratet brukt med tre nye fortynningsforhold og kort forbehandlingstid.

Prøve	Protokoll	Fortynning	Fargerresultat
1	3	1:25	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
1	3	1:1000	Positiv kjernefarge i melanocytter, svakt positiv kjernefarge i myoepitel celler
1	3	1:2000	Svakt positiv kjernefarge i melanocytter, negativ kjernefarge i myoepitel celler
2	3	1:25	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
2	3	1:1000	Svakt positiv kjernefarge i schwannske celler
2	3	1:2000	Svakt positiv kjernefarge i schwannske celler
3	3	1:25	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
3	3	1:1000	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
3	3	1:2000	Svak positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
4	3	1:25	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
4	3	1:1000	Positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
4	3	1:2000	Svak positiv kjernefarge i SOX10-positive celler



### 6.3 Vedlegg 3: Fargeresultater ved tredje utprøvningsrunde

Ved tredje utprøvningsrunde ble fire nye prøver farget. Hver prøve ble farget med seks ulike protokoller. Her ble det utprøvd nye variasjoner for forbehandlingstid, RTU-reagens, konsentrat-fortynning og tilleggs-trinn. I tillegg ble en prøve farget med to ekstra protokoller. Dette var en protokoll med et nytt tilleggs-trinn som også ble farget ved ulike forbehandlingstider.

Prøve	Protokoll	Forbehandlingstid (min)	Fortynning	Tilleggs-trinn	Fargeresultat
5	1	32	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
5	2	64	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
5	5	32	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
5	6	64	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en

					del bakgrunnsfarge i cytoplasma
5	3	32	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
5	4	64	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
6	1	32	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
6	2	63	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
6	5	32	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en

					del bakgrunnsfarge i cytoplasma
6	6	64	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
6	3	32	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
6	4	64	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i melanocytter og myoepitel celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
7	1	32	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
7	2	64	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma

7	5	32	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
7	6	64	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
7	3	32	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
7	4	64	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	1	32	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	2	64	RTU	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma

8	5	32	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	6	64	RTU	Fortynning	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	3	32	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	4	64	1:50	-	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	7	32	RTU	Casein	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma
8	8	64	RTU	Casein	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler, en del bakgrunnsfarge i cytoplasma

#### 6.4 Vedlegg 4: Fargerresultater ved etterprøvning av optimert protokoll

Etterprøvingen av den optimerte protokollen ble utført ved immunhistokjemisk farging med anti-SOX10 på 14 nye vevsprøver med ulike diagnoser. Samtlige prøver ble farget med protokoll 1, altså forbehandlingstid på 32 minutter, ingen tilleggs-trinn og RTU-reagens.

<b>Prøve</b>	<b>Protokoll</b>	<b>Fargerresultat</b>
9	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
10	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
11	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
12	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
13	1	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
14	1	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
15	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
16	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
17	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
18	1	Negativ kjernefarge i SO10-negative tumorceller
19	1	Negativ kjernefarge i SOX10-negative tumorceller
20	1	Sterk positiv kjernefarge i schwannske celler.
21	1	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler
22	1	Sterk positiv kjernefarge i SOX10-positive celler

## 6.5 Vedlegg 5: Immunhistokjemi - Utprøving og validering av primærantistoff

### Immunhistokjemi - Utprøving og validering av primærantistoff

Forfatter: Lise Eid Wålberg  
Godkjent av: Gudrun Hovstein Erikstad

Gyldig fra: 07.03.2019  
Revisjonsfrist: 06.03.2021



Revisjon: 2.1  
ID: 28966

#### Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre at utprøving og validering foregår på en sikker måte og at utprøvinger blir utført etter samme mal.

Prosedyren omfatter fremgangsmåte for utprøving og validering av primærantistoff til bruk i rutinediagnostikk.

Prosedyrene brukes som andre del i utprøvningsprosessen og ses i sammenheng med prosedyrene:

-  Immunhistokjemi - Valg av primærantistoff til utprøving
-  Immunhistokjemi - Implementering av primærantistoff i rutinediagnostikk

#### Ansvar

Avdelingsleder, Avdeling for patologi, St. Olavs hospital.

