



Isala

Tispa, validatie en wetenschappelijk onderzoek

Marije Hoogland, Patholoog Isala Zwolle

Disclosure

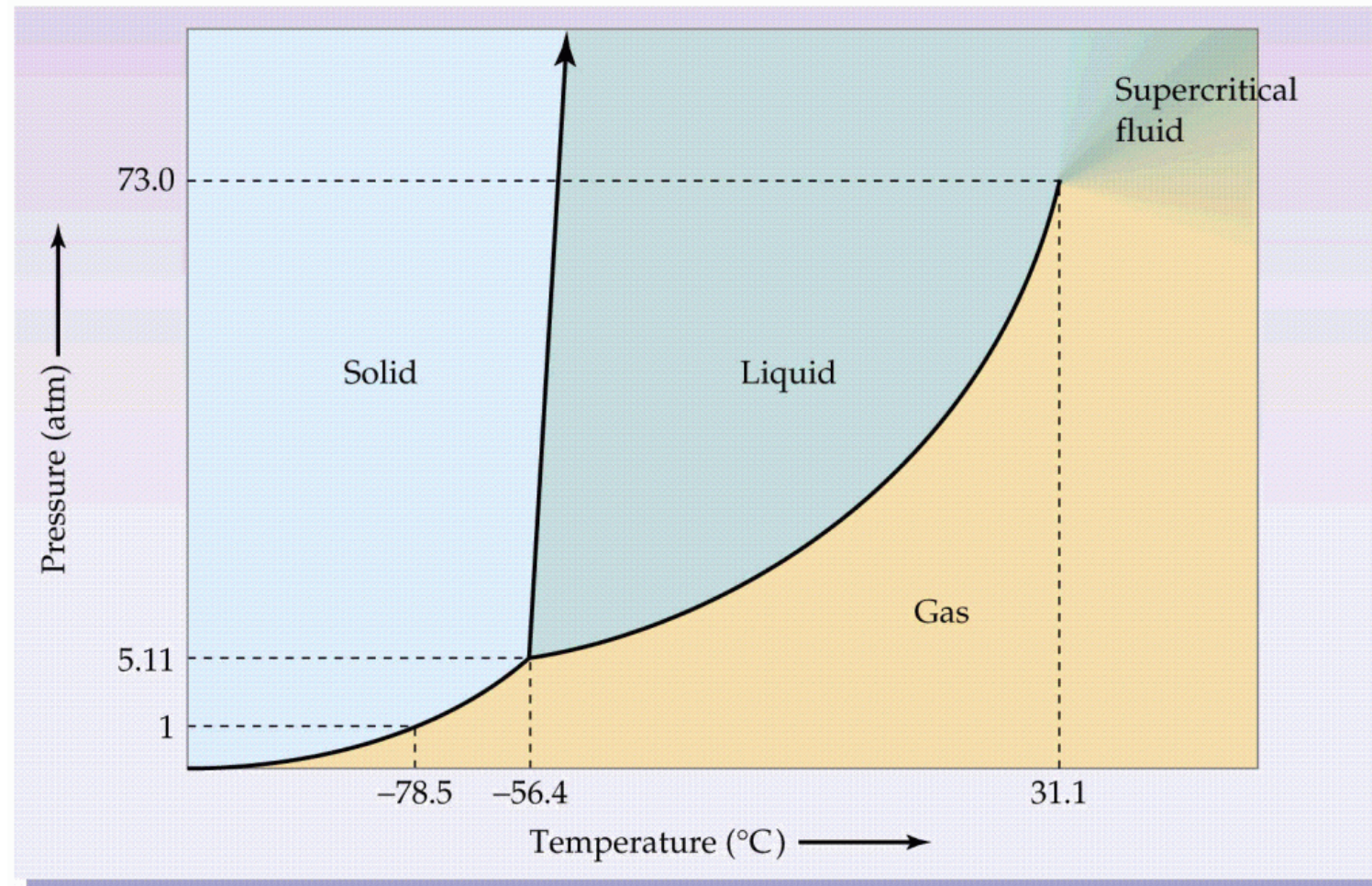
- Onderzoek is een hobby, binnen Isala en vrije tijd wordt hier aan gewerkt
- Ik ben financieel onafhankelijk van het bedrijf Tispa, ik sta op het patent als een van de uitvinders bij patent WO 2024/117901 A1 van Tispa Medical B.V. en Stichting Isala Klinieken mbt de Non-Fixed Paraffin-Embedded (NFPE) techniek, met nog aanvullende patenten in aanvraag.
- Het derde onderzoeksproject (komt later in de presentatie over RNA en DNA) is gedeeltelijk gesponsord door Novartis

Lay-out vandaag

- Algemene introductie in de CO₂ techniek
- Validatie en actuele klinische status
- Wetenschappelijk onderzoek en toekomst plannen

TISPA PROCES? ALGEMENE INTRODUCTIE

- Ethanol
- Superkritisch CO₂
 - Temperatuur (T_c) → 60°C
 - Druk (P_c) → 150 bar
- Paraffine



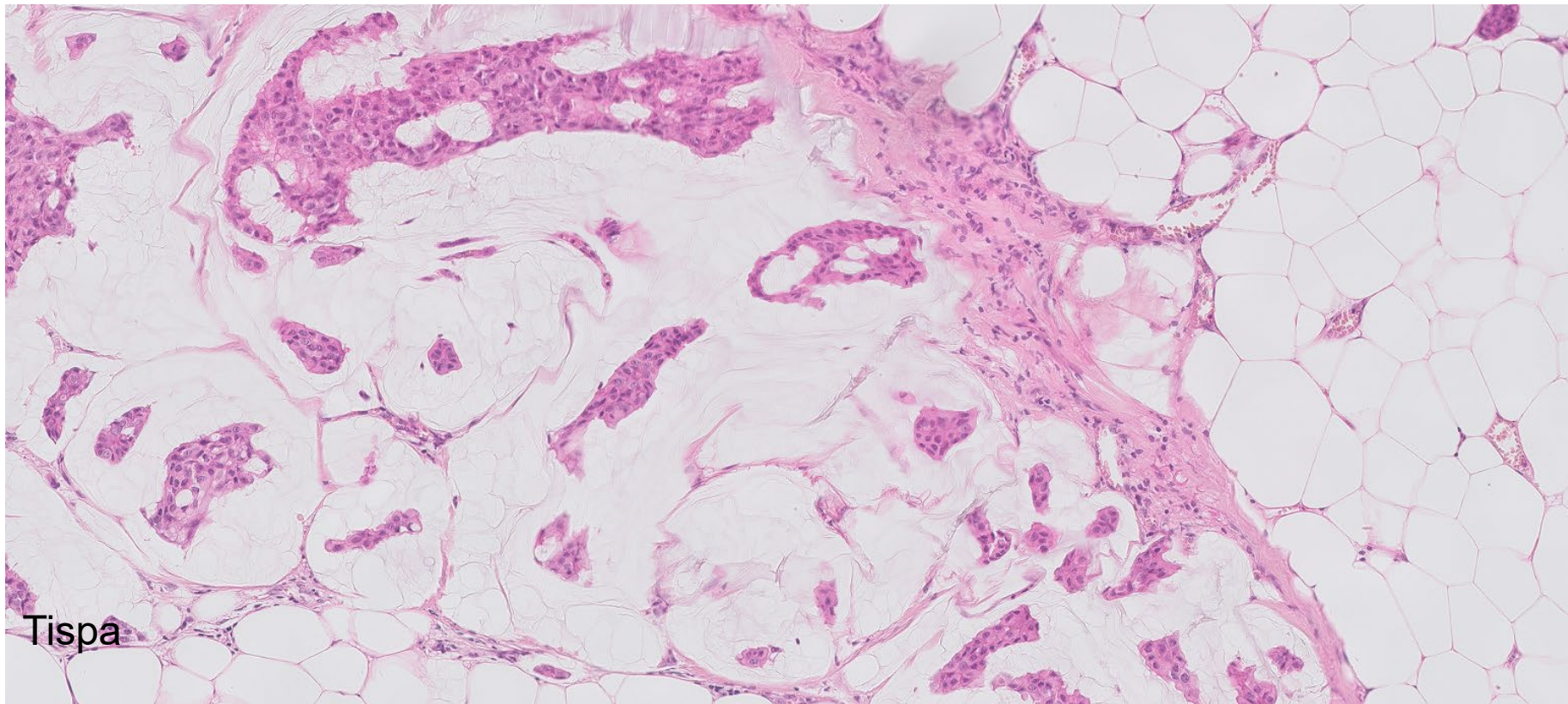
VALIDATIE PROCES (FFPE) 2017, ISALA

- Verschillende weefsel types
- Verschillende afmetingen van weefsel in de cassettes (groot, biopt, AGAR)
- Verschillende programma lengtes
- Kwaliteit van
 - Snijden aan het microtoom
 - HE kleuring
 - Geblindeerde vergelijking door de pathologen
 - Histochemie, immunohistochemie
 - Moleculaire testen

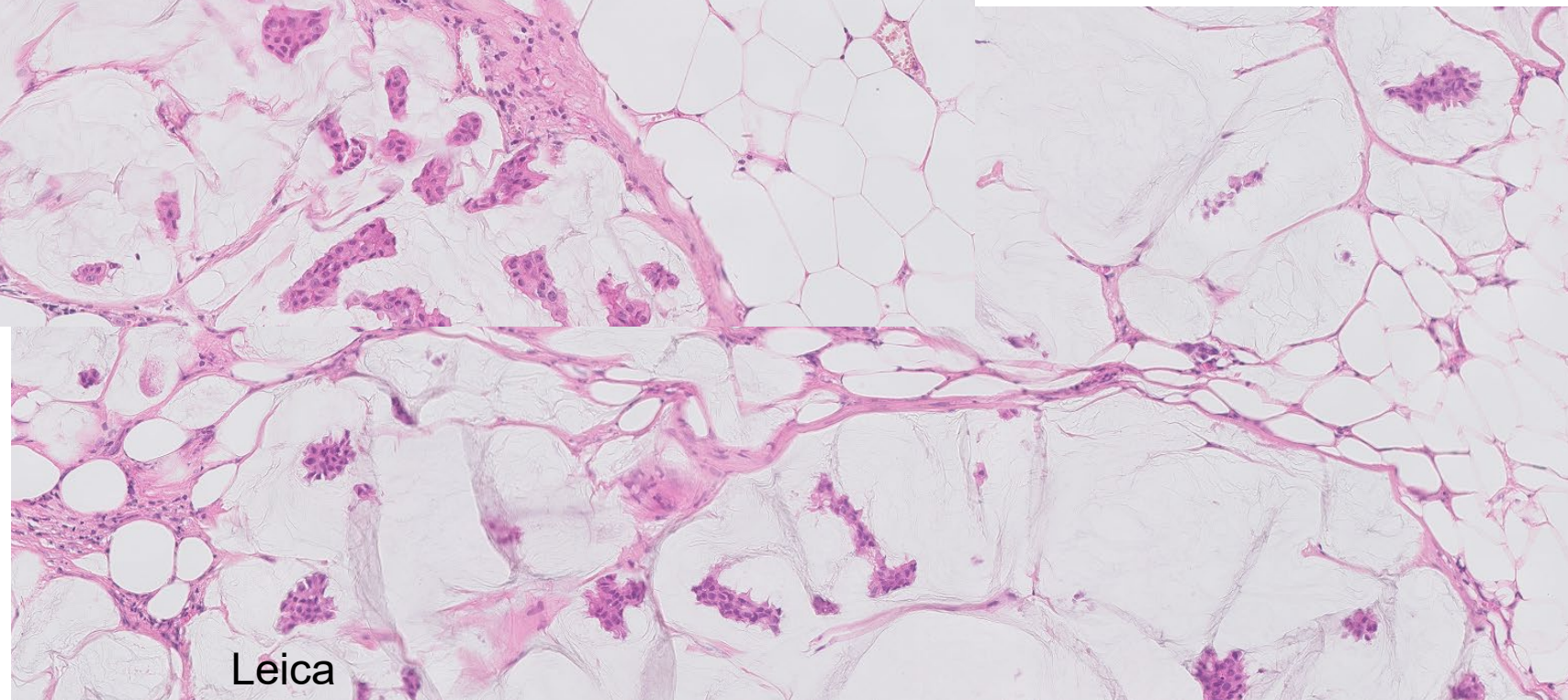
EERSTE FASE VAN VALIDATIE

- Beschikbaarheid van weefsels, restmateriaal
 - Vet was lastig > aanpassingen programma
 - Machine maximaal mishandeld
- Simulatie van biopten
 - Kort programma
- Simulatie van cytologie aspiraten (verse OK preparaten als bron)
 - Ingebed in AGAR, geen succes in de Tispa 1 machine

HE, MAMMA, MUCINEUS CA. + DCIS

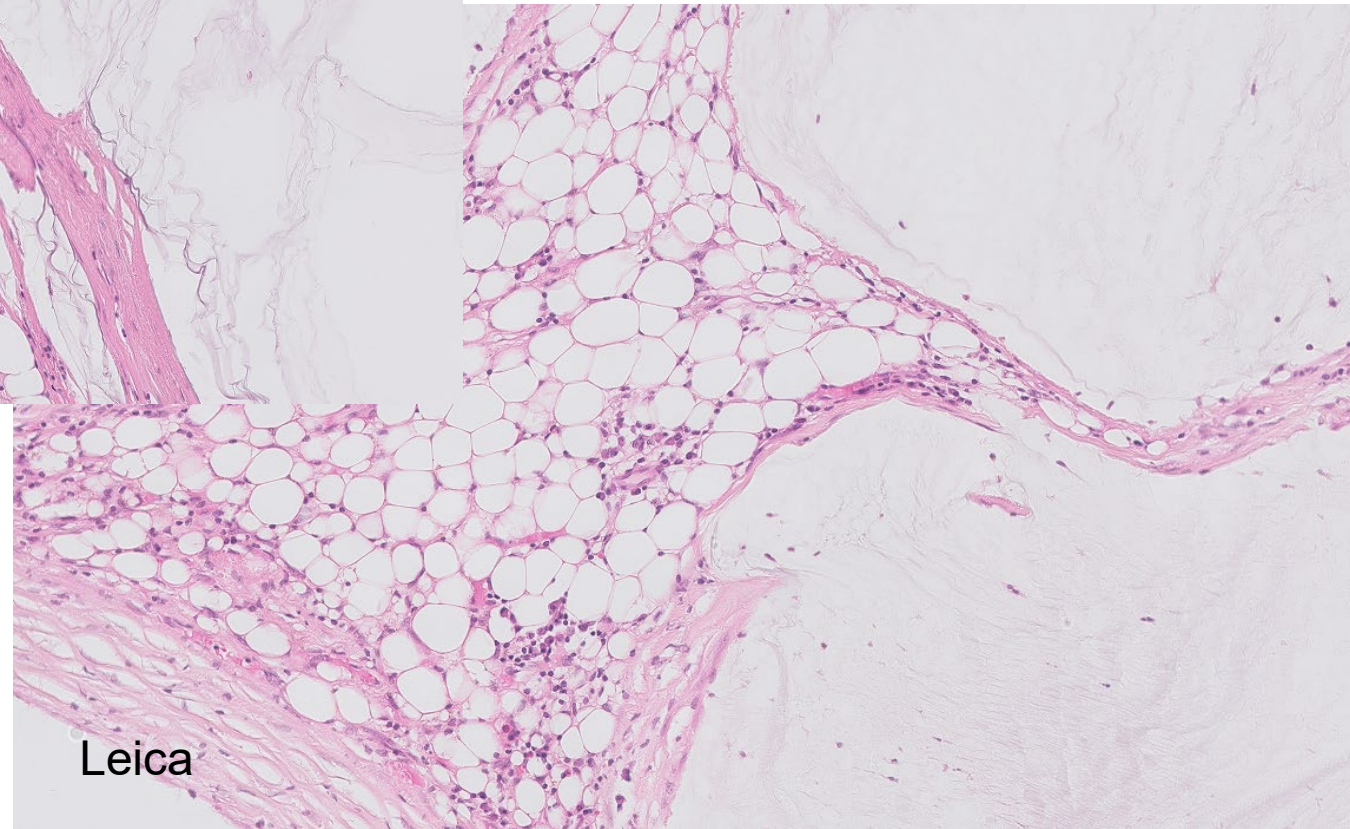
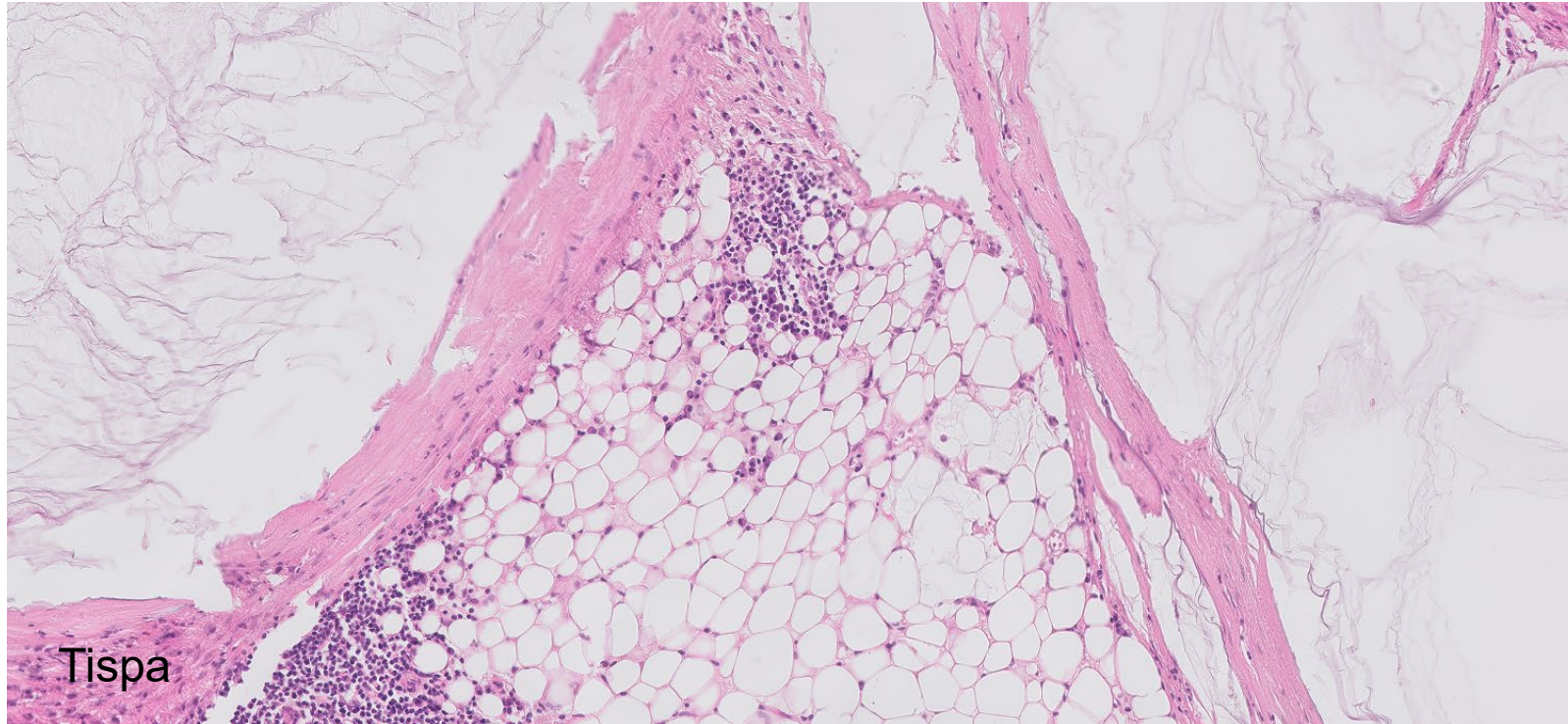


