

Formalinfixierung

Was hat das mit mir zu tun?

Oberhausen, 25. Mai 2019

Hannah Zepp



Personalisierte Medizin

Therapien, die auf Patienten mit spezifischen Krebstypen abgestimmt sind

- Bessere Lebensqualität und gewonnene Lebenszeit
- Weniger unnötige Therapien, Nebenwirkungen und damit verbundene Kosten
- Bessere und eindeutiger vorhersagbare klinische Ergebnisse

https://www.roche.com/de/about/priorities/personalised_healthcare/what_is_phc.htm (zuletzt geöffnet am 7.5.2018, 13:38 Uhr)

Prädiktive und prognostische Tumormarker

Beispiel: Estrogenrezeptor (ER) bei invasivem Mammakarzinom

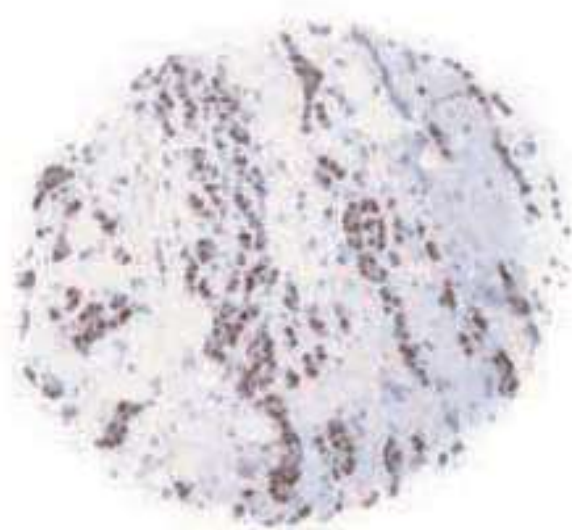
ER-Expression auf Tumorzellen ist positiv prädiktiv für die Therapieantwort bei endokriner Therapie (z.B. Tamoxifen):

- reduzierte Rückfall- und verbesserte Überlebensraten nur bei ER-positiven Tumoren
- kein Nutzen bei ER-negativen Tumoren

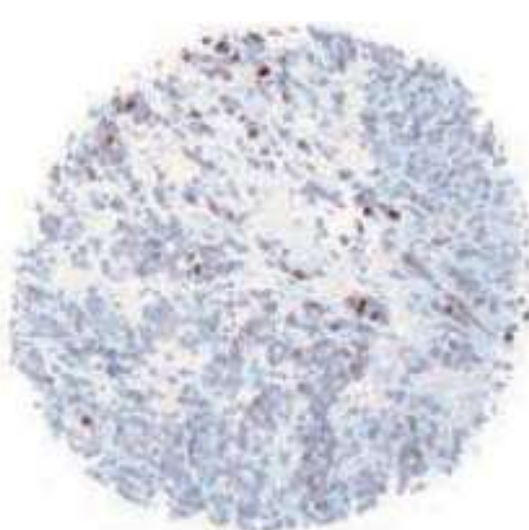
<https://www.breastcancer.org/treatment/hormonal/serms/tamoxifen> (zuletzt geöffnet am 7.9.2018 um 17:08)

ER-Färbung mit DAB auf Mammakarzinom

Drei Fallbeispiele



Patientin A: ER hoch positiv



Patientin B: ER niedrig positiv



Patientin C: ER negativ

Therapie:

ER-Modulator

ER-Modulator + Chemo

Kein ER-Modulator

<https://www.breastcancer.org/treatment/hormonal/serms/tamoxifen> (zuletzt geöffnet am 7.9.2018 um 17:08)

ER-Färbung mit DAB auf Mammakarzinom

Ein beispielhafter Fall



Eine Patientin



Ein Tumor



Ein Tag

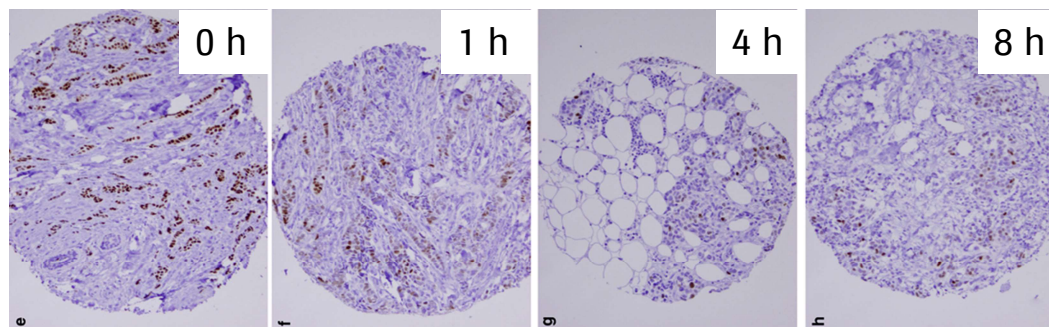
Drei Befunde?

