

Verifiering och jämförelse av två olika lösningssystem för dehydrering

Karin Fonnaland, SpecialistBMA, Klinisk patologi Karlstad

Bakgrund

- I verksamheten används idag fyra olika dehydreringsprogram.
 - Önskemål om bättre program för feta storsnitt. I dagsläget 18 h i maskinen och därefter 8-10 h i paraffin i bäddstationen. - Förlängd labbtid, logistiskt krångligt, inte standardiserat.
- Vældehydrerade prover är en förutsättning för god kvalitet på de analyser och undersökningar som görs på paraffininbäddat material, och för materialets hållbarhet i våra biobanker.



Projektets syfte

Att jämföra tre olika dehydreringsprogram, som använder två olika lösningssystem, körda på dehydreringsinstrumentet **Donatello** Series 3 (DiaPath) med varandra samt med likvärdiga program på instrumenten **VIP 6 AI** (Sakura) och **HP300Plus** (Dakewe), med avseende på kvaliteten på det dehydrerade materialet.

Att utvärdera hur väl utvärderingsprotokollet för dehydrering från Leica Biosystems fungerar i praktiken.

Donatello
xylene

Donatello
Ottix

VIP 6 AI

HP300Plus

Dehydreringens tre steg



- **Dehydrering:** Vatten dras ut ur vävnaden genom en stigande alkoholskala, från 70 % etanol till 99,5 % etanol.
- **Klarning:** Etanolen byts ut mot ett lösningsmedel, xylen eller ett substitut. Lipider löses ut ur vävnaden, som också blir mer transparent. Fungerar som brygga mellan två ej blandbara ämnen (etanol och paraffin).
- **Infiltrering:** Lösningsmedlet byts ut mot paraffin, helst med låg smältpunkt.

Xylensubstitut

- Många olika sorter finns kommersiellt tillgängliga:
 - Alifatiska kolväten
 - Terpen
 - Nafta
 - Isopropanol
- Vegetabiliska oljor som kokosolja, rapsolja och olivolja har använts i studier och fungerat tillfredsställande.
- I KVASt-enkät 2021 svarade 17 % att de använde ett substitut (vid konventionell dehydrering).
- I Donatello används xylensubstitutet Ottix.

- Xylen är ett aromatiskt kolväte.
- Ersatte cancerogena klarningsmedel som kloroform och benzen.
- Exponering: huvudvärk, irritation i luftvägar och ögon, illamående
- Upprepad exponering: neurotoxiska symptom



De tre dehydreringsmaskinerna



De testade programmen

- Donatello: av leverantören validerade program
- VIP 6 AI: program validerade av verksamheten
- HP300Plus: A och B samma som VIP, C nytt program

	Avsett för	Provmaterial	Antal prover/instrument och lösningssystem
Program A	Utskärningspreparat och hudar, ej feta	Tarm, hud, gallblåsa, uterus, ovarium, tuba, testikel, thyroidea och prostata	n = 32
Program B	Feta preparat, tex bröst	Bröst, tarm, gallblåsa och hud, samtliga innehållande övervägande del fett.	n = 20
Program C	Storsnitt, feta	Bröst och tarm	n = 15

Provmaterial

- Besvarade avidentifierade patientprover
- 4 matchade klossar/prov
- Totalt: 204 små och 60 stora

Program A – blandade utskärningspreparat

Donatello Ottix	Donatello Xylen	VIP 6 AI	HP300Plus
Programtid: 12 h 20 min Shaper: 1 h 30 min Ottix: 5 h 30 min Paraffin: 5 h	Programtid: 12 h 50 min Etanol: 5 h 30 min Xylen: 3 h Paraffin: 4 h	Programtid: 8 h 20 min Etanol: 3 h Xylen: 2 h Paraffin: 3 h	Programtid: 8 h 20 min Etanol: 3 h Xylen: 2 h Paraffin: 3 h

