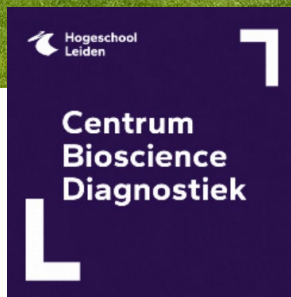




Nynke Hahn
Hahn.n@hsleiden.nl





Fixation matters:

Why it's so important?



Waar gaan we het deze ochtend over hebben?

Pre-analyse

Variabelen bij prefixatie

Warme ischemie en koude ischemie

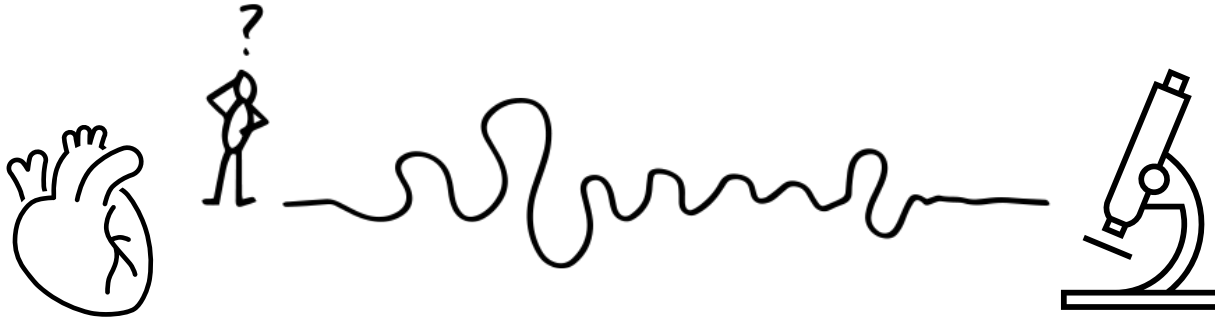
Belang van fixeren

Niet-coagulerende en coagulerende fixatieven

Variabelen bij fixeren

Pre-analyse

Welke stappen horen bij pre-analyse?



Pre-analyse

Prefixatie

Fixatie

Postfixatie / ontkalken

Processing (doorvoeren, dehydreren, ophelderen, paraffine)

Snijden, plakken

Drogen, bewaren

Analyse

Post-analyse

Pre-analyse

Prefixatie

Fixatie!!!

Postfixatie / ontkalken

Processing (doorvoeren, dehydreren, ophelderen, paraffine)

Snijden, plakken

Drogen, bewaren

Analyse

Post-analyse

Variabelen bij prefixatie

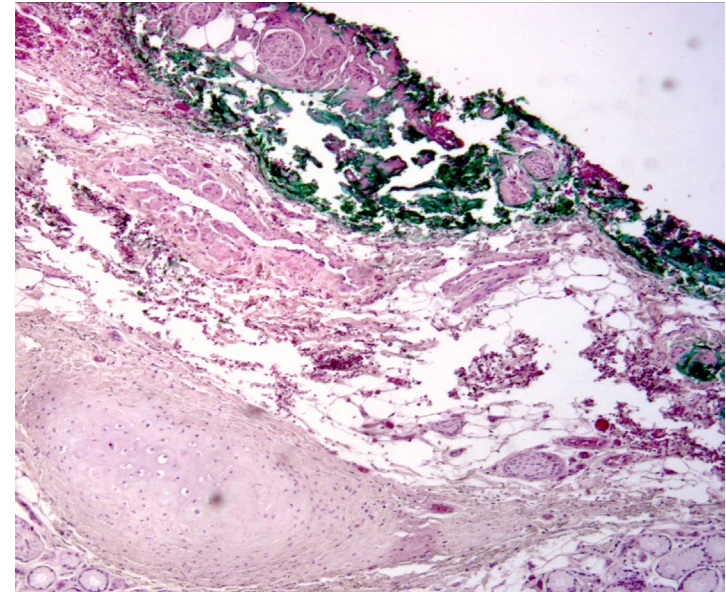
Afname weefsel

Vertraging voordat weefsel in fixatief gaat

Tijd en temperatuur (warme en koude ischemie)

Grootte en type weefsel (biopt, resectie, histologie, cytologie)

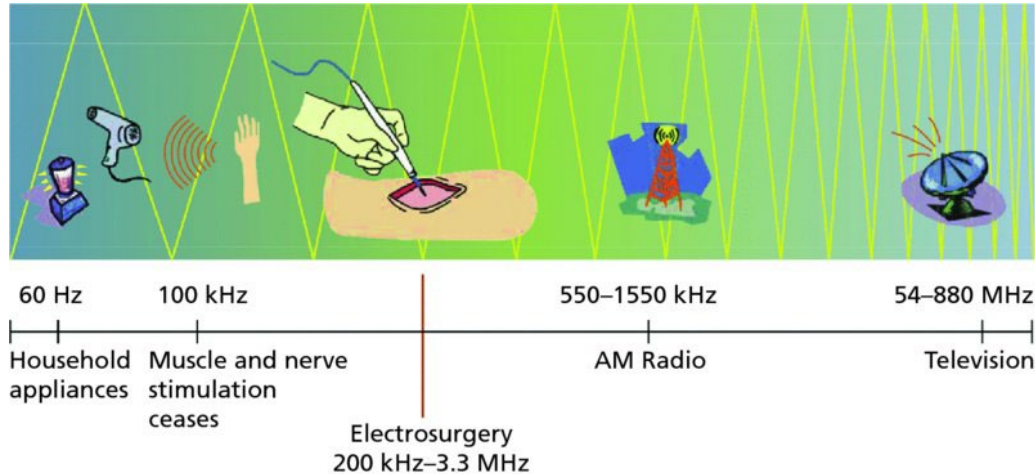
Gebruik van inkt bij markering



Effect afname weefsel bij OK

Electro-chirurgie - Hitte denaturatie

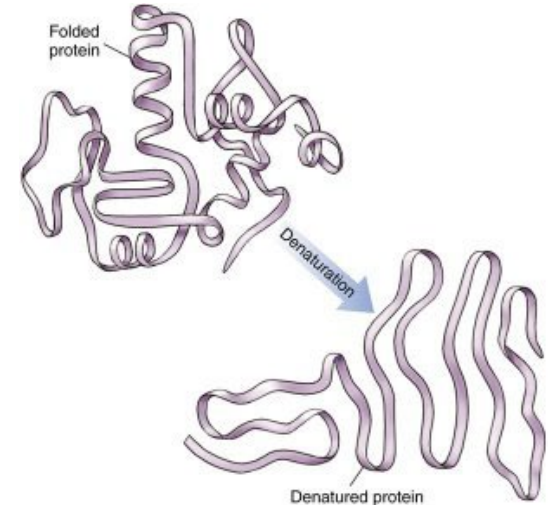
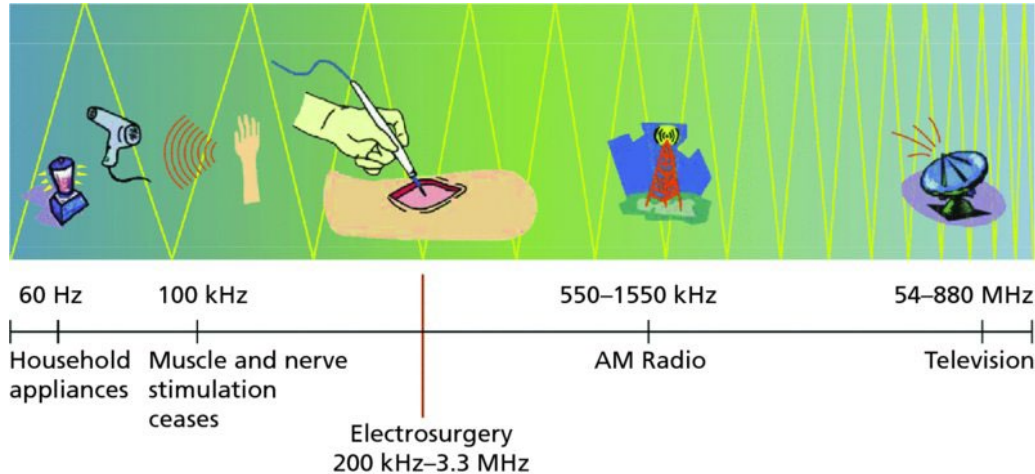
Wat gebeurt er met eiwitten?



