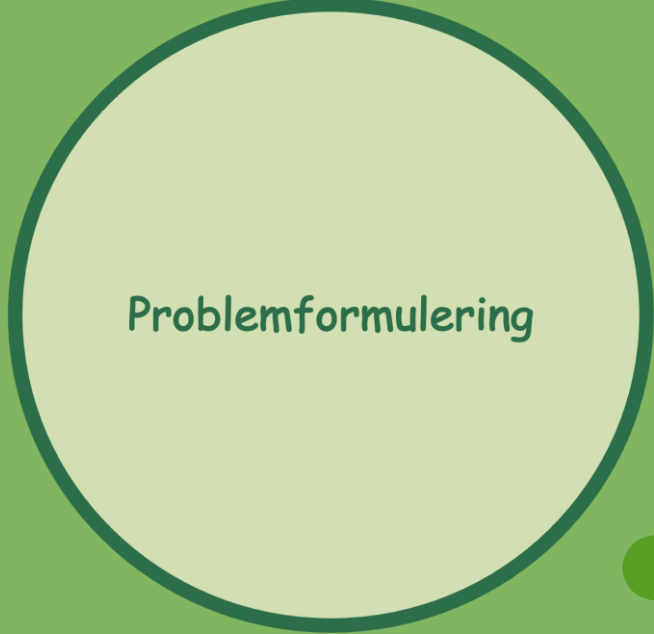
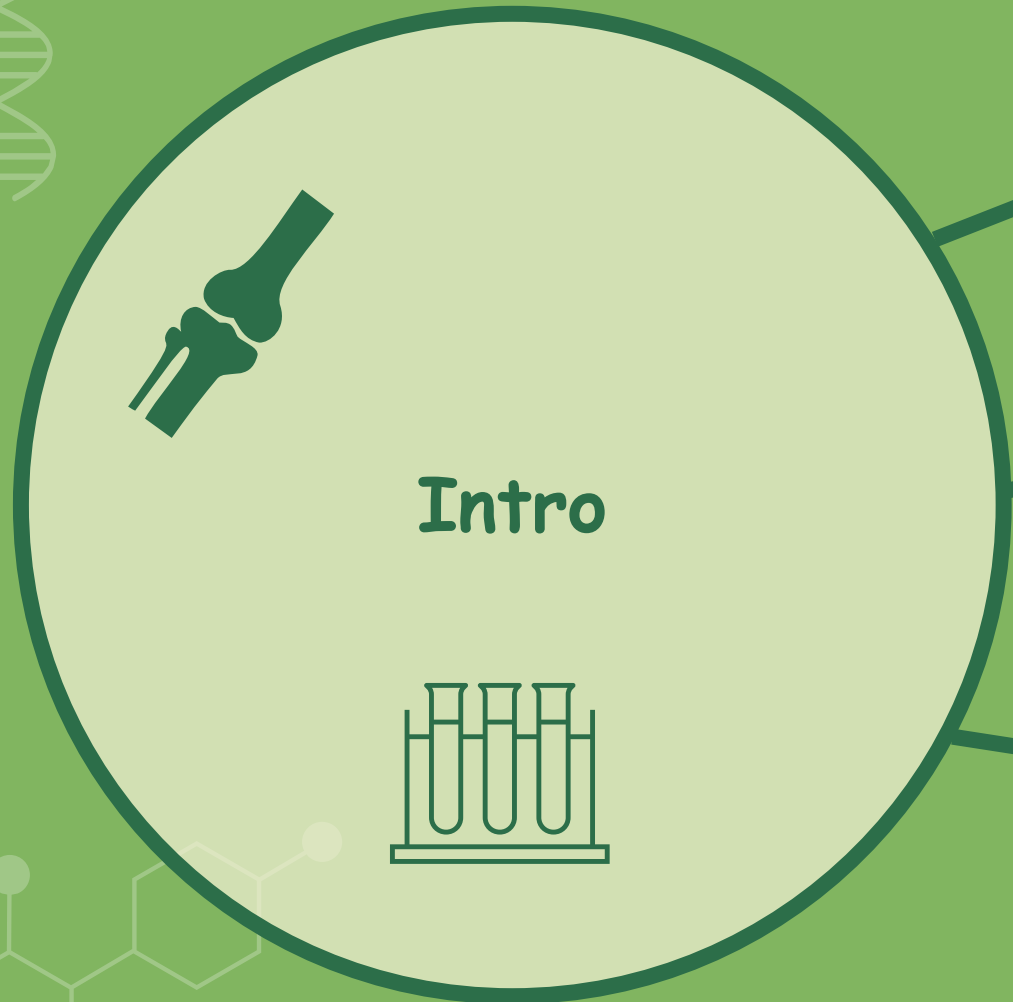


# Bæredygtige alternativer til håndtering af afkalkning af knoglemetastaser

Et grønnere afkalkningsmiddel til afkalkning af knoglemetastaser







# Research Team

---



Alaa Ahmad  
Fagansvarlig bioanalytiker  
for mikrotomi,  
Afdeling for Patologi, Rigshospitalet



