

Kamilla Robertsen og Nils Asle Sara Anti

Optimalisering og validering av fargeprotokoller for Herpes Simplex type 1 & 2, Adenovirus og Pneumocystis jirovecii

Utprøving av primærantistoff på BenchMark Ultra

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Mai 2022

Kamilla Robertsen og Nils Asle Sara Anti

Optimalisering og validering av fargeprotokoller for Herpes Simplex type 1 & 2, Adenovirus og Pneumocystis jirovecii

Utprøving av primærantistoff på BenchMark Ultra

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

FORORD

Denne prosjektoppgaven ble gitt av, og utført ved, Enhet for Immunhistokjemi, Avdeling for Patologi ved St. Olavs Hospital som en avsluttende oppgave via Institutt for Bioingeniørfag, NTNU.

Først og fremst ønsker vi å uttrykke stor takknemlighet til spesialbioingeniør Lise Eid Wålberg for faglig veiledning og all hjelp gjennom prosjektperioden. Vi takker hjertelig for vielse av tid utenfor arbeidstid, i tillegg til opplæring av instrument og imøtekommelse for studenter som ønsker å fordype seg i immunhistokjemi og patologi. Vi setter stor pris på tålmodigheten, hjelpsomheten og all veiledning.

Vi ønsker også å takke prosessveileder Asle Grislingås for god og hjelpsom veiledning, i tillegg til oppmuntrende og motiverende tilbakemeldinger på oppgaven underveis i skriveprosessen. Tusen takk til familie, venner og bekjente som har vært behjelpelig med motivasjon og støtte under travle og vanskelige perioder under bachelorperioden. Takk for at dere har gitt nytt pågangsmot og vært ivrig på korrekturlesing av oppgaven vår. Videre vil vi takke bioingeniører og patologer ved avdelingen for videre opplæring av fagfeltet og veiledning når vi trengte det.

Immunhistokjemi har vært et svært interessant tema å fordype seg i – både teori og fagstoff, i tillegg til prosjektet på en generell basis. Vi håper at vi har gjort en god jobb for dere, og at de resultater vi har produsert vil kunne benyttes videre av dere for å være behjelpelige for de pasienter som trenger det.

Kamilla Robertsen og Nils Asle Sara Anti

Trondheim, 18.05.2022

SAMMENDRAG

Denne oppgaven ble gitt som en avsluttende bacheloroppgave for bioingeniørutdanningen ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Hensikten med prosjektet var å gjennomføre en optimalisering og validering av fargeprotokoller med primærantistoffer for Herpes Simplex type 1 og 2, Adenovirus og *Pneumocystis jirovecii*, slik at Avdeling for patologi kan innføre disse som en del av rutinediagnostikk. Protokollene ble optimaliser og validert på det immunhistokjemiske instrumentet BenchMark Ultra fra Ventana/Roche Diagnostics.

Nye fargeprotokoller for HSV-1 og HSV-2 vil gjøre det mulig å sette en slik diagnose med stor nøyaktighet og høy sikkerhet, ettersom en i dag bare kan kommentere på og PCR-resultater og sykdomsmanifestasjoner og hvordan disse er like for andre virus i herpesfamilien, deriblant Varicella Zoster-virus og Epstein-Barr. For *Pneumocystis jirovecii* kan en i dag gjennomføre diagnostikk via PCR, men nye fargeprotokoller vil kunne gi sikker innsikt i om *P. jirovecii* er årsaken til en sykdom, da ettersom mikroben kan maskeres i andre luftveissykdommer. Adenovirus ble ikke inkludert i utprøving av protokoller ettersom en manglet egnet prøvemateriale.

De protokoller som førte til resultater som var tydelige og pålitelige vil fortløpende bli en del av rutinediagnostikk. Gjennom utprøving ble det bestemt at RTU-primærantistoff for HSV-1 og HSV-2 i CC1-protokoll med 64 minutters forbehandlingstid gir resultater hvor en lett kan observere og identifisere virusets struktur og kjerne, samtidig som cellestrukturen til infiserte celler er tydelig. Protokollen blir tatt i bruk som en del av rutinediagnostikk.

For primærantistoff for *Pneumocystis jirovecii* ble det bestemt at en primærantistofffortynning på 1:25 i protokoll CC1 med 64 minutters forbehandlingstid gir optimale resultater. Resultatet av protokollen er tydelig markerte områder av *P. jirovecii*, samtidig som en unngår større mengder bakgrunnsfarging. Protokollen ga noe uspesifikk farging av blodkar og makrofager, og krever videre utprøving. Protokollen vil likevel bli tatt i bruk i rutinediagnostikk.

ABSTRACT

This thesis was given as the final assignment at Norges Teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) by the Faculty of Natural Sciences, Department of Biomedical Laboratory Science. The project's purpose was to find new primary antibodies for Herpes Simplex type 1 and 2, Adenovirus, and *Pneumocystis jirovecii*. To do that, new staining protocols had to be made and optimized so they could be a part of diagnostic testing. This was done at the department for pathology, with BenchMark Ultra from Ventana/Roche Diagnostics, an immunohistochemical instrument.

New staining protocols for HSV-1 and HSV-2 would make it possible to accurately identify the diagnosis in question. The one currently used only reveals the PCR-results and manifestation, subsequently a comparison will be made to other viruses in the Herpesviridae family, like Varicella Zoster and Epstein-Barr. For the fungi *Pneumocystis jirovecii* a diagnosis can be made with PCR, but a new staining protocol will result in making it known if *P. jirovecii* is the cause of a disease. Adenovirus was lacking in samples and thus not included in the testing of new staining protocols.

Throughout the testing it was determined that the best protocol for HSV-1 and HSV-2 was with primary RTU-antibodies, and a pre-treatment with CC1 for 64 minutes. That gives results where the structure of both the virus and the infected cells are visible and easily identified, and thus the protocol was added to routine diagnostic testing.

For *Pneumocystis jirovecii* the best protocol was determined to have a primary antibody diluent of 1:25 with the pre-treatment CC1 for 64 minutes. The results show clearly defined areas with *P. jirovecii* while avoiding the most amount of background staining. However, the protocol did have some unspecific staining of blood vessels and macrophages. Thus, the protocol will require further testing, but will still be included to the routine diagnostic testing.

FORKORTELSER OG BEGREPSAVKLARINGER

Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over de forkortninger og fagbegreper som blir benyttet i oppgaveteksten, samt en forklaring på disse.

Begrep	Forklaring
PCP	Pneumocystisk Pneumoni. Opportunistisk pneumoni som kommer fra infeksjon med <i>Pneumocystis jirovecii</i> .
Protokoll	En sammensetning av fremgangsmåte og betingelser som vil utgjøre en prosess. Her vil prosessen innebære farging av vevsmateriale.
Primærantistoff	Proteinspesifikke monoklonale eller polyklonale immunoglobuliner som høstes fra vertsdyr, deriblant kanin, mus og geit. Til deteksjon og diagnostiske målinger.
HIER	Heat-induced epitope retrieval. Bruk av varme sammen med spesifikke buffere for å gjenopprette antigenreaktivitet i formalinfiksert, parafininnstøpt vev.
RTU-antistoff	«Ready to use»-antistoff. Antistoff som leveres ferdig fortynnet fra produsent. Motsetning til antistoff-konsentrat som må manuelt fortynnes.
HSV-1 / HSV-2	Herpes Simplex type 1 og Herpes Simplex type 2
PCR	Polymerasekjedereaksjon. Mikrobiologisk metode for å oppkopiere DNA for å identifisere bakterier og virus.

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD	I
SAMMENDRAG.....	II
ABSTRACT.....	III
FORKORTELSER OG BEGREPSAVKLARINGER.....	IV
1. INNLEDNING.....	1
1.1 Hensikten med prosjektet.....	1
1.2 Mikroorganismer.....	1
1.2.1 Diagnostikk	2
1.2.2 Farging	2
1.3 Medisinsk Virologi	3
1.3.1 Interaksjon mellom virus og celle	3
1.3.2 Virusinfeksjon	4
1.4 Medisinsk Mykologi	5
1.4.1 Morfologi	5
1.4.2 Diagnostikk og påvisning.....	6
1.5 Immunhistokjemi	7
1.5.1 Antistoffer.....	7
1.5.3 Antigener.....	8
1.6 Herpes Simplex.....	9
1.6.1 Replikasjon.....	9
1.6.3 Infeksjon og sykdomsbilde	11
1.6.4 Diagnostikk	12
1.7 Adenovirus.....	12
1.7.1 Infeksjon og sykdomsforløp.....	13
1.7.2 Diagnostikk	14
1.8 Pneumocystis jirovecii	14
1.8.2 Klinisk eksempel.....	15
1.8.3 Diagnostikk	17
1.9 Problemstilling.....	17
2. MATERIALE OG METODE	18
2.1 Prinsipp for immunhistokjemi	18

2.1.1	<i>Deparafinering</i>	18
2.1.2	<i>Forbehandling</i>	18
2.1.3	<i>Deteksjonskit OptiView DAB IHC</i>	20
2.1.4	<i>Kontrastfarging med hematoxylin</i>	21
2.1.5	<i>Dehydrering med Xylen</i>	22
2.1.6	<i>Montering</i>	22
2.2	Prøvemateriale	23
2.2.1	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	23
2.2.2	<i>Herpes Simplex</i>	27
2.3	Kontrollmateriale	28
2.3.1	<i>Positiv kontroll</i>	28
2.3.1	<i>Negativ kontroll</i>	29
2.4	Reagenser.....	30
2.5	Utstyr.....	30
2.6	Metode	31
2.6.1	<i>Kriterier for utprøving</i>	31
2.6.2	<i>Planlegging og validering</i>	31
3.	RESULTATER OG DISKUSJON.....	32
3.1	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	32
3.1.1	<i>Optimal protokoll</i>	32
3.1.2	<i>Sammenligning av protokoller</i>	33
3.1.4	<i>Resultater og videre bruk</i>	35
3.2	<i>Herpes Simplex</i>	36
3.2.1	<i>Optimal protokoll</i>	36
3.2.2	<i>Sammenligning av protokoller</i>	37
3.2.4	<i>Resultater og videre bruk</i>	39
3.3	Adenovirus	40
3.4	Mulige feilkilder under utprøving	40
4.	KONKLUSJON	42
5.	REFERANSER	43

1. INNLEDNING

1.1 Hensikten med prosjektet

Bacheloroppgaven ble gitt av Enhet for Immunhistokjemi, Avdeling for Patologi, ved St. Olavs Hospital, Trondheim, hvor den også ble utført. Hensikten med bachelorprosjektet var å gjennomføre en optimalisering og validering for fargeprotokoller med primærantistoffene Herpes Simplex Virus 1&2 fra BioCare Medical, Adenovirus fra Cell Marque, i tillegg til Pneumocystis jirovecii fra Santa Cruz. Funn fra prosjektet skal utgjøre grunnlaget for en vurdering rundt om primærantistoffene som ble benyttet i oppgaven kan implementeres som en del av rutinediagnostikk ved Enhet for Immunhistokjemi, Avdeling for Patologi. Muligheten for implementering er avhengig av god fargekvalitet.

1.2 Mikroorganismer

Mennesker omgis av mikroorganismer, hvor noen er patogene, mens andre er en del av mikrobene som koloniserer kroppen i form av human normalflora – de mikroorganismer som vil eksistere i menneskekroppen under normale omstendigheter, og som deltar i å opprettholde regulær organ- og kroppsfunksjon. Mikrobeforårsakede infeksjoner kan deles i to hovedgrupper:

- i. Endogene infeksjoner – infeksjoner som vil forekomme dersom mikrober fra normalflora sprer seg til sterile deler av kroppen (1)
- ii. Eksogene infeksjoner – infeksjoner som vil oppstå ved kontakt med eksterne mikrober. Kjønnssykdommer og de fleste infeksjoner med virus, sopp og parasitter vil alle falle inn i denne gruppen (1).

Noen sykdomsbilder under mikrobestyrt infeksjon vil føre med seg et enkelt diagnostikkforløp, da disse inkluderer mikrober som fører til et sykdomsløp som vil være svært gjenkjennelig og spesifikt for det relevante patogenet.