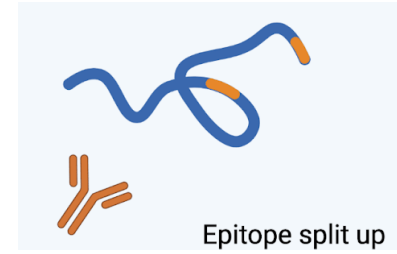
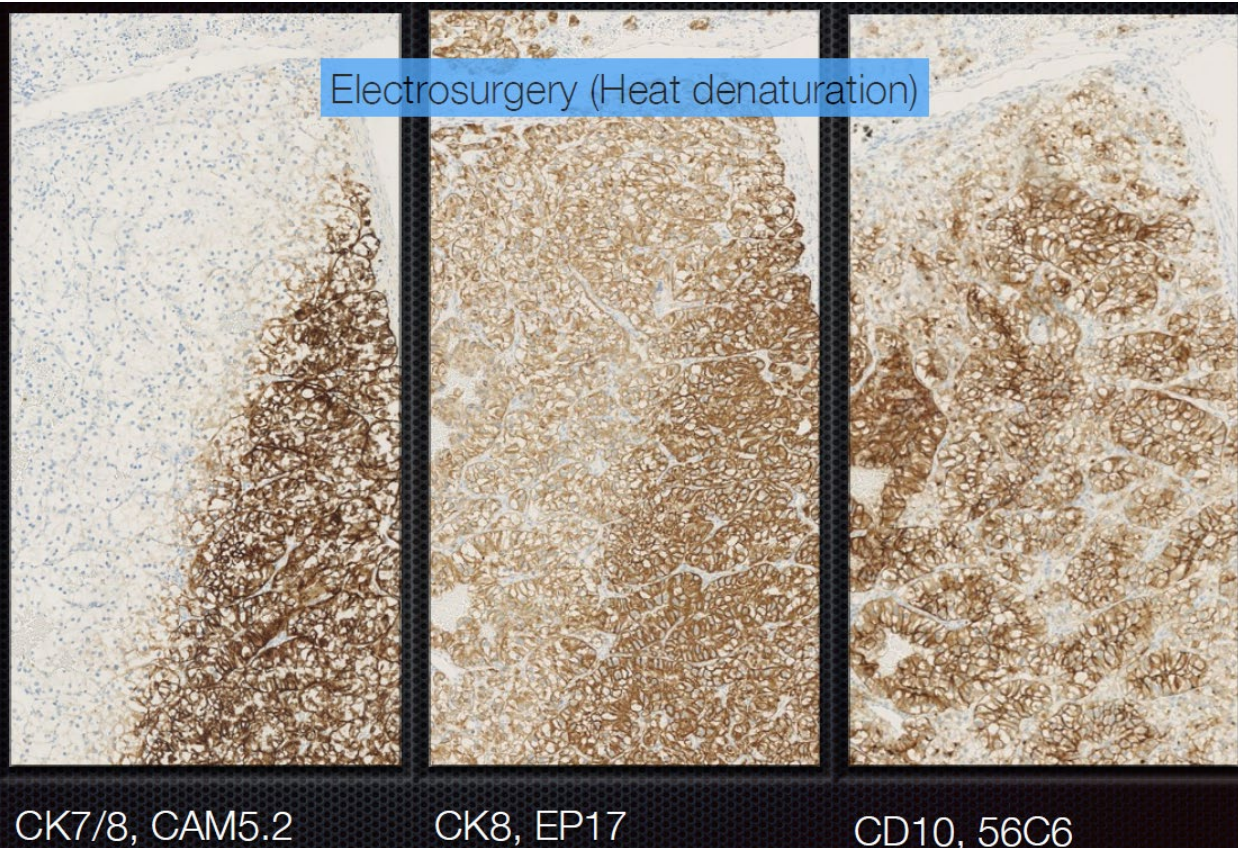
Effect afname weefsel bij OK

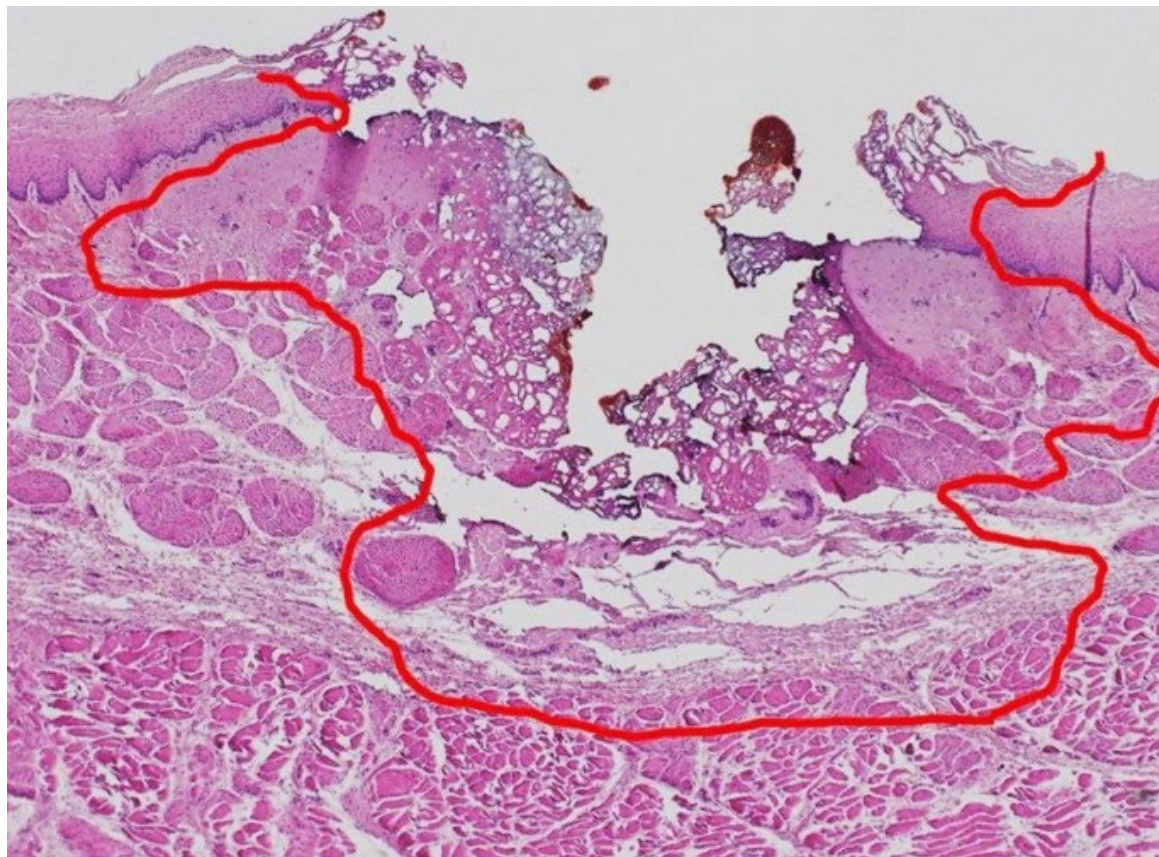
Electro-chirurgie - Hitte denaturatie

Wat gebeurt er met eiwitten?



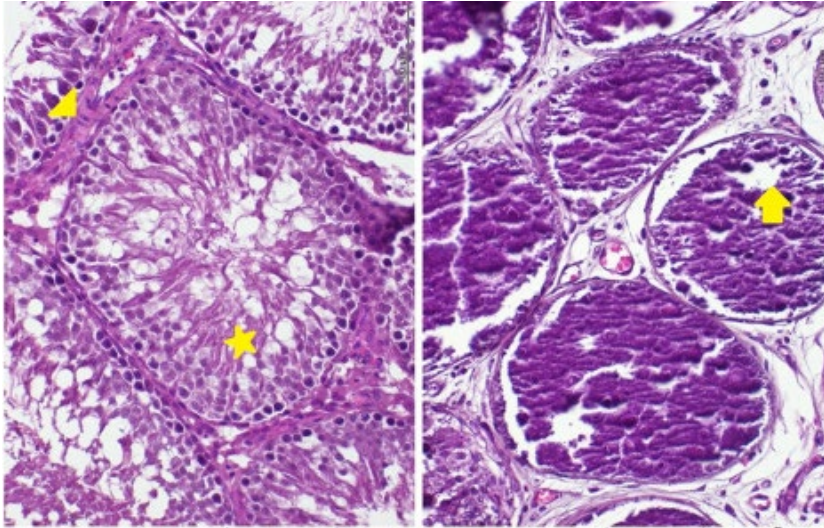
Electrosurgery (Heat denaturation)