Tispa

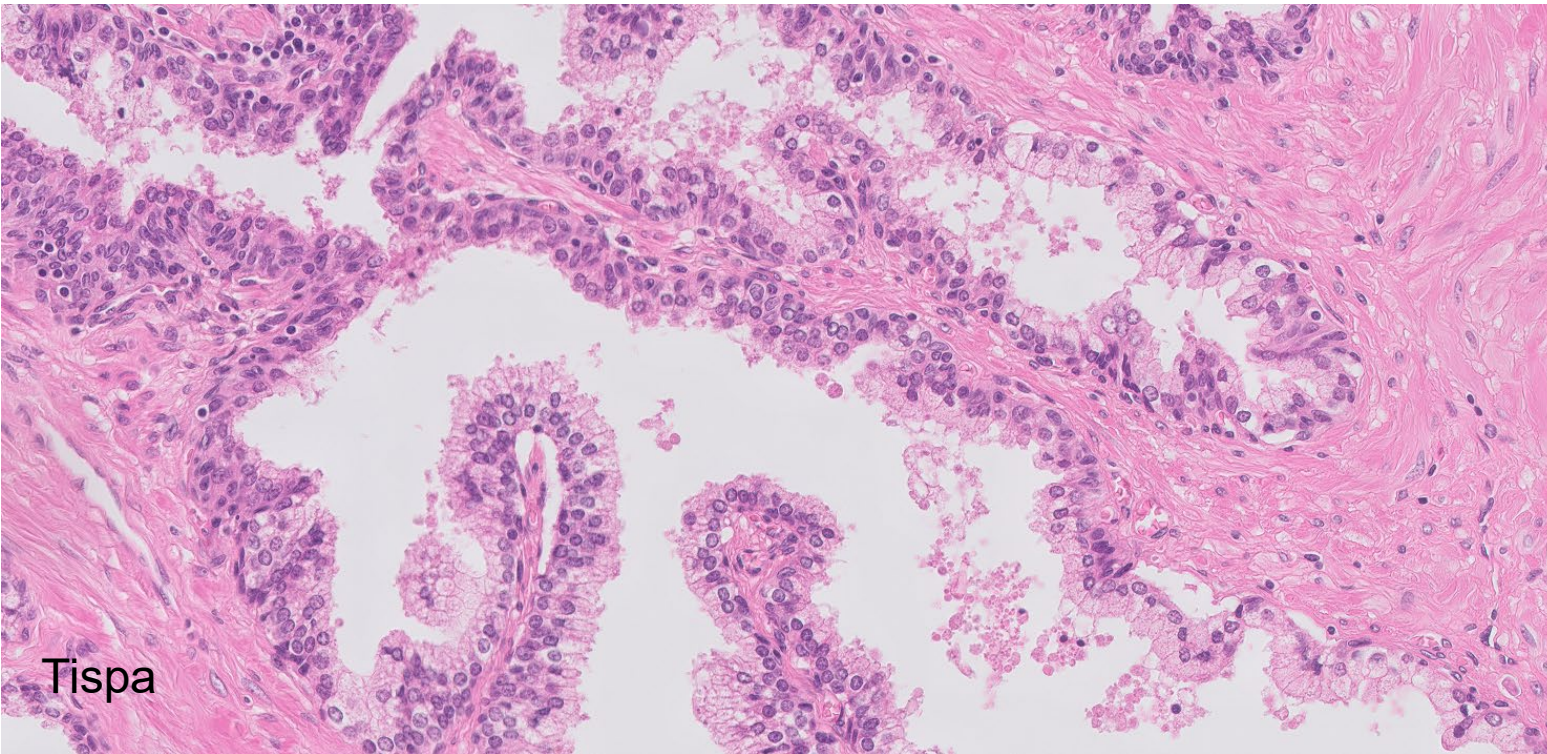


Leica

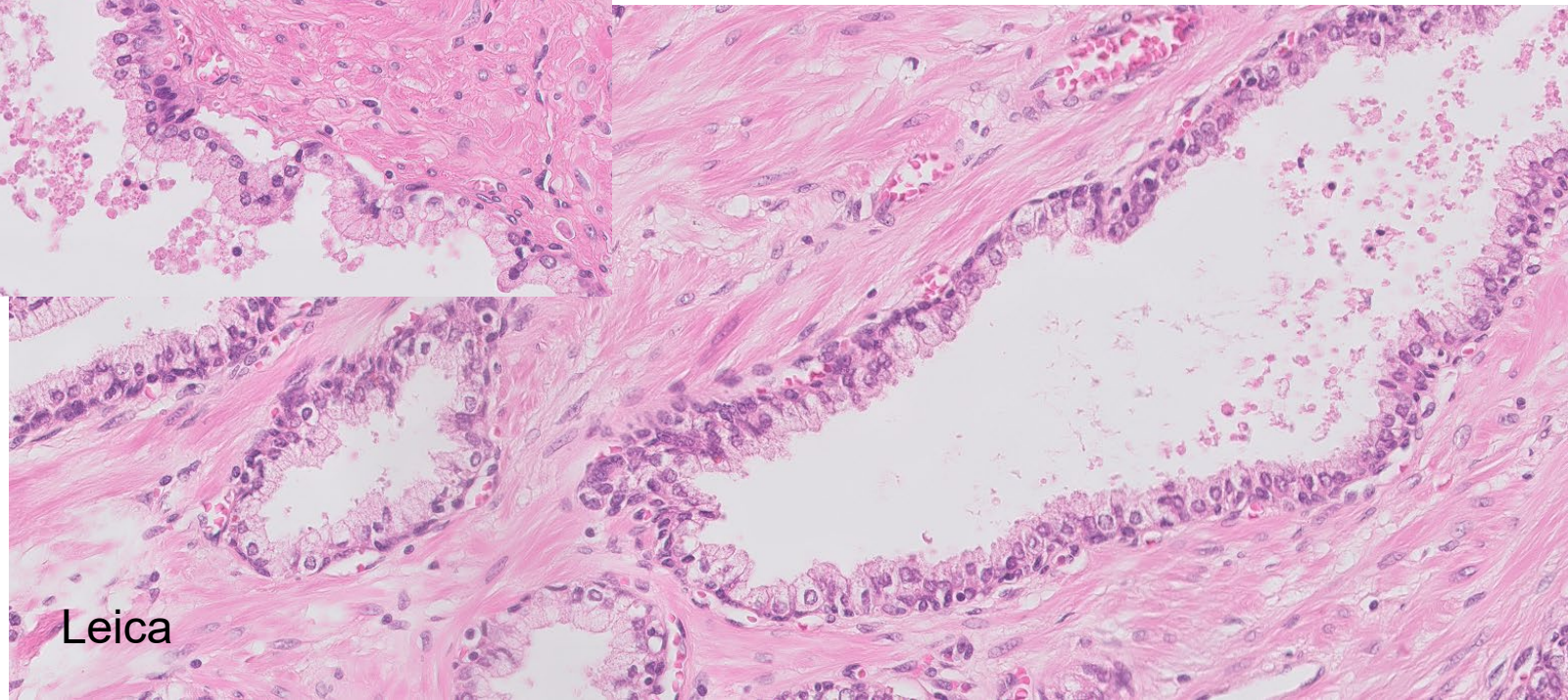
HE, OMENTUM MET PSEUDOMYXOMA PERITONEI



HE, PROSTAAT

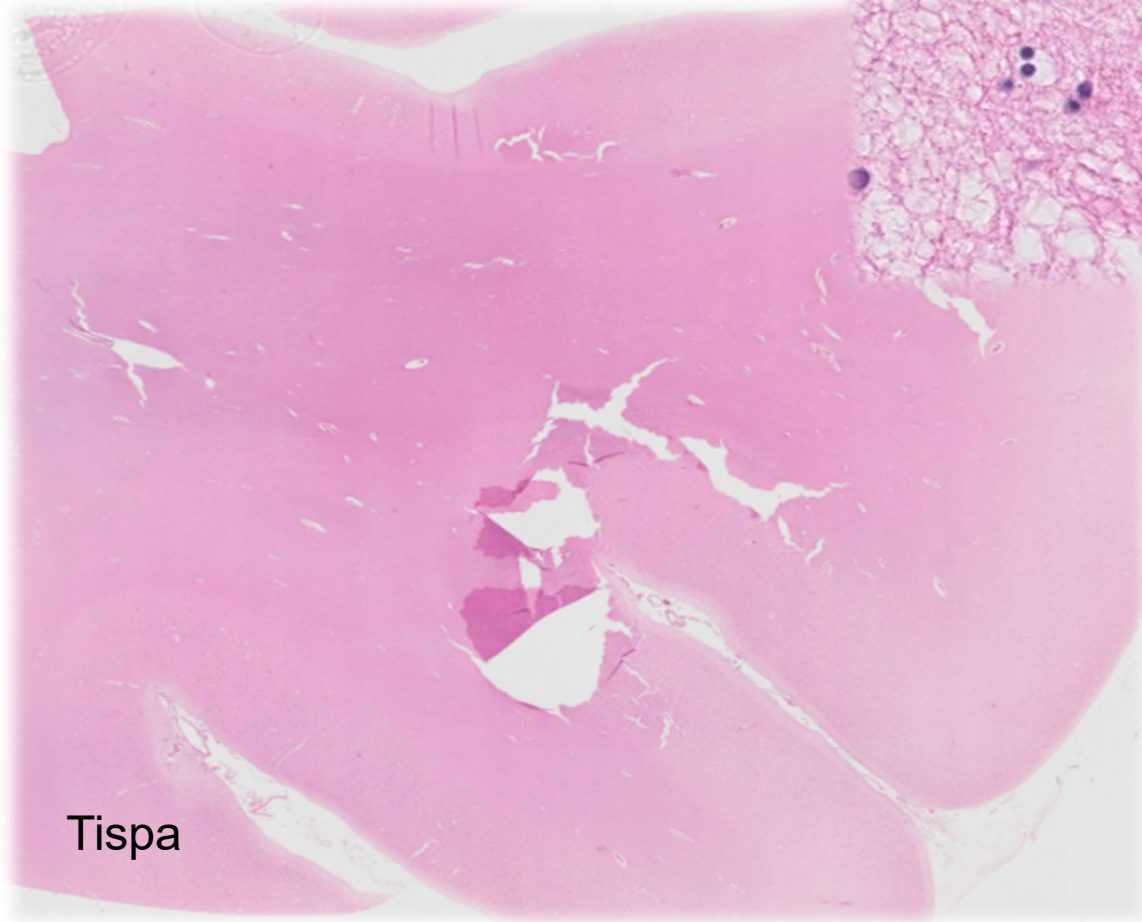


Tispa

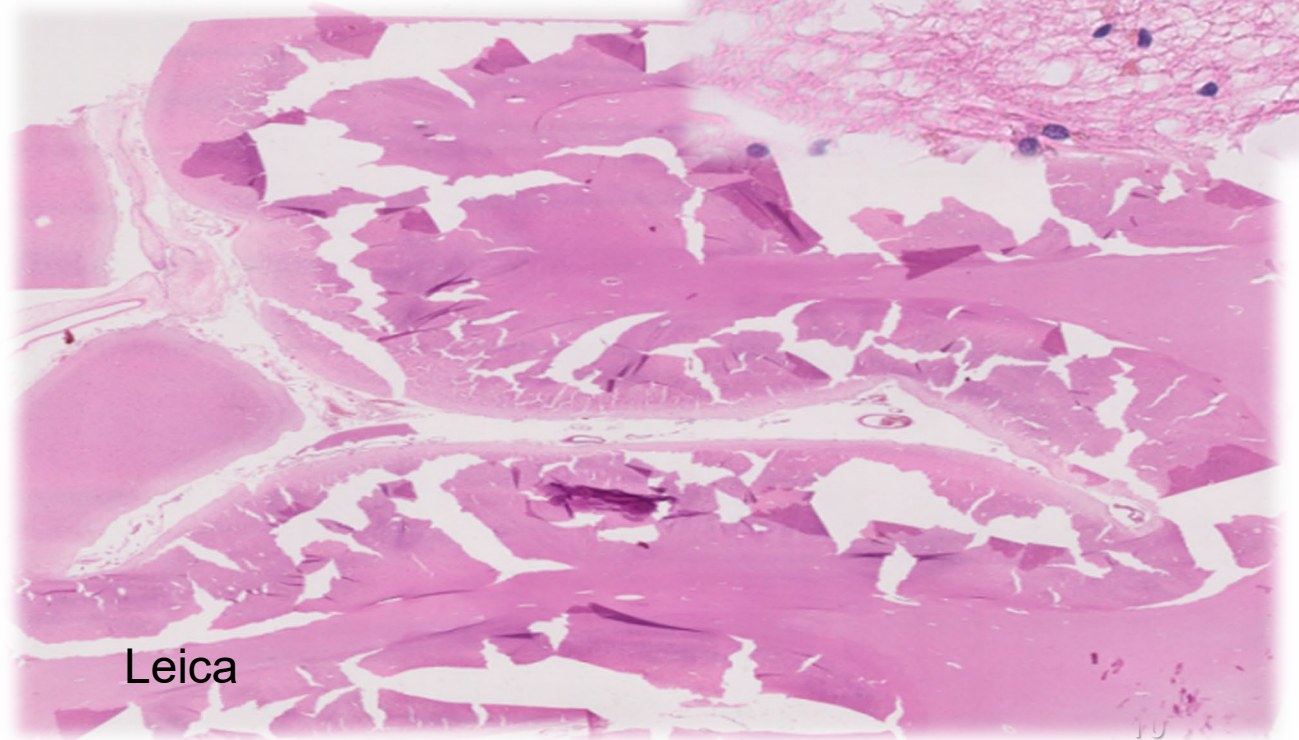
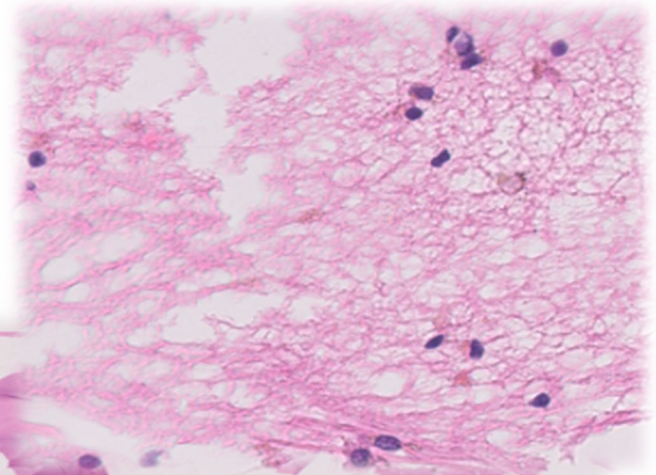
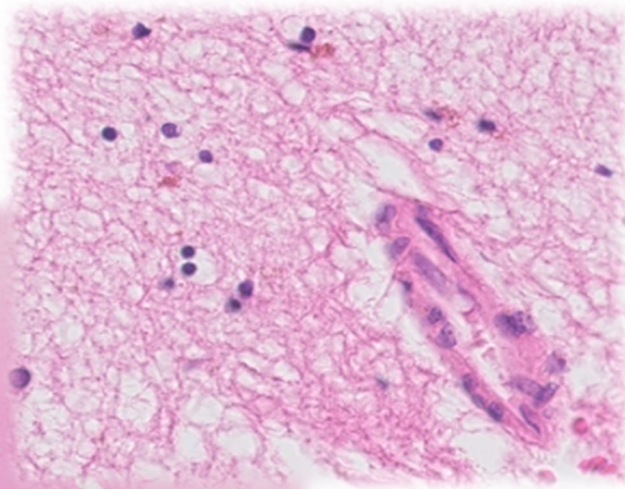