Andre sykdomsbilder er noe vanskeligere å koble til spesifikke patogener, ettersom manifestasjonene kan være generelle tegn for en gruppe mikrober. Eksempelvis vil både lungebetennelse og hjernehinnebetennelse kunne skyldes flere typer patogener, da symptomer vil være identiske.

De fleste mikrober vil være patogene dersom vertens forhold in-vivo ligger til rette for dette. Pasienter med nedsatt immunapparat vil kunne gjennomgå et mulig fatalt sykdomsforløp fra en mikrobekyldt infeksjon som ville gitt et mildt til moderat sykdomsforløp for pasienter med normale forhold innenfor eget immunforsvar. Et slikt eksempel vil være infeksjon fra fungi-arten *Pneumocystis jirovecii*.

1.2.1 Diagnostikk

Diagnostikk av mikrober vil være kritisk for å stille infeksjonsdiagnose, og da videre gi et grunnlag for behandling (1). Hovedårsaken for diagnostikk vil inkludere å påvise en infeksjonsmikrobe via:

1. Mikroskopi
2. Immunhistokjemi
3. Dyrkning av mikrobe med identifisering og resistensbestemmelse

Ofte vil slike metoder kombineres, og oppgaven vil i all hovedsak inkludere de to førstnevnte diagnostiske metodene.

1.2.2 Farging

En benytter seg av histokjemiske fargemetoder for å kunne identifisere og lokalisere biokjemiske substanser i celler og vev, i tillegg til oppbygningen til både normalt og patogent vev. Gjennom selektiv farging kan en flytte fokuset over til de organeller eller lokalisasjonene en ønsker å undersøke, både som en del av diagnostikk ved infeksjoner og sykdom, men også under normale forhold. I hovedsak vil både immunhistokjemisk og histokjemisk farging benytte seg av visse

fremgangsmåter hvor målet er å synliggjøre celle- og vevsstrukturer som vil bli tydeliggjort ved farging og videre undersøkt i mikroskop.

1.3 Medisinsk Virologi

Virus regnes som ikke-levende mikroorganismer, og er dermed avhengig av levende celler for formering (1). Virus kan da kalles en intracellulær parasitt med eget arvestoff, da enten i form av DNA eller RNA. Arvestoffet er innkapslet i et kapsid – et solid proteinskall som vil ta en beskyttende rolle, både for viruset i seg selv, men også under replikasjon.

Noen virus har ikke kapsid, og kalles derfor nakne virus. Slike virus vil ha ett eller flere proteiner i et kapsid, hvor kapsidet fungerer som en ligand som vil binde virus til en vertscelles reseptorer ved første del av en eventuell infeksjonssyklus (1).

Virusproteiner vil videre festes til undersiden av cellemembranen, hvor en samling av kapsidproteiner og arvestoff er samlet, og resultatet vil være en fortregelse av cellulære proteiner. Proteiner som stikker ut av ytre virusmembran vil ha en primær funksjon for binding av virus til cellereseptor og videre opptak av viruset i cellen. For noen virus, som for eksempel Herpes Simplex, vil virusmembranen være tilnærmet en sekk, hvor innholdet er viruskapsid og proteiner – tegumentproteiner – som spiller en sentral rolle i oppstart av virusreplikasjon intracellulært (1).

1.3.1 Interaksjon mellom virus og celle

En celleds egenskap til å produsere virus vil være avhengig av om det finnes aktuelle virusreseptorer på celleoverflaten (1). Cellen må videre inneholde de transkripsjonsfaktorene og enzymer som kreves for videre replikasjon av viruset, hvor en slik replikasjon vil være mest gunstig og effektiv ved S-fasen av en cellyklus.

1.3.2 Virusinfeksjon

I hvilken grad et virus er i stand til å fremkalle sykdom, virulens, vil være varierende hos forskjellige typer virus. Virulensfaktoren er til dels ukjent for noen virus, men defineres som de egenskaper for et virus som vil fremkalle sykdom (1). Avhengig av multiplikasjonssete, vil virus kunne skilles ut via luftveissekret, sæd, vaginalsekret og avføring - ved hudinfeksjoner vil et virus kunne skilles ut, og videre spres, via hudoverflaten. I visse tilfeller vil virus også kunne spres via blod, vev og vevsvæske. En virusinfeksjon vil starte ved virusoverføring fra en gitt smittekilde til en mottaker, hvor smittetyper vil variere for forskjellige virustyper. Smittekilder vil kunne være dråpe- og luftsmitte, i tillegg til kontaktsmitte, seksuell smitte og blodsmitte. For noen virus vil også andre arter enn mottaker være smittekilde, for eksempel mygg, flått og andre insekter. De viktigste smitteinngangene til humane verter vil inkludere munn, nese og andre slimhinner, i tillegg til luftveiseepitel (1).

Forskjellige infeksjonsgrader og -typer vil deles inn etter:

1. Akutt infeksjon
2. Kronisk infeksjon
3. Reaktivert infeksjon

En akutt virusinfeksjon vil innebære at en vert gjennomgår lokale symptomer som varierer etter smittevei. Virus vil videre kunne spres i kroppen til verten via nervebaner, blod og lymfer (1). Etter en akutt virusinfeksjon, vil immunforsvaret sørge for en spesifikk immunitet for det aktuelle viruset, da via dannelse av blokkerende antistoffer - antistoffer som vil forhindre reinfeksjon, eller at en eventuell reinfeksjon ikke medfører sykdom (1).

Smitteoverføring av visse virus vil kunne føre til en kronisk infeksjon hos vert - en infeksjon som vil medfølge en kontinuerlig produksjon av det aktuelle viruset som vil pågå livet ut. Under en slik infeksjon vil det ikke dannes en immunitet hos vert (1).

Noen virus vil gå inn i en latentfase etter primære akutte infeksjon, hvor en latent fase vil dannes i bestemte celletyper, avhengig av det aktuelle viruset, og vil derfra kunne reaktiveres og da gi en ny infeksjon (1). Virusets og vertens samspill, som videre vil gi sykdom, vil ha stor variasjon alt

ettersom hvilket virus infeksjonen skyldes. Varierende virus vil ha forskjellige infeksjons- og smitteoverføringsstrategier, i tillegg til forskjellig replikasjon og interaksjon med vertens immunsystemer, da både medfødt og adaptivt (1).

1.4 Medisinsk Mykologi

Sopp regnes som en egen klasse av eukaryote organismer. I naturen vil sopparter ha kritisk funksjon i å bryte ned organisk materiale, og noen vil i tillegg ha funksjoner som er praktiske for mennesker, deriblant produksjon av antibiotika, steroider og syrer.

Medisinsk sett vil noen sopparter kunne medføre human sykdom ved infeksjon. Av humane infeksjoner er overflattisk infeksjon av hud, hår, negler og slimhinner er å regne som vanligst, mens andre arter vil føre til en invasiv sykdomsutvikling, hvor immunsvekkede pasienter er mest utsatte (1).

1.4.1 Morfologi

Sopper, som eukaryote organismer, vil skilles fra dyr og planter i den forstand at de har en rigid cellevegg oppbygd av kitin og glukose, da i tillegg til en cellemembran hvor kolesterol er byttet ut av ergosterol (1). Organismene kan være encellede eller flercellede, og vil ligne andre organisme på et cellulært nivå. I medisinsk sammenheng vil klassifisering av sopper gjøres etter infeksjonstype soppen vil gi i humant vev;

1. Overflattiske sopper
2. Opportunistiske sopper
3. Invasive sopper

Overflatiske soppinfeksjoner vil være lokalisert på hud, hår, negler og i slimhinner, og regnes videre som den vanligste typen infeksjon (1).

En opportunistisk soppinfeksjon defineres som en infeksjon med en sopp som vanligvis ikke vil gi sykdom dersom immunsystemet er velfungerende (2). Hos immunkompromitterte pasienter, eller i tilfeller hvor normalflora endres, vil en opportunistisk soppinfeksjon variere i alvorlighetsgrad fra mild til potensielt dødelig.

Soppinfeksjoner som er å regne som invasive kan defineres som en infeksjon som har gått inn i blodbanen og som derfra vil kunne spres videre til organer og vev (3). Infeksjonen er å regne som alvorlig hos immunsvekkede personer, hvor et eksempel på sykdom er *Pneumocystis pneumonia* som følge av infeksjon av *Pneumocystis jirovecii*.

1.4.2 Diagnostikk og påvisning

Diagnostikk av sopp som årsak til infeksjon og sykdom vil være basert på mikrobiologisk dyrkning og resistensbestemmelse, i tillegg til mikroskopi, antigenpåvisning, bestemmelse av antistoff og metoder for påvisning av spesifikke nukleinsyrer (1). For farging og videre mikroskopering, vil man kunne bruke formalinfiksert, parafininnstøpt pasientmateriale fra biopsier eller obduksjoner, før dette videre behandles via primærantistoffer og kontrastfarging. Resultatet være spesifikk farging og markering av sopp.

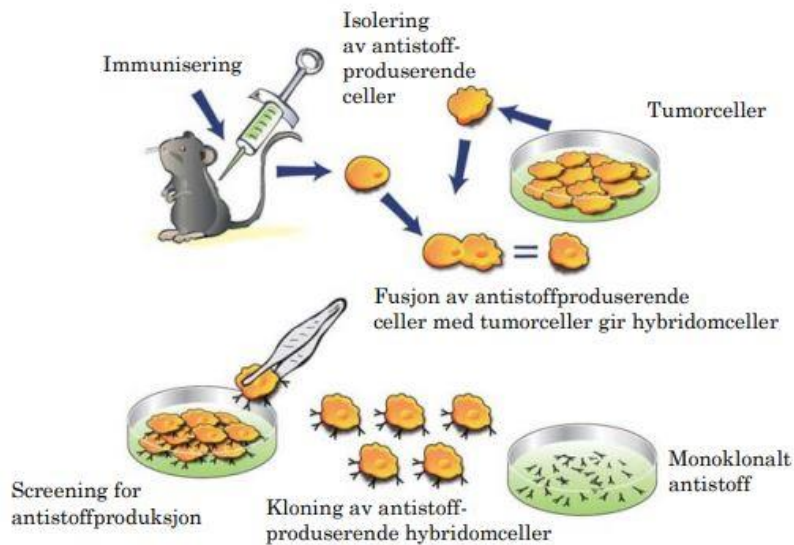
1.5 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi defineres som en metode hvor en kan detektere et eller flere antigener i et gitt vevssnitt via tilførsel av, og inkubering med, spesifikke primærantistoffer som vil bindes til tilhørende antigener på celleoverflaten i prøven.

1.5.1 Antistoffer

Antistoffer, eller immunoglobuliner, defineres som proteiner som vil bindes til smittestoffer, antigener, som en immunrespons og for å videre bekjempe en fremprovosert infeksjon. Antistoffer vil produseres av plasmaceller, og oppholdes i blod og vevsvæske (4). Et spesifikt antistoff vil kun bindes til et korrelerende antigen. Bindingssetet for antigener vil være ulike for hvert antistoff.

Antistoffer kan være monoklonale eller polyklonale. Monoklonale antistoffer produseres fra genetisk identiske celler, og vil ha lik reaksjonsevne. Slike immunoglobuliner kan finnes i blod fra kreftpasienter, men kan også produseres via immunisering av mus via inokulering av det antigenet en ønsker at et spesifikt antistoff skal reagere med. Etter en gitt tidsperiode vil en finne antistoffproduserende celler i milten, og disse cellene kan ekstraheres, og en sammensetning mellom disse cellene og kreftceller gjennomføres, som vist i figur 1. De syntetiserte hybridcellene vil kunne videre benyttes i diagnostikk (5). Monoklonale antistoffer vil ha ett bindingssete for antigener, og vil benyttes i større grad innen immunologiske metoder grunnet høyere spesifisitet (6).



Figur 1: Syntetisering av monoklonale antistoffer. Bildet er hentet fra "Immunologiske metoder" (6)

Polyklonale antistoffer produseres fra flere B-celler som antigenrespons, og er altså en blanding av flere ulike antistoffer som vil gjenkjenne flere epitoper på antigener. Ettersom antistoffene vil reagere på flere epitoper, vil dette bety at polyklonale antistoffer har flere bindingssteder for antigener. Antigenene vil produseres via inokulasjon av mus, geit og kanin, hvor en igangsetter produksjonen av IgG-antistoff i B-celler. IgG vil kunne ekstraheres fra dyrets serum (7).