Formalinfixierung

Der Einfluss der kalten Ischämiezeit

Verzögerung der Formalinfixierung :

- 10 große invasive Mammakarzinome, unmittelbar nach Entnahme zugeschnitten
- Tumorgewebe in acht gleichgroße Stücke zerteilt, unterschiedliche Ischämiezeiten



Ergebnis:

- Der durchschnittliche Score (Prozent Positivität) nahm kontinuierlich ab 2 h bei ER und 1 h bei PR (Progesteronrezeptor) ab

Khoury T, et al. *Mod Pathol*. 2009 Nov;22(11):1457-67

Wie groß ist das Problem tatsächlich?

- Geschätzt 20 (Her2)-40 (ER/PR) % Fehldiagnosen in der Mammadiagnostik
- 68% der Fehlerquellen liegen in der Prä-Analytik (vs 15% in der Analytik)
- Schlechte Prä-Analytik lässt sich nicht wiedergutmachen
- Eine falsche Diagnose führt zu einer falschen Behandlung
- Eine Fehldiagnose bleibt sehr häufig unerkannt
- Eine falsche Behandlung kann zu einer Verschlechterung des Zustands des Patienten führen



Shaping policy: the Canadian Cancer Society and the Hormone Receptor Testing Inquiry
M. Mathews PhD,¹ J. Newbury LLB,² and E. M. Housner MSc²

Several hundred women tested **false** negative for ER/PR in Canada in 1997-2005. Upon discovery of several processing errors, about 2000 were retested in a different lab and ~40% tested ER positive. At least 100 women have since died and it's unclear how earlier Tamoxifen treatment could have averted this. The commission that investigated the incident identified several process issues and mentioned in particular **fixation** and **specimen handling** as major problems in all labs.

ASCO/CAP Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer, Arch Pathol Lab Med-Vol 131, January 2007

Results.—Approximately 20% of current HER2 testing may be inaccurate.

Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: Types and frequency Clin Chem 1997;42:1348-1351

Focus on the **pre-analytical steps, where 68% of errors take place.**

Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a Tertiary Care Facility Increases HER2 Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization Concordance and Decreases the Number of Inconclusive Cases

Carina F. Middleton, MD, Kathy M. Pines, PhD, Pamela Puig, MD, Lori J. Haydon, MD, Emily Tarnai, MD, Heather Swartz, MD, Kaye Bore, PhD, Michael T. Duvvuri, MD

MDA Anderson Study HER2 Discordance
Results prior to CAP implementation:
10.8% inconclusive HER2 FISH/IHC, requiring new samples
After CAP implementation (**regulating fixation times 4h -> 6h**):
3.4% inconclusive (64% reduction)

"From a Medicare stand point lab costs are only 2-3% of overall costs. Yet laboratory results drive 60-70 % of all healthcare spending"
Terrence Dolan, MD CAP Today-May 2008

Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by Immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Engel KB, Moore HM, Arch Pathol Lab Med. 2011 May;135(5):537-43

CONCLUSIONS: Meta-analysis revealed 15 preanalytical variables that were capable of impacting immunohistochemistry (including fixation delay, fixative type; time in fixative).

Fehldiagnosen können dazu führen, dass
Patienten sterben,
deren Erkrankung heilbar gewesen wäre.

Der Siegeszug der Formalinfixierung



Hannah Zepp

- Entdeckung von Formaldehyd 1859 (Alexander Michailowitsch Butlerov)
- Ab 1889 industrielle Produktion
- 1891 Meister, Lucius und Brünig in Höchst produzieren qualitativ hochwertiges Formaldehyd
- 1892 Studien zur antiseptischen Wirkung von 4%igem Formaldehyd, Ferdinand Blum, Frankfurt
- Zufallsentdeckung 1893: Formaldehyd konserviert Gewebe und erhält dessen Struktur
- Von 1893 bis 1896 über 50 Referenzen in Publikationen in Biologie und Medizin

Wie wirkt Formalin?