Program B - små feta preparat

Donatello Ottix	Donatello Xylen	VIP 6 AI	HP300Plus
Programtid: 14 h 50 min Shaper: 1 h 30 min Ottix: 7 h Paraffin: 6 h	Programtid: 15 h 50 min Etanol: 5 h 30 min Xylen: 4 h Paraffin: 6 h	Programtid: 17 h 20 min Etanol: 7 h Xylen: 4 h Paraffin: 6 h 20 min	Programtid: 17 h 20 min Etanol: 7 h Xylen: 4 h Paraffin: 6 h 20 min

Program C – feta storsnitt

Donatello Ottix	Donatello Xylen	VIP 6 AI	HP300Plus
Programtid: 17 h 20 min Shaper: 3 h 30 min Ottix: 7 h Paraffin: 6 h 30 min	Programtid: 19 h 50 min Etanol: 9 h Xylen: 4 h 30 min Paraffin: 6 h	Programtid: 17 h 20 min Etanol: 7 h Xylen: 4 h Paraffin: 6 h 20 min + 8 h i paraffin utanför instrumentet	Programtid: 20 h 10 min Etanol: 7 h 30 min Xylen: 4 h 30 min Paraffin: 8 h

Utvärderingen

- Ett protokoll framtaget av Leica biosystems för utvärdering av dehydrering användes.
- Kategorierna snittning, arkivering och mikroskopisk bedömning betygsattes, 0-2, där 0 är underkänd.
- Totalt består protokollet av sex sektioner som vardera ger ett värde i %, som sedan sammanställs till ett totalbetyg för klossen.
- Originalprotokollet anger 50 % som gräns för godkänd dehydrering.
- I denna undersökning användes minst betyget 1 på samtliga parametrar som gräns för godkänd dehydrering.

Protokollet

Utvecklat av Leica
Biosystems

Appendix: Leica Microsystems score sheet showing details of parameters and scoring guidelines

Parameter	Scoring Guidelines			Score
Section preparation				
1. Cutting	2	1	0	
Texture of block	not brittle, homogenous, excellent texture	some brittleness, variation but cuttable	brittle, uneven, poor texture	1
Uniformity of block	complete uniform infiltration, well supported	some unevenness of infiltration	poor, uneven infiltration	2
Cohesiveness of block	no separation of components	some separation	severe separation	2
Ribboning & compression during cutting	sections ribbon, no compression	occasional breaks in ribbon, minor compression	sections detach, severe compression	1
				6/8 = 75.0%
2. Mounting	2	1	0	
Dehydration & clearing	no sweating	minor sweating	severe sweating	2
Cohesiveness	no separation of components	some separation of components	severe separation of components	1
Flattening	flattens readily	flattens with some difficulty	impossible to flatten	2
				5/6 = 83.3%
Block Storage				
3. Block stability on storage (one week)	2	1	0	
Specimen shrinkage	no shrinkage	minor shrinkage	major shrinkage	1
Opacity	no change	some opacity has developed	considerable opacity observed	2
				3/4 = 75.0%
Microscopic Assessment				
4. Physical quality of section (excludes stain quality)	2	1	0	
disruption x4	no disruption	minor disruption, some holes or tearing	major disruption, holes, tearing	1
adhesion x4	completely flat	minor lifting	severe lifting	2
cracking (coarse - crazy paving) x4	no large cracks	some large cracks	severe large cracks	2
cracking (fine) x40	no cracks	some fine cracks	extensive fine cracks	1
section thickness	uniformly thin	some variation	extensive variation	1
				7/10 = 70.0%
5. Quality of tissue preservation	2	1	0	
nuclear detail (nucleolus, chromatin detail, nuclear envelope, vacuolation, shrinkage or swelling)	good	fair	poor	2
cytoplasmic detail (cohesive, uniformly preserved, texture shown, vacuolation, cell borders defined, swelling or shrinkage)	good	fair	poor	1
special features (kidney - basement membrane definition, liver - sinusoidal endothelium definition)	good	fair	poor	2
extracellular components and muscle (collagen, elastin)	good	fair	poor	1
uniformity of preservation (includes zonal fixation)	uniform across section	some variation	extreme variation	2
				8/10 = 80.0%
6. Quality of staining (chemical)	2	1	0	
uniformity	completely uniform	some variation	extreme variation	1
nuclear stain	strong and sharp, excellent	satisfactory	weak, poor definition, unsatisfactory	2
cytoplasmic stain	strong and sharp, excellent	satisfactory	weak, poor definition, unsatisfactory	1
extracellular components & muscle (collagen, elastin)	strong and sharp, excellent	satisfactory	weak, poor definition, unsatisfactory	2
				6/8 = 75.0%