#### Arbeidsbeskrivelse

Ansvar	Arbeidsoppgave
Ansvarlig bioingeniør	<ul style="list-style-type: none"><li>- Utfylling av utprøvingsskjema med fargeplan</li><li>- Praktisk gjennomføring av utprøvingen</li><li>- Fargevurdering sammen med ansvarlig lege</li><li>- Finne riktig kontrollmateriale</li><li>- Skrive valideringsrapport</li></ul>
Spesialbioingeniør/Fagansvarlig bioingeniør	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lage protokoller</li><li>- Valideringsrapport i EQS (Spesialbioingeniør og Fagansvarlig bioingeniør er dokumentadministratorer i EQS)</li></ul>
Ansvarlig lege	<ul style="list-style-type: none"><li>- Overordnet ansvar for utprøvingen og valideringen av nye analyser</li><li>- Fargevurdering sammen med ansvarlig bioingeniør</li><li>- Velge riktig materiale til utprøvingen</li><li>- Godkjenne kontrollmateriale</li></ul>

#### Utfylling av utprøvingsskjema

Del 2 av utprøvingsskjema er selve utprøvingen og resultatene av denne. Utfyllingen av denne delen forklares videre i avsnittet fargeplan.

#### Fargeplan

Bruk tilgjengelig informasjon og sett opp en fargeplan som fylles ut i tabellen i del 2 i utprøvingsskjemaet. Nedenfor er de ulike kolonnene i tabellen forklart.

- DATO: Dato for farging
- POS KTR (positiv kontroll): Kontrollmateriale og/eller B-nummer som man vet skal være positivt.
- NEG KTR (negativ kontroll): Kontrollmateriale og/eller B-nummer som man vet skal være negativt.
- HIER (Heat induced epitop retrieval): Forbehandlingsmetode med HIER, eksempel Cell Conditioner 1 (CC1), Cell Conditioner 2 (CC2) eller ingen. I denne kolonnen skriver man for eksempel CC1 og antall minutter med forbehandling.
- ENZYM: Forbehandling med enzym. Forbehandling med enzym bør unngås hvis det er mulig. Eksempel på denne typen forbehandling er Protease 1, 2 og 3, og i tillegg skriver man antall

- minutter med denne forbehandlingen. Protease 1 er den sterkeste og protease 3 den svakeste.
- **TEKNIKK:** Visualiseringssystemet som blir brukt. Visualiseringsskitene som kan brukes på BenchMark Ultra er OptiView, UltraView og UltraView Red. I tillegg finnes det amplifiseringskit (Amp) til disse visualiseringsskitene. I denne kolonnen skriver man OptiView, UltraView eller UltraView Red, og eventuelt + Amp og antall minutter inkubasjon med amplifiseringskitet.
  - **KONS:** Fortynning. Ta utgangspunkt i anbefalinger i produktspesifikasjon, artikler, NordiQC og Neqas. Skriv konsentrasjonen og inkubasjonstiden til antistoffet i denne kolonnen. Ved bruk av ready-to-use-antistoff vil man ikke kunne endre fortynning og man skriver RTU i denne kolonnen og antall minutter antistoffet inkuberes på snittet.

Begrens antall parametere ved den første utprøvingen for å få en pekepinn på den videre utprøvingen. Bruk først og fremst anbefalinger som best kan sammenlignes med eksisterende immunfargesystem og rutinedrift.

Noen tips:

- De fleste antistoff har forbehandling med CC1. Det er sjelden man trenger å bruke enzymforbehandling, og det står som regel beskrevet i pakningsvedlegget hvis det er behov for det.
- Prøv to forskjellige forbehandlingstider, eksempel 32, 48 eller 64 min.
- Prøv minst tre forskjellige konsentrasjoner.
- Velg 32 min på inkubasjonstiden til antistoffet som en start hvis ikke noe annet er spesifisert fra produsent.

### Praktisk gjennomføring

Når man har skrevet en fargeplan er man klar for å begynne den praktiske gjennomføringen av utprøvingen. Finn fram aktuelt kontrollmateriale og/eller B-nummer. Det skal brukes materiale med kjent positiv og negativ reaksjon i utprøvingen. Ansvarlig lege har ansvaret for at riktig materiale blir valgt.

Det er laget en del protokoller for utprøving på instrumentene. Sjekk om det er noen av protokollen som allerede er lagt inn som kan brukes før du lager nye protokoller. I tabellen under er det en oversikt over hva man finner på de ulike protokollnummerene.