- Vernetzt Proteine durch Bildung von Methylenbrücken
- Methanal $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \end{array}$
- Penetrationsrate $\sim 1\text{mm/h}$ in der ersten Stunde, danach $\sim 1\text{mm}/3\text{h}$
- Mindestdauer bei 4mm dickem Gewebe: 8 Std.
- **2 Stufen:**
 1. **Diffusion:** verhindert Autolyse/Fäulnis; reversibel durch waschen mit Wasser
 2. **Vernetzung:** festigt die Gewebestruktur; je nach Gewebe zwischen 16 und 50 Std.; stabil und nicht durch Hydrierung lösbar

Formalinfixierung

Was ist zu beachten?

- Kalte Ischämezeit (<1 Std.)
- Formaldehydkonzentration 4% (10% Formalin)
- Neutral gepuffert, isotonisch
- Fixierungsdauer (Gewebespezifisch. Kompromiss im Sinne der Standardisierung: 8 Std.)
- Fixativmenge (Verhältnis Fixativ zu Gewebe sollte 20:1 sein)
- Temperatur (RT vs. 4°C vs 45°C...)
- Größe des Gewebes (4-5mm dicker Zuschnitt)

Formalinfixierung

Stabilität braucht Zeit

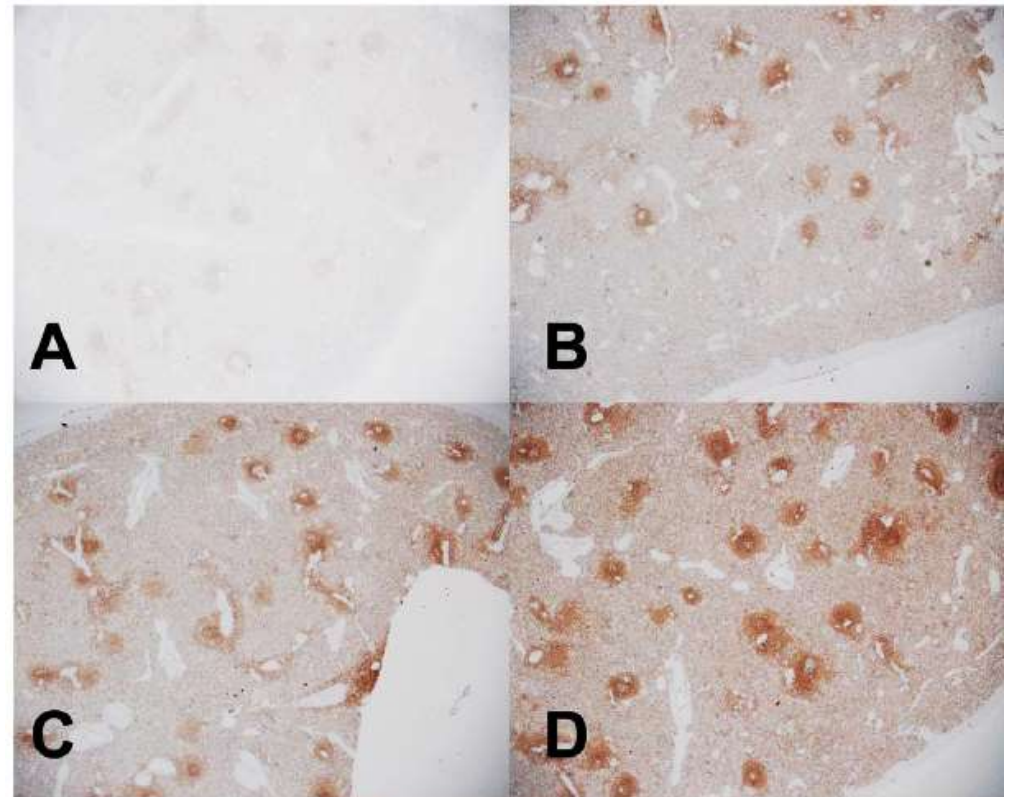
Bcl-2-Färbung auf Milz (10% NBF bei RT fixiert, bei Zuschnitt <1Std nach Entnahme)

A: 0 Std (direkte Überführung in den Einbether)

B: 2 Std

C: 4 Std

D: 24 Std



Formalinfixierung

Stabilität braucht neue Prozesse

Bcl-2-Färbung auf Milz (10% NBF bei RT fixiert, bei Zuschnitt <1Std nach Entnahme)

A: 0 Std (direkte Überführung in den Einbetter)