Leica

HE, CEREBRUM



Tispa



Leica

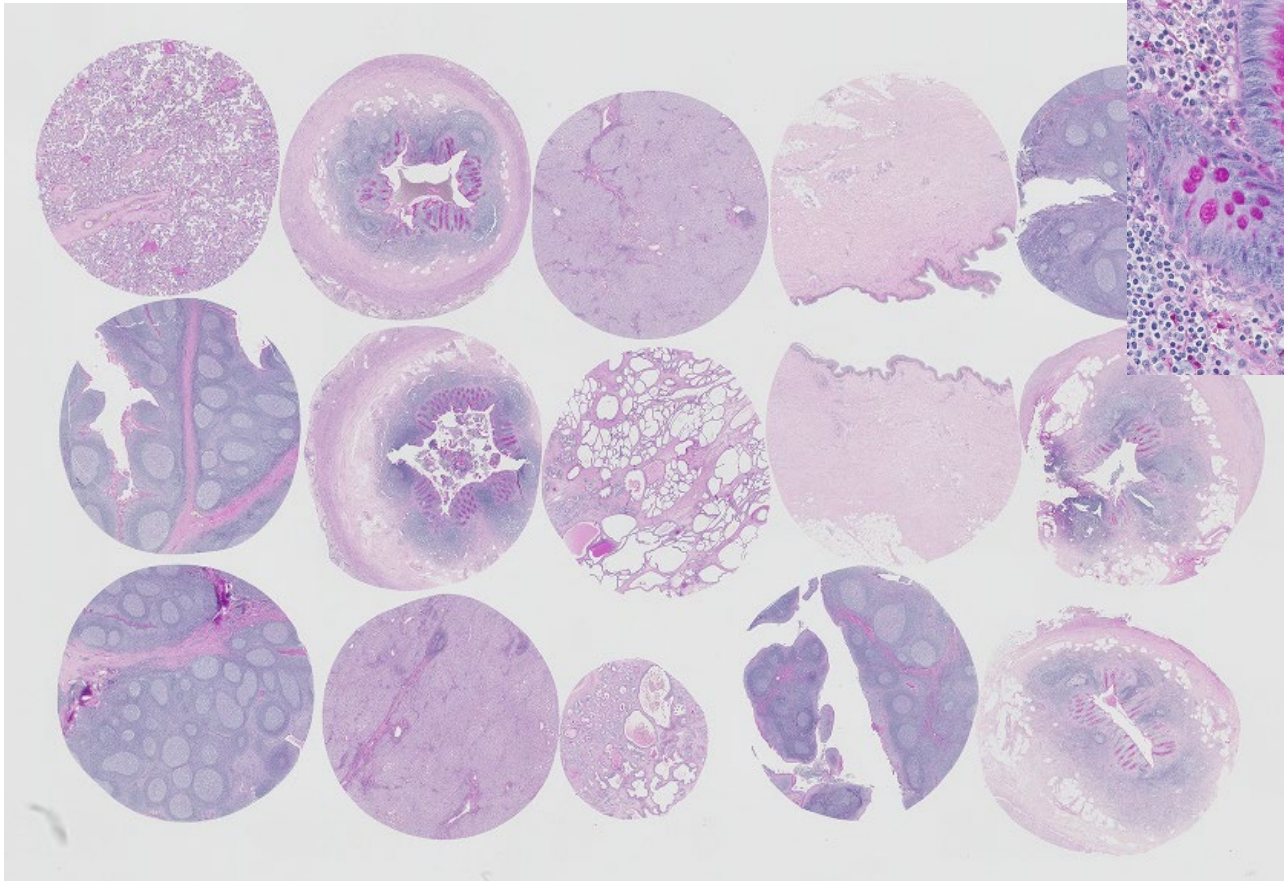
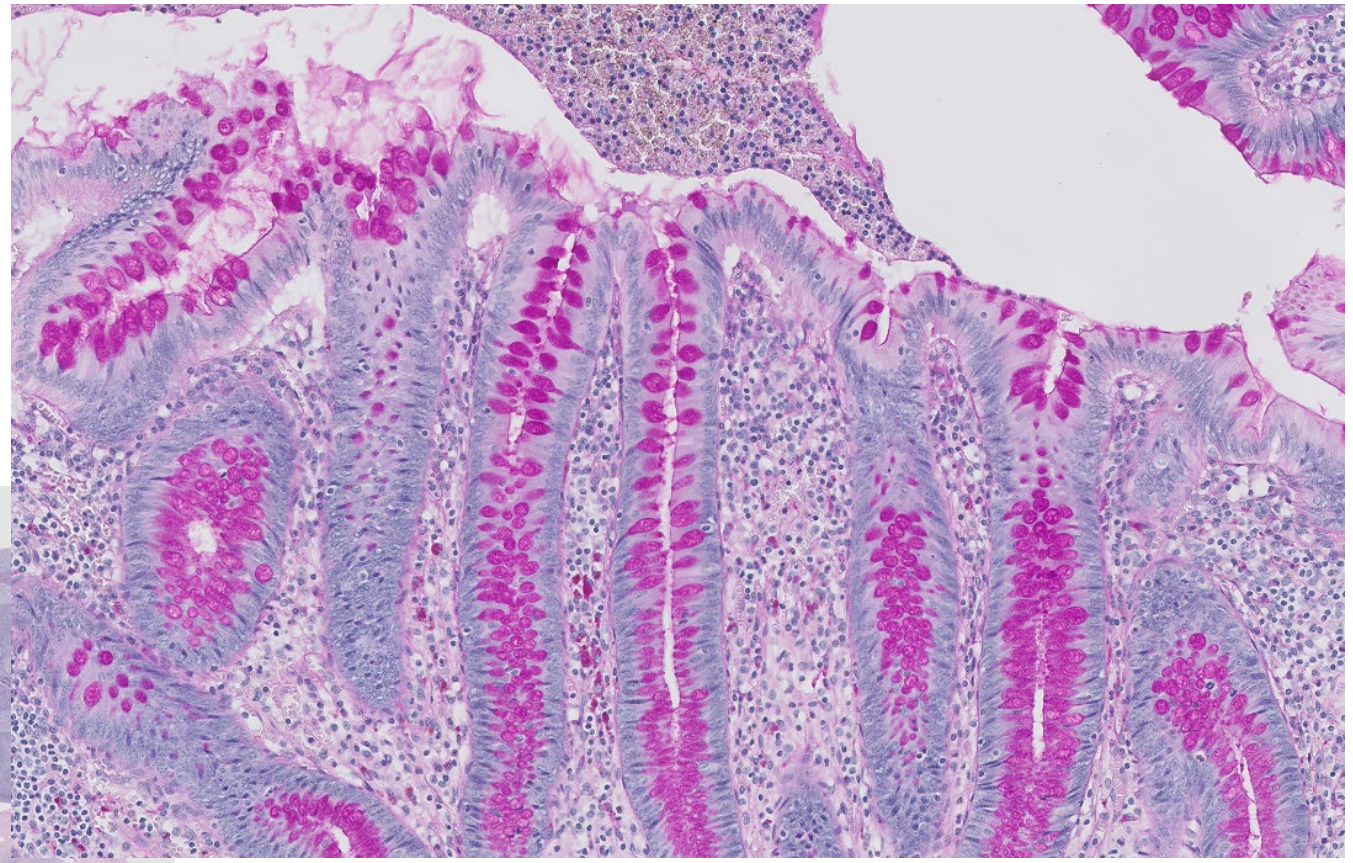
VOLGENDE FASE

- 10 verschillende weefsels parallel in conventionele machine (Leica) vs Tispa
- Geblindeerde beoordeling door alle pathologen van de vakgroep
- Meerderheid had voorkeur voor de vettige weefsels van
- Geen verschil of voorkeur voor de andere weefsels

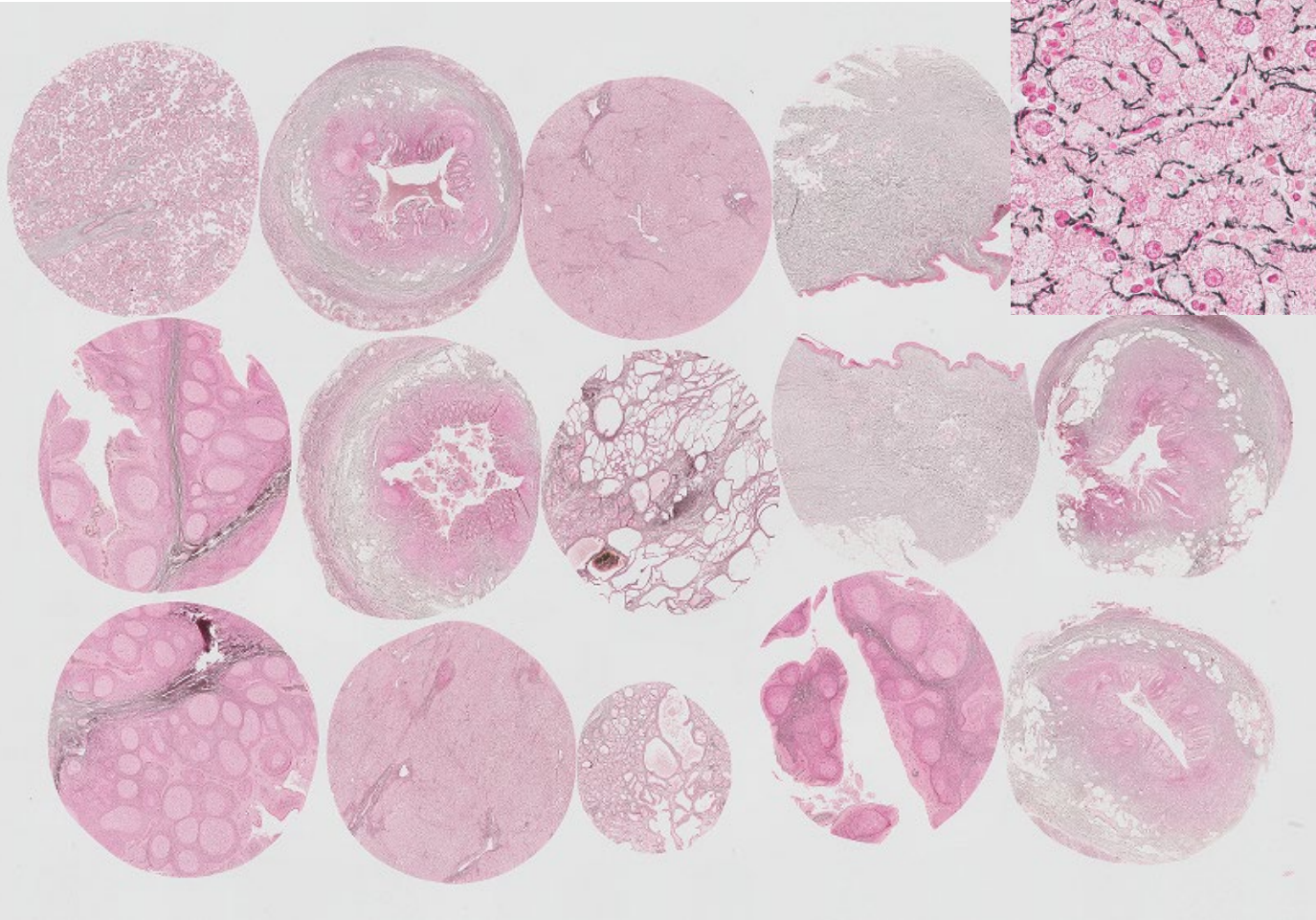
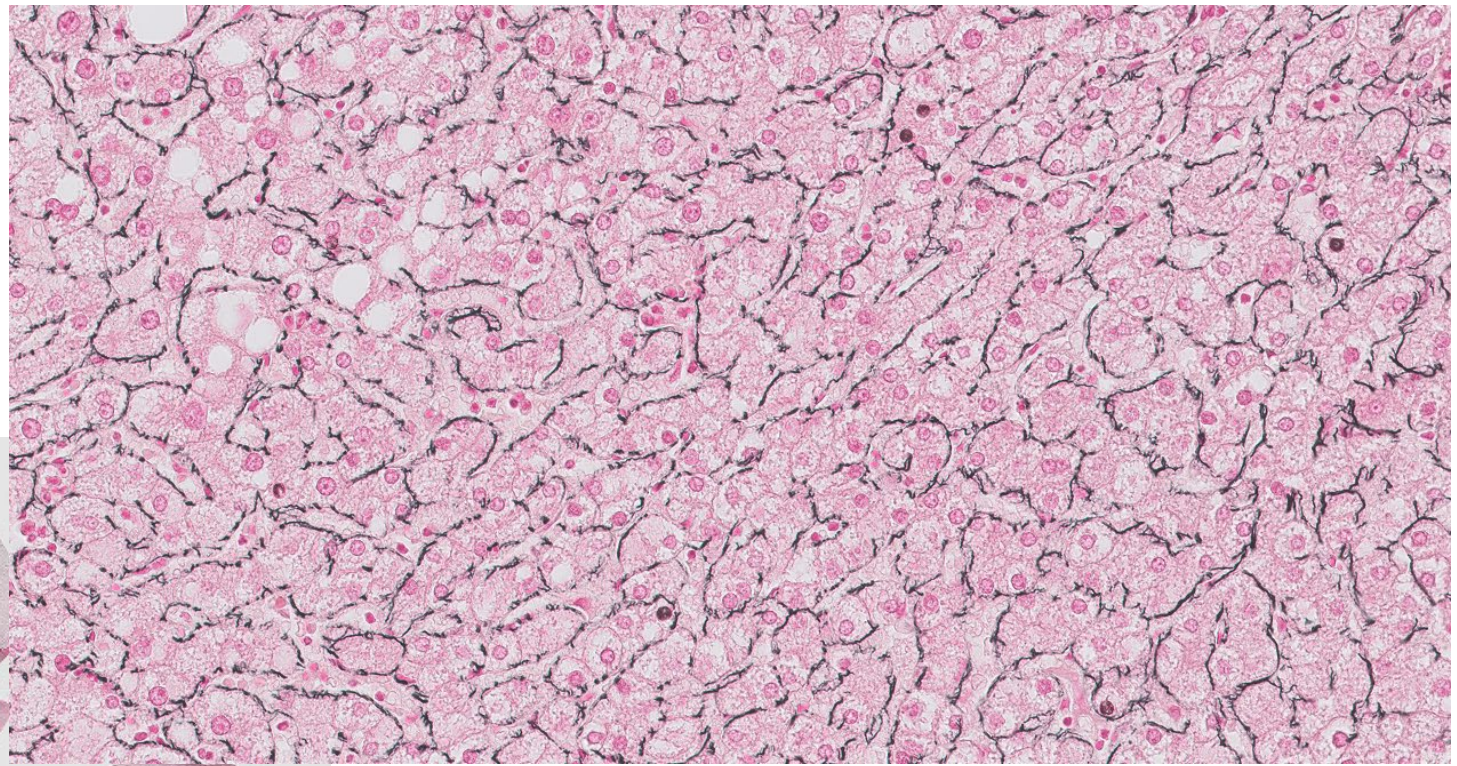
VALIDATIE IHC EN HC KLEURINGEN

- Tissue Micro Array's (TMA's) gemaakt
- Alle beschikbare markers op de TMA
- Alle TMA's beoordeeld door deelspecialist patholoog
- 16 histochemische kleuringen
- >130 immunohistochemische kleuringe

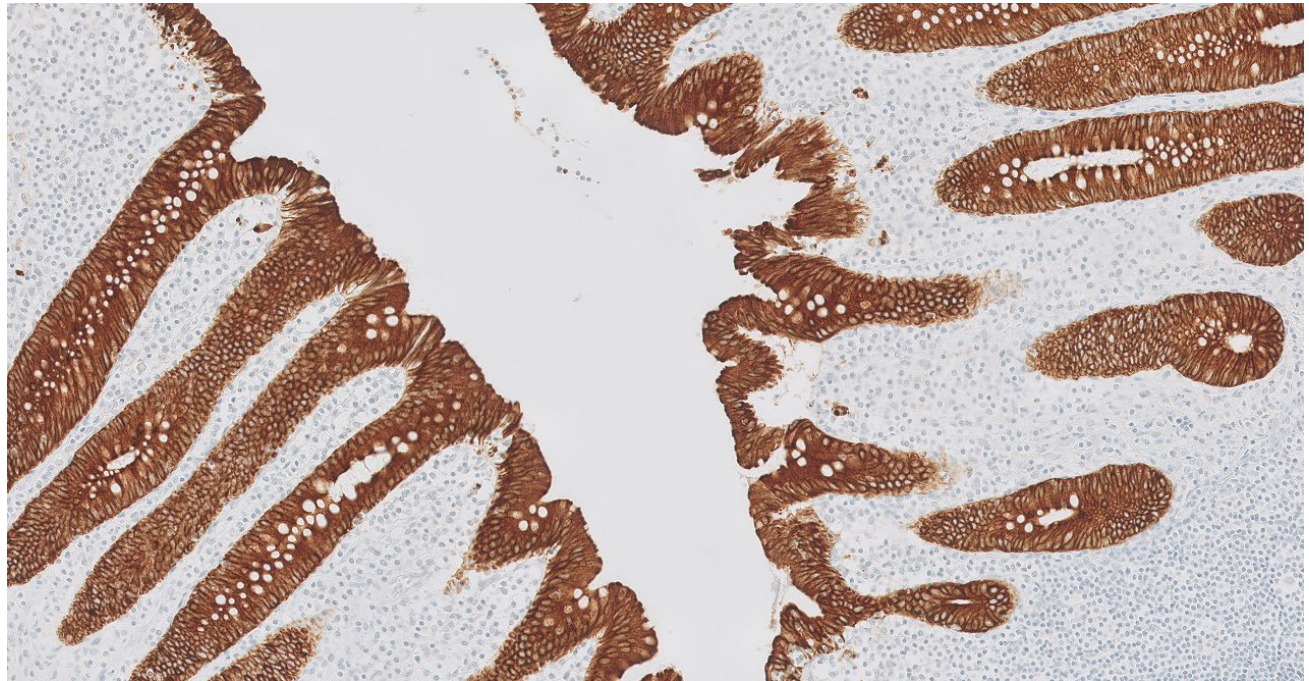
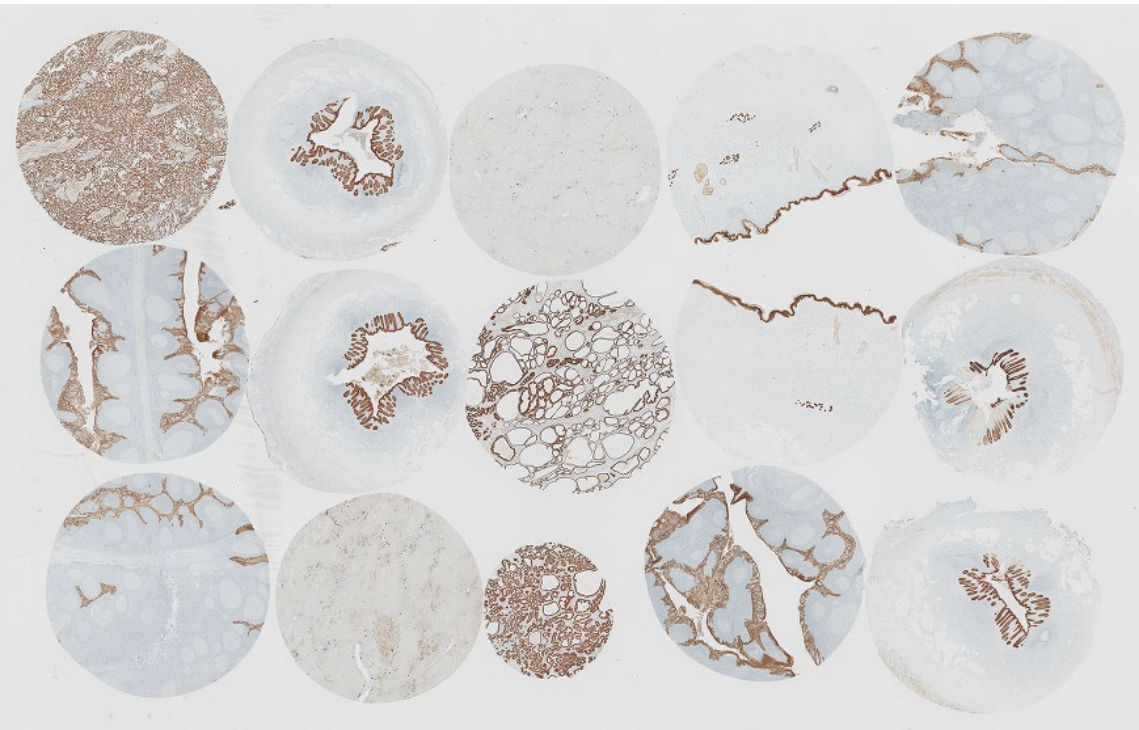
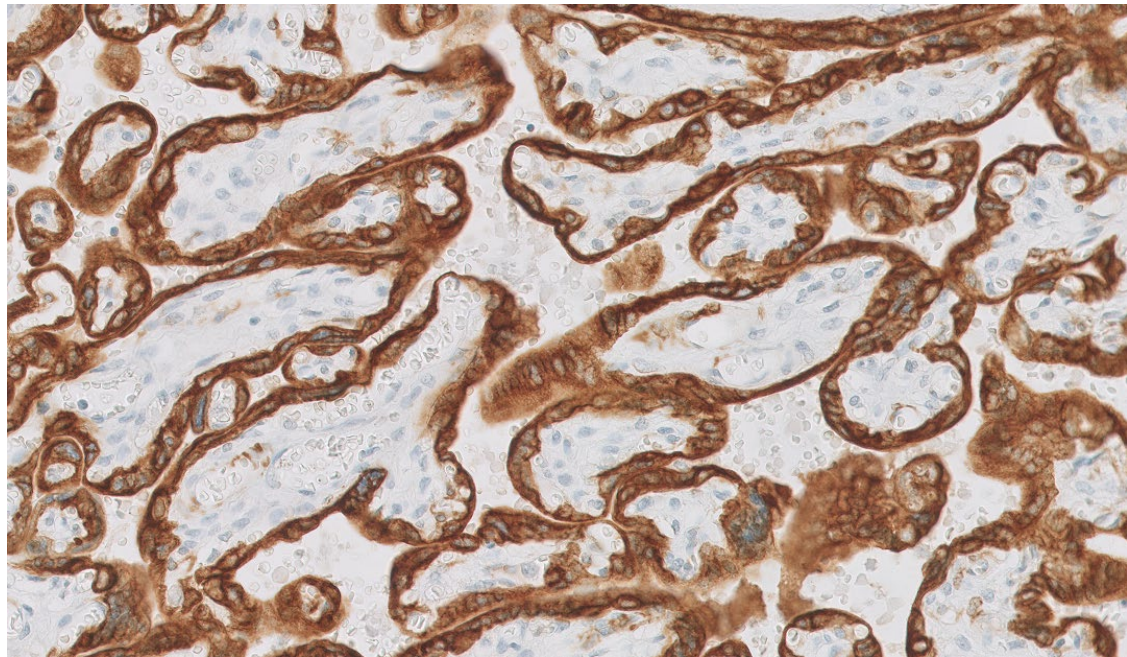
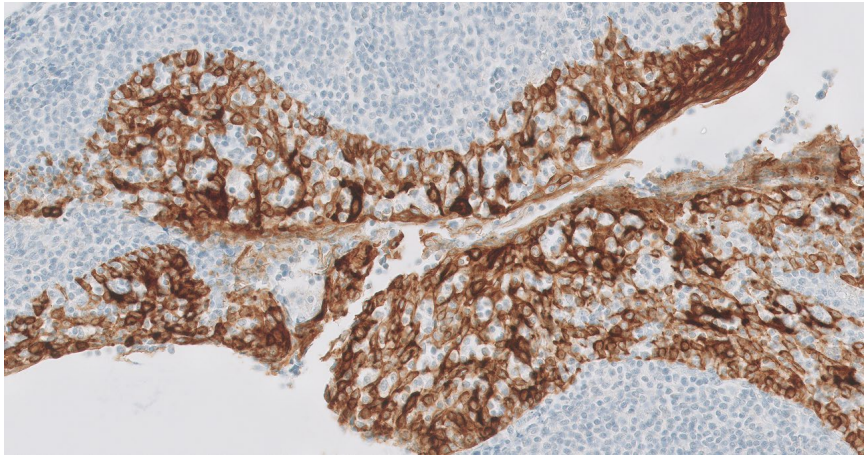
PAS-D