1.5.2 Primærantistoffer

Primærantistoffer er immunglobuliner som bindes til spesifikke proteiner, da med grunnlag i deteksjon og diagnostisk måling (8).

1.5.3 Antigener

Antigener defineres som molekulære strukturer av fremmedlegemer som kan aktivere en immunrespons ved kontakt med kroppen via gjenkjenning av B- og T-cellerreseptorer. Delen av

antigenet som kommer i kontakt med reseptoren defineres som antigenepitop. Strukturene kan være proteiner, polysakkarider, nukleinsyrer eller lipider, og vil inkludere bestanddeler av mikroorganismer som virus, sopp og bakterier (9).

1.6 Herpes Simplex

Humane herpesvirus defineres som en samling av ni typer virus, hvor alle vil ha lignende oppbygning, altså vil alle være membrankledde og ha dobbelttrådet DNA som arvestoff (1). Videre vil herpesvirus ha latensevne, da virus-DNA vil kunne ligge latent og asymptomatisk i spesifikke celler etter en primærinfeksjon, hvor disse kan reaktiveres og videre danne en ny aktiv infeksjon. Felles for herpesvirus er at de har stor evne til unnvikning av immunforsvaret.

Herpes Simplex (HSV) type 1 og 2 regnes som to forskjellige virus, men grunnet deres felles egenskaper, vil de for det meste omtales som ett virus. Med tanke på morfologi, replikasjonsstrategi og sykdomsbilde vil både HSV-1 og HSV-2 være like.

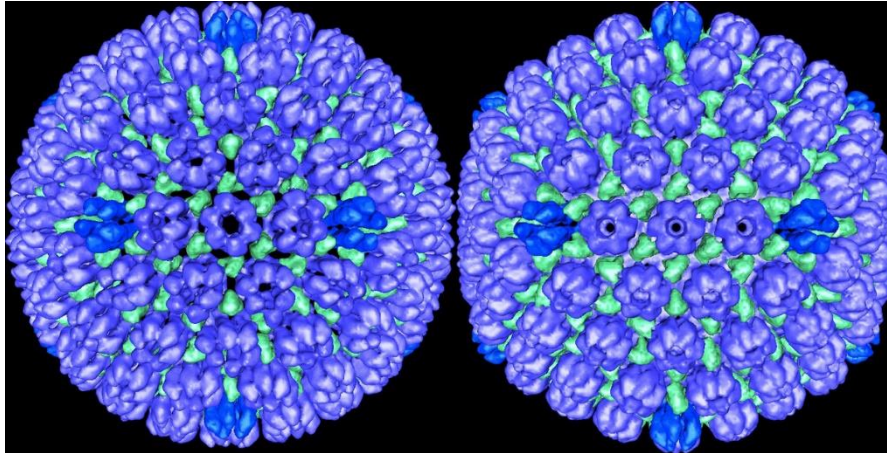
Herpes Simplex type 1 og 2 (HSV-1 og HSV-2) vil kunne infisere de aller fleste humane celler, men begge vil entre kroppen via slimhinner og hudoverflaten. I området mellom kapsid og virusmembran vil en finne tegument, altså en proteinmasse, som vil tømmes i cellers cytoplasma under en virusinfeksjon.

1.6.1 Replikasjon

Grunnlaget for vevsbinding og opptak av HSV i en vertscelle er i all hovedsak glykoproteiner på virusmembranen, som videre vil bindes til heparansulfat på vertscellens overflatemembran (1) (10). Strukturen for Herpes Simplex med glykoproteiner er vist i figur 2. Dette vil føre til en binding av viruset til spesifikke reseptorer på celleoverflaten, hvor virus- og cellemembranen gjennomgår fusjon. Virusets nukleokapsid vil frigjøres i vertscellens cytoplasma, før det fraktes videre til cellens kjernemembran hvor kapsidet lyseres og virus-DNA taes opp i cellekjernen (1).

Virusreplikasjon for Herpes Simplex kan deles inn i tre faser:

1. *Immediate early*-fasen: transkripsjon og translasjon av virusets regulatoriske proteiner.
2. *Early*-fasen: enzymer som er kritiske for virusets DNA-replikasjon dannes.
3. *Late*-fasen: produksjon av strukturelle proteiner som videre vil danne virusets kapsid og glykoproteiner til virusets membran.



Figur 2: Figuren viser overflaten til Herpes Simplex. Glykoproteiner på virusets overflate kan sees i sterk lilla. Bilde hentet fra "Herpesvirus» (11).

1.6.2 Latens

Funksjonen for latens er felles for de ni typene herpesvirus. En latent fase innebærer at det, etter en primær virusinfeksjon, vil forbli virus-DNA i spesifikke celletyper hvor det tidligere har pågått infeksjon. Disse virus-DNAene vil kunne reaktiveres under perioder hvor verten er utsatt for omkringliggende faktorer som vil kunne påvirke kroppen. Faktorer vil inkludere å gjennomgå en annen infeksjon som f.eks forkjølelse, i tillegg til menstruasjon og perioder med stress, og en ny aktiv infeksjon vil da oppstå.

Ved hud og slimhinneinfeksjoner av herpes, vil nukleokapsid for HSV vandre inn til omkringliggende og lokale nervebaner, hvor det videre kan bli liggende som ekstrakromosomalt,

altså med lokalisasjon utenfor kromosomene, sirkulært virus-DNA i cellekjerner hos ganglier – en samling av nervevev (1). Herpes Simplex type 1 vil lettere kunne etablere en latensfase, men både HSV-1 og HSV-2 vil kunne reaktiveres som et resultat av omkringliggende faktorer.

1.6.3 Infeksjon og sykdomsbilde

Primær multiplikasjon og infeksjon av Herpes Simplex type 1 og 2 vil i all hovedsak finne sted i hud- og slimhinneepitel. Ved start av en virusinfeksjon, vil HSV-1 eller HSV-2 binde og aktivere mønstergjenkjenningreseptorer, og den infiserte cellen vil dø som et resultat av inaktivering av cellens molekylsyntese. Felles for alle herpestyper, da også Herpes Simplex 1 og 2, er virusets evne til å unngå deteksjon fra vertens immunsystem, noe som vil skje i to trinn.

Under en aktiv virusinfeksjon vil HSV blokkere presentasjonen av virusproteiner på vertens cellemembranmolekyler, hvor dette vil føre til at viruset kan unngå cytotoksiske T-celler. Videre vil det, under virusets latente fase, kun produseres virus-RNA, hvor resultatet er at HSV da ikke kan gjenkjennes av T-celler (1). Herpes Simplex vil videre kunne spres mellom vertsceller uten å eksponeres for immunapparatet.

Sykdomsmanifestasjonene som vil opptre under en aktiv infeksjon av Herpes Simplex vil være avhengig av hvilken variant som er skyldig. HSV-1 vil gi et relativt mildt sykdomsbilde, da med blemmer som i all hovedsak oppstår i kroppsåpninger, deriblant munn og nese (11). Sykdomsbildet vil sannsynligvis fremtre som et resultat av en annen pågående infeksjon, for eksempel influensa, i tillegg til stress eller ytre stimuli.

En aktiv infeksjon av HSV-2 vil gi et mer alvorlig sykdomsbilde, da i forhold til HSV-1. Under infeksjonen vil væskefylte blemmer fremtre, hvor disse blemmene vil kunne bryte og gi åpne og

smertefulle sår (11). Utbruddet vil i all hovedsak opptre i genitalia, og en aktiv infeksjon kan medføre andre generelle tegn på sykdom, deriblant feber og hovne lymfeknuter.

1.6.4 Diagnostikk

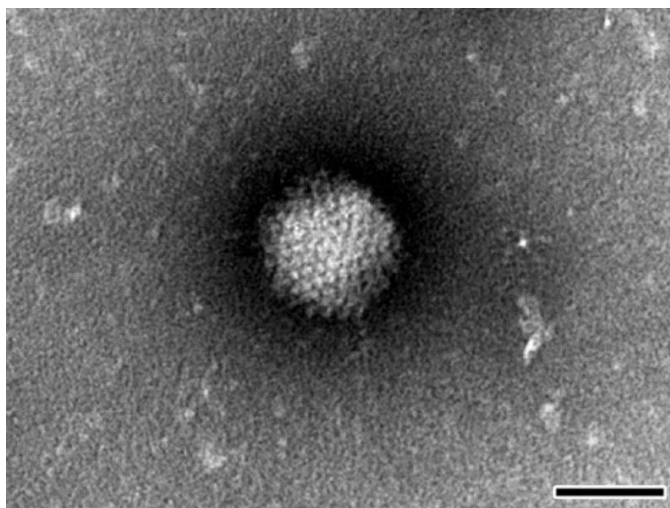
Herpes Simplex vil kunne påvises via penselprøver fra lesjoner forårsaket av en infeksjon, spinalvæske og andre biopsier, i tillegg til via EDTA-blod og påvisning av antistoffer (1). Påvisning i prøvematerialet vil i all hovedsak gjennomføres via PCR.

Immunhistokjemi kan også benyttes til diagnostikk og påvisning, da hvor formålet vil være å spesifikt kunne skille Herpes Simplex type 1 og 2 fra andre virus i familien Herpesviridae, da henholdsvis Varicella zoster-virus og Epstein-Barr-virus, som alle vil ligne hverandre i forhold til sykdomsbilde. Gjennom immunhistokjemisk farging via primærantistoff, vil HSV-1 og HSV-2 danne store, og ofte multinukleære, celler hvor virusets tilstedeværelse i cellen kan morfologisk beskrives som glassaktig (12).

1.7 Adenovirus

Adenovirus defineres som nakne DNA-virus, og en infeksjon vil gi et sykdomsbilde som inkluderer luftveisinfeksjoner, øyeinfeksjoner og gastroenteritter. Viruset er å regne som robust, og vil være resistent for de fleste typer desinfeksjonsmidler, deriblant kroppssyrer (1).

Virusstruktur for adenovirus er vist i figur 3, hvor en kan se kapsomerer og heksoner på overflaten. I tillegg til kapsomerer og heksoner, vil adenovirusets overflate ha 12 hjørnefibere som vil festes til reseptorer på celleoverflaten ved infeksjon (1).



Figur 3: Figuren viser ytre struktur av adenovirus. Bildet er tatt via elektronmikroskop. Bilde hentet fra “ResearchGate” (13).

1.7.1 Infeksjon og sykdomsforløp

Primære infeksjonsveier for adenovirus inkluderer fekal-oral smittevei, i tillegg til aerosol dråpesmitte og eksponering for infeksjøs materiale i form av blod eller vev (Ison). Adenovirus vil gjennomgå infisering av epitelceller i svelg og tarm, konjunktiva og videre spredning til lymfatisk vev (1).

Variasjonen av kliniske tilstander adenovirus vil kunne fremkalle vil variere fra asymptomatiske infeksjoner, til akutte og livstruende sykdomsbilder hos immunsvekkede pasienter. Videre vil eksponering for adenovirus kunne føre til langvarige asymptomatiske infeksjoner av lymfoepitelvev (14). Infeksjon av adenovirus hos immunfriske pasienter vil i de aller fleste tilfeller være selvbegrensende, hvor sykdomsbildet i all hovedsak inkluderer respiratoriske, gastrointestinale og konjunktive sykdommer.

1.7.2 Diagnostikk

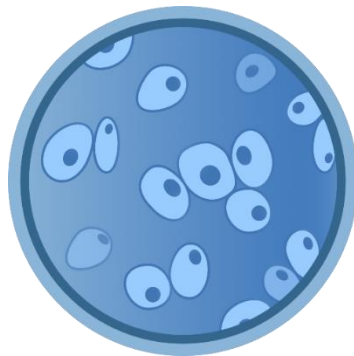
Diagnostikk av adenovirus gjennomføres i dag i all hovedsak via PCR, da for alle typer infeksjøs materialer. Videre kan de diverse serotypene av viruset dyrkes, og en vil videre kunne benytte immunfluorescens og agglutinasjonstesting for påvisning av infeksjon (1). Diagnostikk kan også gjøres serologisk, da via påvisning av adenovirus-spesifikke IgM-, IgG-, og IgA-antistoffer i pasientserum og -sekret.