B: 2 Std

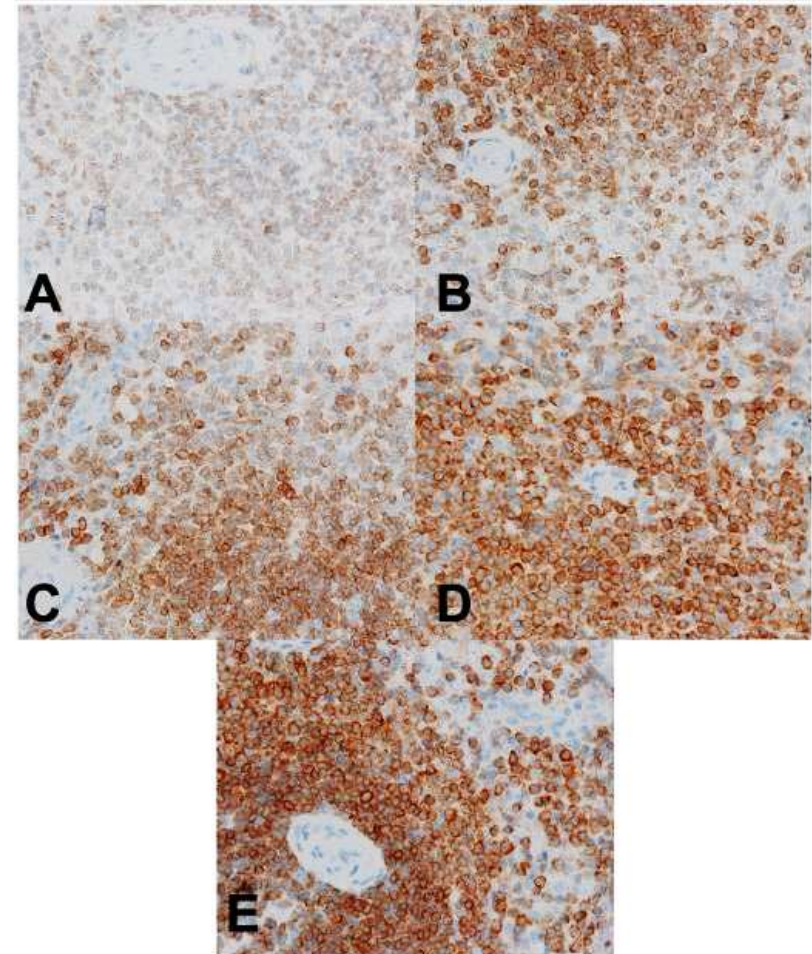
C: 4 Std

D: 24 Std

E: 2+2 Protokoll:

2 Std. NBF bei 4°C

2 Std. NBF bei 45°C

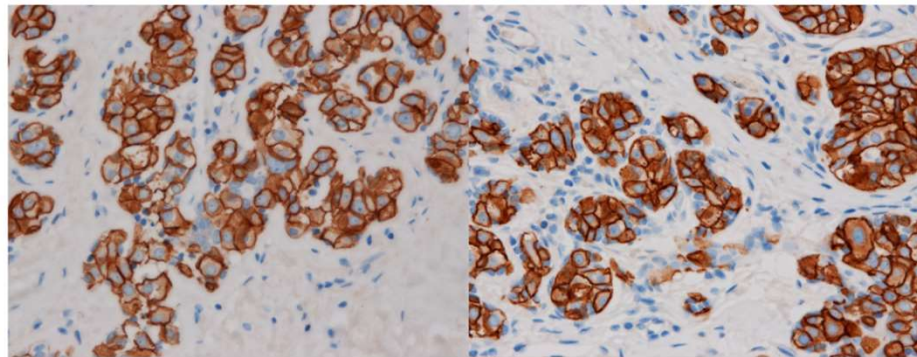


24h RT vs 2+2 Protokoll

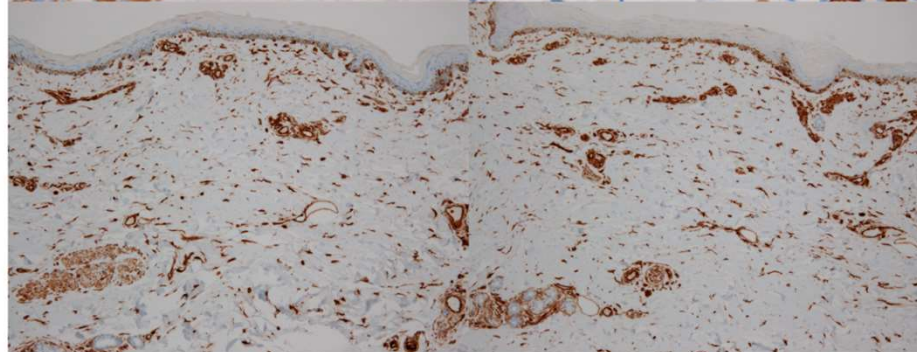
24 Hours

2+2

**HER2 in
Breast DCIS**



**Vimentin
in Skin**



40°C vs 2+2 Protokoll

Tonsille, *bcl-2*

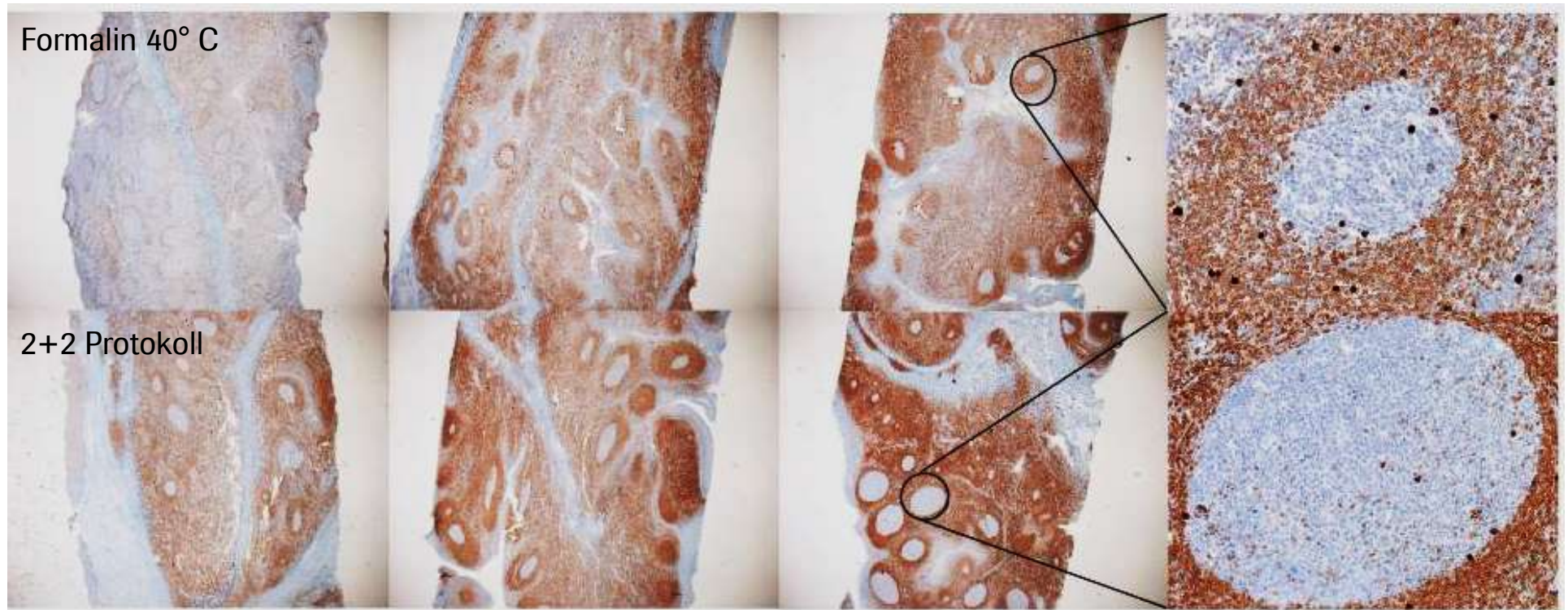


10 min

30 min

60 min

60 min (vergrößert)