Bonnie Svendsen  
Fagansvarlig bioanalytiker  
for kompleks udskæring,  
Afdeling for Patologi, Rigshospitalet



Samah Assi  
Bioanalytiker,  
Afdeling for Patologi,  
Rigshospitalet



Kiran Mirza  
Bioanalytiker,  
Afdeling for Patologi,  
Rigshospitalet







Camilla Christine Qvist  
BLS, MpEd,  
bioanalytikerunderviser,  
Afdeling for Patologi,  
Rigshospitalet



Filis Necip  
BLS, bioanalytikerunderviser,  
Afdeling for Patologi,  
Rigshospitalet

# Baggrund



Myresyre/formalin	EDTA
 	 

MOL- DECALCIFIER



**MILESTONE**  
HELPING  
PATIENTS



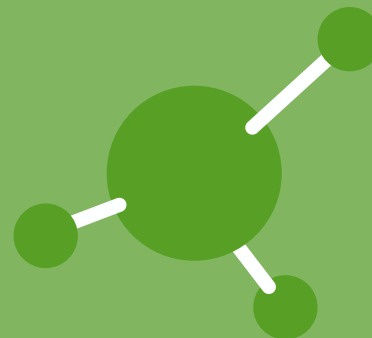


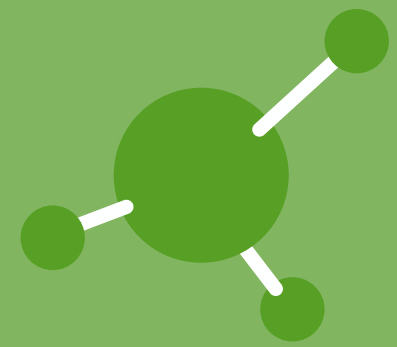
# Problemformulering

---



Hvilken betydning har anvendelse af det grønne reagens Mol-Decalcifier fra firmaet Milestone Medical på bevarelse af vævsmorfologi, farveintensitet, DNA-kvalitet samt samlet diagnostisk billede af knoglemetastaser sammenlignet med myresyre/formalin?





Metode



Metodevalg



Opdeling af  
prøvematerialer

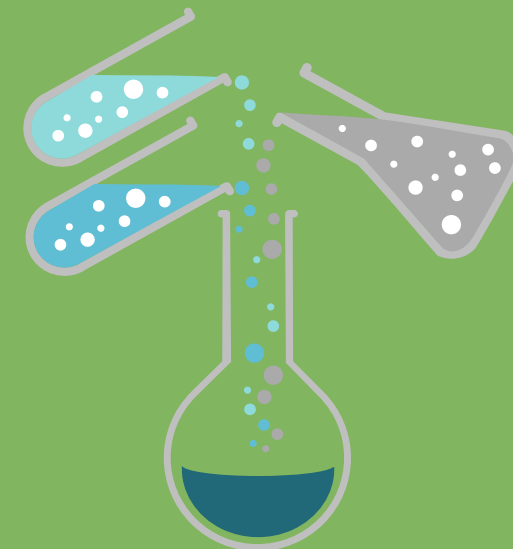


Fremgangsmåde

# Metodevalg

## Analyser:

- HE-farvning
- ALVG
- Immunhistokemi (Ck7, ER, HER2, PAX8 og TTF1)
- Molekylær analyse (DNA-fragment analyse/Ladder)



## Afkalknings metoder

	A	B	C	D	E
Afkalkningsmidler	Myresyre/formalin	Myresyre/formalin	Mol-Decalcifier	Mol-Decalcifier	EDTA
End-point test	Fysisk	Kemisk	Fysisk	Kemisk	Kemisk
maksimalt afkalkningstid	7 dage	14 dage	7 dage	14 dage	Ingen

Score	Definition
<b>0 (Ingen reaktion)</b>	Ingen farvning.
<b>1 (Svært nedsat)</b>	Farvningen forekommer ikke acceptabel, idet den generelt er for svag. Der er falsk negativ reaktion i et mindre antal af de celler, som bør reagere. Protokollen bør optimeres.  Vævet har mistet en del struktur. Vævet mangler detaljer om cellulære, dvs. De diagnostisk relevante celler er ikke velbevarede. Der kan ikke skelne mellem kerner og cytoplasma og der ses autolyse og skrumpede celler.
<b>2 (Let nedsat)</b>	Farvning er acceptable til diagnostisk brug, men der er let svag farvning af de forventede komponenter i vævet, hvor det er muligt at optimere den.  Der er lidt ændring i struktur, hvor vævet har mistet en del af struktur. En moderat andel af diagnostisk relevante celler er velbevarede. Der skelnes nemt mellem kerner og cytoplasma, og der ses lidt/ingen autolyse og skrumpede celler.
<b>3 (Normal)</b>	Kontrast af farvning er helt normalt. Dvs. perfekt farvning, eller så tæt på perfekt som muligt, mht. signalets intensitet og lokalisation (kerner, cytoplasma, andre komponenter og baggrund).  Strukturen af vævet er næsten det samme som reference vævet. De diagnostisk relevante celler er velbevarede, og det er nemt at skelne mellem kerner og cytoplasma, dvs. (ingen autolyse eller skrumpede celler).