1.8 Pneumocystis jirovecii

Pneumocystis jirovecii, tidligere kalt *Pneumocystis carinii*, er en soppart som mangler ergosterol i cellemembranen, og som da regnes som en atypisk sopp (15). Klassifiseringen begrunnes med egenskaper hos *P. jirovecii* som passer til atypiske sopper;

1. Sopparten vil ikke kunne vokse frem på dyrkningsmedier (1).
2. Behandling av pasienter via antimykotika vil ha manglende effekt (1).

Morfologisk sett vil *P. Jirovecii* beskrives som cysteformig, og vil som regel kunne påvises i alveoler i respirasjonssystemet. En illustrert oversikt over morfologi i *P. jirovecii* er vist i figur 4.



Figur 4: Figuren viser en illustrasjon som viser hvordan *P. jirovecii* ser ut morfologisk sett via mikroskopi. Illustrasjon hentet fra "Pneumocystis pneumonia" (15).

1.8.1 Infeksjon

Soppinfeksjon via *Pneumocystis jirovecii* vil i all hovedsak kunne danne et alvorlig sykdomsbilde hos immunkompomitterte pasienter, da i form av Pneumocystisk pneumoni (PCP). Smittevei for pneumocystis-pneumoni hos immunsupprimerte pasienter vil sannsynligvis være via luftsmitte fra individer kolonisert av *P. jirovecii*, men også fra andre pasienter med påvist PCP. Tidligere har smitteforekomsten og relaterte dødsfall blant HIV-pasienter vært å regne som høy, med 10-20% dødelighetsrate ved smitte, men da også økende dødelighetsrate dersom ventilator benyttes (16). I dag ser man også at pasientgruppen for HIV-negative er økende (17). Symptomer og sykdomstilstand hos denne gruppen vil ha mer akutt sykdomsforløp, en kraftigere inflammasjon og høyere letalitet (17).

Pneumocystis-pneumoni har blitt beskrevet, men også påvist, som en opportunistisk infeksjon hos HIV-pasienter, i tillegg til i pasienter som gjennomgår immunosuppressiv behandling (17).

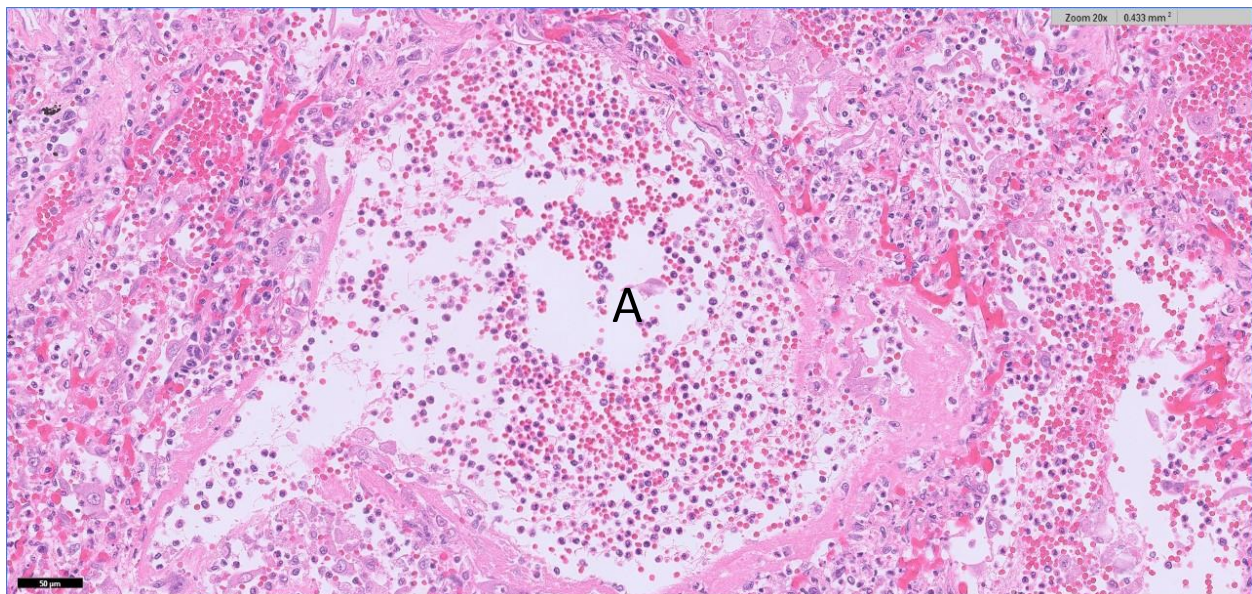
Ved infeksjon av *Pneumocystis jirovecii* i HIV-pasienter har en sett en inkubasjonstid på opp til 2 måneder, hvor symptomer i all hovedsak kan ligne en bakteriell pneumoni, og som inkluderer lavgradig feber, ikke-produktiv hoste og dyspné (16). Av denne grunn kan *P. Jirovecii* i maskeres som en annen infeksjon, noe som vil kunne føre til forhøyet dødelighetsrate ettersom PCP må behandles aggressivt (18). I andre tilfeller kan et umiddelbart akutt sykdomsforløp forekomme via hypoksi – en tilstand hvor tilførsel av oksygen til vev ikke er tilstrekkelig i forhold til hva vevet krever for å opprettholde aerob metabolisme – i tillegg til en raskt utviklende respirasjonssvikt og død (1) (19).

1.8.2 Klinisk eksempel

Et klinisk eksempel på soppinfeksjon hvor *Pneumocystis jirovecii* er årsak, ble gjort via behandling av respiratorisk obduksjonsmateriale fra pasient (pasient 1) hvor infeksjonen var aktiv ved dødsfall. Pasient 1 hadde påvist tilstand som krevde immundempende medikamenter,

Fra agensegenskaper for *P. jirovecii* vil en kunne konkludere at immunsvekkede pasienter er i risikogruppen av pasienter som kan gjennomgå et mulig letalt sykdomsforløp.

Ved obduksjon av pasient 1 kunne man se tydelige sykelige forandringer i lungevev med hjelp av mikroskopi. I den forstand at vevet hadde sykelige forandringer, vil en kunne si at pasient gjennomgikk lungesvikt, da trolig akutt lungesviktsyndrom (ARDS), i tillegg til sepsis. En kunne observere dannelse av hyaline membraner rundt pasientens alveoler, hvor alveoler var omringet av væske og døde celler som resultat av lungeskade eller lungesvikt, noe som vil føre til dårlig gassutveksling mellom alveoler og blodbanen. Områdene i og rundt alveoler bestod i all hovedsak av fibrose, hyaliner og betennelsesceller, som vist i figur 5. Videre ble det observert rosa, skummende væske i alveolerommet, noe som vil tyde på infeksjon av *P. jirovecii*.



Figur 5: Figuren viser HE-farget lungevev fra obduksjon av pasient 1. En kan se at alveolerommet (A) er omringet av betennelsesceller og bindevev. Der hvor en skulle sett lumen i alveolerommet kan en her se rosa og skummende væske. Bilde hentet fra St. Olavs Hospital.

1.8.3 Diagnostikk

P. Jirovecii kan påvises via mikroskopi av immunhistokjemiske behandlede prøver og PCR-analyse av bronkialvæske og -slim. Forbehandling av prøver før mikroskopering inkluderer å benytte monoklonale primærantistoffer for å markere prøven, som videre kontrastfarges. Resultatet av primærantistoffbehandling og farging vil være pasientmateriale hvor *P. jirovecii* er markert.

1.9 Problemstilling

Analytiske metoder i dag er utviklet i en slik grad at en kan diagnostisere de fleste sykdommer med høy sikkerhet og god nøyaktighet. Et gitt antall diagnoser er per i dag ikke mulig å fastslå, og i disse tilfeller kan en kun si at en gitt sykdom har morfologiske trekk som korrelerer med diagnosen. Herpes Simplex kan i dag diagnostiseres via PCR, men andre virus i familien Herpesviridae, som Epstein-Barr og Varicella Zoster, vil gi likt sykdomsbilde. Videre kan heller ikke *Pneumocystis jirovecii* diagnostiseres med sikkerhet annet enn ved PCR, hvor det tenkes som gunstig å kunne gjøre dette direkte ved Patologisk Avdeling. Oppgavens problemstilling ble da som følger:

Hvordan vil en implementering av nye primærantistoffer for deteksjon av Herpes Simplex type 1 og 2, Pneumocystis jirovecii og Adenovirus påvirke pasientdiagnostikk, og vil disse være nøyaktige og pålitelige nok til å implementere i rutinediagnostikk ved Avdeling for Patologi?

2. MATERIALE OG METODE

2.1 Prinsipp for immunhistokjemi

Immunhistokjemi er en teknikk som benyttes til diagnostiske formål, da via lokalisering av antigener i vevssnitt gjennom bruk av spesifikke primærantistoffer. Antigener i vev og tilsatte primærantistoffer vil danne et antigen-antistoffkompleks, da ved bruk av en eller flere antistoffer, hvor et kromogen vil være festet til det ytterste primærantistoffet. Dersom en har flere antistoffer enn bare primærantistoffet vil metoden regnes som indirekte, og en krever da flere trinn for å lokalisere antigenet og videre skape en fargereaksjon. Etter fargebehandling kan en se mengden antigener i prøven via mikroskopi.

2.1.1 Deparafinering

Før utprøving av en ny protokoll gjennomføres vil de vevssnitt man skal benytte måtte behandles. Første steg i materialebehandling innebærer deparafinering av snittet. Snitt vil på forhånd være formalinfiksert og parafininnstøpt som bevarer vevet. En deparafinering gjennomføres ved å fjerne parafinvoks via EZprep-reagens og varme. Dermed vil vevet være tilgjengelig for videre reaksjoner.

2.1.2 Forbehandling

Før utprøving gjennomføres må prøvematerialet som skal benyttes forbehandles. Hensikten med forbehandling er å bryte ned kryssbindingene som blir dannet av formalinet i innstøpt vev. En forbehandling vil også forsterke og spesifisere signalet fra de enzymreaksjoner og immunologiske reaksjoner som vil skje, i tillegg til at bakgrunnsfarge og artefakter som kan oppstå i snittet vil undertrykkes. En forbehandling vil gjøres med antigen retrieval, altså at man får bedre tilgang til antigenene i det formalinfikserte vevet.

Som nevnt må en lage protokoller i BenchMark Ultra før en starter en utprøving. Protokollene lar en prøve ut forskjellige faktorer for analysen – som inkubasjonstid og når i analysegangen primærantistoffet skal tilsettes prøvematerialet. Man vil teste ut de varierende trinnene av forbehandlingen. For oppgaven ble diverse forbehandlingsmetoder testet ut, henholdsvis CC1, CC2 og enzymbehandling med protease:

1. CC1 er en forbehandlingsbuffer via bruk av Heat Induced Epitope Retrieval (HIER). Bufferen har en pH på 8-8,5. En forbehandler de fleste antistoff med CC1.
2. CC2 er en forbehandlingsbuffer via HIER, men med en pH på 6.
3. Enzymbehandling er en forbehandling med protease. Man kan velge mellom protease 1, 2 eller 3. Enzymbehandling burde unngås om mulig, ettersom den regnes for å være en hard behandling av cellene, og kan videre medføre endret morfologi i celler og vev.

Cell Conditioning (CC) er en HIER, altså en prosess som gjør at et gitt antistoff kan bindes til epitoper i formalinfiksert vev. CC regnes ikke som en del av bindingen, men heller en faktor som vil bryte de kovalente kryssbindingene som dannes under formalinfiksering (20). Kontrollering av temperatur, inkubasjonstid og pH er svært viktig i denne prosessen, da for å opprettholde den eksisterende morfologien i celler og vev, men også for å få et optimalt fargerresultat. Lavere pH-verdier vil bevare morfologi bedre, mens forhøyet pH vil føre til sterkere fargeintensitet.