Type protokoller	Protokollnummer
Prep Kit	1-159
Ready-to-use (RTU) antistoff	160-199
Titring	200-249
Cytologi	250-299
Immunfluorescens	300-310
Dobbelfarginger	350-399
Utprøvinger	400-499
In situ hybridisering (ISH)	550-560
Forskningsprosjekt	600-699

### Legge inn nye protokoller

Fagansvarlig bioingeniør og Spesialbioingeniør har tilgang til å legge inn nye protokoller og slette protokoller som ikke skal brukes lenger.

For å lage en ny protokoll må man gå på «Protocols» i hovedvinduet. Der får man videre fem valg:

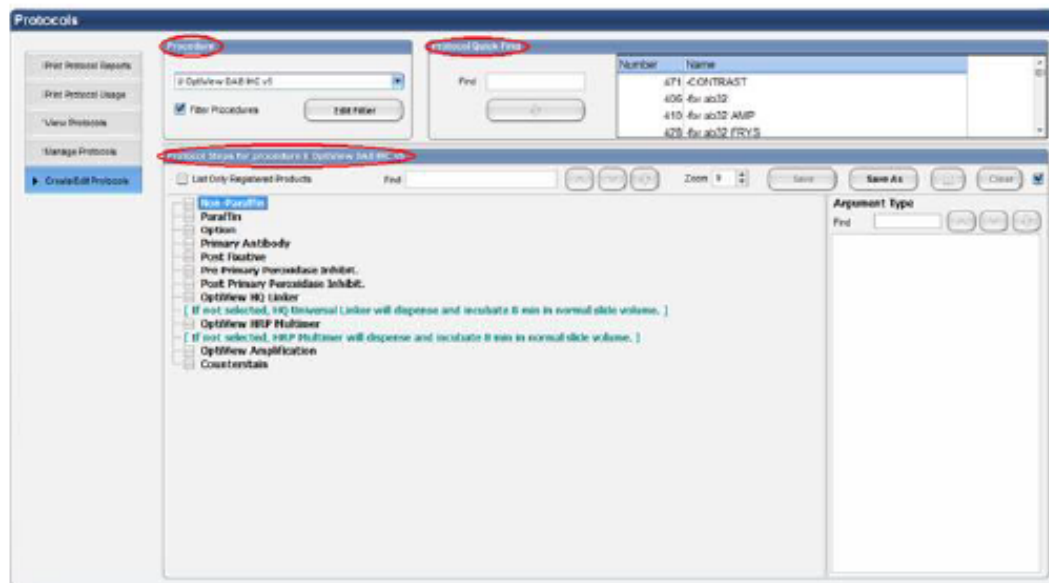
- «Print Protocol Reports» - Her kan man se de ulike protokolltrinnene og man kan skrive ut protokollrapporter. Velg «Full Procedure» eller «Protocol Summary», velg protokoll og trykk «Print Report».
- «Print Protocol Usage» - Her får man en oversikt over hvor mange ganger de ulike protokollene er farget i ulike tidsrom og man kan skrive ut rapporter på protokollbruk.
- «View Protocols» - Her vises et kort sammendrag av protokollene.
- «Manage Protocols» - Under denne fanen får man en liste over alle analysene som er lagt inn og



her kan man slette protokoller. For å slette protokoller markerer man den eller de protokollene man vil slette og trykker «Delete»

- «Create/Edit Protocols» - Her legger man inn protokoller eller endrer på eksisterende protokoller.

Når man skal lage en ny protokoll er det lurt å ta utgangspunkt i en protokoll som allerede er lagt inn slik at man får med alle trinnene. Bilde nedenfor viser skjermbildet når man velger «Create/Edit Protocols».



Noen av overskriftene er markert med rødt på bildet over. Under «Procedure» velger man hvordan deteksjonsmetode man vil bruke. Ved utprøving av primærantistoff er det mest vanlige å bruke OptiView DAB IHC v5, men her kan man også velge UltraView, In situ hybridisering (ISH), immunfluorescens (IF), dobbeltfarger ol. Under «Protocol Quick Find» kan man søke opp protokoller med protokollnummer eller navn og under «Protocol Steps» legger man inn de ulike trinnene i selve protokollen.