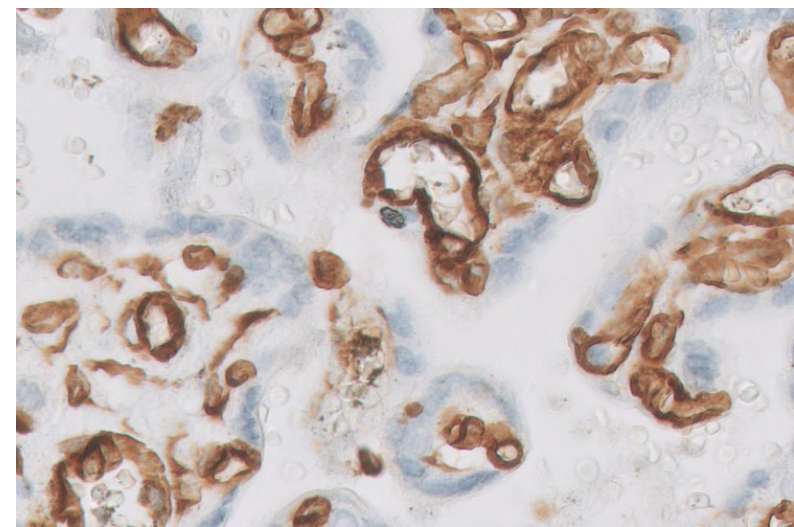
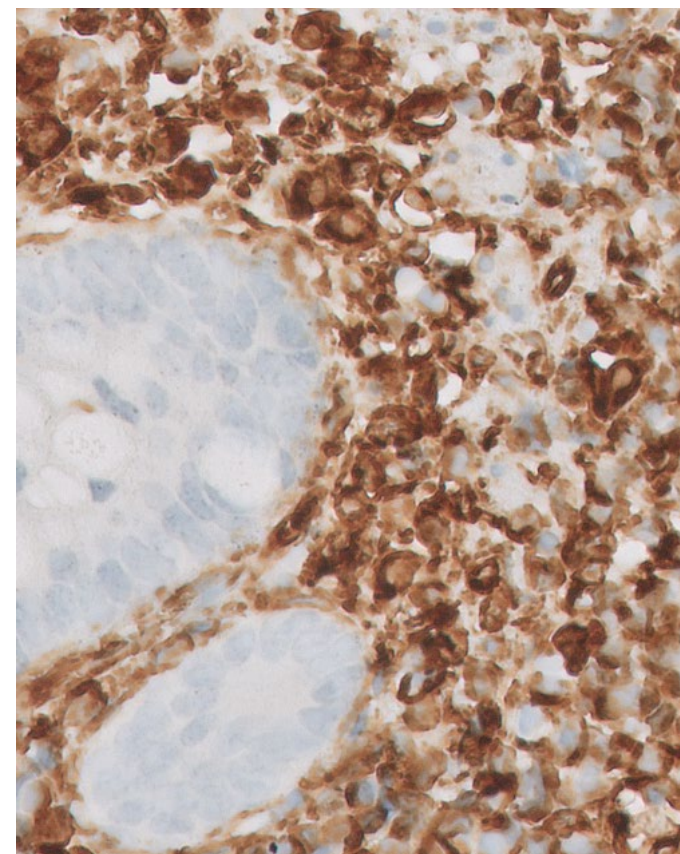
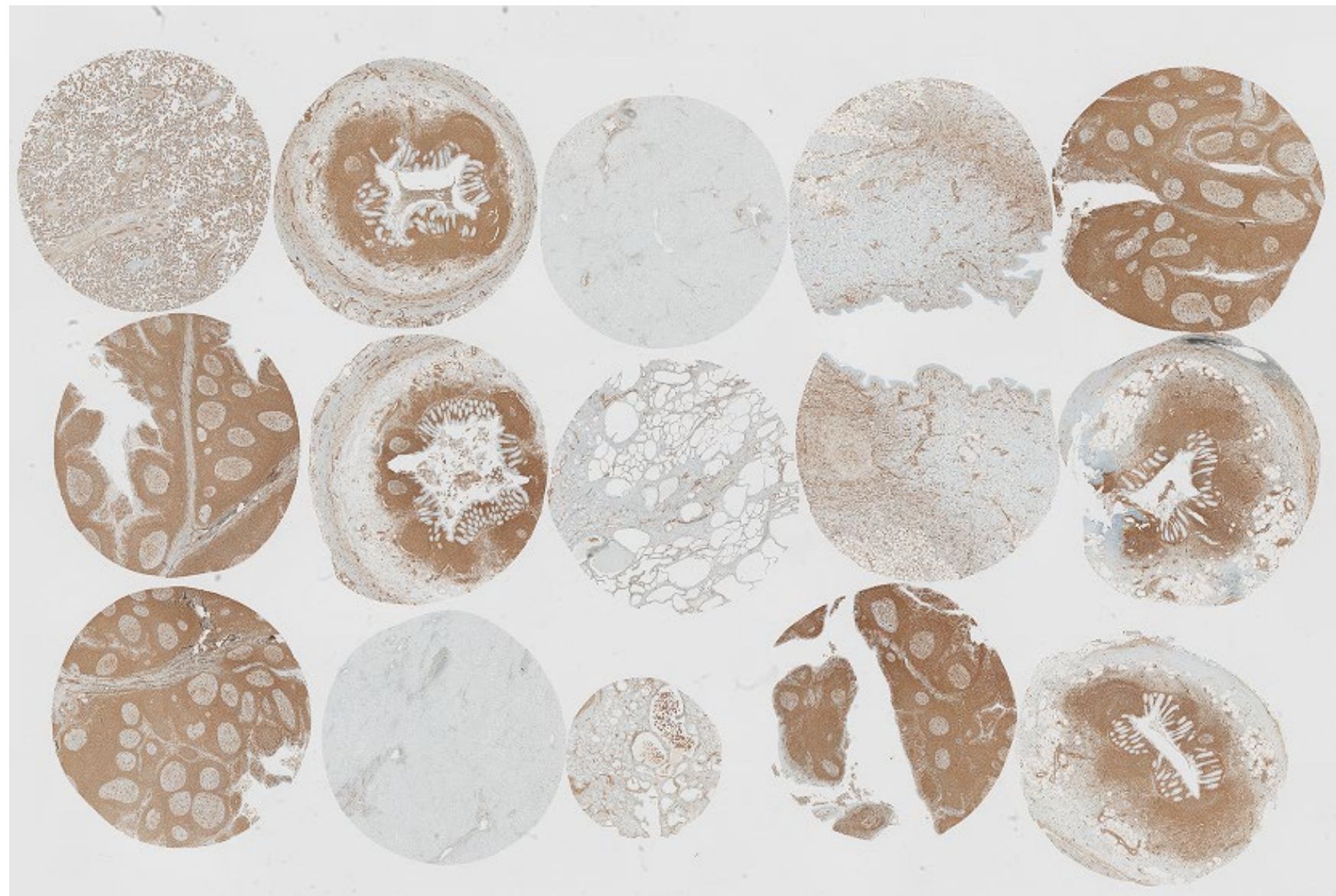
RETICULINE



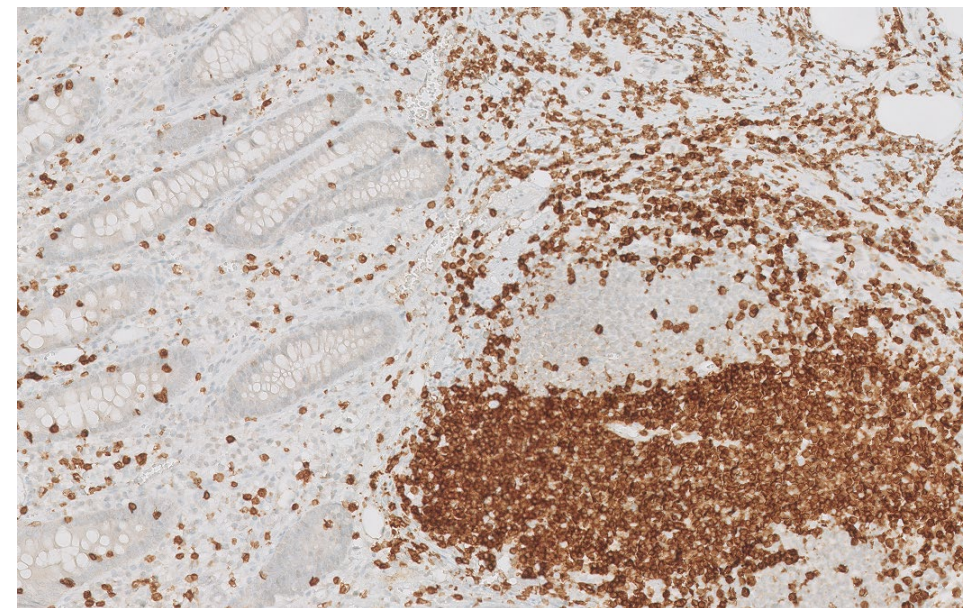
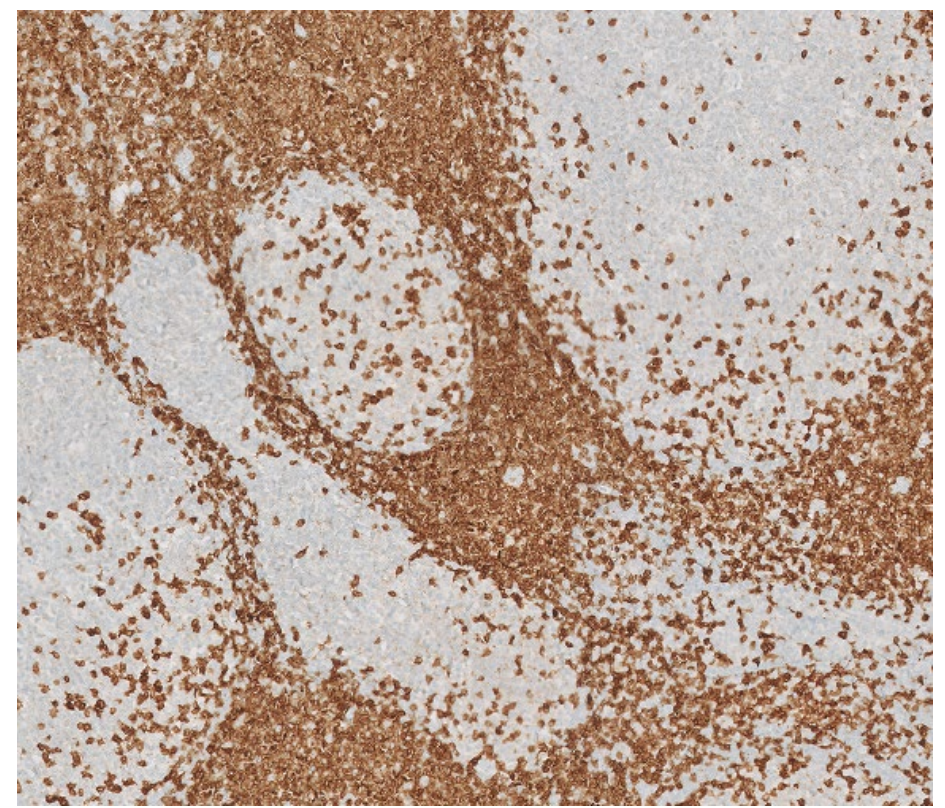
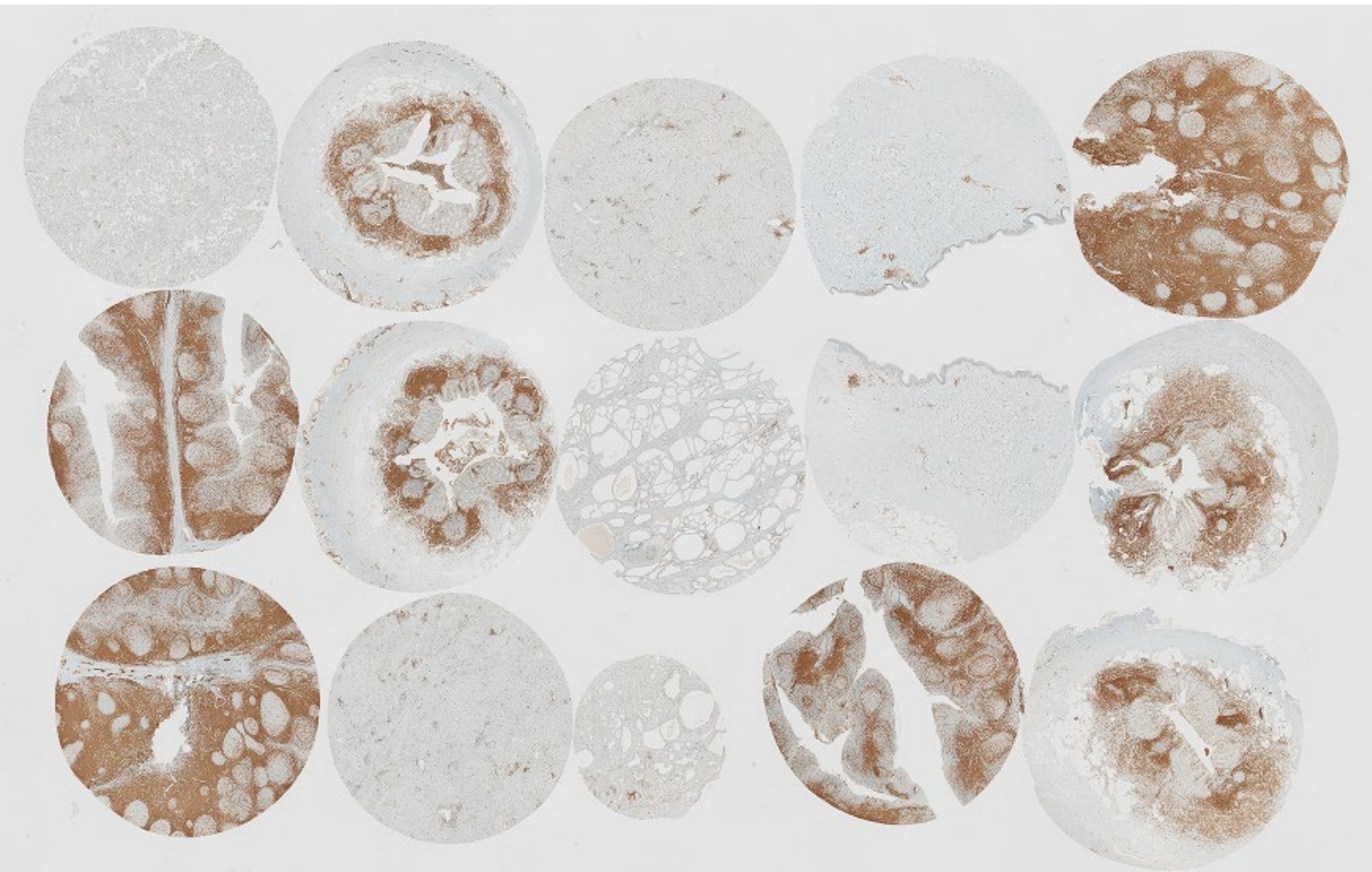
PAN CYTOKERATINE



VIMENTINE



CD3



VALIDATIE PROGNOSTISCHE MARKERS

- Hormoon receptor markers mamma
 - >20 mammacarcinoma parallel conventioneel (Leica) – Tispa
 - >ER / PR / Her2 IHC en Her2 FISH
- PDL1
 - >20 tumoren (long / UCC / mamma) parallel conventioneel (Leica) – Tispa
- Al deze markers toonden geen verschil tussen conventioneel en Tispa