Enzymbehandling med protease er også en forbehandlingmetode som omdanner kovalente kryssbindinger. Proteolysen som oppstår vil forsterke penetreringen for reagenser slik at de lettere når vevsstrukturene, og også gi tilgang til epitopene slik at primærantistoffene bindes til målantigenene. Enzymene som benyttes vil kløyve spesifikke animosyrekjeder i peptidkjedene. Men etter undersøkelser fra NordiQC vil enzymbehandling produsere dårligere resultater og samtidig ha mindre reproduserbarhet (21).

Videre må man teste ut hvordan eventuelle endringer i forbehandlingstid vil påvirke fargerresultatet fra utprøvingen. For en utprøving bør en teste ut minst to forskjellige forbehandlingstider, hvor tidene 32 min, 48 min og 64 min benyttes oftest. Forbehandlingstid vil

påvirke kryssbindinger, og jo lengre forbehandlingstiden er desto mindre kryssbindinger vil en se i resultatet. Dersom forbehandlingen varer for lenge, kan de antigenene man leter etter ødelegges og dermed få resultater som er falsk negativ. Hvis forbehandlingstiden er for kort, vil man fortsatt ha kryssbindinger og dermed vil ikke antistoffet fått festet seg til antigenene og resultatet vil være falsk negativ.

I tillegg til endringer i forbehandlingstid og -metode, må man også velge hvilken fortynning av antistoffet som skal testes. Primærantistoffenes fortynningsmuligheter vil bli testet i flere paralleller for å finne den fortynningen som produserer det mest optimale resultatet. Dette innebærer at man vil ha sterkest mulig fargeintensitet, men samtidig unngå bakgrunnsfarging av vevet rundt de aktuelle mikrobene en ser etter. Det anbefales at man prøver ut minst tre forskjellige konsentrasjoner, og man tar som regel utgangspunkt i konsentrasjoner som er anbefalt i produktspesifikasjonen for antistoffet. I tillegg til å finne best mulig resultat, kan en utprøving av flere konsentrasjoner også føre til at man er sparsom med antistoffet i forhold til produktmengde og økonomi ved at man bruker minst mulig antistoff. DAB-IHC-komplekset, sekundær- og tertiærantistoff i tillegg til substrat er forhåndsfortynnet og vil ikke endres på.

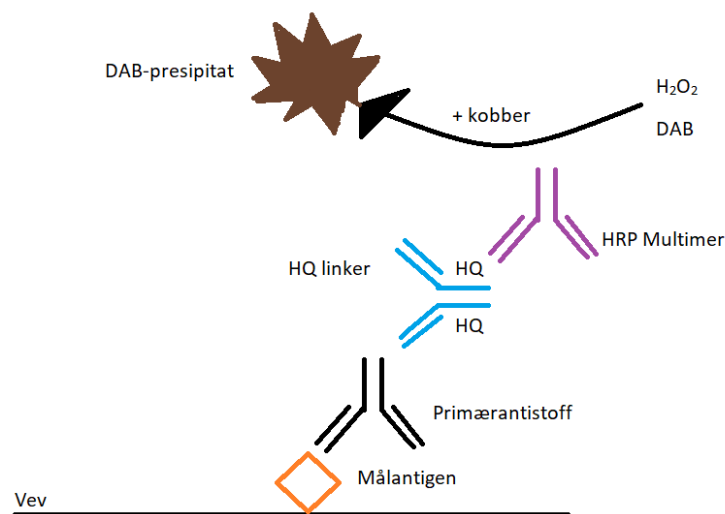
Noen primærantistoffer blir levert ferdig fortynnet fra produsentene, og kalles derfor ready-to-use (RTU). Disse antistoffene vil bli testet ved både høy og lav pH, i tillegg til testing for primærantistoffets inkubasjonstid. Man vil da forsikre seg om at flest mulig av antigenene reagerer med antistoffene i en analyse (20).

2.1.3 Deteksjonskit OptiView DAB IHC

OptiView DAB IHC Detection Kit (OptiView) er deteksjonskitet som benyttes under utprøvingene. Kitet er et indirekte, biotinfritt system som påviser IgG og IgM fra mus, i tillegg til primære kaninantistoffer.

OptiView regnes som en indirekte biotinfri metode, og benytter seg av tre forskjellige antistoffer,

i tillegg til diaminobenzinide tetrahydroklorid-kromogen (DAB) som vil avsette et brunfarget presipitat, som visualisert i figur 6. Kitets funksjon er å kunne detektere antigener via primærantistoffer fra mus og kanin, hvor primærantistoffet vil festes til epitopet på målantigenet. Videre vil et HQ-merket sekundærantistoff bindes til primærantistoffet. HQ-linkene vil forsterke primær-sekundær-bindingen slik at flere tertiærantistoffer vil kunne bindes til komplekset. Tertiærantistoffene er merket med Horse-Radish Peroxidase (HRP), som vil reagere med hydrogenperoxidase (H_2O_2) og DAB-kromogenet. HRP har funksjonen som katalysator i reaksjonen mellom H_2O_2 og DAB, der DAB oksideres og danner et brunt utfellingsprodukt. Ved hvert trinn blir også reagensene inkubert i forhåndsbestemte temperaturer og tidsperioder. Prinsippet for OptiView er illustrert i figur 6. I tillegg vil snittene ved hvert trinn bli vasket for å fjerne ubundet materiale (22).



Figur 6: Figuren viser strukturen i en reaksjon for OptiView DAB Detection Kit. DAB-presipitatet er komponenten som vises som farging i et ferdig preparat. Bildet er illustrert av oppgavens medforfatter.

2.1.4 Kontrastfarging med hematoxylin

Når primærantistoffreaksjonen og farging av prøvematerialet med DAB-kromogener er gjennomført, må man manuelt kontrastfarge materialet med hematoxylin. Grunnlaget for en manuell kontrastfarging er at patologene ved avdelingen har tatt en subjektiv avgjørelse at man oppnår gunstigere resultater ved manuell farging enn man hadde fått med selve instrumentet. Blå

fargepigmenter fra hematoxylin vil danne en sterk kontrast mot den brune fargingen fra DAB, noe som fører til at en lettere kan se vevets morfologi, i tillegg til et optimalt fargerresultat. Tiden som brukes under fargingen vil ha mye å si for resultatet – dersom en farger vevet for lenge vil optisk forvrenging kunne oppstå, men for kort fargetid vil føre til dårligere skille i morfologi (20).

Etter farging i instrumentet vil prøvematerialet overføres til et fargekar med hematoxylinløsning med pH på 2.05 i 20 sekunder. Snittene blir videre satt til blåning i vannbad med lunken temperatur i 3 minutter. Blåning i temperert vann vil føre til økt pH, og hematoxylin på snittet vil endre farge til blålilla.

2.1.5 Dehydrering med Xylen

Etter kontrastfarging vil snittene passere en dehydreringsrekke med økende alkoholprosent. Karene rangeres: 80% - 96% - absolutt alkohol, som er ren etanol. Etter dehydreringsrekken vil snittene plasseres i 3 kar xylen, hvor de vil oppbevares henholdsvis 1 minutt hver.

2.1.6 Montering

Montering av ferdigfargede snitt ble gjort i en automatisk oppleggsmaskin – Tissue-Tec Film. Etter opplegg tørkes preparatene i avtrekkskap i 20 minutter, før de ble vurdert i mikroskop og videre skannet og digitalisert i laboratoriets datasystem.

2.2 Prøvemateriale

For undersøkelse av primærantistoffmarkering av *Pneumocystis jirovecii* og Herpes Simplex benyttet man formalinfiksert, parafininnstøpt vev fra prøver med diagnoser som var kjent, eller hvor PCR-resultater viste mistanke om diagnose. Oversikt over vevsprøver for *P. jirovecii* og Herpes Simplex er vist i tabellene 2-4.

2.2.1 *Pneumocystis jirovecii*

Prøvematerialet som ble benyttet under protokollutprøving for *Pneumocystis jirovecii* var obduksjonsmateriale fra lunge hvor pasient fikk påvist *P. jirovecii* via PCR (pasient 1). Vevssnitt fra obduksjonsmateriale kom fra to forskjellige blokker og ble navngitt henholdsvis 1 og 2, og videre klassifisert via alfabetet. Oversikt over vevsprøvene, i tillegg til utprøving er gitt i tabell 2.

Tabell 2: Tabellen viser en oversikt over prøvemateriale fra obduksjonsblokk med påvist *Pneumocystis jirovecii*, i tillegg til protokoller som ble testet på snittene.

Protokoller for <i>Pneumocystis jirovecii</i>					
Prøvenummer	Forbehandling	AMP	Fortynning	Deteksjonskit	Inkubasjonstid
1A	CC1 32 min	Nei	1:50	OptiView DAB	32 min
1B	CC1 64 min	Nei	1:50	OptiView DAB	32 min
1C	CC2 24 min	Nei	1:50	OptiView DAB	32 min
1D	Protease	Nei	1:50	OptiView DAB	32 min

1E	CC1 32 min	Nei	1:300	OptiView DAB	32 min
1F	CC1 64 min	Nei	1:300	OptiView DAB	32 min
1G	CC2 24 min	Nei	1:300	OptiView DAB	32 min
1H	Protease	Nei	1:300	OptiView DAB	32 min
1I	CC1 32 min	Nei	1:500	OptiView DAB	32 min
1J	CC1 64 min	Nei	1:500	OptiView DAB	32 min
1K	CC2 24min	Nei	1:500	OptiView DAB	32 min
1L	Protease	Nei	1:500	OptiView DAB	32 min
1M	CC1 32 min	Nei	1:10	OptiView DAB	32 min
1N	CC1 64 min	Nei	1:10	OptiView DAB	32 min
1O	CC1 64 min	Ja	1:10	OptiView DAB	32 min
1P	CC1 32 min	Nei	1:25	OptiView DAB	32 min
1R	CC1 64 min	Nei	1:25	OptiView DAB	32 min
1S	CC1 64 min	Ja	1:25	OptiView DAB	32 min
2A	CC1 32 min	Nei	1:10	OptiView DAB	32 min

2B	CC1 64 min	Nei	1:10	OptiView DAB	32 min
2C	CC1 64 min	Ja	1:10	OptiView DAB	32 min
2D	CC1 32 min	Nei	1:25	OptiView DAB	32 min
2E	CC1 64 min	Nei	1:25	OptiView DAB	32 min
2F	CC1 64 min	Ja	1:25	OptiView DAB	32 min
2G	CC1 32 min	Nei	1:50	OptiView DAB	32 min
2H	CC1 64 min	Nei	1:50	OptiView DAB	32 min
2I	CC1 64 min	Ja	1:50	OptiView DAB	32 min

Etter den initielle utprøvingen av blokk 1 og 2 fra pasient 1 ble det fastslått hvilken forbehandling som ga best resultater, og det ble videre gjennomført protokoll på 10 ekstra prøver. Prøve 3 kommer fra obdusert lungevev fra HIV-positiv pasient. Prøvene 4-8 er kileresektat fra pasienter med interstitiell lungesykdom, og prøvene 9-12 er fra normalt lungevev. Prøver 3-12 er oppført i tabell 3.

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over lungemateriale fra HIV-positiv pasient, i tillegg til pasienter med interstitiell lungesykdom og normalt lungevev, og hvilke protokoller som ble testet på prøvene.

Protokoller for <i>Pneumocystis jirovecii</i>					
Prøvenummer	Forbehandling	Fortynning	AMP	Deteksjonskit	Inkubasjonstid
3A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
4A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
5A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
6A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
7A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
8A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
9A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
10A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
11A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min
12A	CC1 64 min	1:25	Ja	OptiView DAB	32 min

2.2.2 Herpes Simplex

For utprøving av protokoll for Herpes Simplex ble det benyttet totalt 9 pasientprøver. Prøver 1-3 og 6-9 er stansebiopsier fra hud, mens prøvene 4-5 er øsofagusbiopsier. Testede protokoller og prøveoversikt er vist i tabell 4. Prøvematerialet er fra pasienter med påvist Herpes Simplex.

Tabell 4: Tabellen viser en oversikt over prøvemateriale fra pasienter med påvist Herpes Simplex. Prøvematerialet er hentet med stansebiopsi eller tradisjonell biopsi fra hud og øsofagus.