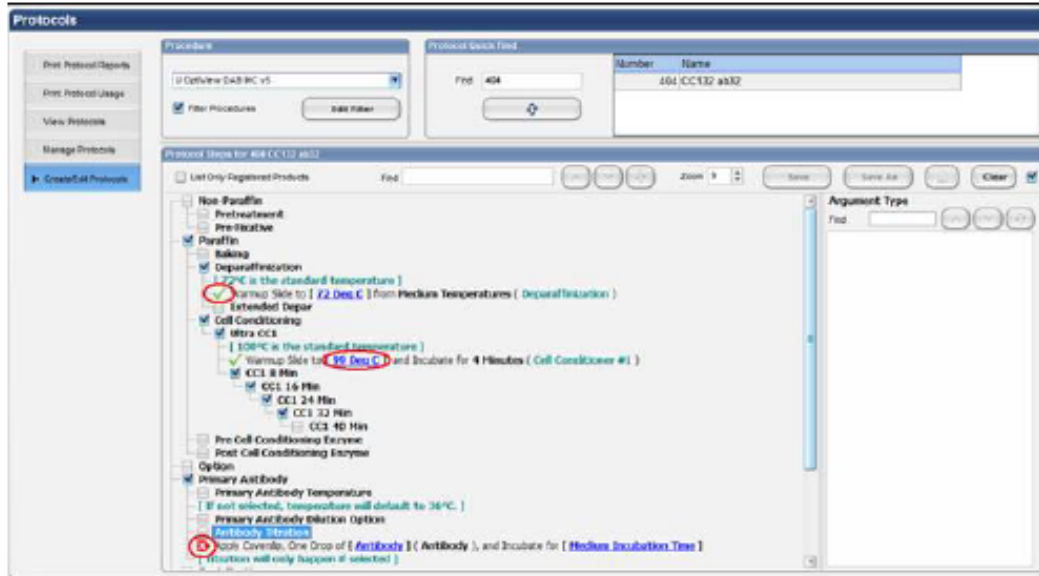
Videre kommer en kort beskrivelse av de ulike protokolltrinnene med utgangspunkt i deteksjonskitet OptiView som vises i bildet over:

- Non-Paraffin: Hvis man har cytologiuttstryk som ikke skal ha forbehandling velger man denne. Videre velger man «Wet Slide Load».
- Paraffin: Her velger man det som omhandler baking, deparaffinering og forbehandling av snitt.
  - o Baking: Velg «Warmup slide» 60 °C og «Incubation» 8 min.
  - o Deparaffinization: Velg deparaffinering og velg standard temperatur på 72 °C hvis ikke noe annet er anbefalt.
  - o Cell Conditioning: Dette er forbehandlingen av snittene og her kan man velge mellom:
    - Ultra CC1: Dette er heat induced epitop retrieval (HIER) med forbehandlingsbufferen CC1 som har en pH på 8-8,5. Velg standard temperatur på 100 °C hvis ikke annet er anbefalt, og velg ønsket forbehandlingstid. Dette er den forbehandlingsbufferen som brukes på de fleste antistoff. Mild forbehandling er 32 min, standard 64 min og hard 92 min.
    - Ultra CC2: CC2 er en annen forbehandlingsbuffer med pH 6. Denne brukes sjelden, men man gjør de samme valgene som for CC1 hvis den skal benyttes.
    - Enzymforbehandling: Man velger «Pre Cell Conditioning Enzyme» eller «Post Cell Conditioning Enzyme». Her kan man velge om man vil ha kun enzymforbehandling eller enzymforbehandling i kombinasjon med HIER enten før eller etter. Man velger protease 1, 2 eller 3 og inkubasjonstid.
- Option: Brukes sjelden, men hvis man har problemer med bakgrunnsfarge kan man ha en dispenser med «Antibody diluent med casein» i dette trinnet for å blokkere for bakgrunnsfarge.
- Primary Antibody: Her gjør man valg som har med antistoffet å gjøre.