Parameter	Scoring Guidelines		
Section preparation			
1. Cutting	2	1	0
Texture of block	not brittle, homogenous, excellent texture	some brittleness, variation but cuttable	brittle, uneven, poor texture
Uniformity of block	complete uniform infiltration, well supported	some unevenness of infiltration	poor, uneven infiltration
Cohesiveness of block	no separation of components	some separation	severe separation
Ribboning & compression during cutting	sections ribbon, no compression	occasional breaks in ribbon, minor compression	sections detach, severe compression

Score Summary	
Cutting	75.0%
Mounting	83.3%
Block stability on storage	75.0%
Physical quality of section	70.0%
Quality of tissue preservation	80.0%
Quality of staining (chemical)	75.0%
Section prep & block storage (1+2+3)	77.8%
Microscopic assessment (4+5+6)	75.0%
Total Score	76.4%

Exempel på bedömning

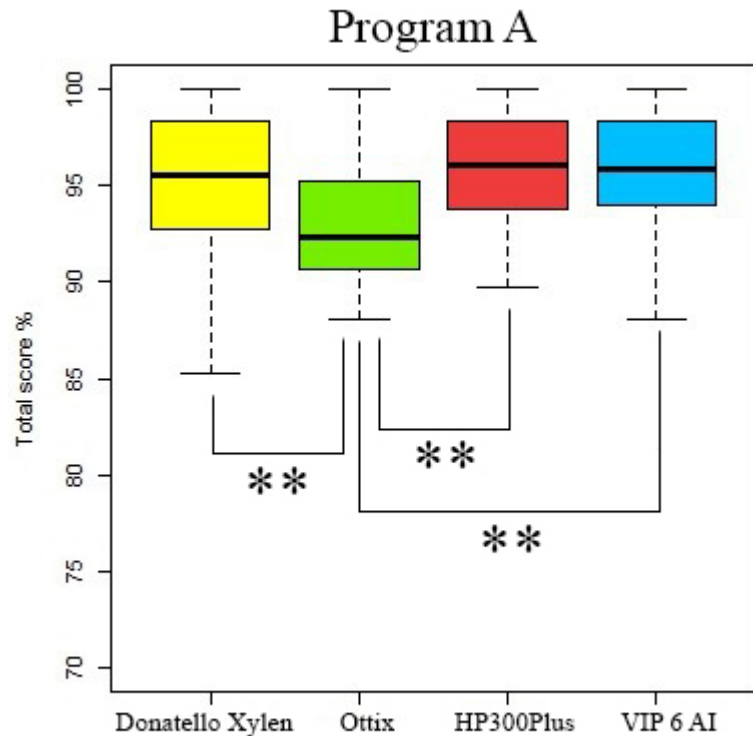
	Betygsättning								
Snittning och glaspreparation	2	1	0	Betyg (exempel)	3.Arkivering (1 vecka)	2	1	0	
1.Snittning					Krympning av preparat i kloss	Ingen krympning	Lätt krympning	Kraftig krympning	1
Klossens textur	Homogen, bra textur	Lite spröd, men snittbar	Spröd, dålig textur	2	Opacitet	Ingen förändring	Har blivit något mer opakt	Har blivit mycket mer opakt	2
Klossens homogenitet	Komplett, jämn infiltration	Lite ojämn infiltration	Mycket ojämn infiltration	1					3/4 = 75 %
Hur väl snittet håller samman vid snittning	Ingen separation av komponenter	Lite separation	Kraftig separation, hål bildas	1	Mikroskopisk bedömning	2	1	0	
Hur väl snitten bildar band Hur mycket snitten veckas samman	Håller ihop i band, ingen veckning	Band håller delvis ihop, lite veckning	Snitten separerar från varandra, kraftig veckning	2	4.Snittets fysiska kvalitet				
				6/8 = 75 %	Sönderfall	Inget sönderfall	Mindre sönderfall, små hål och skador	Kraftigt sönderfall, stora hål och skador	1
2.På vattenbad och glas					Adhesion	Helt slätt	Mindre lösa partier/veck	Stora lösa partier/veck	2
Dehydrering och klarning	Inga vatten-droppar bildas på snitten	Enstaka vatten-droppar bildas på snitten	Många vatten-droppar bildas på snitten	2	Stora sprickor	Inga	Få stora sprickor	Många stora sprickor	1
Hur väl snittet håller samman på vatten/glas	Ingen separation av komponenter	Lite separation	Kraftig separation, snitt sprids ut över glaset	2	Små sprickor	Inga	Få små sprickor	Många små sprickor	2
Utsträckning	Blir helt slätt	Blir till största delen slätt	Omöjligt att få slätt	2	Snittets tjocklek	Jämn korrekt tjocklek	Lite variation i tjocklek	Stor variation i tjocklek	2
				6/6 = 100 %					8/10 = 80 %