Hannah Zepp

Formalinfixierung

Roche Diagnostics Deutschland GmbH

Tonsille, HE

10 min

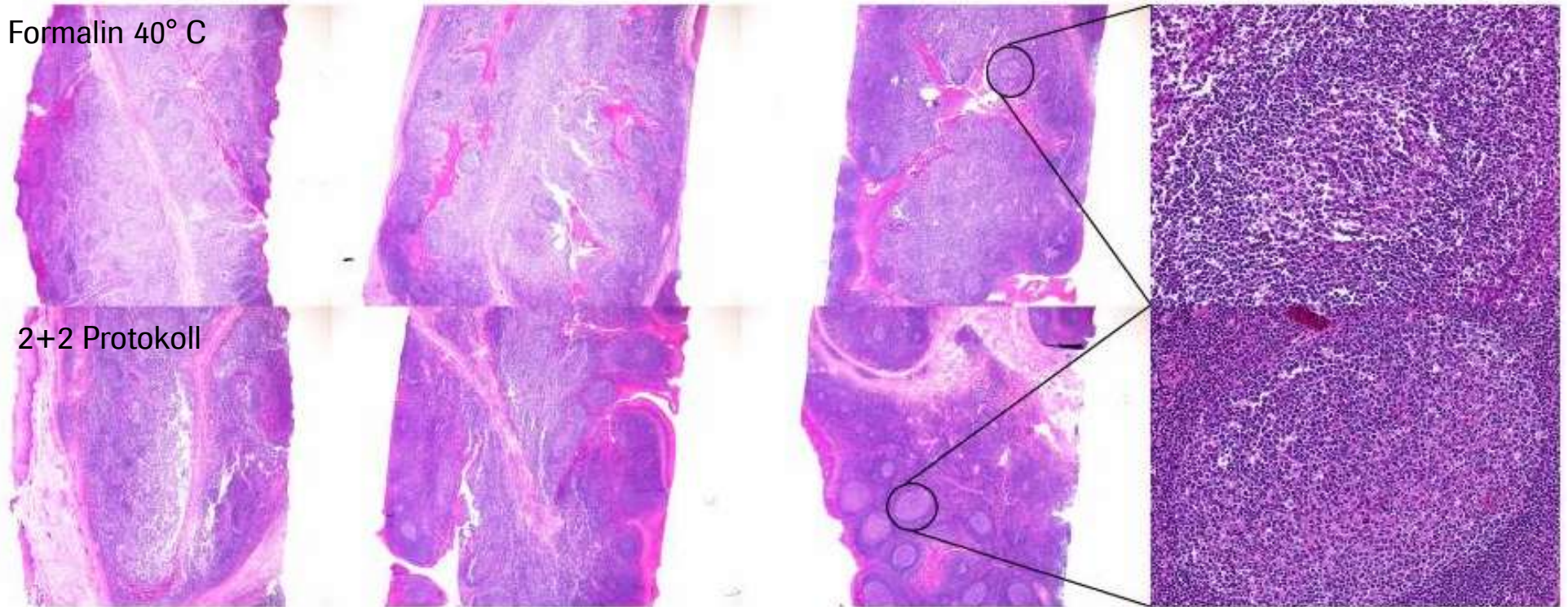
30 min

60 min

60 min (vergrößert)