- o Primary Antibody Temperatur: Hvis man ikke velger noe her vil inkubasjonstemperaturen være 36 °C.
- o Primary Antibody Dilution Option: Velger man dette trinnet fortynnes primærantistoffet 10x med reaksjonsbuffer, og dette kan brukes hvis man har mye bakgrunn.
- o Man må også velge om man vil titrere på antistoff eller om man vil brukes dispensere (Prepkitt eller RTU-antistoff). Skal man bruke dispenser må man velge antistoff og tid.
- Post Fixative: Brukes ikke.
- Peroxidase Inhibit: Her har man to valg:
  - o Pre Primary Peroxidase Inhibit: Her velger man om man vil at peroxidase blokkeringstrinnet skal skje før antistoffet dispensere på snittet.
  - o Post Primary Peroxidase Inhibit: Her velger man om man vil at peroxidase blokkeringstrinnet skal skje etter antistoffet dispensere på snittet. Velg dette alternativet på grunn av at noen av antistoffene er sensitive for dette reagenset.
- OptiView HQ Linker: Inkubasjonstiden på dette trinnet er 8 min hvis man ikke velger noe annet.
  - o HQ Linker Dilution Option: Velger man denne vil dette reagenset fortynnes 5x med reaksjonsbuffer på snittet. Dette kan velges hvis man har problemer med bakgrunn.
  - o OptiView HQ Universal Linker: Her kan man endre inkubasjonstiden til Linkeren til 12 min, for å få litt sterkere reaksjon.
- OptiView HRP Multimer: Inkubasjonstiden på dette trinnet er 8 min hvis man ikke velger noe annet.
  - o HRP Multimer Dilution Option: Velger man denne vil dette reagenset fortynnes med reaksjonsbuffer på snittet, men test fortynning av Linker før denne prøves ut. Man kan velge begge.
  - o HRP Multimer Incubation Time: Her kan man endre inkubasjonstiden til multimer til 12 min for å få litt sterkere reaksjon.
- OptiView Amplification: Hvis man velger dette trinnet må man velge inkubasjonstider for OV AMP H2O2/OV AMPLIFIER og OV AMP MULTIMER. Begynn med å velge 4 min. Man kan også velge OV AMP Multimer Dilution Option hvis man vil fortynne OV AMP multimer. Da fortynnes reagenset 5x med reaksjonsbuffer og dette brukes også hvis man har problemer med bakgrunn.
- Counterstain: Her kan man velge kontrastfarge og inkubasjonstid, men dette gjøres manuelt utenfor instrumentene på de fleste analyser.
  - o Post Counterstain: Dette er blåningstrinnet, og man velger Bluing reagent og inkubasjonstid.

Protokolltrinnene for deteksjonskittet UltraView og UltraView Red er ganske like som det som er beskrevet over for OptiView, men det er et linkertrinn som ikke er med her. Det er heller ikke mulig å endre inkubasjonstid på multimertrinnet. Denne er satt til 8 min. Hvis man ønsker amplifisering må man velge «Amplify» og videre velger man «Mouse Antibody Amp» eller «Rabbit Antibody Amp» ut i fra om det er et mus eller kanin antistoff. Dette står på beholderen til uforynnet primærantistoff. UltraWash er et fortyningstrinn man kan bruke hvis man har problemer med bakgrunnsfarge. UltraBlock kan man også bruke. Da fyller man en dispenser med Antibody diluent og blokkerer vevet.

Når man oppretter protokoller er det en del valg man må ta for å kunne få til å lagre protokollene. Se bilde under og forklaring av de ulike indikatorene som må velges under bildet:



- Grønn hake betyr at protokolltrinnet er fullført.
- Rødt kryss betyr at valg på dette protokolltrinnet ikke er utført
- Blå understreket tekst betyr at det er valg tilgjengelig som du kan klikke på og fylle inn med bestemte verdier. Disse valgene kommer opp under «Argument Type». Det kan være antistoff, inkubasjonstid, temperatur, reagentstype osv.

Når du har gjort det du skal trykker du «Save As» og får da opp en boks som du skriver protokollnavnet og velger et ledig protokollnummer. Har du bare endret og vil lagre den med samme navn og nummer trykker du «Save».

Når man skal ta ut etiketter til utprøving velger man «Create Label» i hovedbildet. Velg videre «Protocols». Da får man opp et vindu hvor man under «Select Template» velger «Titring». Velg de protokollen man skal bruke og trykk «Close/Print». I det vinduet som da kommer opp legger man inn fortynningen i feltet som heter «Fortynning», navn på antistoff i feltet «Antistoff» og prøvenummer i feltet «Patient ID», og så trykker man «Print».

Ved utprøvinger velger man titring og fortynner antistoffene i eppendorf-rør. For fremgangsmåte for bruk av instrumentene, se prosedyre [Immunhistokjemi - Daglig bruk av Benchmark Ultra](#). Her står også titring beskrevet. For beskrivelse av snitting, se prosedyre [Immunhistokjemi - Snitting](#).