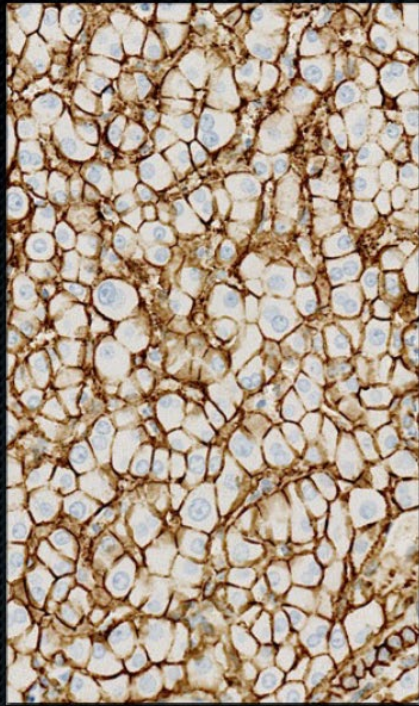
Effect afname weefsel bij OK

Afbinden orgaan – Warme ischemie

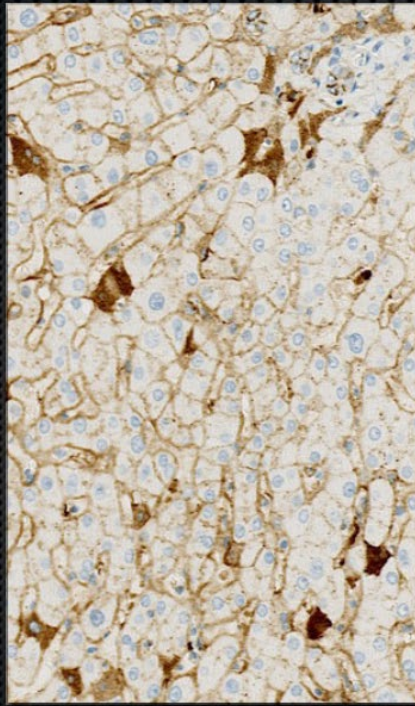


Variabelen bij prefixatie

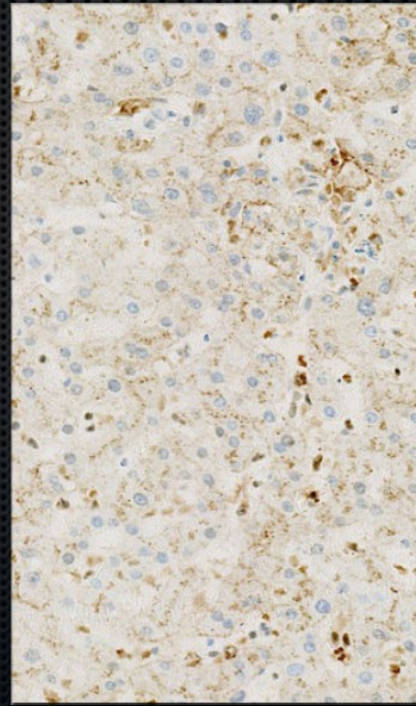




Liver: No Fix delay



Liver 16 hrs delay

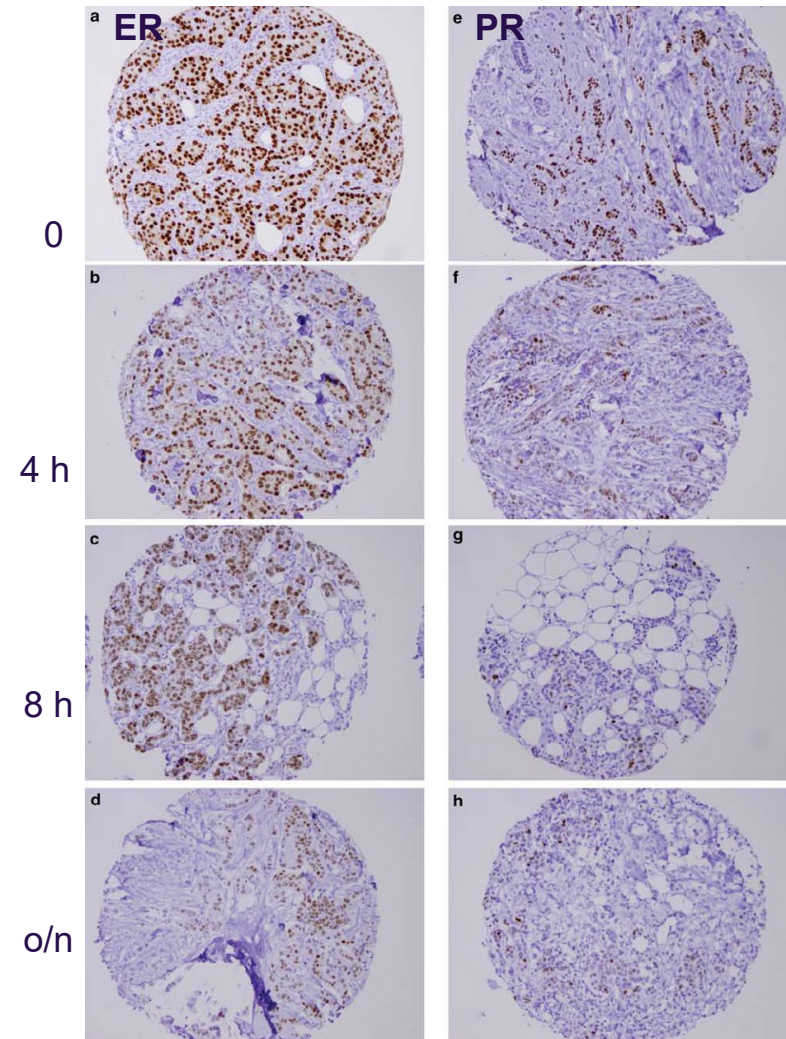


Liver 48 hrs delay

Koude ischemie

Tijd tussen afname weefsel en fixatie

Belangrijk voor de juiste diagnose!



New ER Guidelines Require Recording Time Points for Tissue Handling

Require **3 time points be recorded for each specimen** and be available when you sign out report so time to fixation will be known

1. Time tissue is removed (OR staff to record)
2. Time tissue is received in grossing room
3. Time tissue was placed in fixative



These time point will help in trouble shooting unexpected test results

*Standard procedure at URM Medical Center for over one year for all OR specimens

<http://www.asco.org/portal/site/ascov2>
<http://www.asco.org/ascov2/Press+Center/Latest+News+Releases/ASCO+and+the+CAP+Issue+Joint+Guideline+to+Improve+Hormone+Receptor+Testing+for+Patients+With+Breast+Cancer>

Meest recente update: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.19.02309#T2>

Koude ischemie

Fixeren!

Gepubliceerde richtlijnen en aanbevelingen (ASCO en CLSI)

Fixeren binnen één uur

Literatuur-gebaseerde aanbevelingen

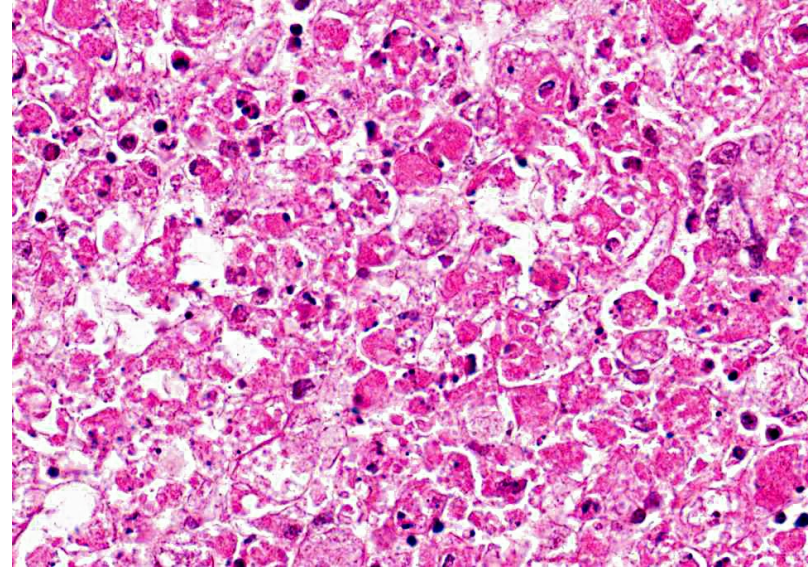
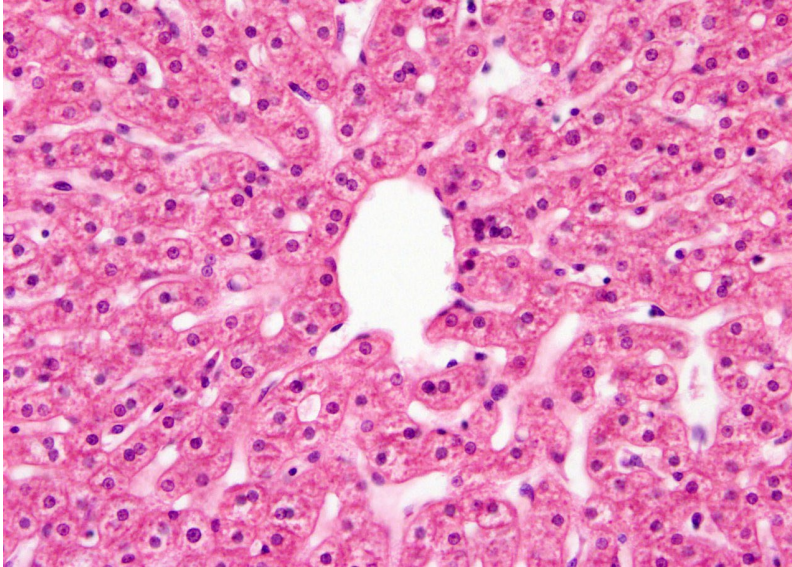
Fixeren binnen 12 uur

Waarom is op tijd fixeren
zo belangrijk?

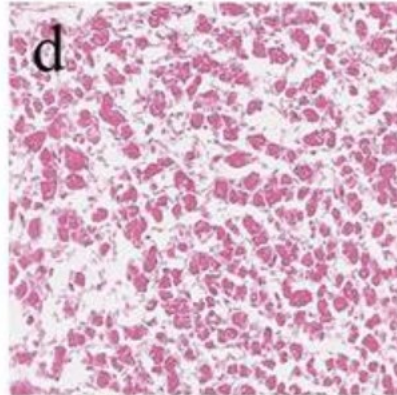
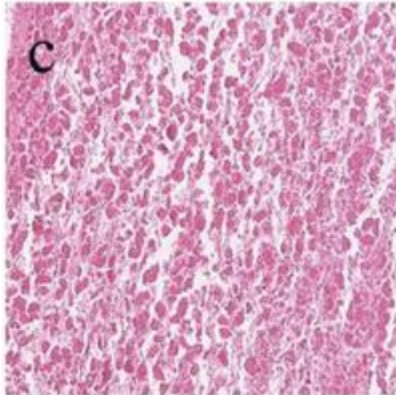
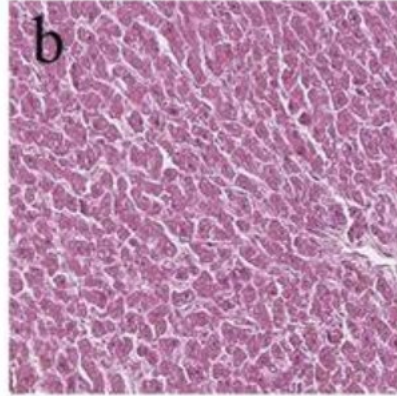
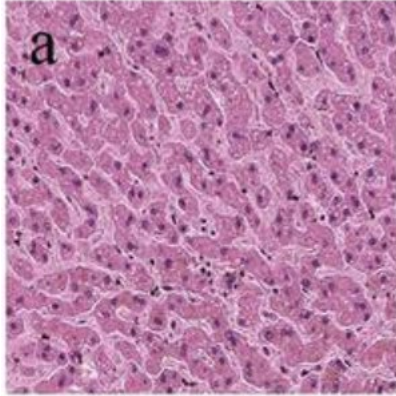




Koude ischemie – Autolyse



Zoek de verschillen...