Utvärdering av utvärderingen

5.Vävnadens kvalitet				
Detaljer i kärnorna	Bra	Godtagbar	Dålig	2
Detaljer i cytoplasma	Bra	Godtagbar	Dålig	2
Särskilda stukturer	Bra	Godtagbar	Dålig	2
Extracellulära komponenter och muskel	Bra	Godtagbar	Dålig	2
Homogenicitet i kvalitet	Jämn över hela snittet	Lite variation	Stor variation	2
				10/10 = 100 %
6.Färgningens kvalitet				
Enhetlighet	Helt jämn	Lite variation	Stor variation	2
Kärnfärgning	Stark och skarp, mycket bra	Godtagbar	Svag med dålig definition, otillräcklig	2
Cytoplasmatisk färgning	Stark och skarp, mycket bra	Godtagbar	Svag med dålig definition, otillräcklig	2
Extracellulära komponenter och muskel	Stark och skarp, mycket bra	Godtagbar	Svag med dålig definition, otillräcklig	2
				8/8 = 100 %

- De kategorier som handlade om snittningsprocessen, arkivering och snittens fysiska kvalitet i mikroskop gav relevant information.
- De kategorier som rörde bedömning av vävnadens kvalitet på cellnivå och färgning utföll nästan alltid med högsta poäng även när snittet underkänts på flera andra parametrar.
- För användning i klinisk verksamhet kan ett förenklat protokoll användas.

Resultat program A



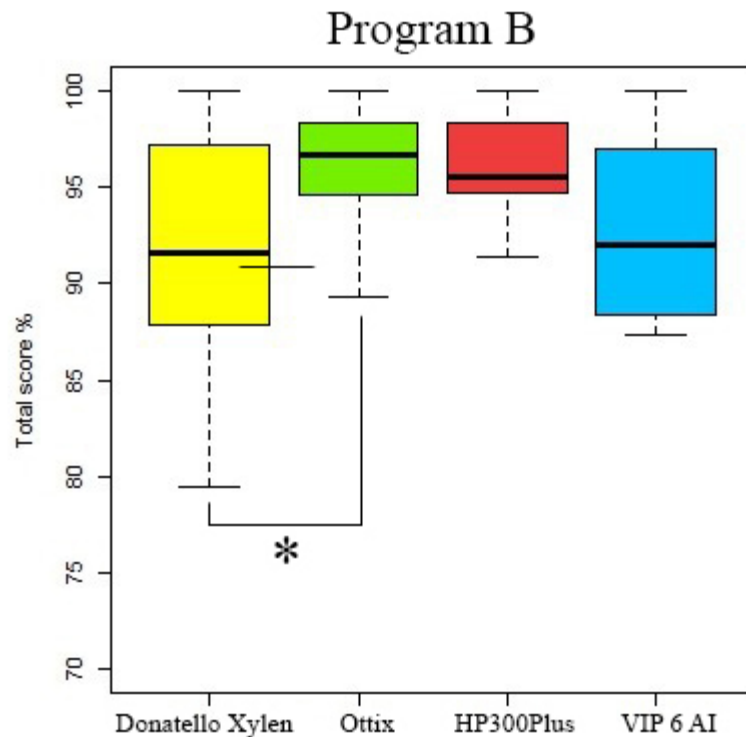
Signifikant högre poäng för VIP 6 AI och HP300Plus än för Ottix.