Formalin 40° C

2+2 Protokoll

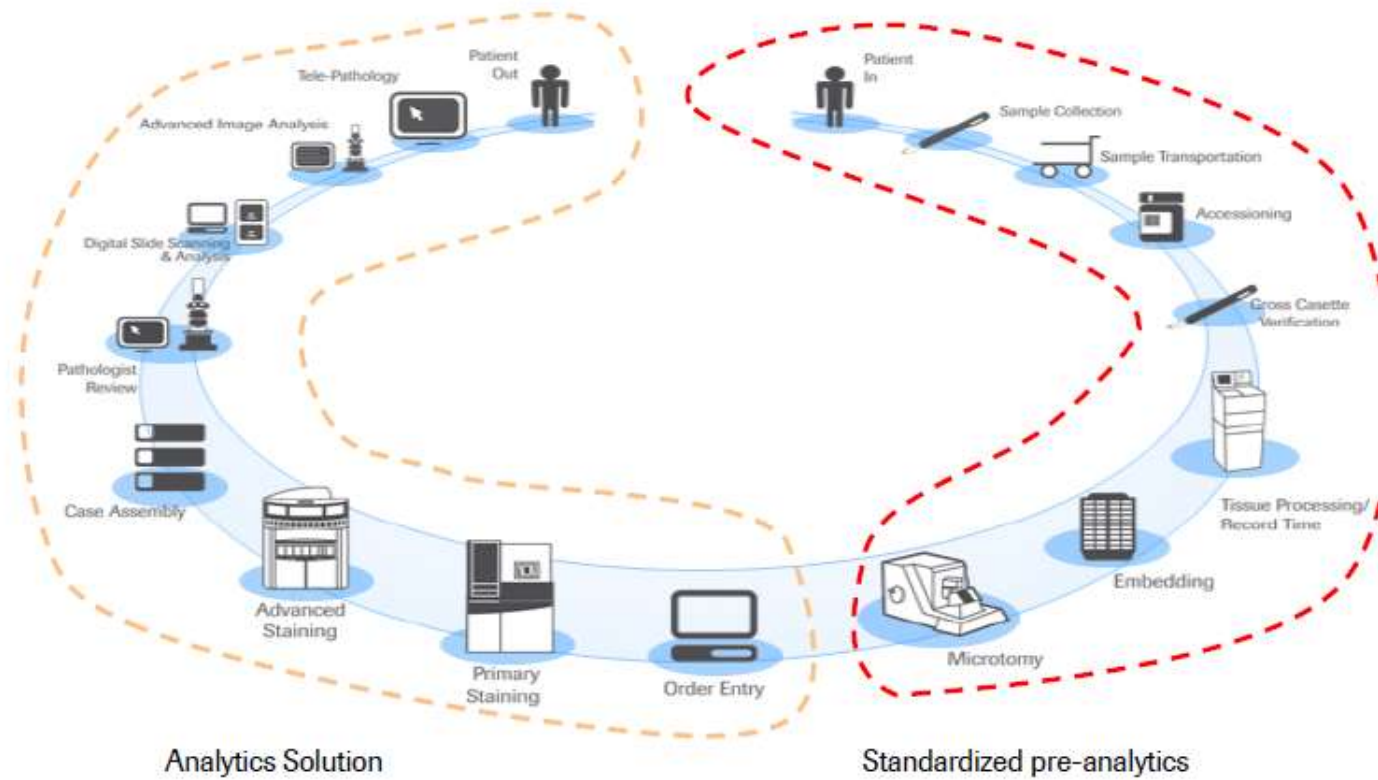


Hannah Zepp

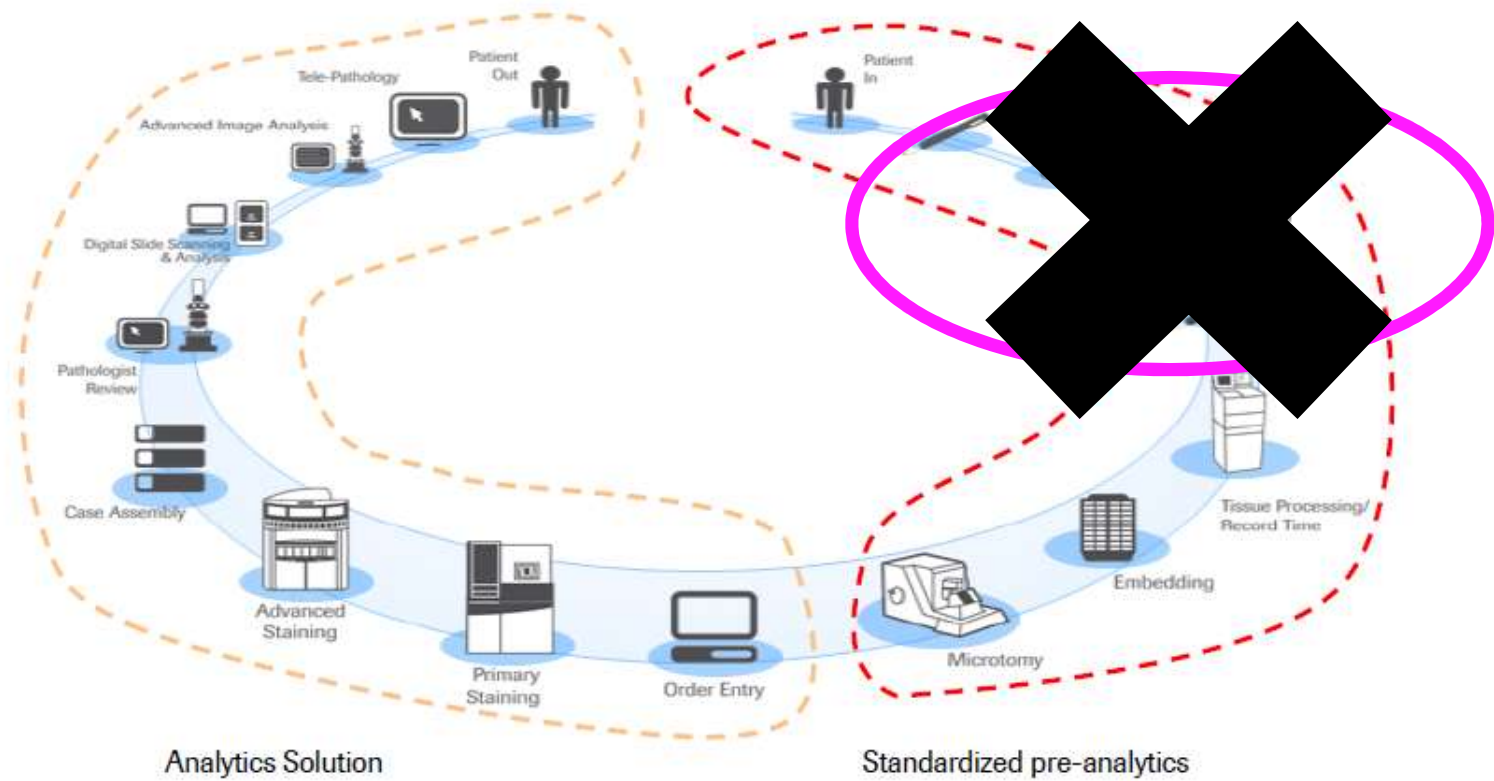
Formalinfixierung

Roche Diagnostics Deutschland GmbH

Stationen der Gewebediagnostik



Stationen der Gewebediagnostik



Maßnahmen zur Verkürzung der Ischämiezeit

Zeitdokumentation!

Drei Zeitpunkte protokollieren:

1. Gewebeentnahme
2. Ankunft im Zuschnitt
3. Zuschnitt in Formalin

	Baseline specimen Handling (nurse transport)	Trial with pathology technician pickup (pathology transport)
Collection to receipt in lab (average, minutes)	120 min.	24 min.
Collection to fixation (average, minutes)	138 min.	41 min.

University of Rochester Medical Center, Specimen Handling QA/QC Projekt (2008)

Voraussetzungen:

- Klar definierte Zuständigkeiten (Fixierungsbeauftragte)
- Sofortige Bearbeitung bei Ankunft im Pathologielabor (Zuschnitt)

Formalinfixierung

Was kann ich jetzt tun?





Quellen



- https://www.roche.com/de/about/priorities/personalised_healthcare/what_is_phc.htm (zuletzt geöffnet am 7.5.2018, 13:38 Uhr)
- <https://www.breastcancer.org/treatment/hormonal/serms/tamoxifen> (zuletzt geöffnet am 7.9.2018 um 17:08)
- <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/tumorbiologie.html> (zuletzt geöffnet am 3. 5. 2018, 19:17 Uhr)
- Chafin D, Theiss A, Roberts E, Borlee G, Otter M, et al. (2013) Rapid Two-Temperature Formalin Fixation. PLoS ONE 8(1): e54138. doi:10.1371/journal.pone.0054138