Autolyse

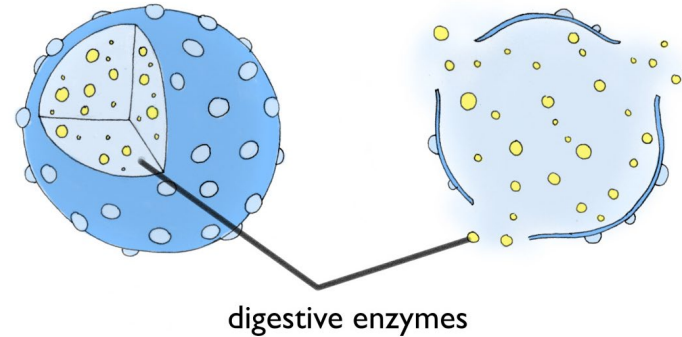
Zelf-degradatie van cellen
enzymatische activiteit na celdood

Resulteert in zwelling, verlies van nucleair
detail en morfologische veranderingen
van het cytoplasma

Koude ischemie – Autolyse

‘zelf vertering’

- afbraak processen
- afvalstoffen
- membraanpermeabiliteit
- lekken lysosomen



Leidt tot zwelling, lysis en verlies kern-
en cytoplasma structuren

Hoe kun je autolyse voorkomen of beperken?

Zonder fixatief

Met fixatief



Hoe kun je autolyse voorkomen of beperken?

Zonder fixatief

Koelen

Met fixatief

Zo snel mogelijk!!!

Fysisch = invriezen

Chemisch = fixeren



Het belang van fixeren

Met welke doelen wordt weefsel gefixeerd?

Welke manieren van chemisch fixeren zijn er?

Doelen fixeren

Afbraak (katabole processen) remmen / voorkomen

autolyse

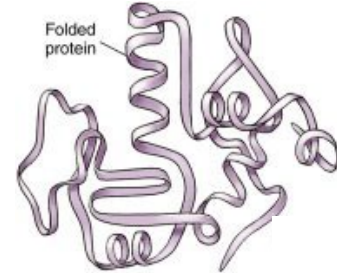
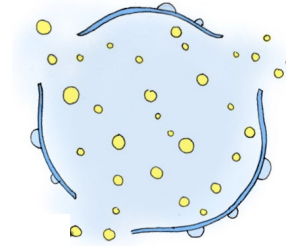
heterolyse

3D structuur vastleggen

behoud van eiwit structuur

antigeniciteit

Bestand maken tegen histotechnische bewerkingen



Chemisch fixeren

Niet-coagulerend (cross-link)

Formaline

Formaldehyde

Coagulerend

Aceton

Ethanol, methanol

Azijnsuur

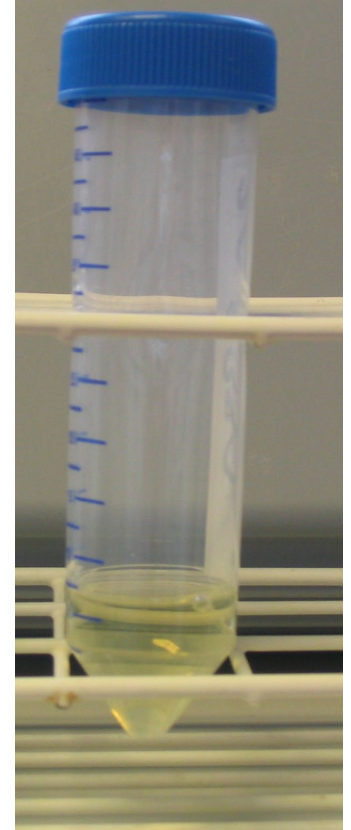
Wat zit waar in?

Twee buizen met een BSA (eiwit) oplossing

Aan één buis is ethanol toegevoegd

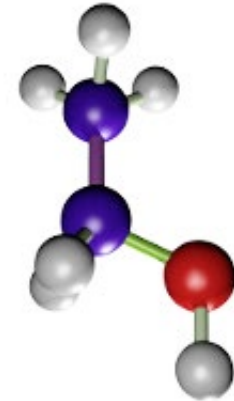
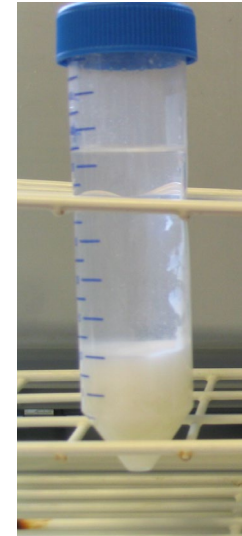
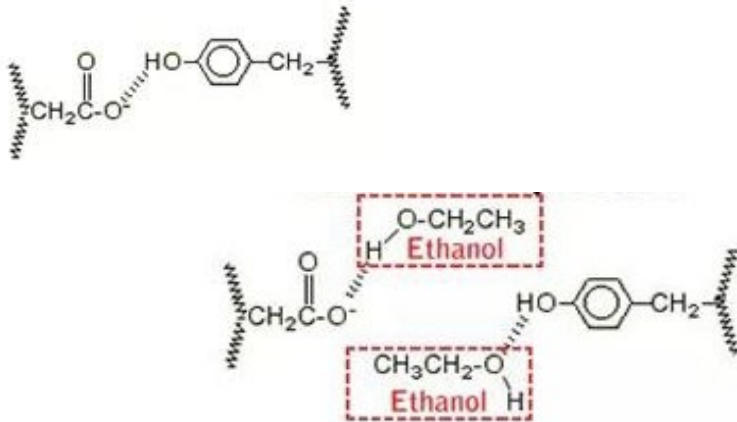
Aan één buis is formaline toegevoegd

Wat gebeurt er met de eiwitten in deze buizen?



Wat zit waar in?

Aan één buis is **ethanol** toegevoegd
Coagulerend (klonteren)

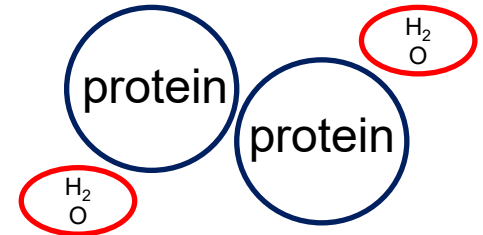
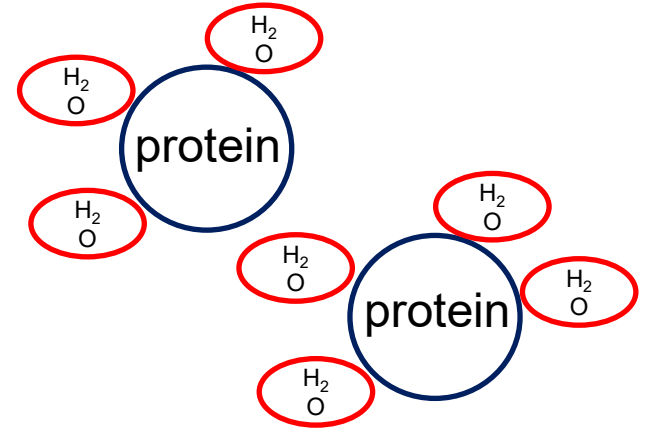
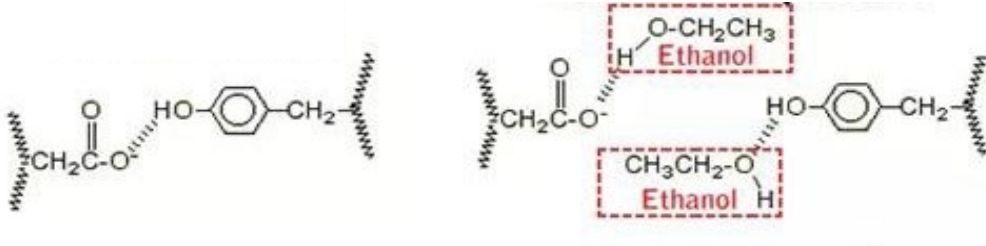


Ethanol
($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Coagulerend fixatief

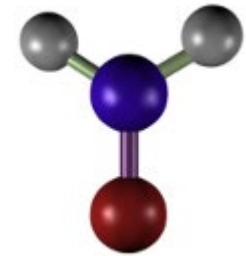
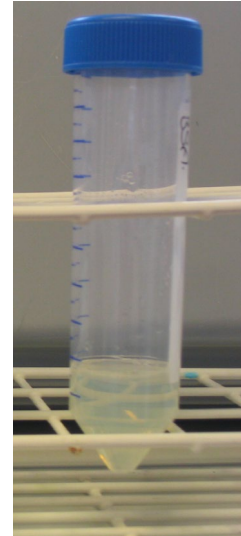
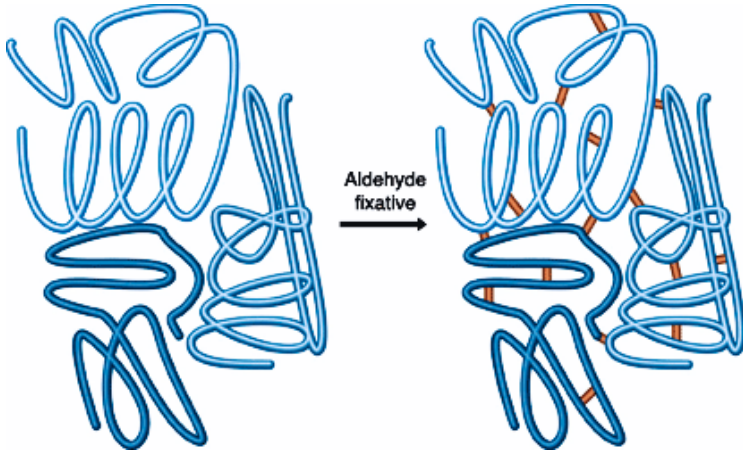
Verwijdert de watermantel (waterstofbruggen)