### Fargevurdering

Når snittene er ferdig farget gjør ansvarlig lege og bioingeniøren som er ansvarlig for utprøvingen en vurdering av snittene. Følgende skal vurderes:

- Farging av riktige cellyper/strukturer (kjerner-, cytoplasma- og/eller membranfarge, granulær farge og lignende).
- Fargeintensiteten på positiv farging i forhold til ekspresjon.
- Antall positive celler i forhold til hva som er forventet.
- Eventuelt bakgrunnsfarging/uspesifikk farging.
- Tilfredsstillende bevart morfologi.

Fargeresultatene skrives inn i tabellen i utprøvingsskjema del 2 for hver enkelt utprøving slik:

- RESULTAT: En kort beskrivelse av farger resultatet.
- SUM: Oppsummering av farger resultatet, eksempel OK (bra farger resultat), OK- (ikke helt optimal farging) eller – (ikke bra nok farging).

Videre settes det opp oppsett for videre utprøving med utgangspunkt i følgende:



- Vurder hvilke forbehandlingsmetode som er best egnet.
- Ved for sterk farging fortynnes antistoffet, og hvor mye det skal fortynnes må vurderes i hvert enkelt tilfelle.
- Ved for svak farging må man prøve en lavere fortynning. Man kan også eventuelt forlenge inkubasjonstiden til antistoffet, men dette bør unngås om mulig fordi man vil unngå for lange protokoller.
- Man må vurdere om det kan være aktuelt å prøve amplifiseringskit, men dette bør unngås om mulig.

Videre gjentar man prosessen med å optimalisere i samråd med ansvarlig lege til man har kommet frem til en egnet protokoll. Antall prøver inkludert i utprøvingen vurderes i hvert enkelt tilfelle av ansvarlig lege og bioingeniør. Protokollene bør prøves ut på normalvev og tumorvev i de tilfellene det er mulig.

Når optimaliseringen er ferdig fyller man ut de siste punktene i utprøvingsskjemaet der man oppsummerer resultatene fra de ulike rundene med utprøving og skriver en kort fargevurdering, eventuelt om det er noe spesielt med fargingen. Tilslutt skriver man en konklusjon med hvilke forbehandling man har valgt, deteksjonskit, fortynning, inkubasjonstid antistoff og eventuelt amplifisering. I tillegg skriver man hvordan kontrollmateriale som skal brukes og når antistoffet tas i bruk i rutinediagnostikken.

### **Kontrollmateriale**

Ut i fra innhentet informasjon og hva antistoffet er tenkt brukt til velges det ut egnet kontrollmateriale. NordiQC har mange tips til kontrollmateriale. Sensitiviteten og spesifisiteten vurderes på grunnlag av kontrollmaterialet. Man må ved hjelp av kontrollprosedyrer sikre at man verken får falsk negativ eller falsk positive farginger. Det skal derfor være vev med både positive og negative celler i en kontroll for å unngå dette. Det positive vevet bør være med høy og lav ekspresjon for å kunne si noe om sensitiviteten til antistoffet. Hvis mulig benyttes en av multi-tissue (MTB)-blokkene som allerede finnes. For fremgangsmåte for tillaging av kontrollblokker og oversikt over hva som allerede finnes av MTB-blokker, se prosedyre [Immunhistokjemi - Tillaging av kontrollblokker](#).

### **Validering**

Lag en ny revisjon av valideringsplanen å endre versjonsnummer på utprøvingsskjemaet og legg ved rapporten. I tillegg legger man protokollen til antistoffet med som vedlegg. Send rapporten på høring til medisinsk ansvarlig, fagansvarlig bioingeniør/spesialbioingeniør og seksjonsleder. Når høringsrunden er ferdig sendes rapporten til godkjenning til kvalitetskoordinator. Se prosedyre [Valg, validering og innføring av nye analyser, metoder eller utstyr, AP og AMG](#).

### **Relaterte dokumenter**

- [Immunhistokjemi - Daglig bruk av Benchmark Ultra](#)
- [Immunhistokjemi - Implementering av primærantistoff i rutinediagnostikk](#)
- [Immunhistokjemi - Snitting](#)
- [Immunhistokjemi - Tillaging av kontrollblokker](#)
- [Immunhistokjemi - Valg av primærantistoff til utprøving](#)
- [Valg, validering og innføring av nye analyser, metoder eller utstyr, AP og AMG](#)