Dålig textur och uppkomst av mikroskopiska hål var de huvudsakliga problemen för de Ottixdehydrerade proverna.

Ingen skillnad mellan VIP 6 AI, HP300Plus och xylenprogram på Donatello.

N=32

Resultat program B



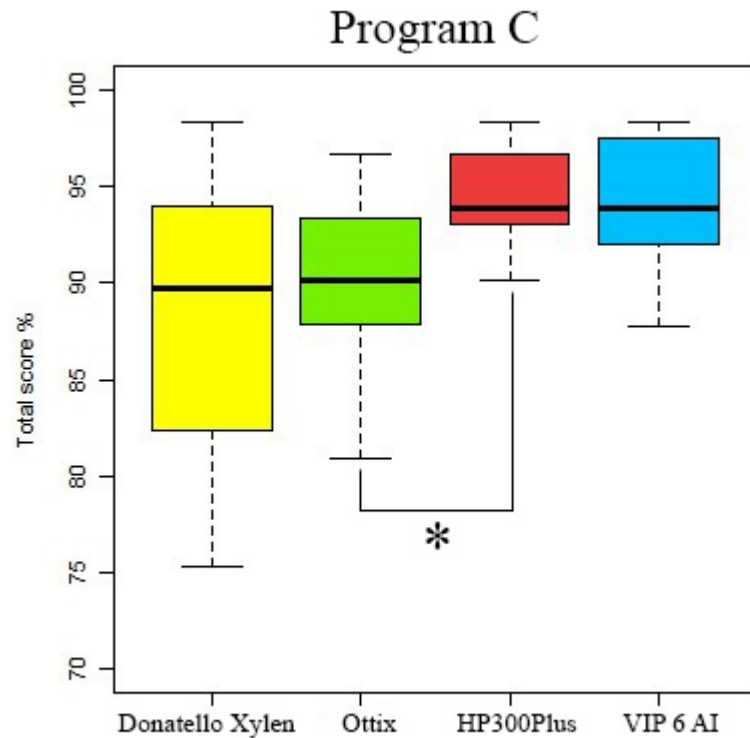
Signifikant bättre resultat med Ottix än xylen på Donatello.

Övriga skillnader var efter Bonferronikorrektion inte signifikanta.

Ottixprogrammet var 2,5 h kortare än programmen på VIP 6 AI och HP300Plus.

N=20

Resultat program C



HP300Plus gav signifikant bättre resultat än Ottix.

Ottixprogrammet var 3 h kortare än programmet på HP300Plus, vilket förmodligen var orsaken till underdehydreringen.

Ingen skillnad sågs mellan HP300Plus och VIP 6 AI trots kortare paraffinsteg.

Antal underkända klossar

Instrument	Program A, n = 32	Program B, n = 20	Program C, n = 15
Donatello Ottix	6 (19 %)	0 (0 %)	5 (33 %)
Donatello Xylen	4 (13 %)	6 (30 %)	6 (40 %)
VIP 6 AI	2 (6 %)	3 (15 %)	2 (13 %)
HP300Plus	1 (3 %)	0 (0 %)	1 (7 %)

Molekyläranalys MSI på Idylla (PCR)

- Material från kända positiva prover (MSI-high) dehydrerades i HP300Plus och analyserades på Idylla.
- På grund av långa fixeringstider misslyckades dock analyserna i två av tre fall.
- Användningen av besvarade patientprover för dehydreringsutveckling försvårar validering av molekyläranalyser.



Fortsatt arbete med HP300Plus

- Optimera ett program för feta storsnitt för att förkorta processtiden på labbet.
- Validera MSI-analys på Idylla på tarmpreparat dehydrerade i instrumentet.