Protokoller for Herpes Simplex				
Prøvenummer	Forbehandling	Fortynning	Deteksjonskit	Inkubasjonstid
1A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
1B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
1C	CC2 24 min	RTU	OptiView DAB	32 min
1D	Protease	RTU	OptiView DAB	32 min
2A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
2B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
2C	CC2 24 min	RTU	OptiView DAB	32 min
2D	Protease	RTU	OptiView DAB	32 min
3A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
3B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
3C	CC2 24 min	RTU	OptiView DAB	32 min
3D	Protease	RTU	OptiView DAB	32 min
4A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min

4B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
5A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
5B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
6A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
6B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
7A	CC1 32min	RTU	OptiView DAB	32 min
7B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
8A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
8B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min
9A	CC1 32 min	RTU	OptiView DAB	32 min
9B	CC1 64 min	RTU	OptiView DAB	32 min

2.3 Kontrollmateriale

2.3.1 Positiv Kontroll

For hver fargeprosedyre som gjennomføres i BenchMark Ultra skal en positiv vevskontroll inkluderes. Kontrollvevet skal komme fra nylige biopsier, obduksjoner eller kirurgiske prøver, og skal være preparert eller fiksert på lik måte som pasientprøver så raskt som mulig. Vevet som benyttes som kontroll kan ta rollen som både positiv og negativ kontroll, dersom den inneholder både positive og negative vevskomponenter. For optimal kvalitetskontroll vil vev med svak positiv farging være best egnet.

En positiv vevskontroll skal undersøkes for å sikre seg at alle reagenser som benyttes fungerer optimalt, og dette gjøres ved å lete etter et reaksjonsprodukt med korrekt farging av målceller under mikroskopi. Kontrastfargingen med hematoxylin vil gi en varierende grad av blåfarge

avhengig av hematoxylinens konsentrasjon, i tillegg til inkubasjonstid. For kraftig eller for lite kontrastfarging kan hindre i riktig tolkning av immunfargingen (23). I de tilfeller hvor positiv vevskontroll ikke gir tilfredsstillende fargerresultater, må alle testresultater forkastes ettersom de vil regnes som ugyldige.

2.3.1 Negativ kontroll

Kontrollmaterialet som benyttes til positiv kontroll kan også brukes som negativ kontroll. Ved negativ farging vil man se fravær av fargerresultater, da vevet ikke vil inneholde de antigener som antistoffene i fargekitet bindes til. En negativ kontroll skal verifisere primærantistoffets spesifikke merking av målantigenet, og vil undersøkes etter den positive vevskontrollen.

Fraværet av spesifikk farging vil bekrefte at ingen kryssreaksjon mellom antistoff til celler og cellekomponenter har oppstått. Dersom det oppstår spesifikk farging på negativ kontroll må resultatene forkastes som ugyldige.

2.4 Reagenser

- Deteksjonskit: OptiView DAB IHC fra Ventana/Roche Diagnostics. Følgende reagenser er inkludert i deteksjonskitet:
 - * OptiView HQ Universal Linker
 - * OptiView Peroxidase Inhibitor
 - * OptiView HRP Multimer
 - * OptiView DAB
 - * OptiView Copper
- Amplifiseringskit: Ventana Medical Systems, Inc's Amplifications Kit fra Ventana / Roche Diagnostics. Amplifier A og Amplifier B.
- Primærantistoff: RTU polyklonalt Herpes Simplex (HSV-1, HSV-2)-antistoff fra kanin, fra BioCare Medical.
- Primærantistoff: Konsentrat av monoklonalt anti-*Pneumocystis jirovecii* fra mus, fra Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Andre reagenser som benyttes i analysen:

- * ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) fra Ventana
- * ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) fra Ventana
- * Reaction Buffer fra Ventana
- * ULTRA LCS (Predilute) fra Ventana
- * Hematoxylin, pH 2.05
- * Xylen
- * 80%, 96% og absolutt alkohol

2.5 Utstyr

- Fargeinstrument: BenchMark Ultra, Roche Diagnostics
- Monteringsinstrument: Tissue-Tec Film, Sakura
- Digitalisering av ferdigfargede preparater: Ultra Fast Skanner (UFS), Phillips
- Pipette, volum 10-100 µL

2.6 Metode

2.6.1 Kriterier for utprøving

For å kunne starte en utprøving av nye primærantistoffer må visse kriterier oppfylles. Først må det optimaliseres en protokoll som brukes til gjeldende antistoffer, som i tillegg må tilpasses til driftens immunfargesystem med henhold til forbehandlingsmetode, automasjon, og visualiseringssystem.. Når en utprøving gjennomføres må en kunne benytte seg av formalinfiksert, parafininnstøpt materiale, eventuelle frysesenitt eller cytologiske utstryk.

2.6.2 Planlegging og validering

Når en utprøving gjennomføres, må avdelingens ansvarlige bioingeniør først skrive en valideringsplan. Før selve utprøvingen vil man måtte fylle inn informasjon om bakgrunnen for utprøvingen. Etter gjennomført utprøving skal man også fylle in detaljer om validerings- eller verifiseringsresultater, implementering, konklusjon og godkjenning av valideringsprotokoll, samtidig som en kontinuerlig kvalitetskontroll skal foregå.

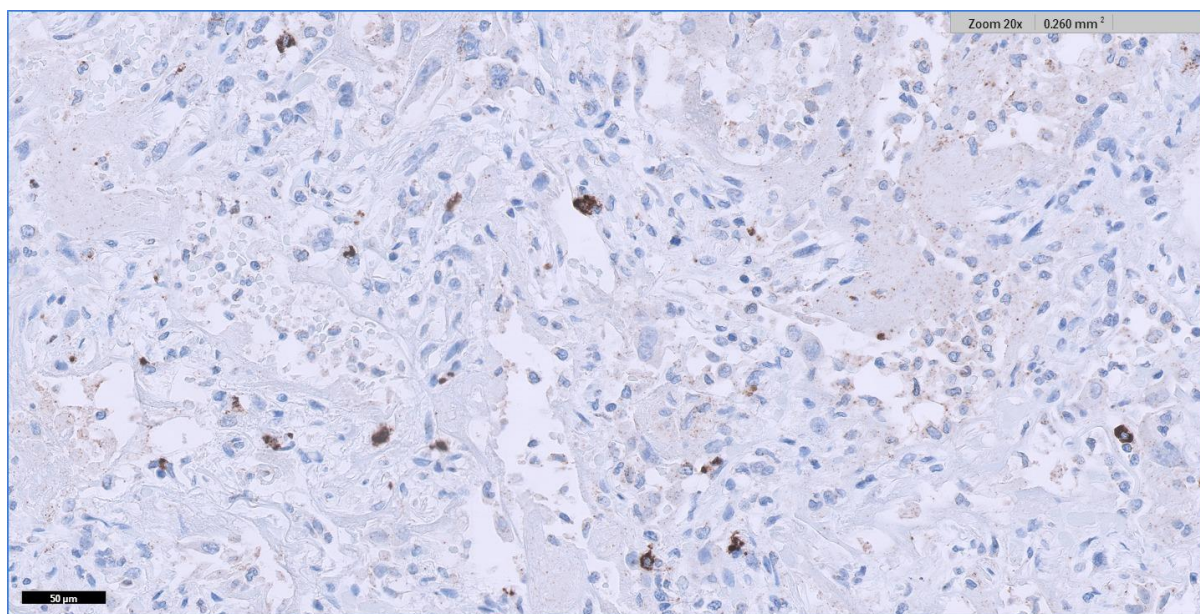
Videre skal man fylle inn et utprøvingsskjema. Et slikt skjema vil være todelt: grunnlagsinformasjon og utprøving. Grunnlagsinformasjon vil inneholde detaljer om det aktuelle antistoffet, diagnostikk, positiv og negativ farging, i tillegg til kontrollmateriale og hvilke protokoller som testes. Delen om utprøving vil inneholde resultatene fra utprøvingen, en fargevurdering og konklusjon.

3. RESULTATER OG DISKUSJON

3.1 Pneumocystis jirovecii

3.1.1 Optimal protokoll

Under utprøving av protokoll for *P. jirovecii* ble 15 snitt fordelt på 2 blokker farget, hvor pasientmaterialet var PCR-påvist med *Pneumocystis jirovecii*. Snittene ble testet med CC1, CC2 og Protease, hvor forbehandlingstiden på CC1 var enten 32 eller 64 minutter. I tillegg ble flere forskjellige fortyninger på primærantistoffet testet ut, som vist i tabell 2 og 3. Gjennom vurdering av fargekvalitet etter fargebehandling, ble det bestemt at den protokollen som ga optimale fargeresultater var CC1 med 64 min forbehandlingstid ved 1:25 primærantistoffsfortynning. I mikroskop kunne man se positivt fargede flekker av *P. jirovecii* med minimalt av bakgrunnsfarging, som vist i figur 7. Videre kunne en se noe uspesifikk farging av blodkar og makrofager, samt noen områder med pneumocytter. Dette ble også verifisert sammen med patolog som kom frem til samme resultat.



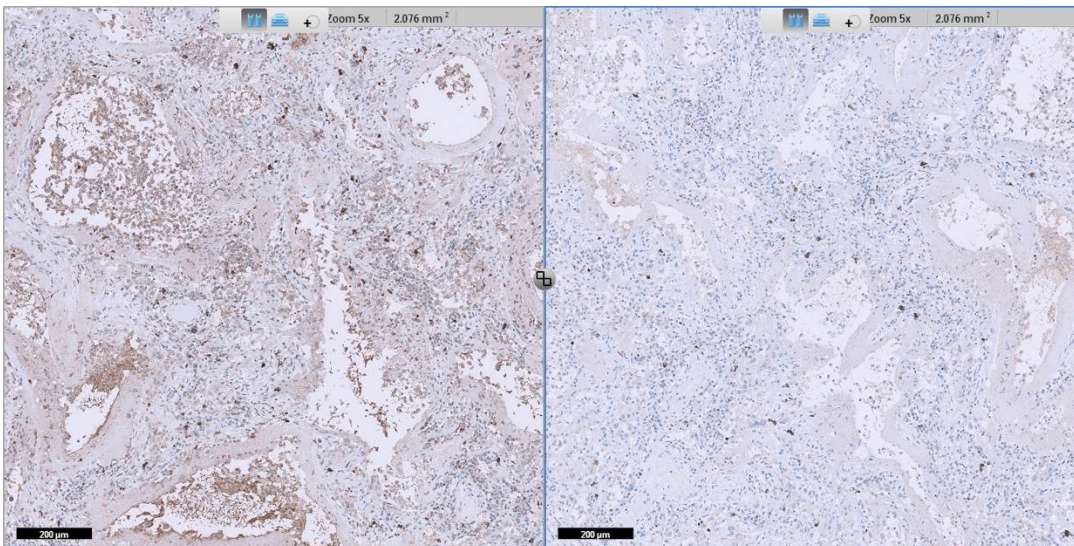
Figur 7: Figuren viser fargebehandlet lungevev ved protokoll CC1 64 min med fortyning 1:25. Brune flekker er positive prøver på *Pneumocystis jirovecii*. Bilde hentet fra laboratoriets database, St. Olavs Hospital.

3.1.2 Sammenligning av protokoller

Den gunstige protokollen for påvisning av *P. jirovecii* ble funnet til å være CC1 64 min med primærantistofffortynning på 1:25. Andre forbehandlingsvarianter viste seg å gi svakere farge på positivt vev, men også større mengder bakgrunnsfarge av omkringliggende vev. Enzymbehandling med protease var protokollen med størst mengde bakgrunnsfarge, noe som gjorde det vanskelig å kunne identifisere positive mikrober.

Forbehandling med protokoll for CC2 ga svært svakt utslag. Endringer i forbehandlingstid for CC1 viste små forskjeller i resultatet – forbehandlingstid på 64 minutter viste noe sterkere farge, og man kunne da se cellenes omriss i større grad.

Fortynningen av primærantistoffet som ble benyttet hadde stor innvirkning på resultatet. En fortynning på 1:10 førte til store mengder bakgrunnsfarge, mens 1:25 viste særdeles små mengder farging av omkringliggende vev, som vist i figur 8. Under utprøving av fortynning 1:50 så man særdeles lite farging av mikrober.



Figur 8: Figuren viser en sammenligning mellom fargeprotokoller og fortynning. Til venstre kan en se fortynning 1:10. Fortynning 1:25 er vist til høyre. Bilde hentet fra laboratoriers database, St. Olavs Hospital.