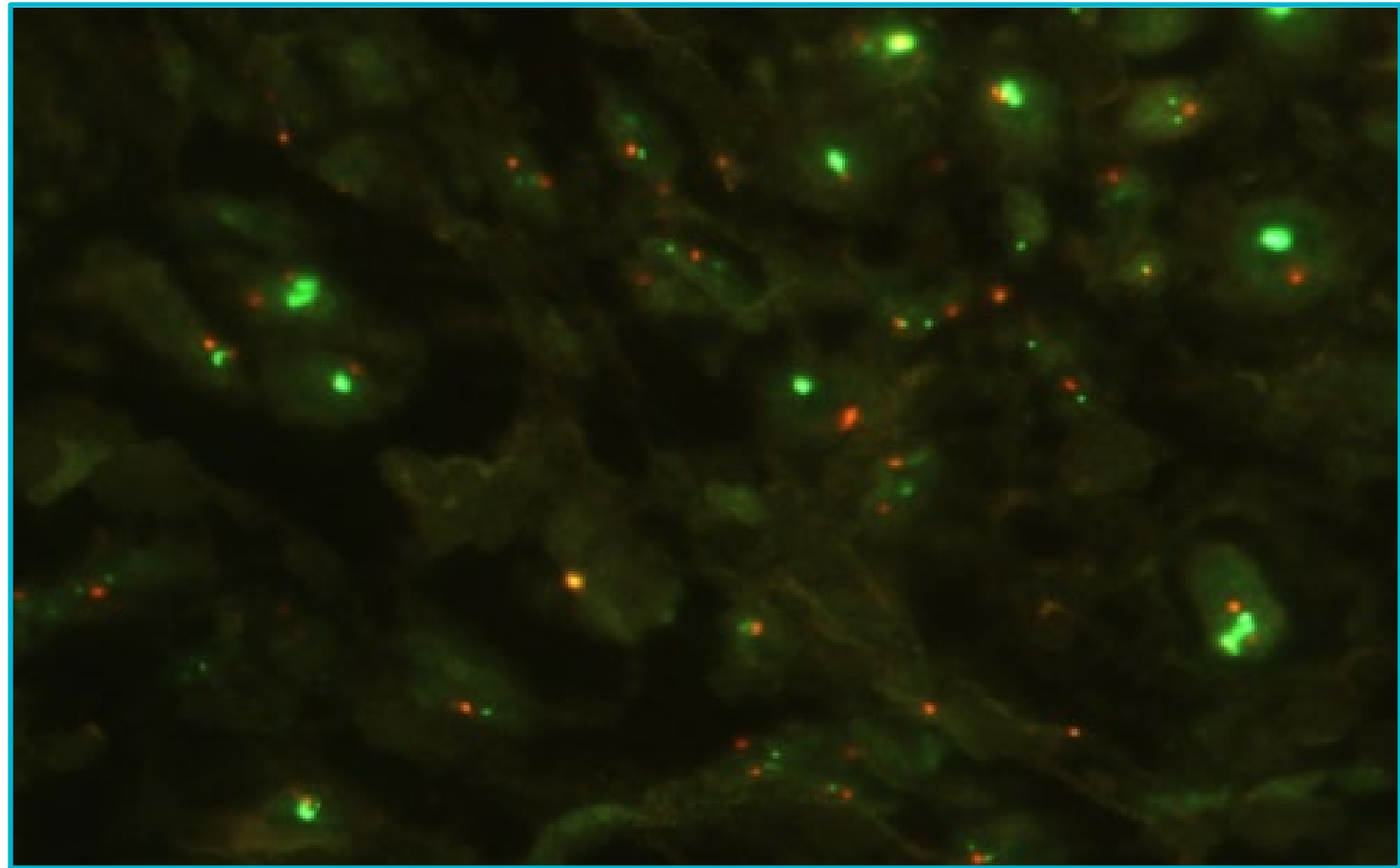
MOLECULAIRE TESTS

FISH BCL-2, BCL-6 en MYC
EBER

Her2 FISH

MMR eiwitten

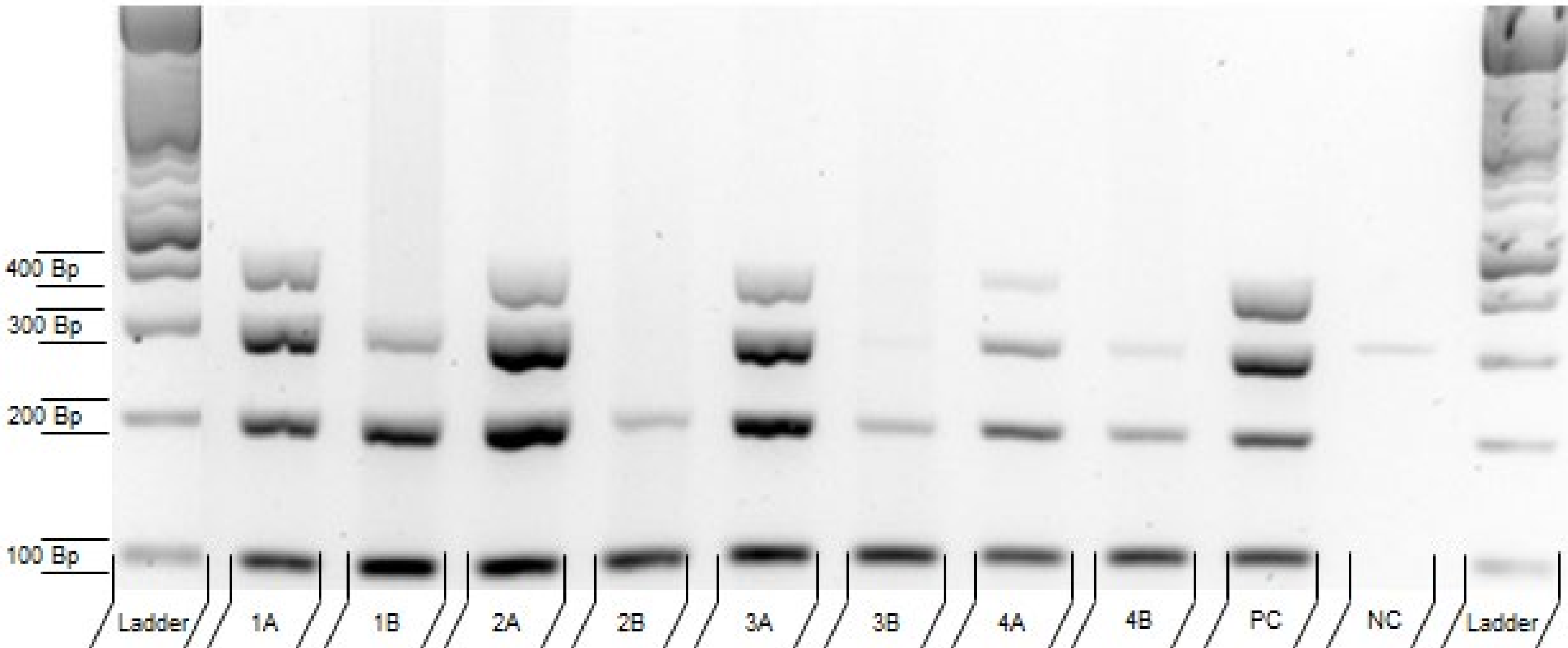
- Op relevante weefsels. Parallel vergeleken in Leica vs Tispa



DNA ISOLATIE, GEL ELECTROFERESE

A = Tispa

B = conventioneel (Leica)



MEER CIJFERTJES....

	Leica	Tispa
Doorvoertijd biopten run	4 uur	1 uur
Doorvoertijd Large run	15 uur	3:45 uur
Verbruik van ethanol	10 liter / week (hergebruik)	500 ml / run (geen hergebruik)
Verbruik van xyleen	10 liter / week	0
Ruimte voor fouten	GEEN!	Eindeloos

Actuele status TISPA 1 in Isala

- Gebruik in dagelijkse diagnostiek
 - Als aanvulling op onze conventionele machines
- Gebruikt voor alle weefsel types
- MAAR:
 - In formale gefixeerde setting!!!

Wetenschappelijk onderzoek en toekomst plannen

- Voorgaande slides = FFPE
- Kunnen we formaline weg laten in de Tispa?
- Zonder formaline fixatie vooraf?
- We noemen dat: **NFPE = Non Fixed Paraffin Embedded**

Eerste publicatie, December 2024

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Formalin-free tissue embedding is less hazardous and results in better DNA quality

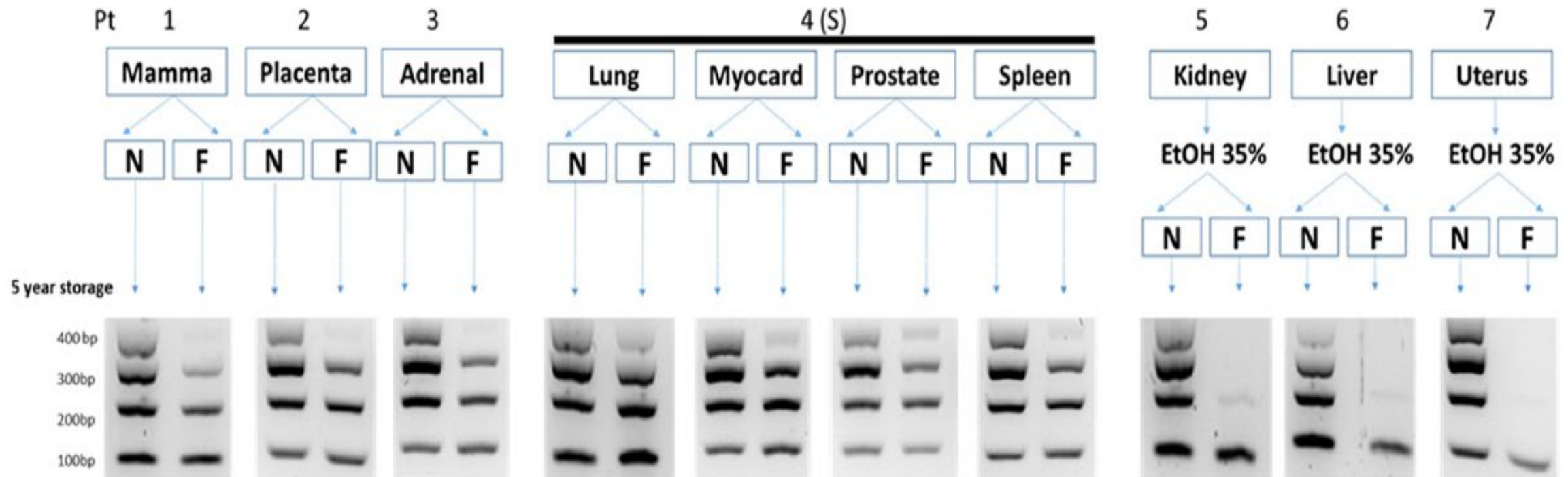
Maarten Niemantsverdriet, Ageeth Knol, Jose van der Starre-Gaal, Agnes Marije Hoogland  *

Isala Pathology, Zwolle, The Netherlands

* a.m.hoogland@isala.nl

FFPE vs NFPE > DNA kwaliteit na 5 jaar

- 10 weefsels van 7 verschillende patiënten
- FFPE vs NFPE, DNA kwaliteit na 5 jaar (niet speciale) opslag
- Getoond in DNA ladders en NGS



FFPE

Leica
ASP6025



24hr

26hr

28hr

30hr

32hr

34hr

Formaldehyde 4% 24 hr	Formaldehyde	E 70 %	E 80 %	E 95 %	E 100 %	E 100 %	E 100 %	Xylene	Xylene	Xylene	Paraf- fin	Paraf- fin	Paraf- fin

FFPE block Kidney



NFPE

Preparation	E 100 % > CO ₂	E 100 % > CO ₂	E 100 % > CO ₂	CO ₂	Paraffin	Finishing

0hr

2hr

4hr

6hr

NFPE block Kidney

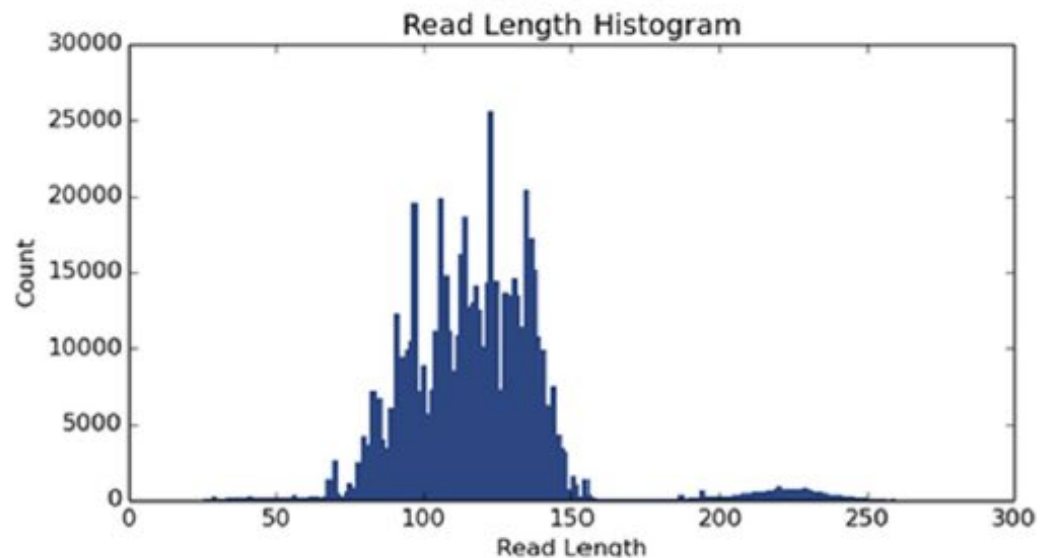


Tispa
+CO₂

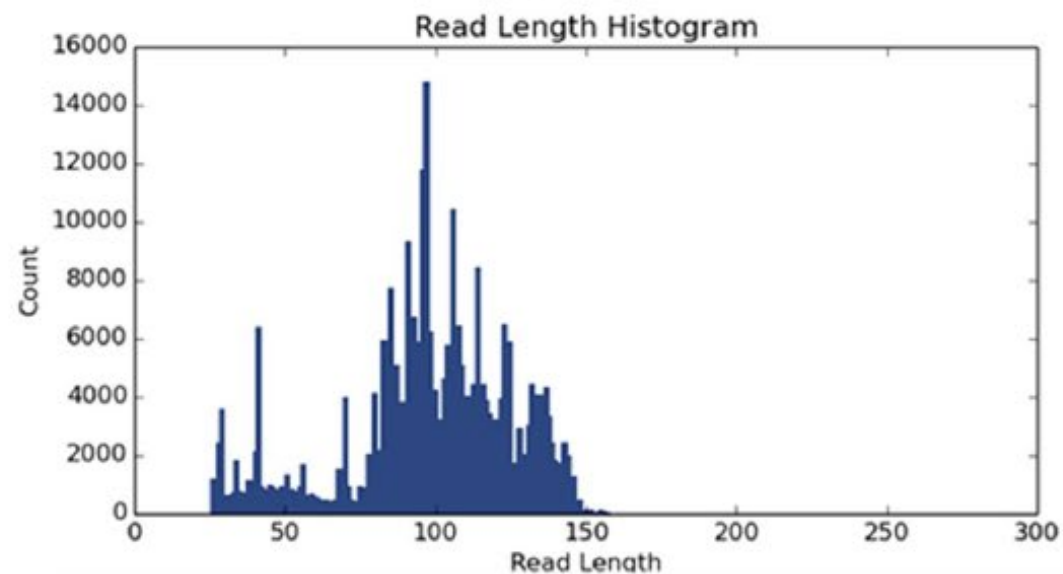


Uterus
(etOH)

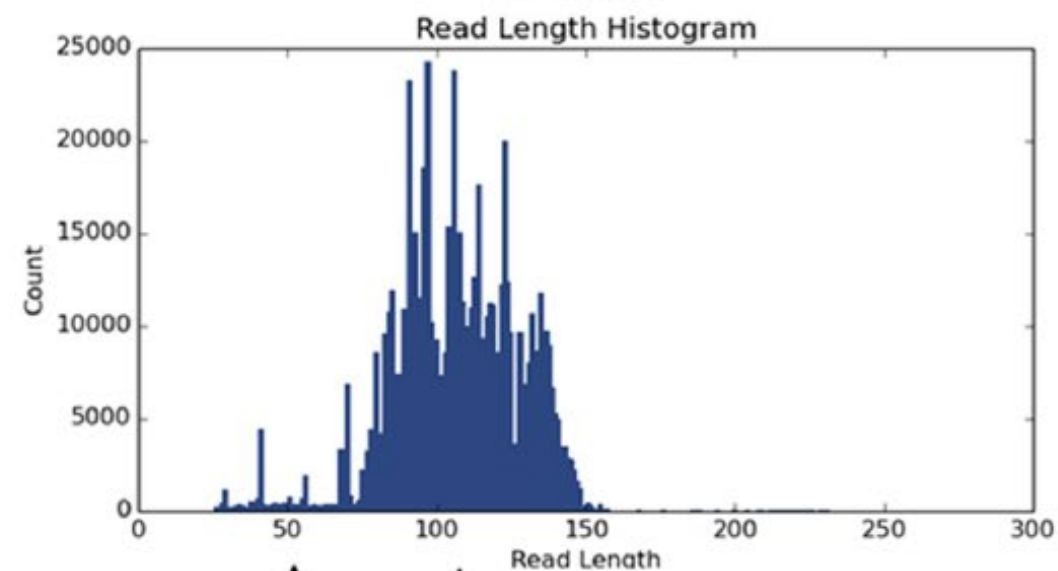
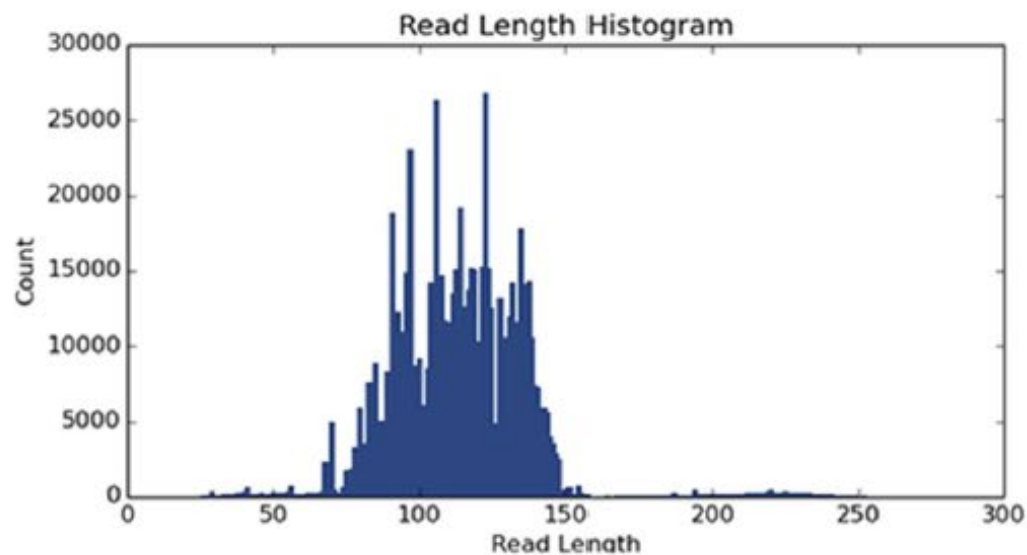
NFPE



FFPE



Adrenal



↑
on-target

↑
large

↑ small ↑ on-target

Conclusies

- Formaline-vrije weefsel doorvoer (NFPE) is mogelijk
- NFPE beschadigt het DNA niet zoals FFPE dat doet
- Doorvoeren middels NFPE heeft de mogelijkheid om het gebruik van toxische formaline in pathologie laboratoria drastisch te verminderen en tegelijk de DNA kwaliteit voor moleculaire pathologie (BIOBANKEN) te vergroten.
- Deze studie opent te poort naar uitgebreidere DNA en RNA analyses middels moderne technieken om het positieve effect van NFPE doorvoeren te begrijpen

Tweede publicatie, Februari 2026



RESEARCH ARTICLE

High-quality histochemistry, immunohistochemistry, and immunofluorescence on xylene- and formalin-free paraffin-embedded tissues

Maarten Niemantsverdriet, Anne Mei Eshuis, Naomi van der Horst, Rory Ogink, Pien van Smeerdijk, Jose van der Starre-Gaal, Agnes Marije Hoogland^{ID}*

Isala pathology, Dr. Van Heesweg 2, 8025 AB Zwolle, The Netherlands

* a.m.hoogland@isala.nl

Is histochemie, immunohistochemie and immunofluorescensie mogelijk op NFPE?