Eiwitten coaguleren en slaan neer

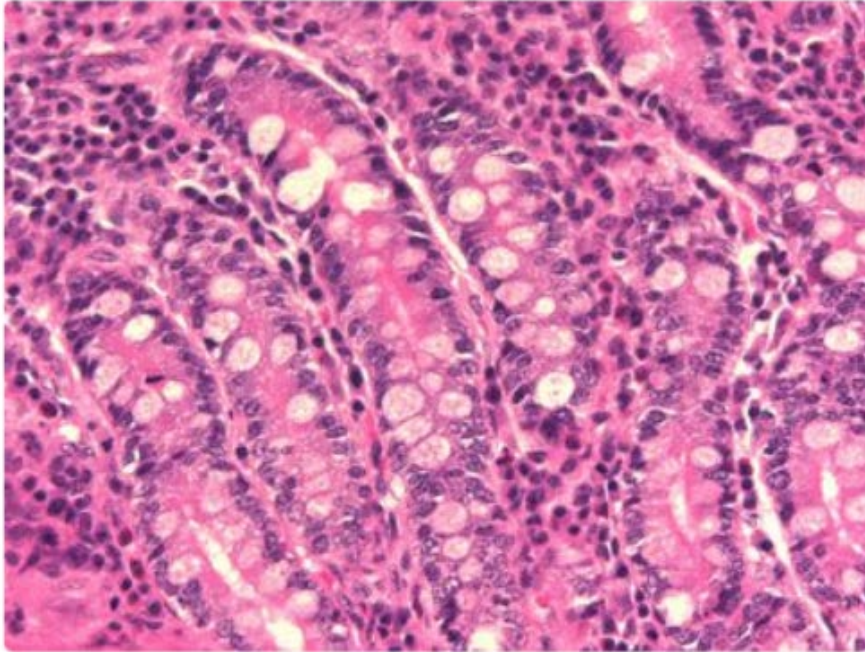


Wat zit waar in?

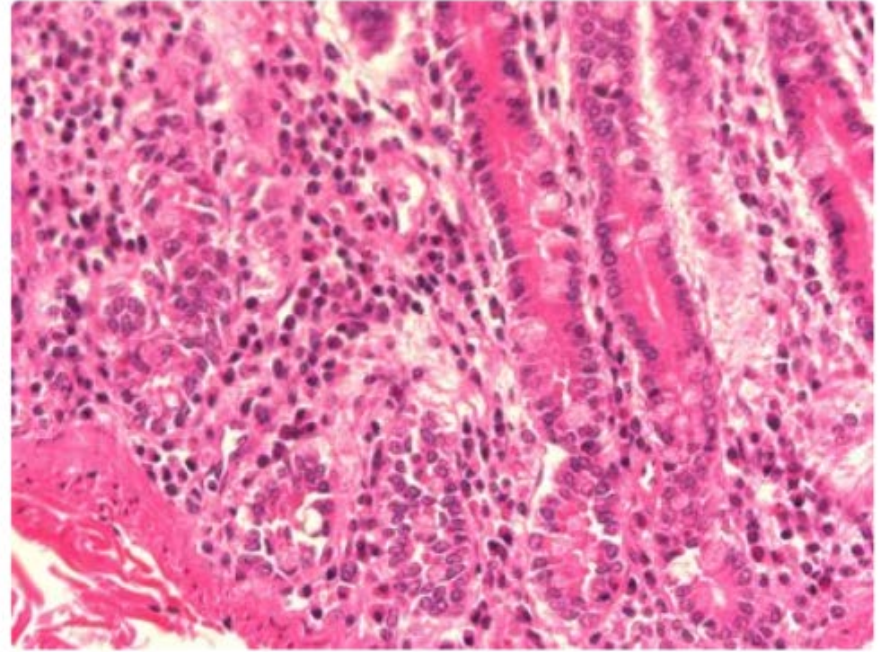
Aan één buis is **formaline** toegevoegd
Niet-coagulerend (cross-link)



Formaldehyde
($\text{CH}_2=\text{O}$)



HE dunne darm – NBF fixatie



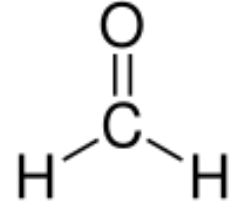
HE dunne darm – 95% ethanol fixatie

Niet-coagulerend (cross-link)

Aldehyde-gebaseerde fixatieven, zoals formaline en paraformaldehyde

Meestal 4% gebufferde formaldehyde ($\approx 10\%$ formaline)

Meest gebruikt binnen de histopathologie (NBF, FFPE)



4% gebufferde formaldehyde

Formaline – Formaldehyde

Formaldehyde (g)

→ oplosbaar tot 37%

→ (100%) formaline

→ 10x verdunnen

→ 10% formaline

Paraformaldehyde (s), polymeer van formaldehyde

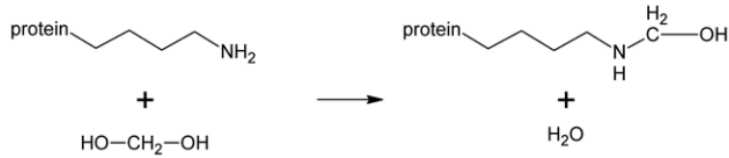
→ 4g / 100 ml

→ 4% formaldehyde

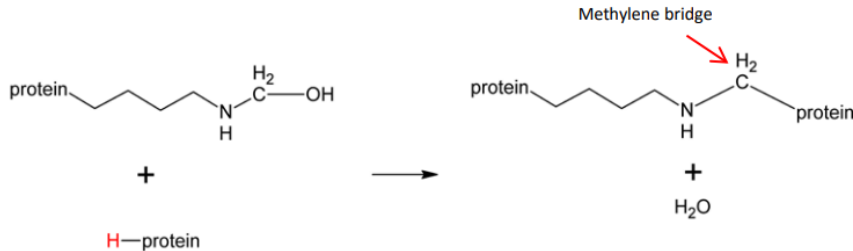
4% formaldehyde $\approx$ 10% formaline

Formaldehyde reactie

Addition of formaldehyde (methylene glycol) to a lysine side-chain (fast)



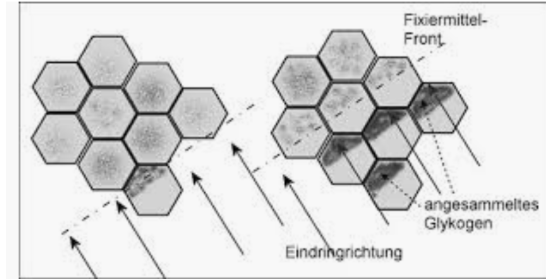
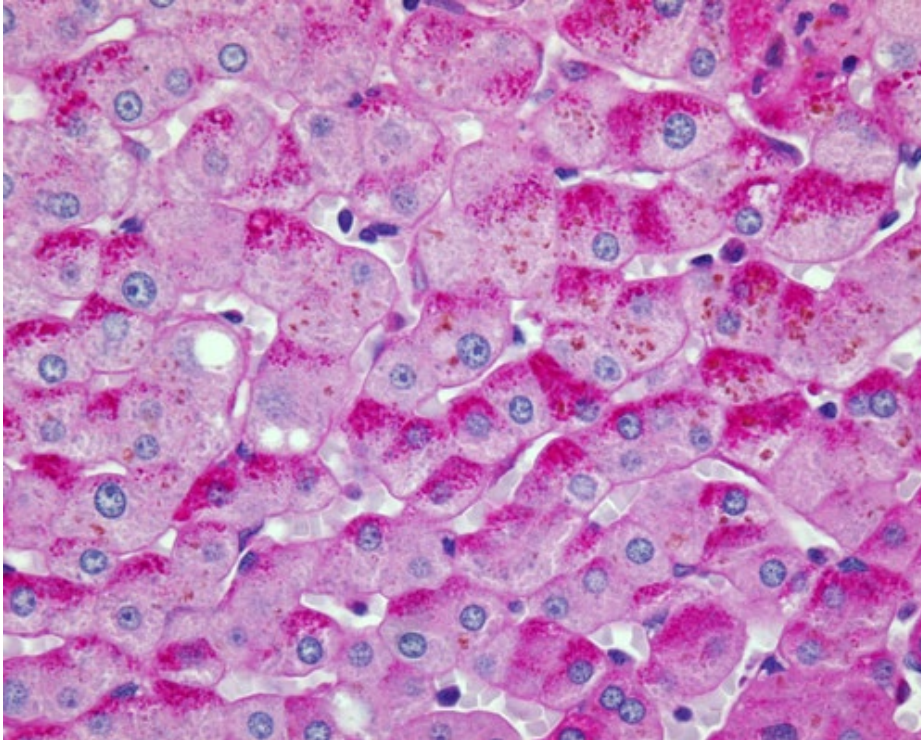
Formation of methylene bridge with a neighboring nitrogen atom (slow)



De aldehyde groep kan met een amine -NH₂- of andere atomen van de eiwitten reageren

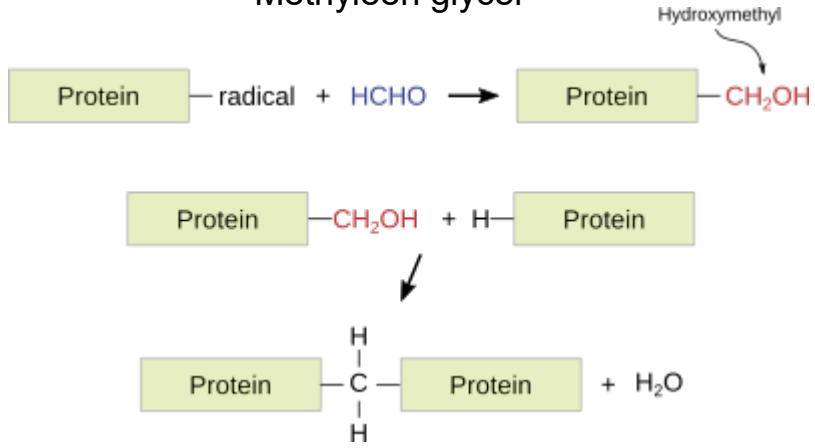
Er wordt een methyleenbrug -CH₂- gevormd tussen twee reactieve antomen in eiwitten die dicht bij elkaar gelegen zijn. Andere moleculen worden waarschijnlijk **gevangen** in een matrix of cross-linked eiwitten.