- Hicks DG. The Impact of Pre-analytic Variables on Tissue Quality from Clinical Samples Collected in a Routine Clinical Setting: Implications for Diagnostic Evaluation, Drug Discovery, and Translational Research. Methods in Pharmacology and Toxicology DOI 10.1007/7653_2014_18.
- Neumeister VM, Parisi F, England AM, Siddiqui S, Anagnostou V, Zarrella E, Vassilakopoulou M, Bai Y, Saylor S, Sapino A, Kluger Y, Hicks DG, Bussolati G, Kwei S, Rimm DL. A tissue quality index: an intrinsic control for measurement of effects of preanalytical variables on FFPE tissue. Lab Invest. 2014 Apr;94(4):467-74.
- Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, Rowe JJ, Patil D, Lanigan C, Budd GT, Hicks DG, Rimm DL, Tubbs RR. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. Mod Pathol. 2013 Jan;26(1):1-9.
- Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S, England AM, Zarrella ER, Vassilakopoulou M, Parisi F, Kluger Y, Hicks DG, Rimm DL. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues. J Natl Cancer Inst. 2012 Dec 5;104(23):1815-24.
- [Targeted therapies in breast cancer: tailoring treatment to the molecular drivers of disease progression. DG Hicks](#) - MLO: medical laboratory observer, 2012 - europepmc.org. Author: Hicks DG, Journal: MLO: medical laboratory observer[2012/01].
- Hadi Yaziji, MD. Consensus Recommendations on Estrogen Receptor Testing in Breast Cancer By Immunohistochemistry Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: [December 2008 - Volume 16 - Issue 6 - p 513-520](#)

Doing now what patients need next