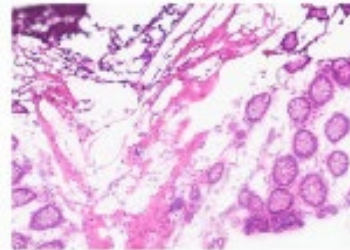
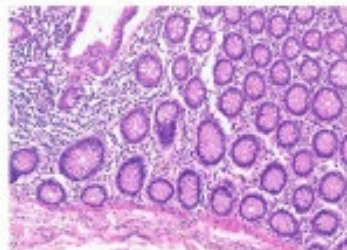
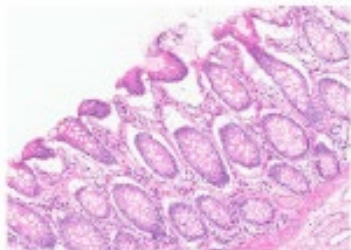
- Weefselbibliotheek is gebouwd op basis van beschikbare weefsels, gespiegeld FFPE / NFPE en zo mogelijk vriesmateriaal.
- Uitgebreid getest op histochemische (HC) en immunohistochemische (IHC) markers, concinute vergelijking FFPE vs NFPE
- Test set van immunofluorescensie markers (IF), vergelijking vriesmateriaal vs NFPE

NFPE

FFPE

Frozen

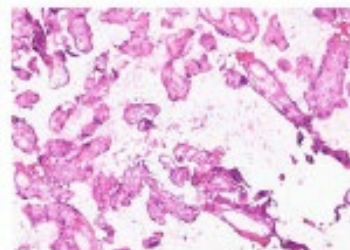
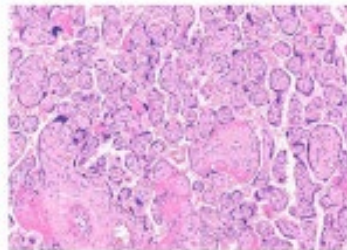
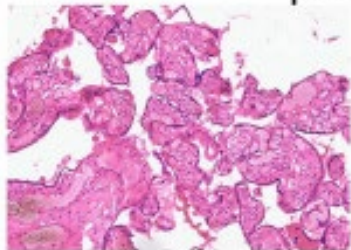
colon



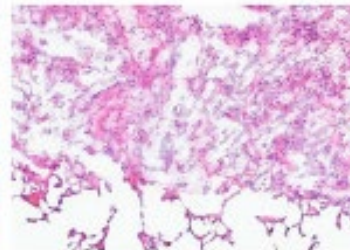
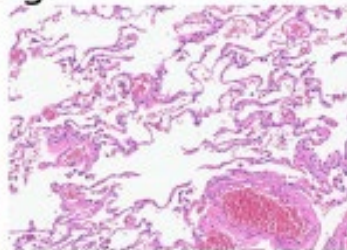
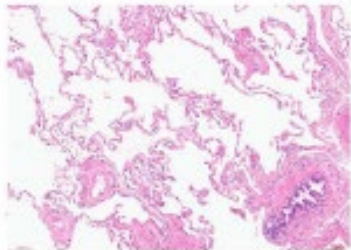
tonsil



placenta



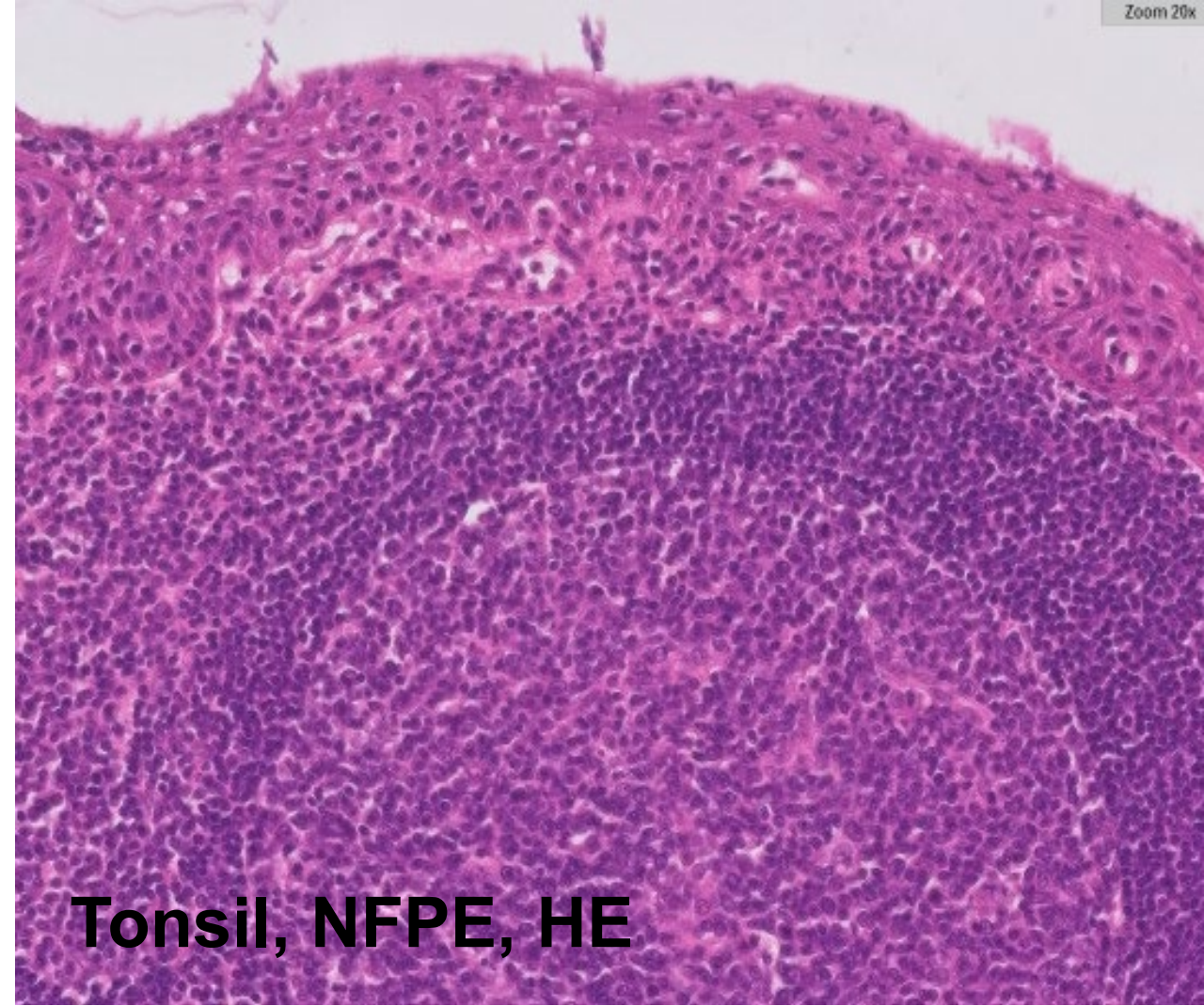
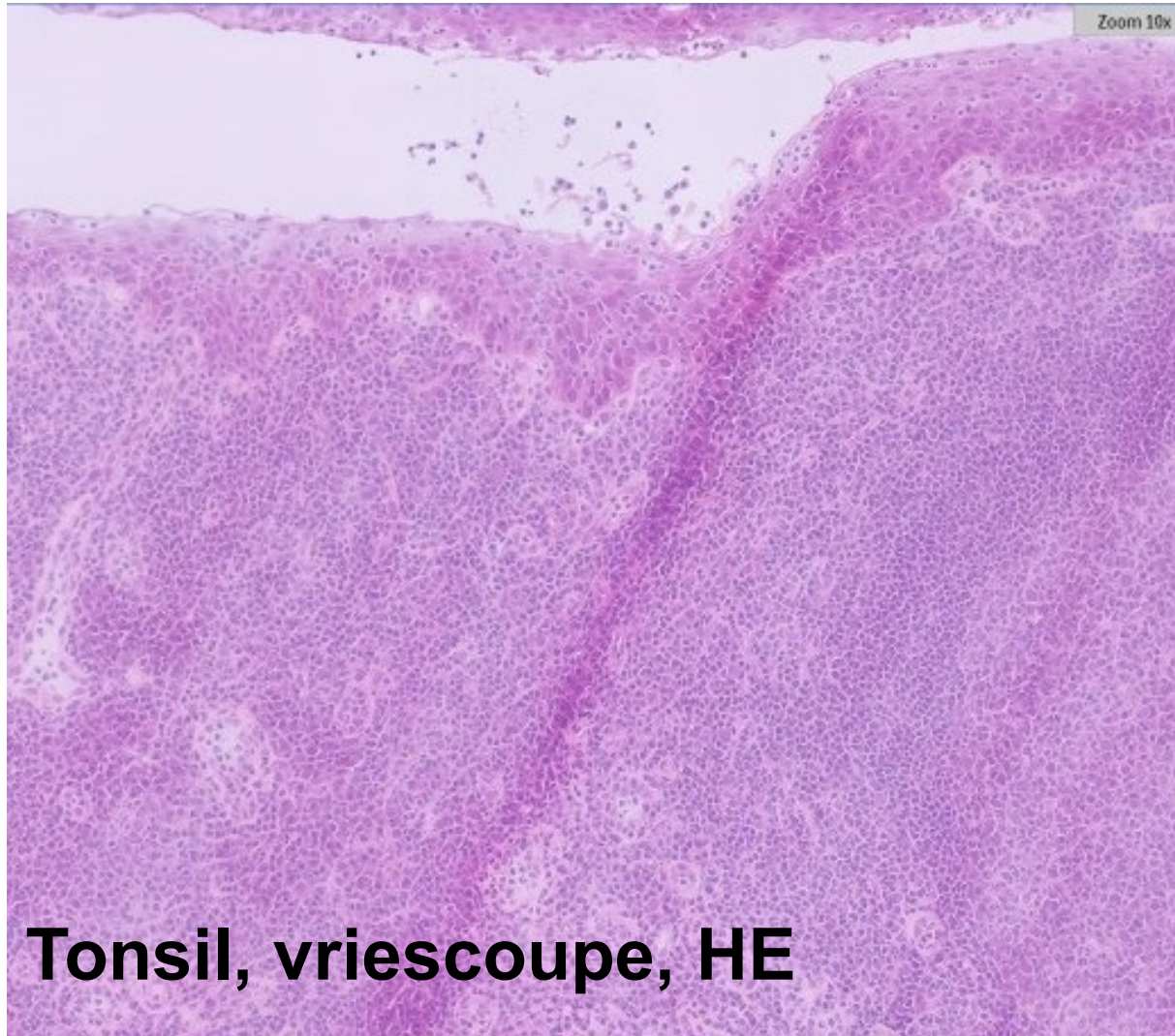
lung



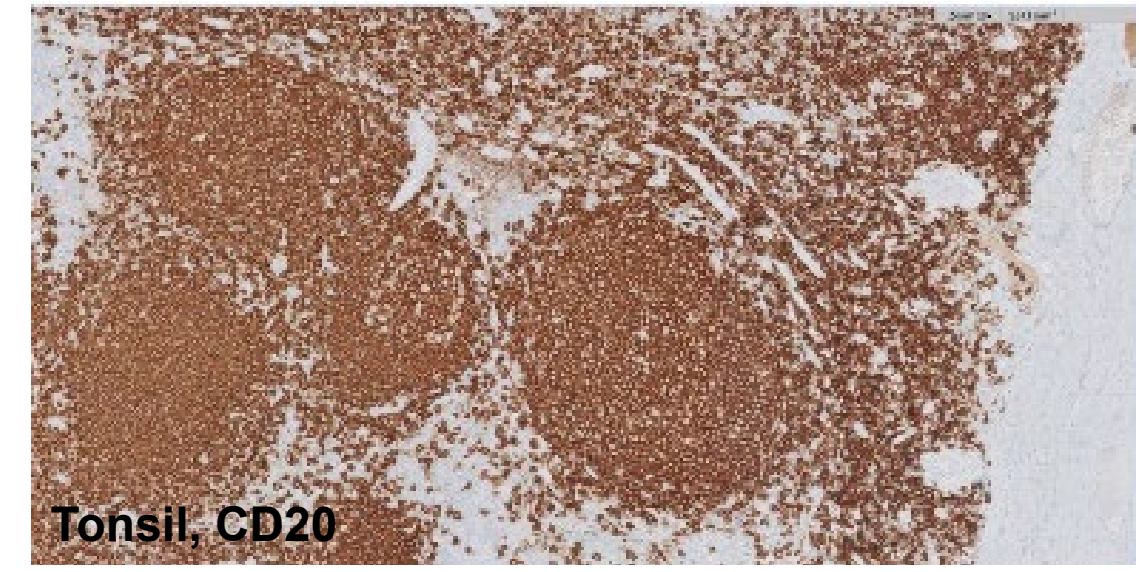
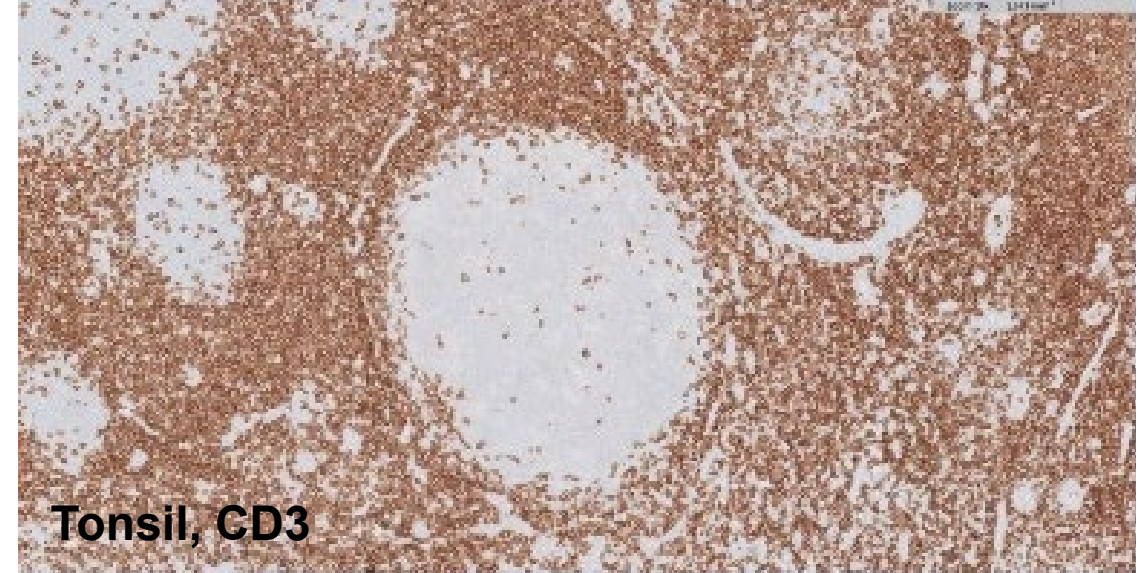
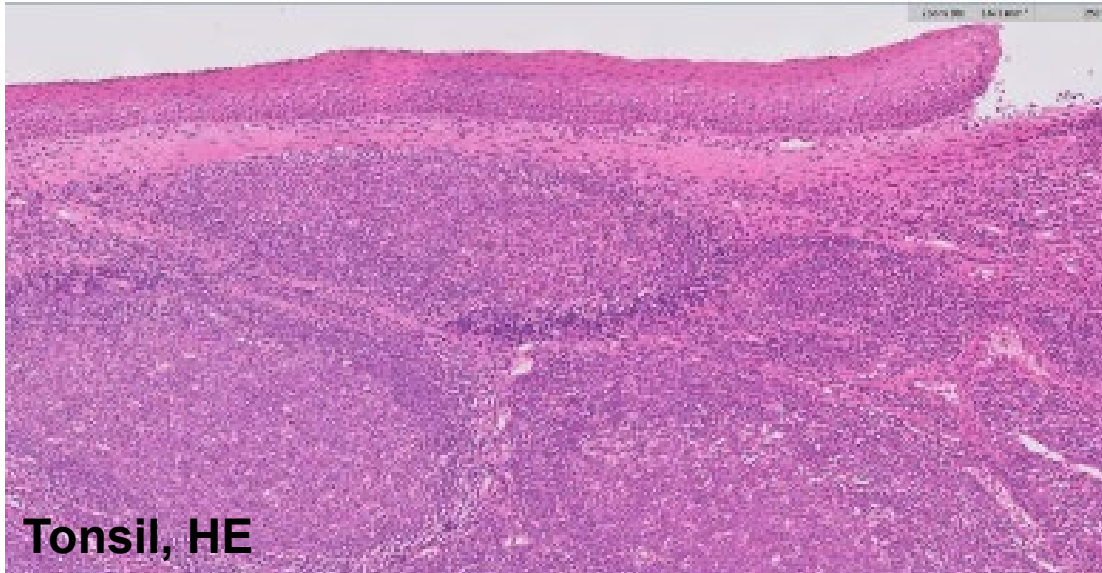
1000 μ m