Streaming artefact

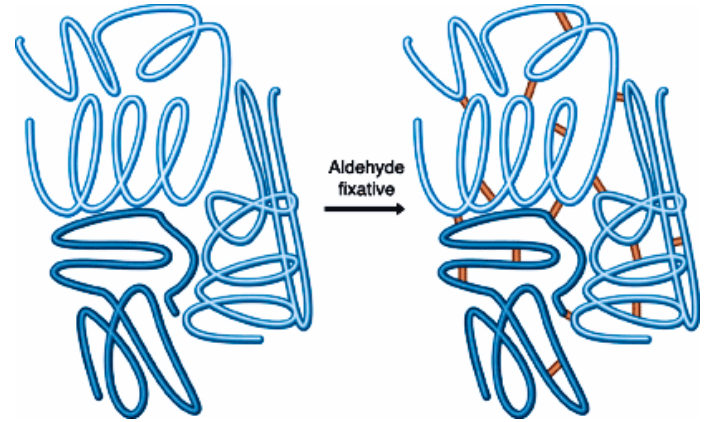


Koolhydraat (glycogen) floating

Methyleen glycol



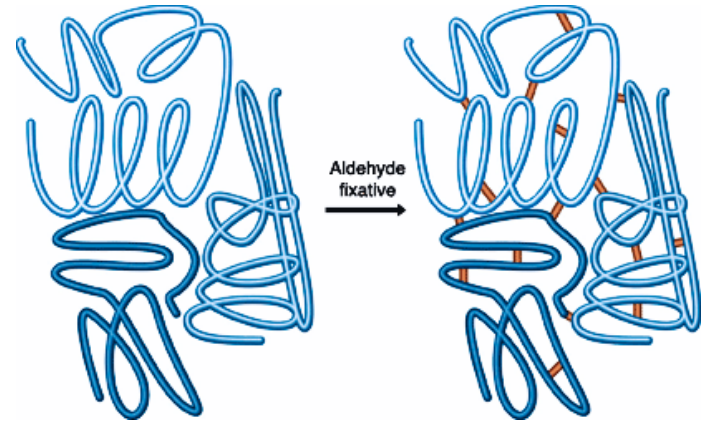
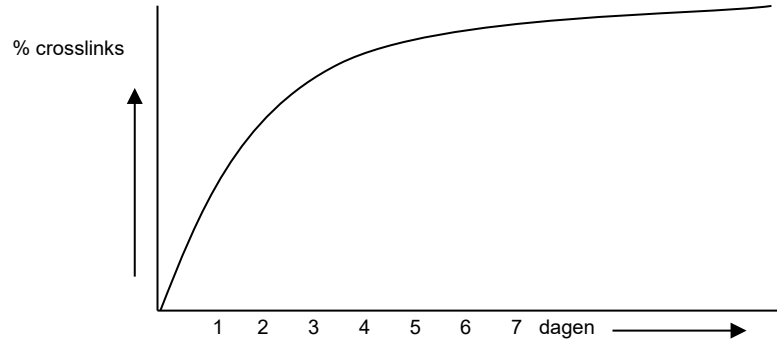
Methyleenbrug



Fixatiesnelheid

Fixatie reactie van formaline met weefsel

Pathologie, diagnostiek: 24 uur formaline fixatie



Variabelen bij fixatie

Fixatie tijd: onderfixatie, optimale fixatie, overfixatie

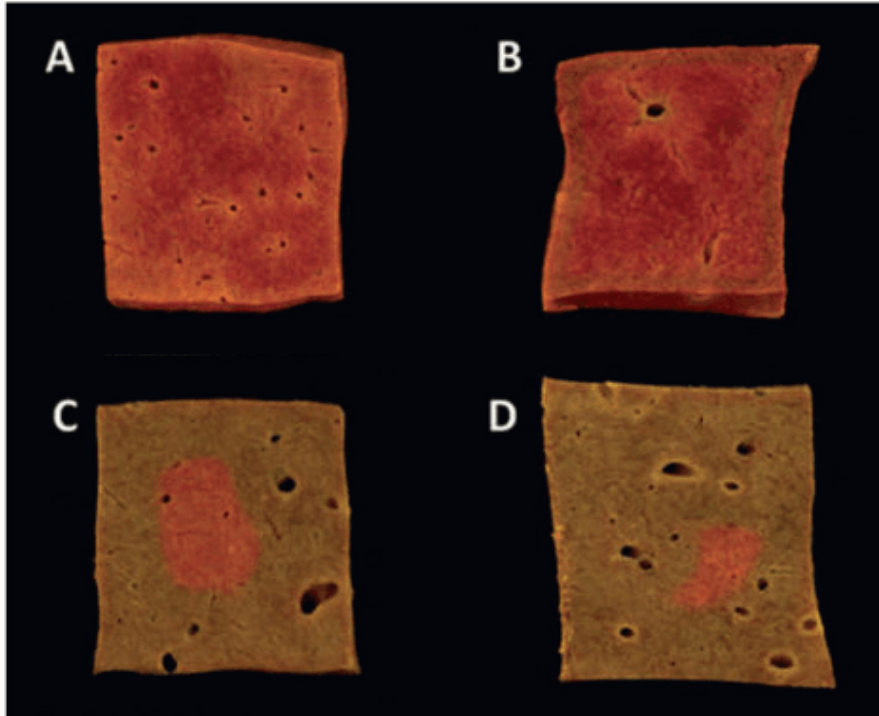
Buffer type en concentratie

Concentratie fixatief

Fixatie temperatuur (kT versus 4 °C)