I protokollsammenligningen vist i figur 8 ser man tydelige forskjeller mellom testede protokoller. I protokollen som vises til venstre i figuren ble en fortytning på 1:10 utprøvd, og en kan se at store deler av vevet har tatt opp brunt DAB-presipitat. I flekker hvor kromogenet er svært konsentrert kan det tenkes at dette skyldes tilstedeværelse av *P. jirovecii*, men en kunne ikke forsikre seg om dette grunnet fargen til omkringliggende vev. Videre kunne de konsentrerte områdene være makrofager som har tatt opp diverse fremmedlegemer, og som da var blitt farget underveis i prosessen. Forventet resultat av en korrekt farging av *P. jirovecii* vil være at en ser hyaline membraner rundt alveolerommet hvor en også vil finne mikroben. Fortytning 1:10 viser farging av det som kan tenkes å være erythrocytter i blodkar, i tillegg til farging av cellekjerner. En kan da ikke si med sikkerhet at det som er farget er *P. jirovecii* eller makrofager, erythrocytter, slim eller cellekjerner i omkringliggende vev. Resultatet av protokoll med fortytning 1:10 ble da valgt bort grunnet uspesifikk farging.

Under utprøving av protokoll med fortytning 1:50 var resultatet lite farging av både mikrober og omkringliggende vev. Cellekjerner og cytoplasma ble kontrastfarget av hematoxylin til henholdsvis mørk og lys blå. Resultatet av protokollen viste ingen tilstedeværelse av *P. jirovecii* i vev hvor dette var forventet. Grunnet lite farging av mikroben ble protokollen valgt bort.

Til høyre i figur 8 kan en se korrekt protokoll, da med fortytning 1:25 CC1 64 minutter. Protokollen viser noe bakgrunnsfarging, for det meste noe uspesifikk farging av hyaline membraner rundt alveoler, som her kommer av lungesvikt, i tillegg til fibrøst bindevev og blodkar. Bakgrunnsfarging av omkringliggende vev vises også for denne protokollen, men i en slik grad at det ikke vil ha interferens med mikroben, og fungi er tydelig syneliggjort. Noen tilfeller av konsentrerte flekker vil vises i mikroskop som svarte, og det ble konkludert at dette er rusk, men det vil være en tydelig morfologisk forskjell mellom disse og mikrobene dersom en vurderer dette i mikroskop. Videre kan en se at celler og cellekjerner er kontrastfarget lys og mørkere blå som et resultat av hematoxylin. En kan se flekker av konsentrert brunt kromogen som ble bekreftet av patolog til å være *P. jirovecii*. Til tross for noe bakgrunnsfarging av bindevev, hyaline membraner og erythrocytter, ble det konkludert med at protokollen CC1 med forbehandlingstid på 64 minutter og med fortytning 1:25 var mest gunstig av de som ble testet.

3.1.3 Kontroller

Under utprøving av protokoller for *Pneumocystis jirovecii* ble det ikke inkludert kontrollmateriale, hverken positiv eller negativ kontroll. Grunnlaget for å ikke benytte kontroll under utprøvingen var manglende prøver, i tillegg til vanskeligheter for å finne egnet materiale. Kontrollvev som i teorien skulle blitt benyttet var materiale fra påvist syk pasient, i tillegg til materiale fra en frisk og normal lunge. Dette kontrollmaterialet vil bli brukt videre når fargeprotokollen taes i bruk som en del av rutinediagnostikk.

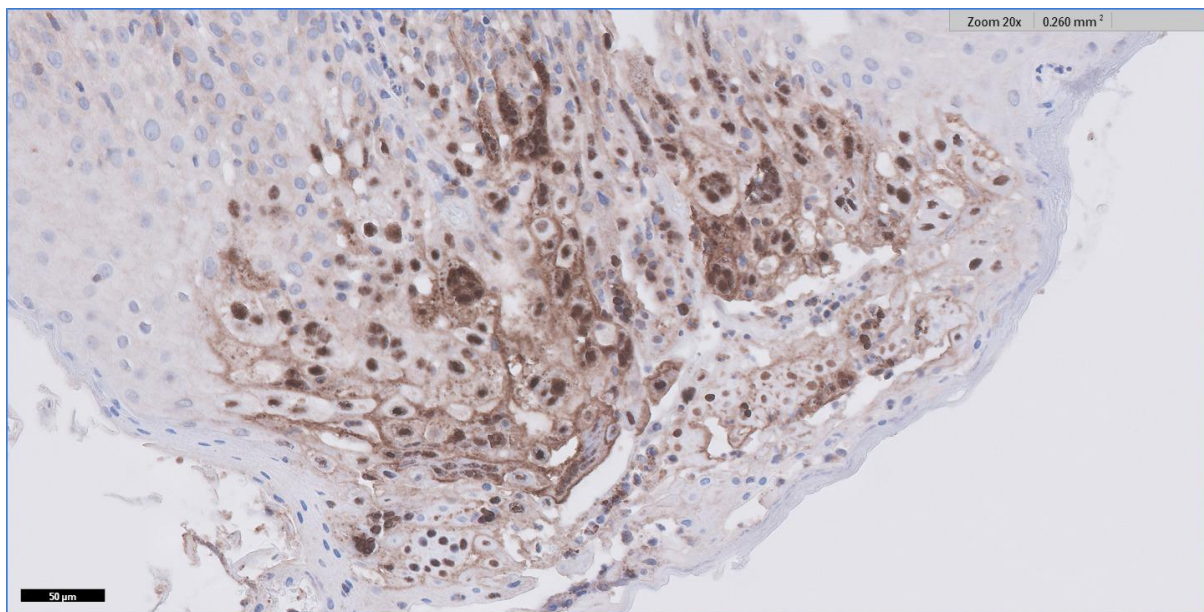
3.1.4 Resultater og videre bruk

Fargeprotokollen som ble produsert og testet underveis i oppgaven ga resultater som er optimale, altså fant man en protokoll for primærantistoffmarkering og farging av lungevev som gir positive og pålitelige resultater i forhold til diagnostikk. Grunnet noe uspesifikk farging av blodkar og makrofager, i tillegg til mangel på kontrollmateriale, må validering av primærantistoffet fortsette samtidig som protokollen taes i bruk. Sammen med patolog ble det funnet at protokollen godkjennes og kan benyttes snarlig som en del av rutinediagnostikk.

3.2 Herpes Simplex

3.2.1 Optimal protokoll

For utprøving av protokoller for Herpes Simplex benyttet vi materiale fra 9 blokker fra pasienter hvor infeksjon av Herpes Simplex var mistenkt via PCR. Forbehandlinger som inngikk i testingen var CC1, CC2 og protease, hvor CC1 hadde forbehandlingstid på 32 eller 64 minutter. Primærantistoffet som ble benyttet var RTU, og krevde da ingen fortynning. Ved å variere forbehandlingstype og -tid ble det funnet at protokollen for CC1 64 minutter ga de mest optimale resultatene. Protokollen viser tydelige celleomriss, og virusets kjerne blir gjort svært tydelig, som vist i figur 9.

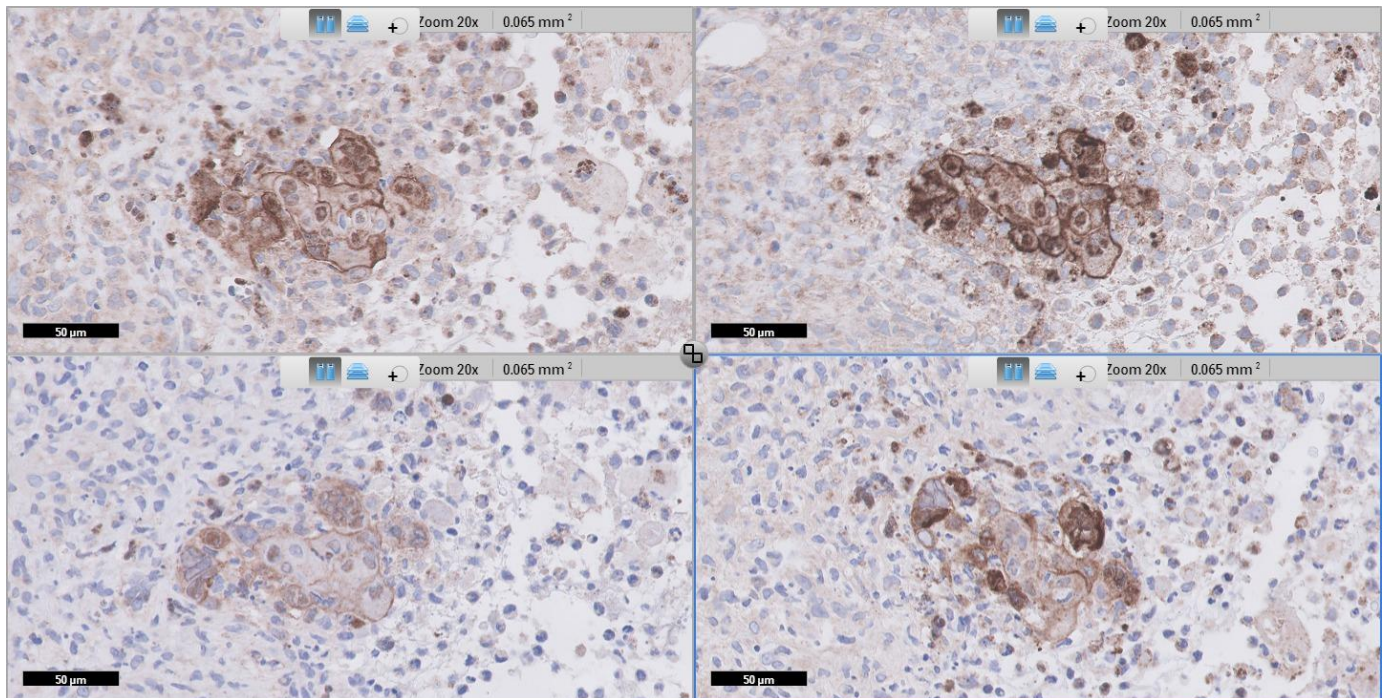


Figur 9: Figuren viser stansebiopsi av hud med diagnostisert Herpes Simplex. Vevssnittet er farget etter protokoll CC1 med 64 minutters forbehandlingstid. Figuren viser tydelig fargede kjerner tilhørende Herpes Simplex, i tillegg til celleomriss. Bilde hentet fra laboratoriets database, St. Olavs Hospital.

3.2.2 Sammenligning av protokoller

Ettersom primærantistoffet var forhåndsfortynnet kunne man kun endre forbehandlingstype og -tid for å detektere forskjeller i resultater. Eneste forskjell på snitt behandlet på CC1 32 minutter og CC1 64 minutter, var at 64 minutter viste noe tydeligere omriss av cellene. Begge hadde også noe bakgrunnsfarge. Det ble derimot konkludert med at den bakgrunnsfargingen som oppsto ved CC1 64 minutter ikke var å regne som forstyrrende, da virus og celleomriss var såpass tydelige.

Pasientvev behandlet med CC2 hadde noe svakere fargeintensitet på Herpes Simplex, og ble regnet som mindre tydelig enn CC1 32 min og 64 min. Mens forbehandling med protease resulterte i store mengder bakgrunnsfarge, i tillegg til svak fargeintensitet på virus. Protease ble bestemt til å være minst optimalt for videre bruk. En sammenligning av de fire protokollene som ble testet ut er å finne i figur 10.



Figur 10: Figuren viser en sammenligning av samme vevsområde farget med forskjellige protokoller for Herpes Simplex. CC1 32 min (øverst t.v.), CC1 64 min (øverst t.h.), CC2 24 min (nederst t.v.) og protease (nederst t.h.).