Morfologie

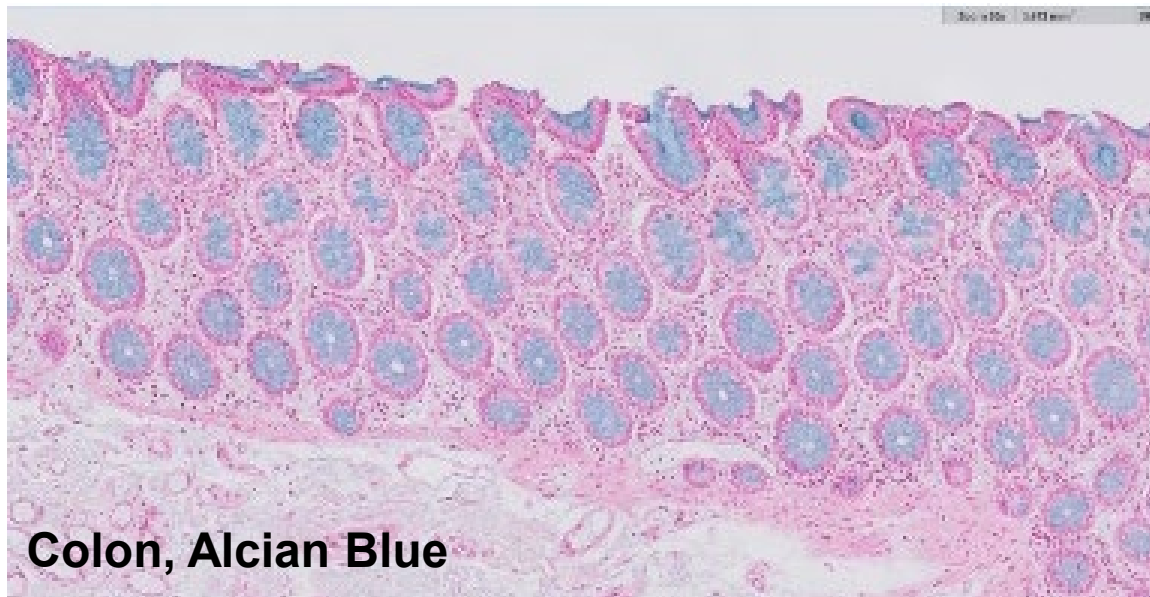
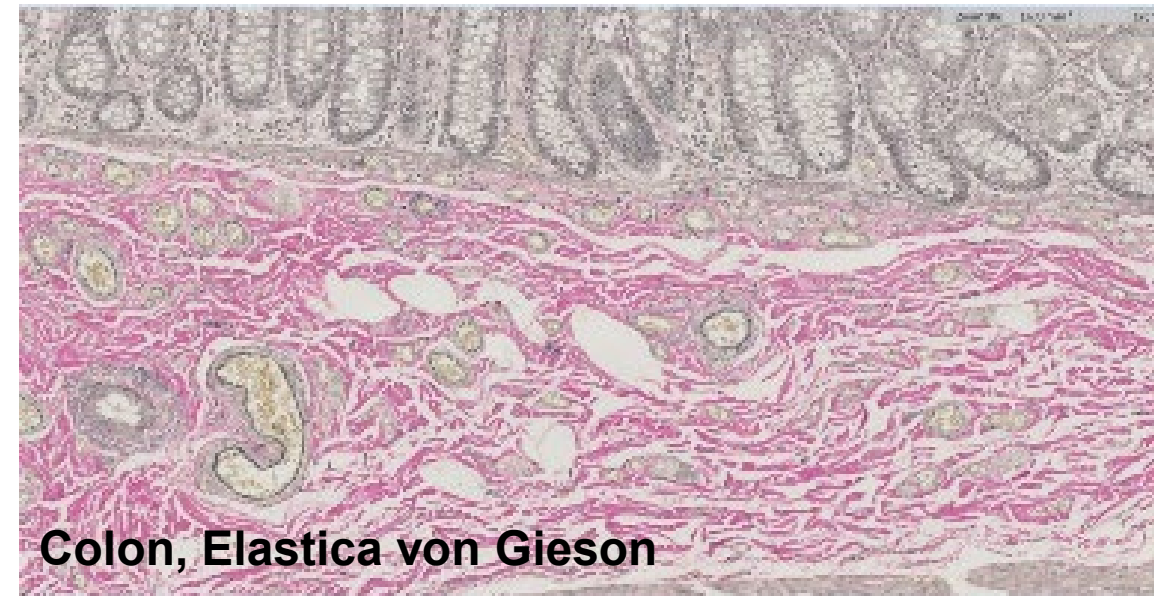
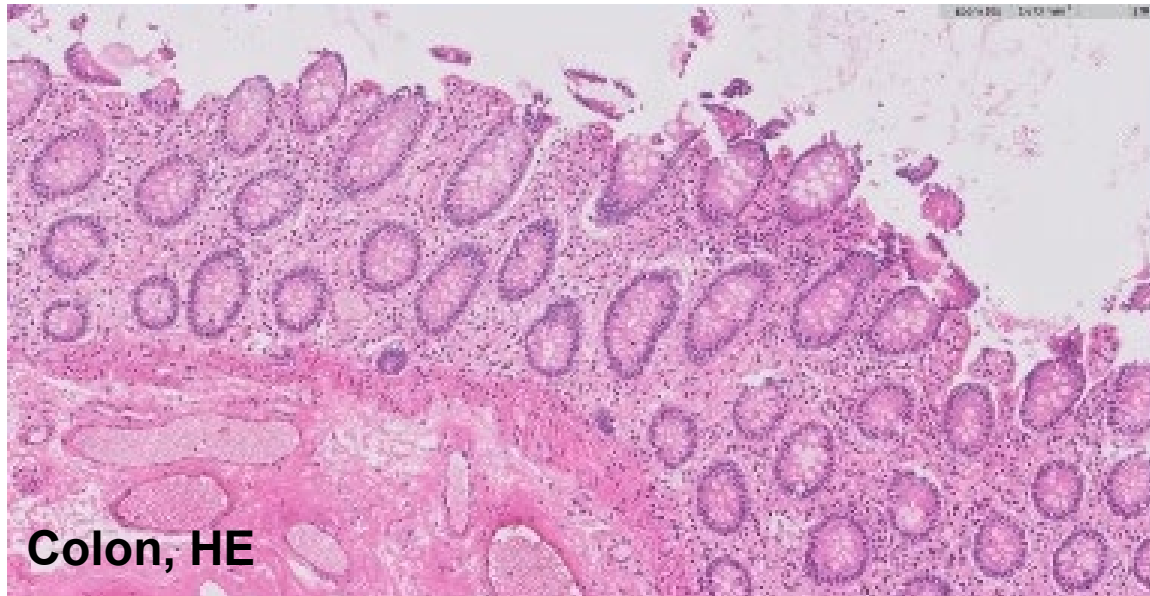




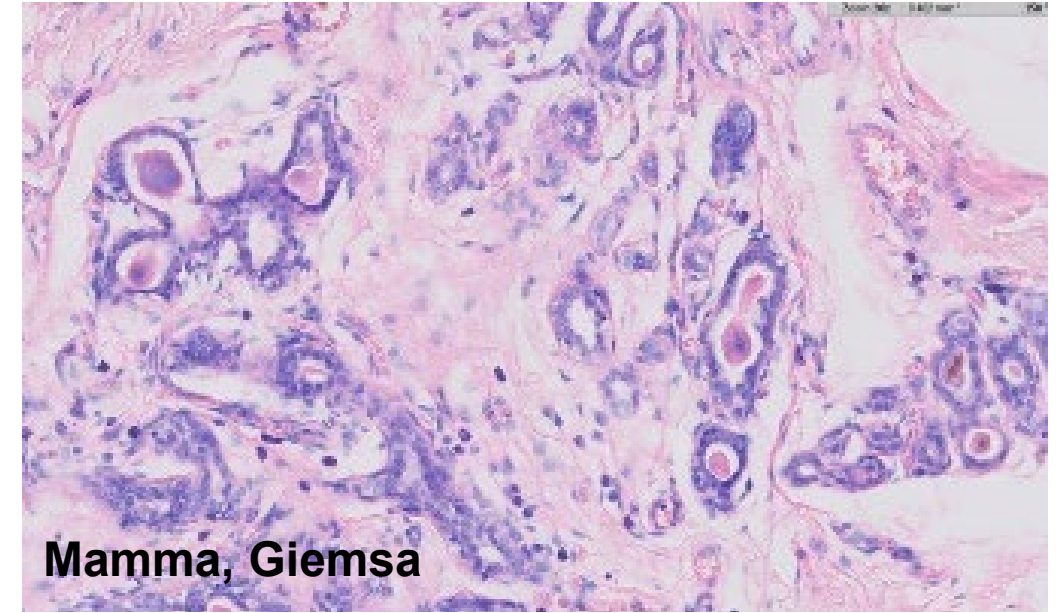
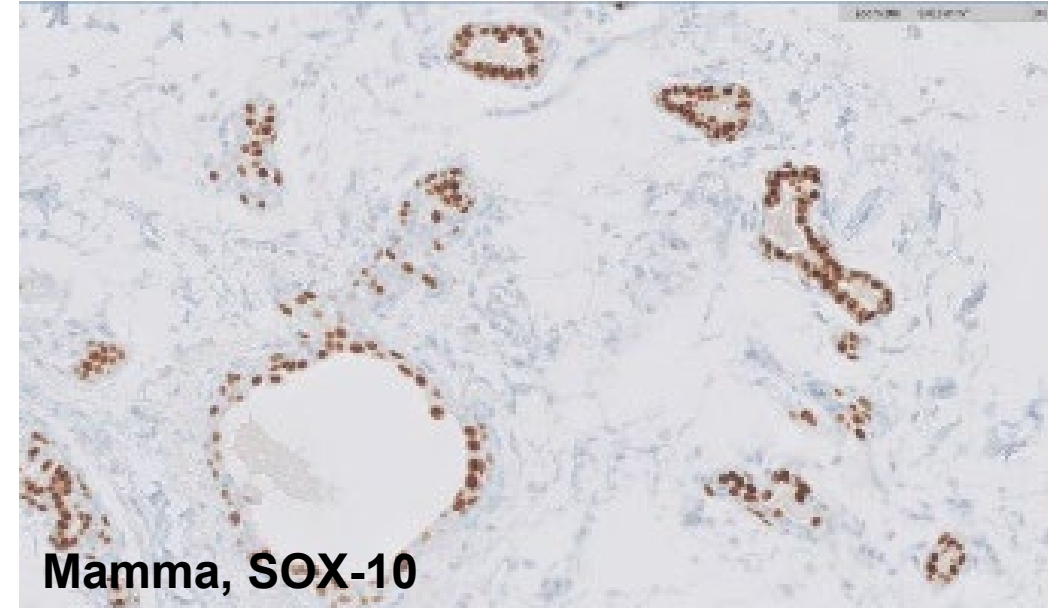
Histochemische en immunohistochemische markers



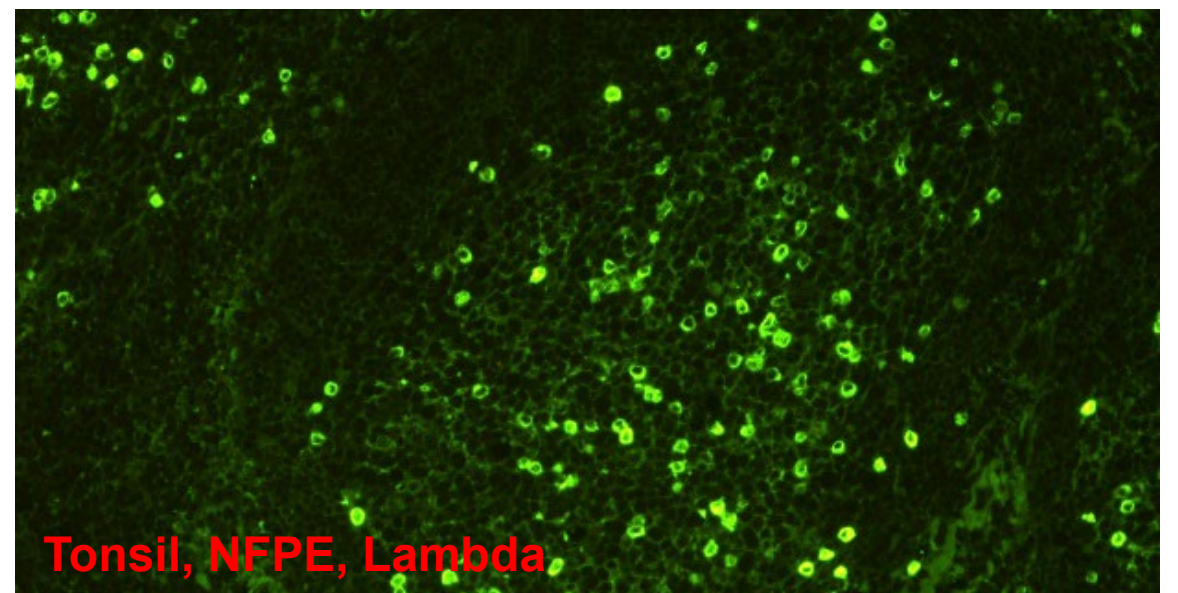
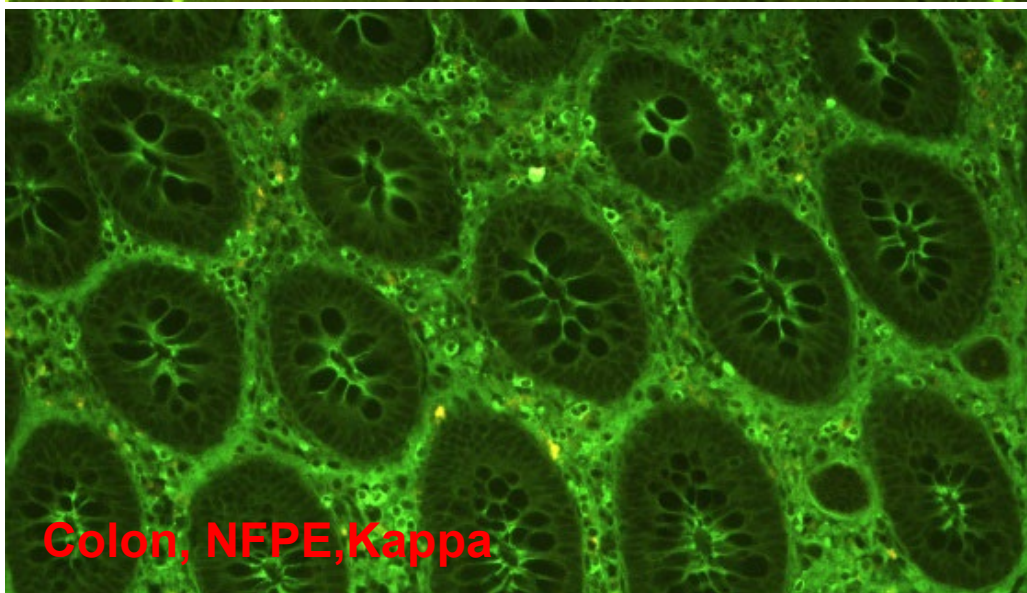
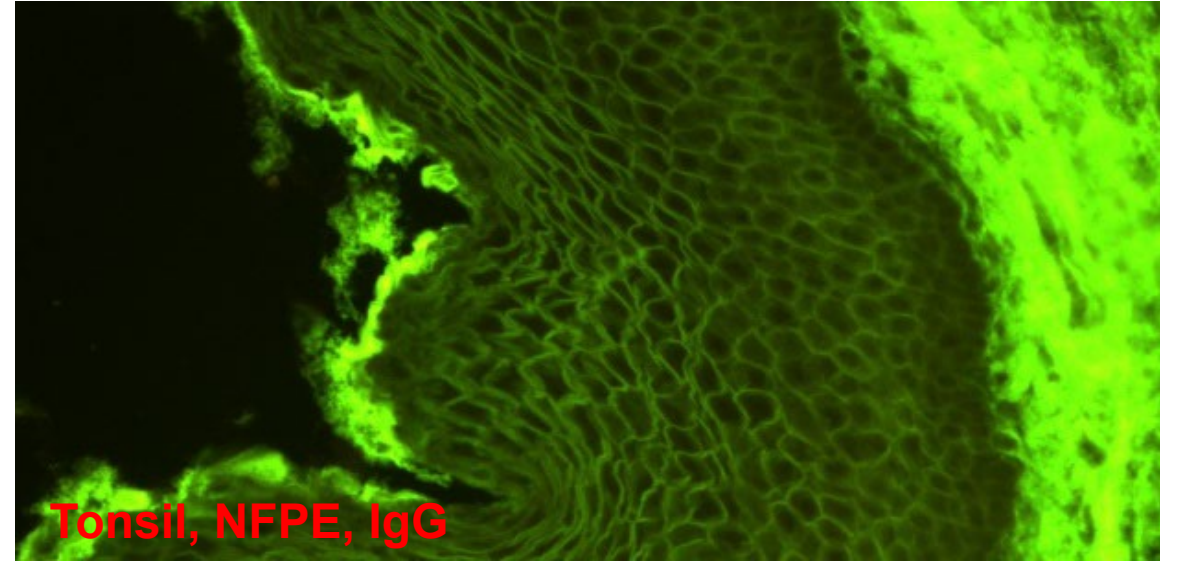
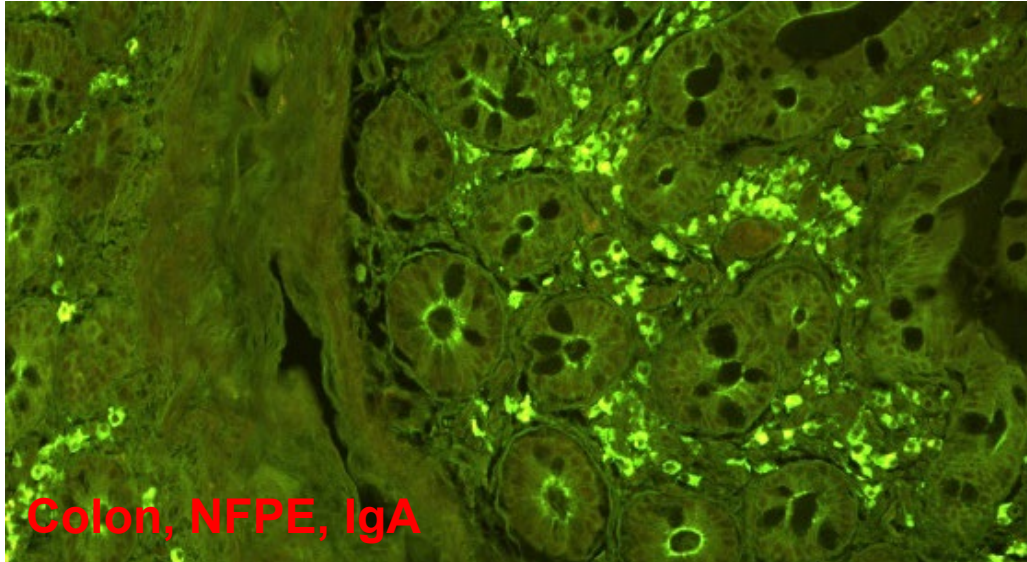
Histochemische en immunohistochemische markers



Histochemische en immunohistochemische markers



Immunofluorescensie



Conclusies

- Met het doel toxische oplosmiddelen als xyleen en formaline te elimineren van het doorvoerproces, NFPE met gebruik van superkritisch CO₂, werd gebruikt om in paraffine ingebedde weefsels te produceren.
- Histochemie, immunohistochemie en immunofluorescensie voor diagnostisch gebruik werd beoordeeld. De overgrote meerderheid, 45 van 49 kleuringen (92%) gaven een goed resultaat.
- Reticuline ondermijnt dit proces momenteel.
- Voor de overige kleuringen tonen wij aan dat doorvoer zonder xyleen en zonder formaline (NFPE) is mogelijk en levert hoge kwaliteit weefsels op, geschikt voor HC, IHC en IF.