Aard van weefsel: cytologie, histologie

Belang fixatietijd - macroscopie



2.5 cm

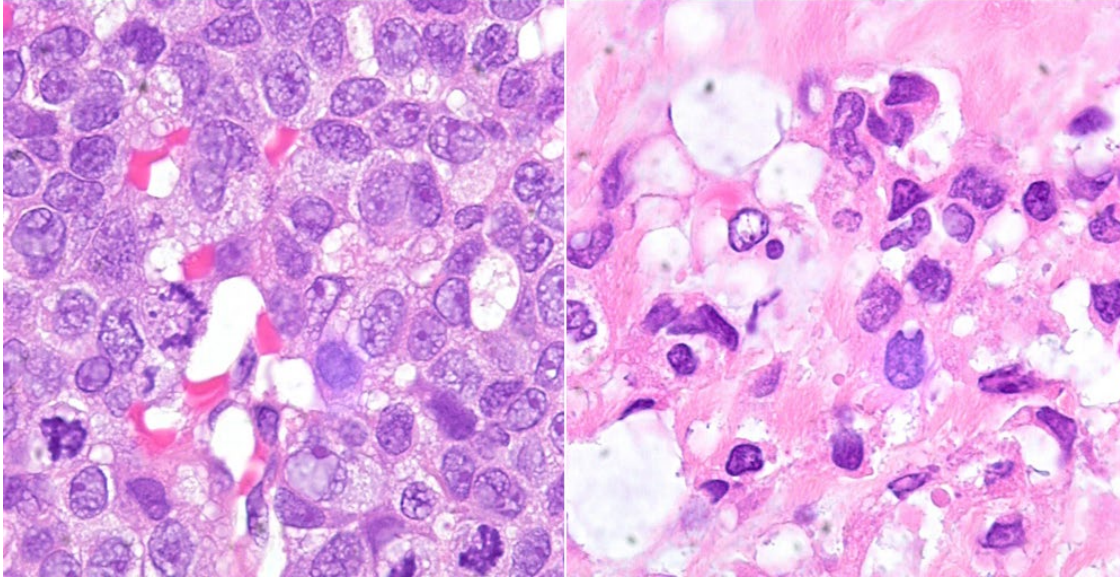
A = 1h

B = 3h

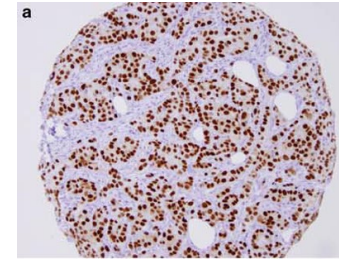
C = 12h

D = 20h

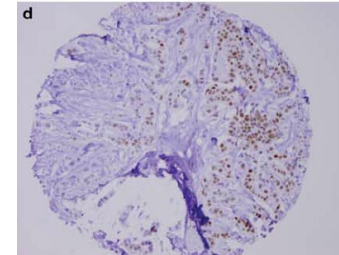
Belang fixatietijd - microscopie



HE – Breast carcinoma



ER

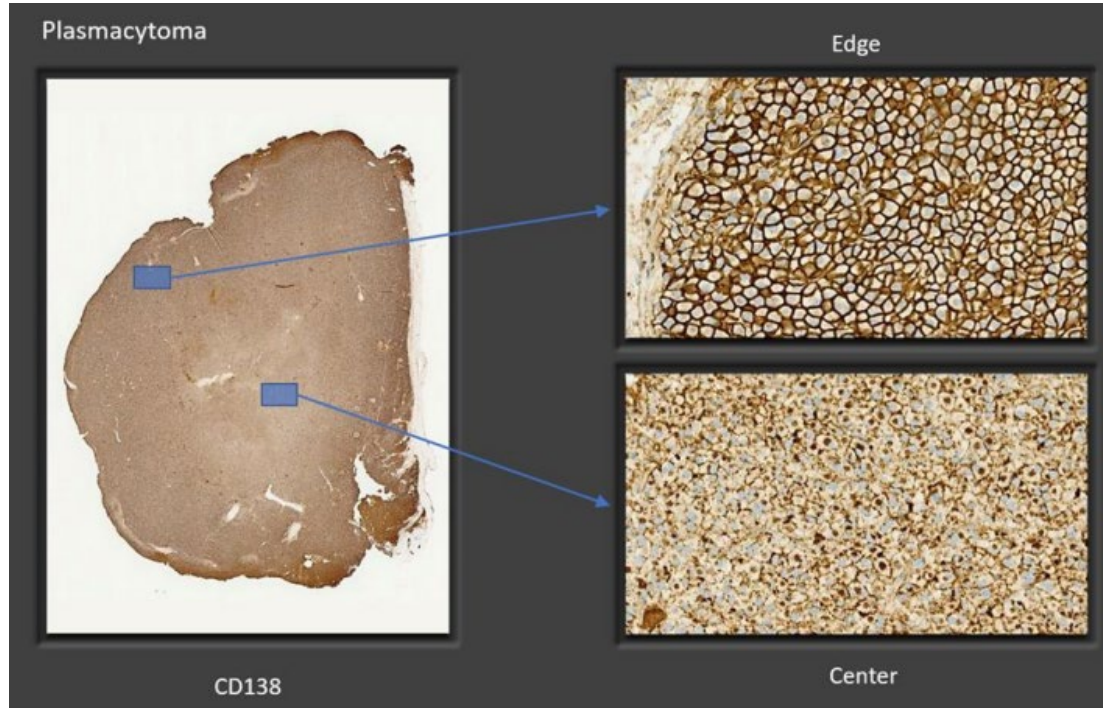


PR

Belang fixatietijd – IHC



Belang fixatietijd – IHC



Diffundeerbaarheid fixatief

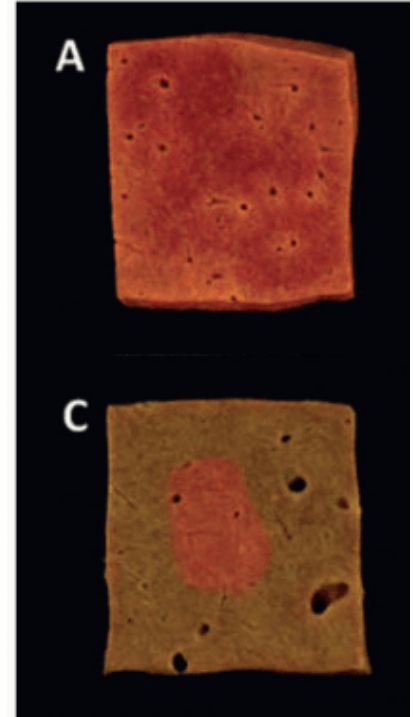
In 1941 liet Peter Medawar zien dat weefselfixatieven de wetten van diffusie volgen en stelde hij een formule op om de penetratiediepte te berekenen:

$$d = K * \sqrt{t}$$

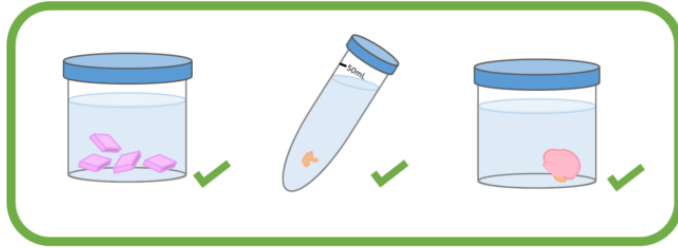
d = penetratiediepte in millimeters

K = Medawar-constante, specifiek voor elk fixatiemiddel

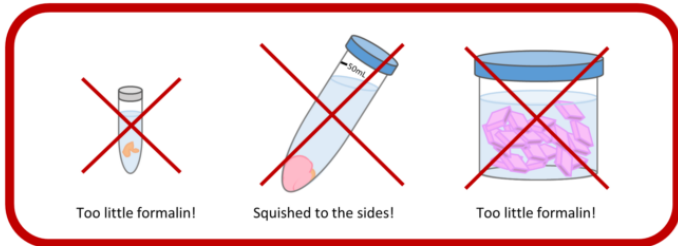
t = tijd van fixatie in uren



Diffundeerbaarheid fixatief



Yes, 20 times more formalin than your sample! Your sample should also be free to drift with lots of space around it.



Diffusie coëfficiënt hangt af van weefsel
grootte en tijd

Minimum weefsel-fixatief ratio is 1:10

Grotere weefsels hebben langere
fixatietijd nodig

Minimale fixatietijd

Summary of ASCO/CAP ER and PgR Guideline Recommendations

Optimal tissue handling requirements*

*Revised per the 2011 ASCO/CAP Clinical Notice on HER2 and ER/PgR

Recommendation:

Time from tissue acquisition to fixation should be $\leq$ one hour. Samples for ER and PgR testing are fixed in 10% NBF for 6–72 hours. Samples should be sliced at 5-mm intervals after appropriate gross inspection and margins designation and placed in sufficient volume of NBF to allow adequate tissue penetration. If tumor comes from remote location, it should be bisected through the tumor on removal and sent to the laboratory immersed in a sufficient volume of NBF. Cold ischemia time, fixative type, and time the sample was placed in NBF must be recorded.

As in the ASCO/CAP HER2 guideline, storage of slides for more than 6 weeks before analysis is not recommended.

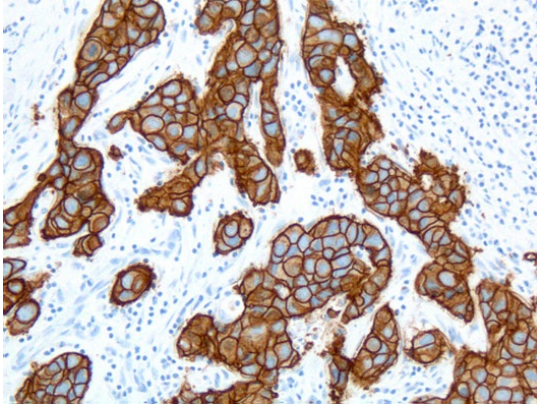
Time tissue is removed from patient, time tissue is placed in fixative, duration of fixation, and fixative type must be recorded and noted on accession slip or in report.

Is er een maximum fixatietijd voor ER?

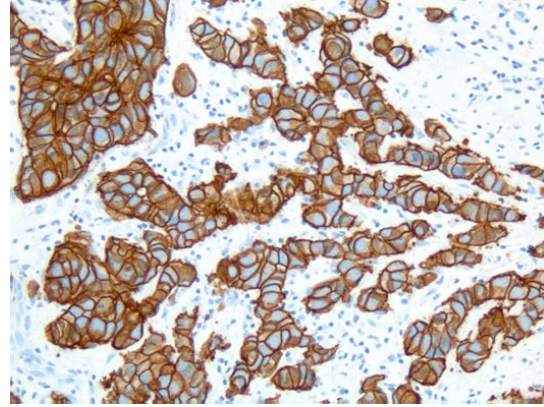
Waarom zou er technisch een maximum fixatietijd zijn?