Øverst til venstre i figur 10 kan en se resultatet av protokoll CC1 med forbehandlingstid på 32 minutter. Figuren viser at protokollen har noe uspesifikk farging av det som kan tenkes å være makrofager, i tillegg til fett og erythrocytter. Når protokollresultatet ble vurdert og observert sammen med patolog at blodkar også hadde uspesifikk farging. Makrofager kan sees i bindevev rundt lumen i blodkar og fett, da som små, konsentrerte flekker. Cytoplasma har noe lys bakgrunnsfarge, noe som blir tydelig ettersom kontrastfarging av vev hvor denne brune kromogenfargen ikke er tilstedet, vil være farget lys blå. Cellekjerner i normalt hudvev er noe svake i forhold til det som er forventet. Videre kan en observere at også cellekjerner, i tillegg til virusets nukleus, i infiserte celler blir lite tydelig. Grunnet svak farging av virusinfiserte celler, i tillegg til noe bakgrunnsfarge som gjør det vanskelig å skille disse infiserte cellene fra normale celler i vevet, ble protokollen avvist.

Nederst til venstre i figur 10 kan en se resultatet av protokoll CC2 med en forbehandlingstid på 24 minutter. Her kan man observere svært svak farging av cytoplasma i virusinfiserte celler, i tillegg til at nukleus i Herpes Simplex er lite tydelig. Cellenukleus i normale hudceller er synlige gjennom cytoplasma til det som kan tenkes å være celler infisert av herpes. Protokollen viser også små mengder bakgrunnsfarge, noe som vil tyde på fravær av DAB-kromogenet som vil oppstå som et resultat av oksidering av DAB. Grunnet svak farging av virusinfiserte celler og cytoplasma ble også denne protokollen satt til side.

Nederst til høyre i figuren kan en se vev farget etter enzymbehandling med protease. Resultatet viser store mengder bakgrunnsfarging, i tillegg til at cytoplasma i omkringliggende celler i områder som vil inkludere celler infisert av herpesvirus smelter sammen med cellekjernen. På grunn av dette er det noe vanskelig å skille cytoplasma fra virusets nukleus i cytoplasma, men også fra bakgrunnsfargen og uspesifikk farging av makrofager og normale celler. Ettersom protokollens resultater inkluderte bakgrunnsfarge som gjorde det vanskelig å skille mikrobe fra den cellestrukturen en forventer å finne i hudvev, ble også denne forkastet.

Protokollen som ga optimale resultater var CC1 med forbehandlingstid på 64 minutter.

Protokollen har noe uspesifikk farging av blodkar, fett, kollagen og makrofager. Videre kan en

observere at CC1 64 minutter førte til skarp markering av celleveggen i celler infisert av herpesvirus, i tillegg til at celle- og virusnukleus er svært synlig og kan lett skilles fra de kontrastfargede cellene en forventer å se etter behandling med hematoxylin. Oksidering av DAB har gitt et brunt kromogen som tydeliggjør hvor Herpes Simplex er lokalisert i vevet. Protokollen har noe mer bakgrunnsfarging enn CC1 32 minutter, men denne vil ikke være fremtredende nok til å maskere viruset og infiserte celler i en grad som gir noen tvil rundt diagnostikk. Ettersom protokollen viser aktiv virusinfeksjon og markerer denne tydelig ble protokollen godkjent av veileder og patolog til diagnostisk bruk ved avdelingen.

3.2.3 Kontroller

Under utprøving av protokoller for Herpes Simplex ble det ikke inkludert kontrollmateriale, da hverken positiv eller negativ kontroll. I likhet med *Pneumocystis jirovecii* var det også her vanskelig å finne egnede prøver. Kontrollmaterialet som vil kunne brukes for utprøving av protokoller for viruset vil være pasientmateriale som er diagnostisert som positive for Herpes Simplex. Per i dag, og underveis i utprøvingene for oppgaven, var det kun funnet små biopsier som ikke regnes som egnet til stansing for å lage en kontrollblokk.

3.2.4 Resultater og videre bruk

Den fargeprotokollen som ble produsert og testet ga optimale resultater som vil være spesifikke og pålitelige innen pasientdiagnostikk for HSV-1 og HSV-2. Fra mikroskopi av snittene kunne man se at to protokoller hadde resultater som videre kunne benyttes, henholdsvis CC1 32 min og CC1 64 min av RTU antistoff, hvor sistnevnte vil være den mest pålitelige. Protokoll CC1 64 min viser tydelige cellestrukturer og tydelige viruskjerner. Grunnet mangel på kontrollmateriale under utprøvingen, vil protokollen videre utprøves samtidig som den tas i bruk. Sammen med patolog ble det funnet ut at analysen kan godkjennes, og den vil da bli innført i rutinediagnostikk.

3.3 Adenovirus

I tillegg til utprøving av protokoller for Herpes Simplex og *P. jirovecii*, skulle man også finne en egnet protokoll for immunhistokjemisk farging av adenovirus via primærantistoffer. Når planlegging og utprøving startet manglet man pasientprøver påvist med adenovirus, og utprøving for viruset ble derfor utsatt frem til man fant positive prøver. Ettersom Avdeling for Patologi ikke hadde pasientmateriale hverken i laboratoriet eller på lager, sendte man forespørsel til andre sykehus, men uten hell. Utprøving av protokoller for adenovirus kunne da ikke gjennomføres med grunnlag i mangel på prøvemateriale, både på St. Olavs Hospital, men også ved de sykehus man forsøkte å kontakte i denne sammenheng. Vi kan derfor ikke presentere en protokoll eller resultater for viruset per i dag.

3.4 Mulige feilkilder under utprøving

En utprøving av protokoller for mikrober vil kunne føre med seg feilkilder. For vår utprøving vil den største muligheten for feilkilder opptre via mangel på både positivt og negativt kontrollmateriale. Analyser av pasientmateriale, og utgivelse av svar til refererende helsepersonell, vil kreve godkjente kontroller. I immunhistokjemisk sammenheng for utprøving av primærantistoffer vil kontroller være viktige med det grunnlag at det vil bli tydeliggjort dersom de protokoller en tester for eksempel fører med seg farging av normale celler, makrofager eller annet vev som vil resultere i falske positive eller negative svar.

I tillegg til mangel på kontrollmateriale vil en annen mulig feilkilde opptre under manuell kontrastfarging. Etter farging via primærantistoffer i BenchMark Ultra må en kontrastfarge vevssnitt med pH 2.05 hematoxylin. Dersom en farger flere vevssnitt manuelt vil ikke alle snittene farges likt hver gang, noe som kan føre til at en feiltolker resultater dersom farge varierer fra prøve til prøve. I tillegg vil farger resultatet være avhengig av en stabil pH-verdi for hematoxylinen. Dersom pH skulle endres vil resultatene av kontrastfarges kunne påvirkes i liten eller stor grad avhengig av endringen. Dersom en går ut fra at de protokoller som gjelder for

manuell farging følges, vil ikke fargevariasjonen mellom snitt være fremtredende nok til at dette vil påvirke resultater i særlig stor grad.

4. KONKLUSJON

Etter utprøving av ulike protokoller for farging via RTU-primærantistoff for Herpes Simplex fra BioCare Medical ble protokoll som inkluderer 64 minutters forbehandlingstid med HIER i CC1-løsning ansett som best egnet for diagnostikk. Fargerresultatet på vevsprøver som ble testet ble som forventet og derfor vurdert som optimale. Ettersom det var mangel på biopsier som videre kunne benyttes som kontroll, både positiv og negativ, har en ingen protokolltesting via disse. Gjennom fargeprotokollen kan en se små mengder bakgrunnsfarging samtidig som virusets membran og kjerne er tydelig i kontrast med omkringliggende celler, hvor cytoplasma er blekt og kjerner er lys blå.

Gjennom utprøving av ulike protokoller for farging via primærantistoff for *Pneumocystis jirovecii* fra Santa Cruz ble protokollen som inkluderer en antistofffortynning på 1:25, i tillegg til 64 minutters forbehandlingstid med HIER i CC1-løsning ansett som egnet. Fargerresultatet av vevsprøver ble som forventet. For utprøving av *P. jirovecii* ble det ikke inkludert kontroller, hverken negativ eller positiv, og en har da ingen protokolltesting på kontrollmateriale. Etter farging etter protokoll kan en se blekt lungevev hvor celler har blå kjerner. *Pneumocystis jirovecii* er kontrastfarget, og en kan se mikrobens lappedelte kjerne i mørk brun.

Med bakgrunn i de protokoller som er utprøvd, fargerresultatet på disse og spesifisiteten til vevet som ble farget – prøvematerialet fremtrår i en slik grad at det er liten tvil i om korrekte mikrober er farget i prosessen – vil protokoller for både Herpes Simplex og *Pneumocystis jirovecii* tatt i bruk som en del av rutinediagnostikk ved Avdeling for patologi.

5. REFERANSER

1. Müller F, Rollag H, Tønjum T. Medisinsk Mikrobiologi. Fjerde utgave utg. Oslo: Gyldendal; 2019.
2. Myrvang B. Opportunistisk infeksjon Store Medisinske Leksikon: Store Norske Leksikon; 2009 [oppdatert 11. november 2019; hentet 15. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/opportunistisk_infeksjon.
3. Systemisk soppinfeksjon NHI.no: Norsk Helseinformatikk; [hentet 15. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/bakteriesykdommer/soppinfeksjon-systemisk/>.
4. Vikse J. Antistoffer sml.snl.no: Store Norske Leksikon; 2009 [oppdatert 13. april 2022; hentet 9. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antistoffer>.
5. Vikse J. Monoklonale antistoffer sml.snl.no: Store Norske Leksikon; 2009 [oppdatert 1. mars 2022; hentet 3. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/monoklonale_antistoffer.
6. Hansen LS. Immunologiske Metoder NITO.no: NITO; 2018 [oppdatert 28. november 2018; hentet 10. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/immunologi-og-immunologiske-metoder/02-immunologiske-metoder-linn-silje-hansen.pdf>.
7. ThermoFisher. Polyclonal Antibodies ThermoFisher.com: ThermoFisher Scientific; [hentet 12. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/antibodies/primary-antibodies/guide-primary-antibody-types/polyclonal-antibodies.html>.
8. ThermoFisher. Primary Antibodies ThermoFisher.com: ThermoFisher Scientific; [hentet 12. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/antibodies/primary-antibodies.html>.
9. Vikse J. Antigener sml.snl.no: Store Norske Leksikon; 2009 [oppdatert 19. desember 2021; hentet 3. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antigener>.
10. Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC. Herpes Simplex Virus Replication: Roles of Viral Proteins and Nucleoporins in Capsid-Nucleus Attachment. Journal of Virology. 2009;83(4):1660-8.
11. Tønjum T. Herpesvirus sml.snl.no: Store Norske Leksikon; 2009 [oppdatert 27. januar 2022; hentet 15. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/herpesvirus>.
12. Solomon IH, Hornick JL, Laga AC. Immunohistochemistry Is Rarely Justified for the Diagnosis of Viral Infections. Am J Clin Pathol. 2017;147(1):96-104.
13. Steyer A, Jerman UD, Kolenc M, Kreft ME. A Novel Strain of Porcine Adenovirus Detected in Urinary Bladder Urothelial Cell Culture. Viruses. 2014.
14. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. Microbiol Spectr. 2016;4(4).
15. Pneumocystis pneumonia CDC.gov: Center of Disease Control; 2021 [oppdatert 13. oktober 2021; hentet 10. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/pneumocystis-pneumonia/index.html>.
16. Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis Pneumonia. New England Journal of Medicine. 2004;250(24):2487-98.
17. Pneumocytose FHI.no: Norsk Folkehelseinstitutt; 2010 [oppdatert 7. juli 2019; hentet 30. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pneumocytose---veileder-for-helsep/>.
18. Pneumocystis jiroveci [carinii] (3F6): sc-57980. Santa Cruz Biotechnology, INC.
19. Myrvang B. Pneumocystis-pneumoni sml.snl.no: Store Norske Leksikon; 2009 [oppdatert 4. mai 2020; hentet 15. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Pneumocystis-pneumoni>.
20. Dako. Immunohistochemical Staining Methods. Sjettemte utgave utg: Agilent Technologies Company; 2013 5. mai 2022.

21. Nielsen S. Immunohistochemical principles: The technical test approach International Symposium on Immunohistochemistry: NordiQC; 2018 [oppdatert 2018; hentet 9. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.nordiqc.org/downloads/documents/57.pdf>.
22. OptiView DAB IHC Detection Kit. Ventana / Roche; 2022.
23. Adenovirus (20/11 & 2/6) Mouse Monoclonal Antibody. Cell Marque; 2017.