Derde publicatie, augustus 2026



Good DNA- and sufficient RNA integrity in formalin-free paraffin-embedded tissues

**Maarten Niemantsverdriet¹, Natalie Methorst¹, Sanne Yvet Hoek¹, Ageeth Knol¹
and Agnes Marije Hoogland^{1*}**

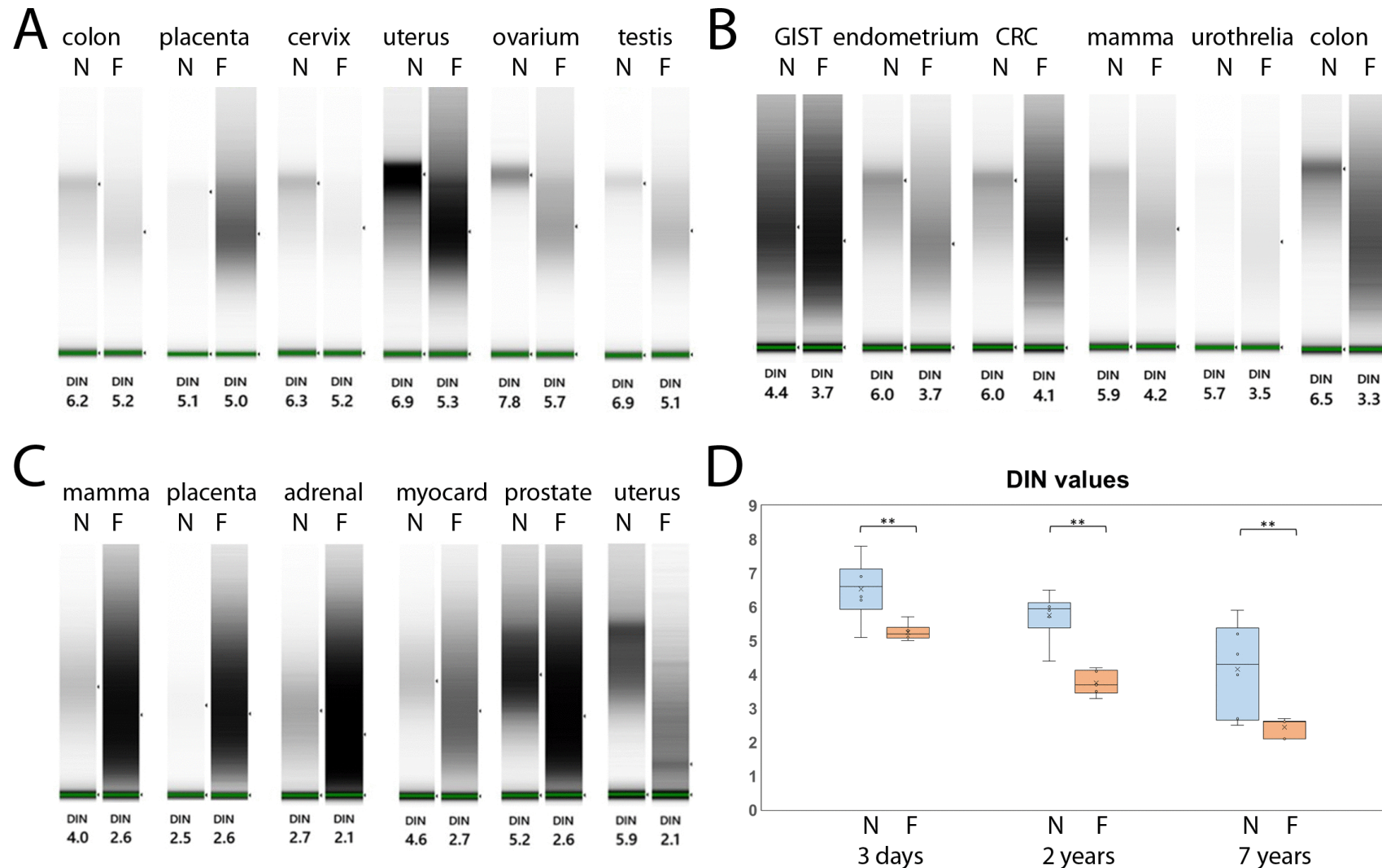
1) Isala, Department of Pathology, Dr. Van Heesweg 2, 8025 AB Zwolle, Postbus 10400, 8000 GK Zwolle, The Netherlands.

*corresponding author

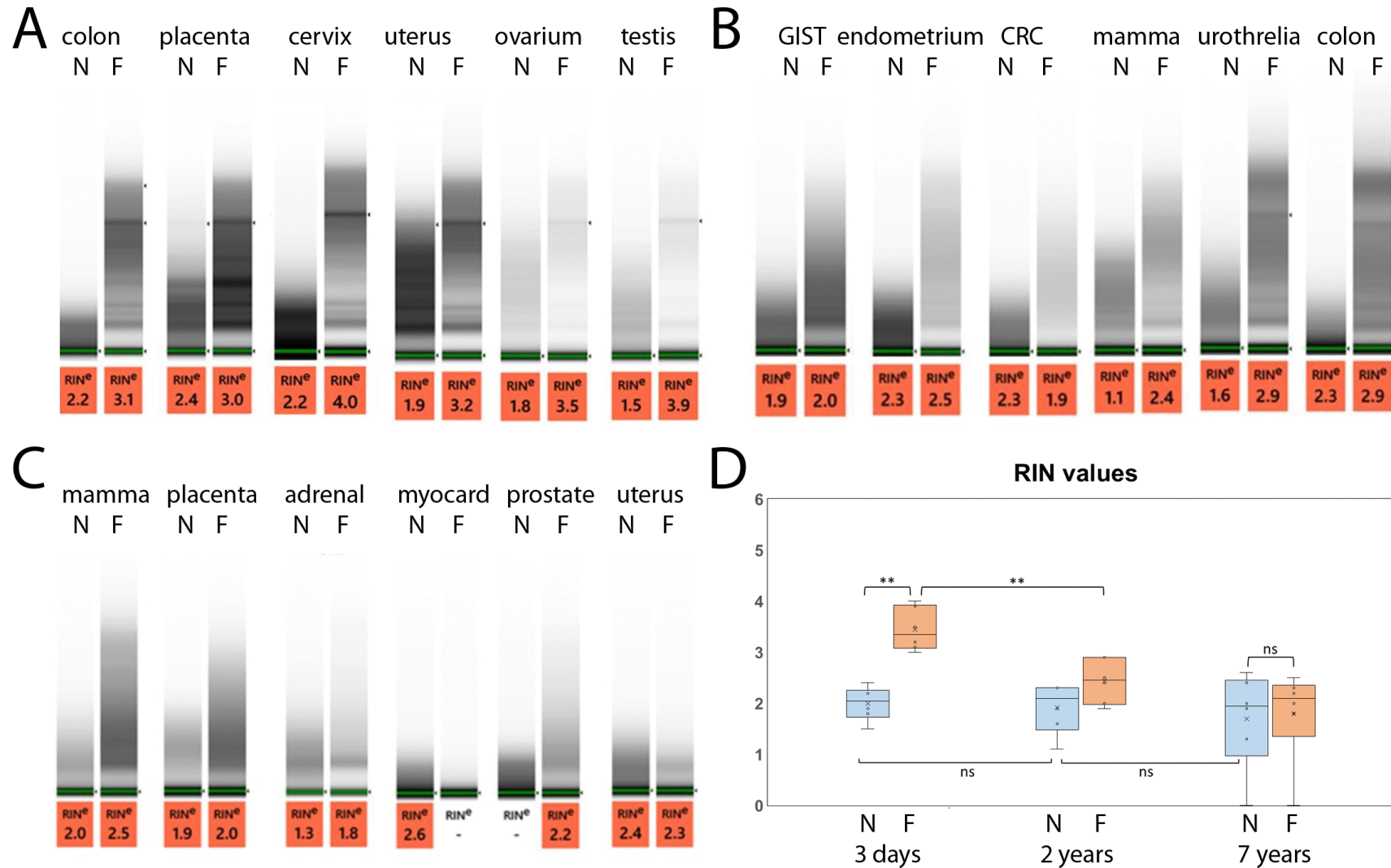
Studie opzet

- Wij verrichtten integriteit analyses op zowel DNA als RNA geïsoleerd uit weefsels 7 jaar, 2 jaar en 3 dagen na doorvoer en vergeleken FFPE met NFPE.
- Weefsels werden op verschillende momenten in de afgelopen jaren verzameld, gesplitst en gespiegeld doorgevoerd middels FFPE en NFPE.
- DNA en RNA werd geïsoleerd middels AllPrep DNA/RNA FFPE kit (QIAGEN).
- DNA en RNA concentraties werden bepaald middels de Qubit™ 4.0 Fluorometer.
- DNA en RNA fragment afmeting en de respectievelijke DIN of RIN waarden werden bepaald middels de Agilent 4200 TapeStation
- RNA and DNA sequencing werd verricht

DNA integriteit van non-fixed (N) en formaline fixed (F) weefsels 3 dagen (A), 2 jaar (B) en 7 jaar (C) na doorvoer.



RNA integriteit van non-fixed (N) en formalin-fixed (F) weefsels 3 dagen (A), 2 jaar (B) and 7 jaar (C) na doorvoer.



Conclusies

- Xyleen- en formaline vrij doorvoeren (NFPE) is mogelijk en levert DNA op met een hogere integriteit dan DNA uit formaline gefixeerde weefsels.
- RNA integriteit in NFPE was lager dan RNA integriteit in FFPE in 3-dagen en 2-jaar oude weefsels, maar gelijk in 7 jaar oude weefsels.
- RNA Next-Generation-Sequencing was succesvol voor NFPE RNA, zelfs in bijna alle 7-jaar oude weefsels, en lijkt minder gevoelig voor sequencing artefacten dan RNA geïsoleerd uit FFPE
- Weefseldoorvoer middels NFPE is sneller en goedkoper dan FFPE, heeft daarmee de mogelijkheid om de blootstelling aan xyleen en formaline drastisch te verminderen en tegelijk de kwaliteit van moleculaire testen te verbeteren.

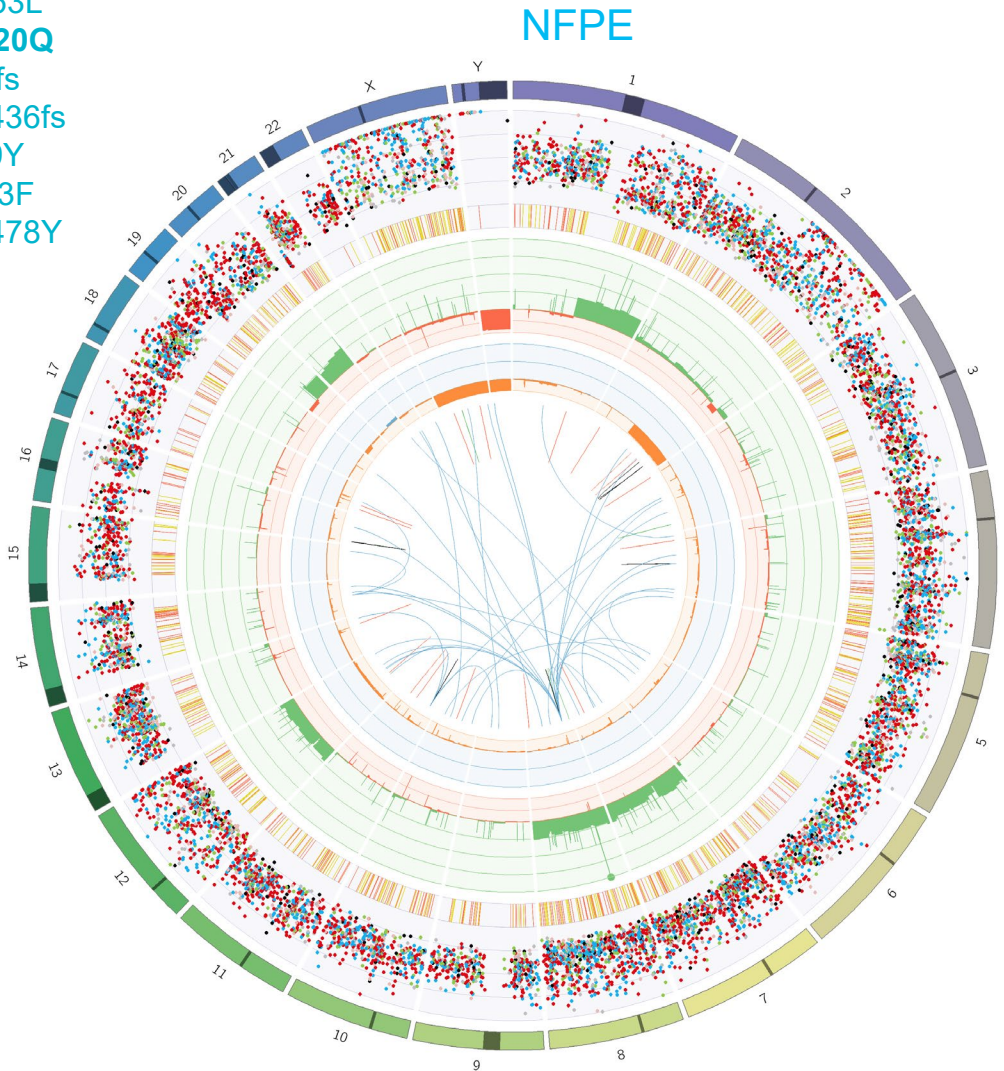
En Whole Genome Sequencing WGS) dan?

- Small pilot with Hartwig Medical Centre (Amsterdam)
- No follow-up yet

NFPE Drivers:

- APC M1211fs
- APC G1312fs
- **KRAS G12V**
- **PIK3CA N345K**
- TP53 G266E
- TCF7L2 P353L
- **TCF7L2 R420Q**
- SOX9 V306fs
- ARID1A P1436fs
- JAK2 N1109Y
- MED12 Y283F
- TNFAIP3 C478Y
- FLT1 R281*

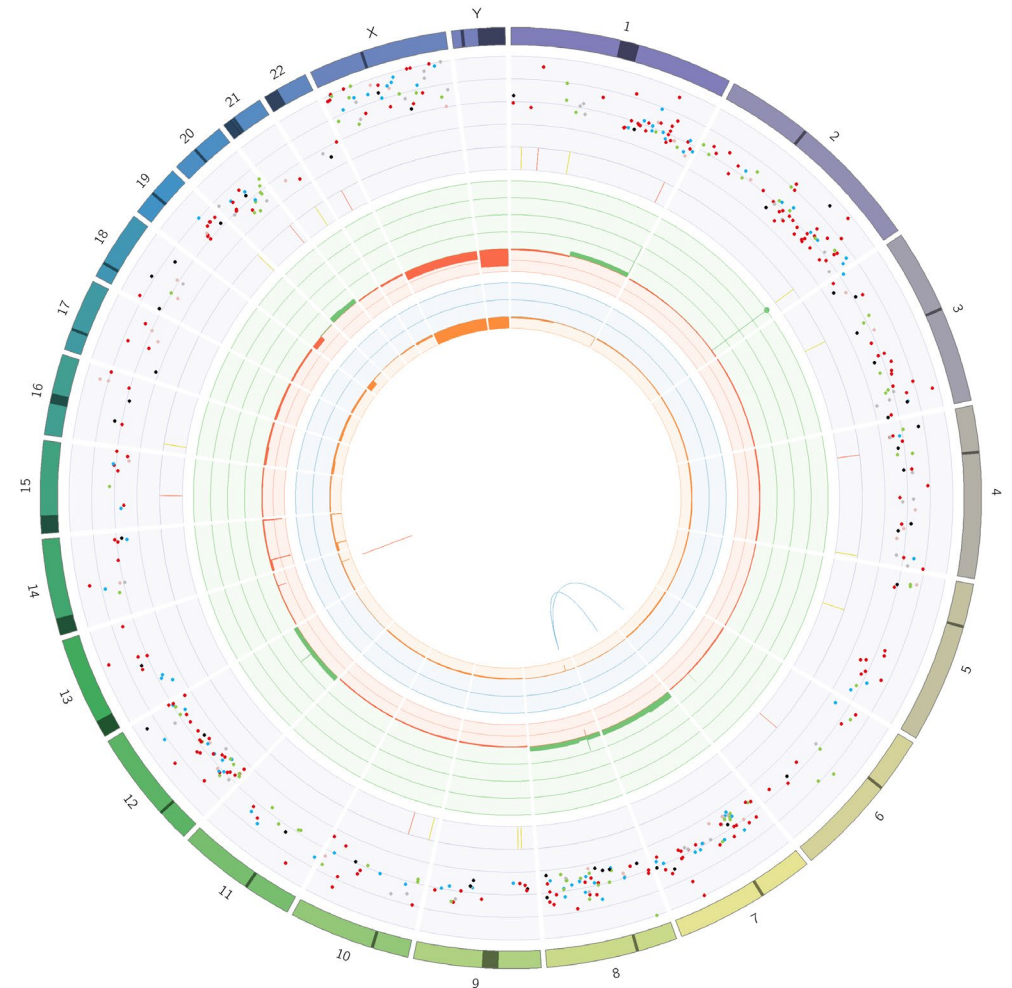
DNA: WGS



Fresh Frozen

Fresh Frozen Drivers:

- KRAS G12V
- PIK3CA N345K
- TCF7L2 R420Q



Toekomst plannen?



- Multicenter samenwerking!
 - Isala, LabPon, LUMC en UMCG
- University of Frankfurt is geïnteresseerd maar terughoudend
- Lange termijn opslag van NFPE blokjes (> 30 jaar): Oxipress experiment
- Commerciële partij voor het marktaandeel...



**Wie heeft er vragen /
opmerkingen /
aanmerkingen / ideeën?**