Breast carcinoma 3+, HER-2 PATHWAY, rmAb 4B5

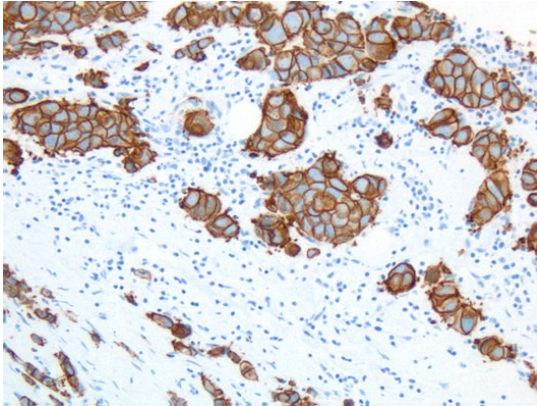
4 h



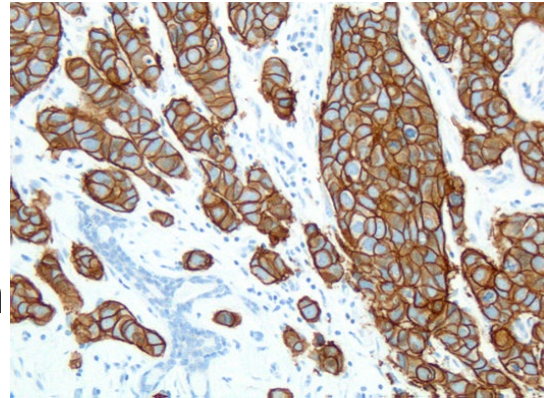
24 h



48 h

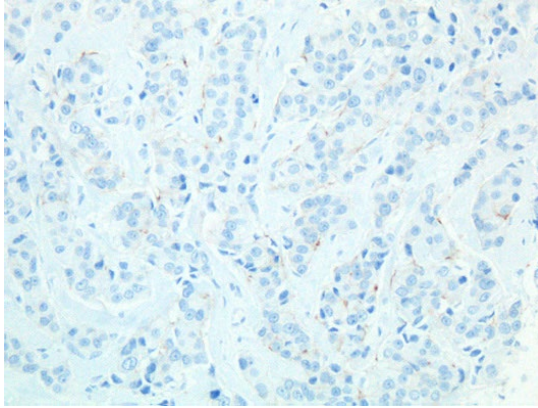


168 h

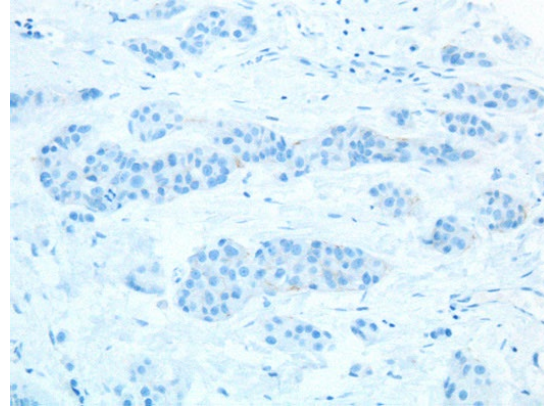


Breast carcinoma 1+, HER-2 PATHWAY, rmAb 4B5

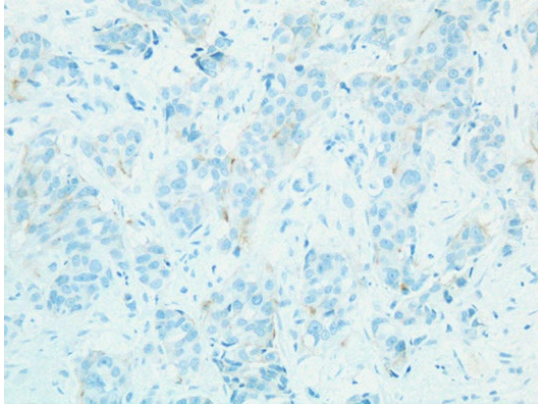
4 h



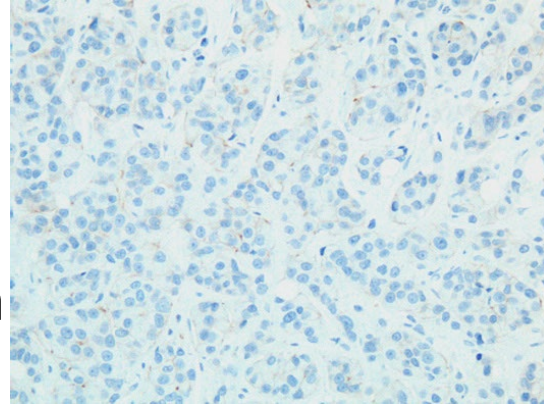
24 h



48 h

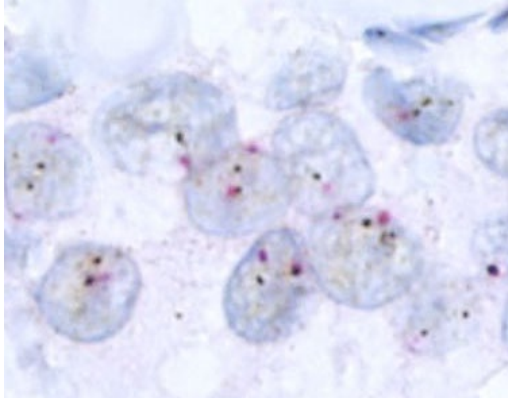


168 h

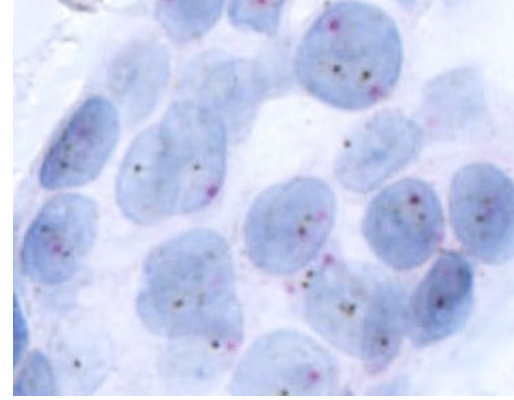


Breast carcinoma, 1+ Dual SISH CCrb ext, P3. 8 m

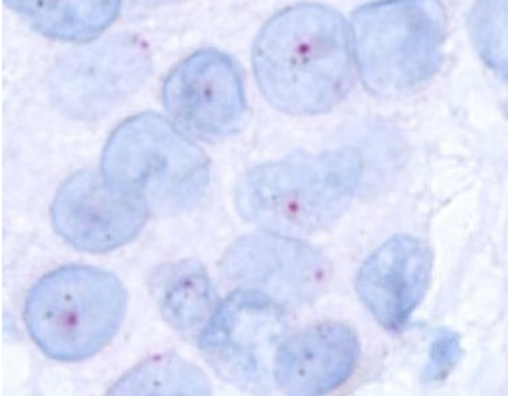
4 h



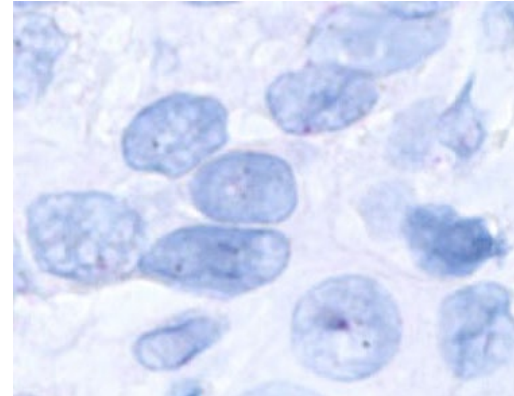
24 h



48 h



168 h



ASCO CAP richtlijnen HER-2 test

	2007	2013	Laatste update 2023
Optimal tissue handling requirements	Time from tissue acquisition to fixation should be as short as possible; samples for HER2 testing are fixed in 10% neutral buffered formalin for 6–48 hours; cytology specimens must be fixed in formalin. Samples should be sliced at 5-mm to 10-mm intervals after appropriate gross inspection and margins designation and placed in sufficient volume of neutral buffered formalin		Duration of fixation has been changed from 6–48 hours to 6–72 hours. Any exceptions to this process must be included in report.

Richtlijnen fixeren

Tijd van afname, dan wel tijd van aankomst op het lab is bekend

Tijd wanneer het weefsel in het fixatief ging is bekend

Gebruikte fixatief is bekend

Fixatietijd is bekend

Richtlijnen fixeren

Tijd van afname, dan wel tijd van aankomst op het lab is bekend

Tijd wanneer het weefsel in het fixatief ging is bekend

Gebruikte fixatief is bekend

Fixatietijd is bekend



Waar hebben we het deze ochtend over gehad?

Pre-analyse

Variabelen bij prefixatie

Warme ischemie en koude ischemie

Belang van fixeren

Niet-coagulerende en coagulerende fixatieven

Variabelen bij fixeren

Zin om meer te leren?

Cursussen

- Basis histotechniek
- Kleurtheorie voor de dagelijkse praktijk
- Immunohistocytochemie
- Histologie
- Pathologie
- Controles van immuunkleuringen
- Macroscopie van de huid
- Markers en panels in de diagnostiek van tumoren
- Markers en panels bij testis en ovarium

Webinar

- In situ hybridisatie – Wat, waarom en hoe?
- HER2 ISH bij borstkanker

Symposium

- IHC-dag over lymfomen
- Pathasdag – dwarsdoorsnede door de pathologie



Onze expertisegebieden

Wat heeft jouw interesse?

▼ Immunologie en Immunochemie

▼ Kwaliteitszorg & Algemeen Life Science

▼ Microbiologie

▼ Moleculaire biologie

▼ Pathologie en Histotechnologie

▼ Genomics & Data analyse

▼ Digital Forensics

▼ Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

▼ Professionele en persoonlijke ontwikkeling

https://www.hsleiden.nl/bijscholen-omscholen/groeien-in-life-science-and-health?utm_source=laboratorium.nl&utm_medium=banner&utm_campaign=cursussen-cbd

<https://www.linkedin.com/company/hsleiden-cbd/posts/?feedView=all>

Tiggelman.a@hsleiden.nl

Wat vinden jullie?



Waar

Niet waar

Wat vinden jullie?

Fixeren is een zeer belangrijk onderdeel van de pre-analyse fase

Waar – Ga staan

Niet waar – Blijf zitten

Wat vinden jullie?

De concentratie van 37% formaline wordt standaard toegepast voor fixatie

Waar – Ga staan

Niet waar – Ga zitten

Wat vinden jullie?

De verhouding tussen fixatief en weefselvolume moet minstens 1:10 zijn

Waar – Ga staan

Niet waar – Ga zitten

Wat vinden jullie?

Cross-linkende fixatieven verwijderen de watermantel rond eiwitten

Waar – Ga staan

Niet waar – Ga zitten

Wat vinden jullie?

De aanbevolen maximale tijdsvertraging voor weefselfixatie is 1 uur

Waar – Ga staan

Niet waar – Ga zitten



Fixation matters!