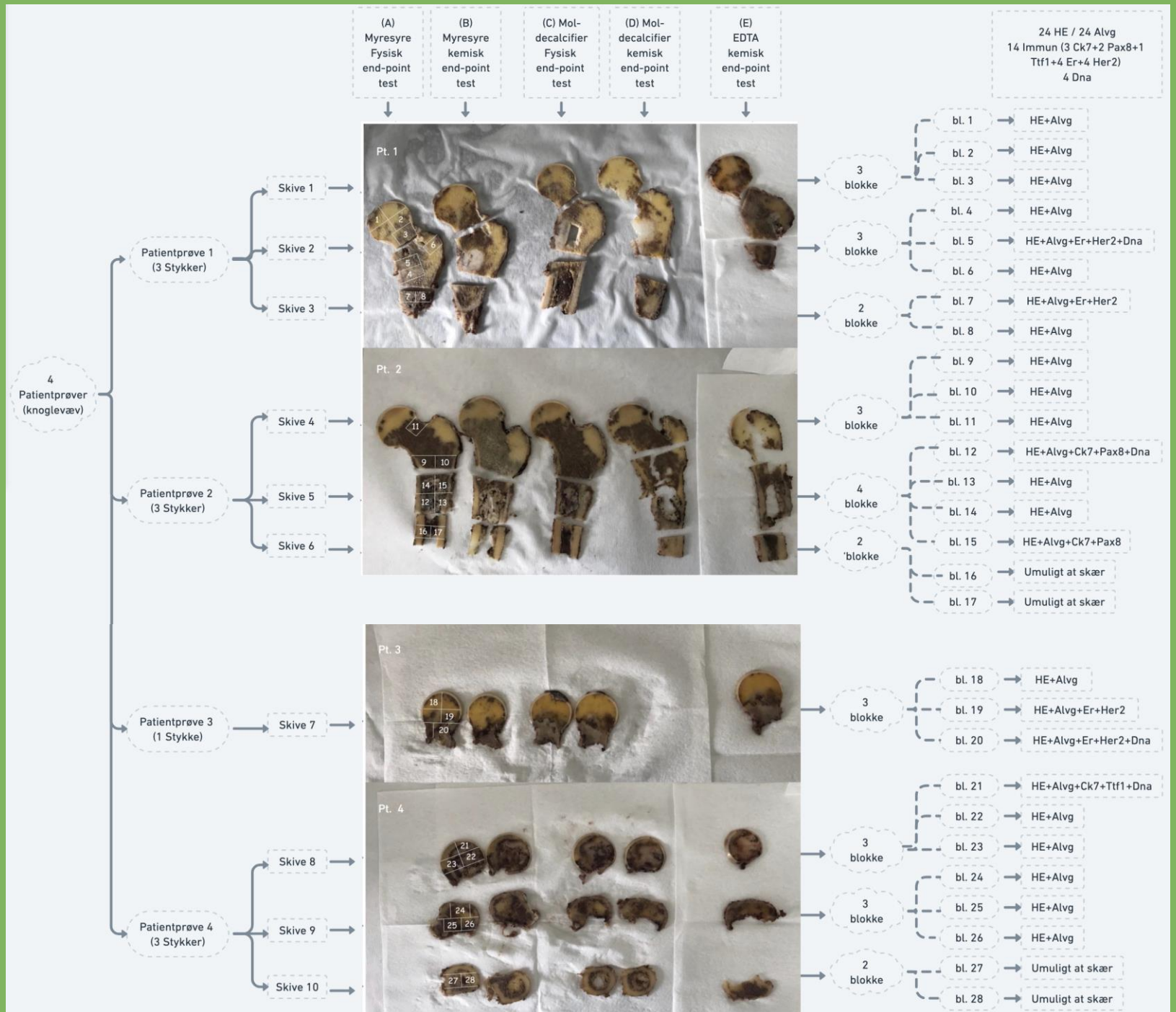
37 °C

Blok nr.	Overflade afkalkning	Umuligt at skære	Kommenter

Score	Definition
<b>Score 0 (Ingen reaktion)</b>	Ingen farvning
<b>Score 1 (Uacceptabel)</b>	Farvningen forekommer ikke acceptabel er for svag.  Der er falsk negativ reaktion i et mindre antal af de celler, som bør reagere eller falsk positiv reaktion bør reagere. Protokollen bør optimeres.
<b>Score 2 (Acceptabel)</b>	Farvning er acceptable for diagnostisk overfarvning eller svag farvning af de vævet.
<b>Score 3 (Optimal)</b>	Perfekt farvning, eller så tæt på perfekt signalets intensitet og lokalisation (kerne)



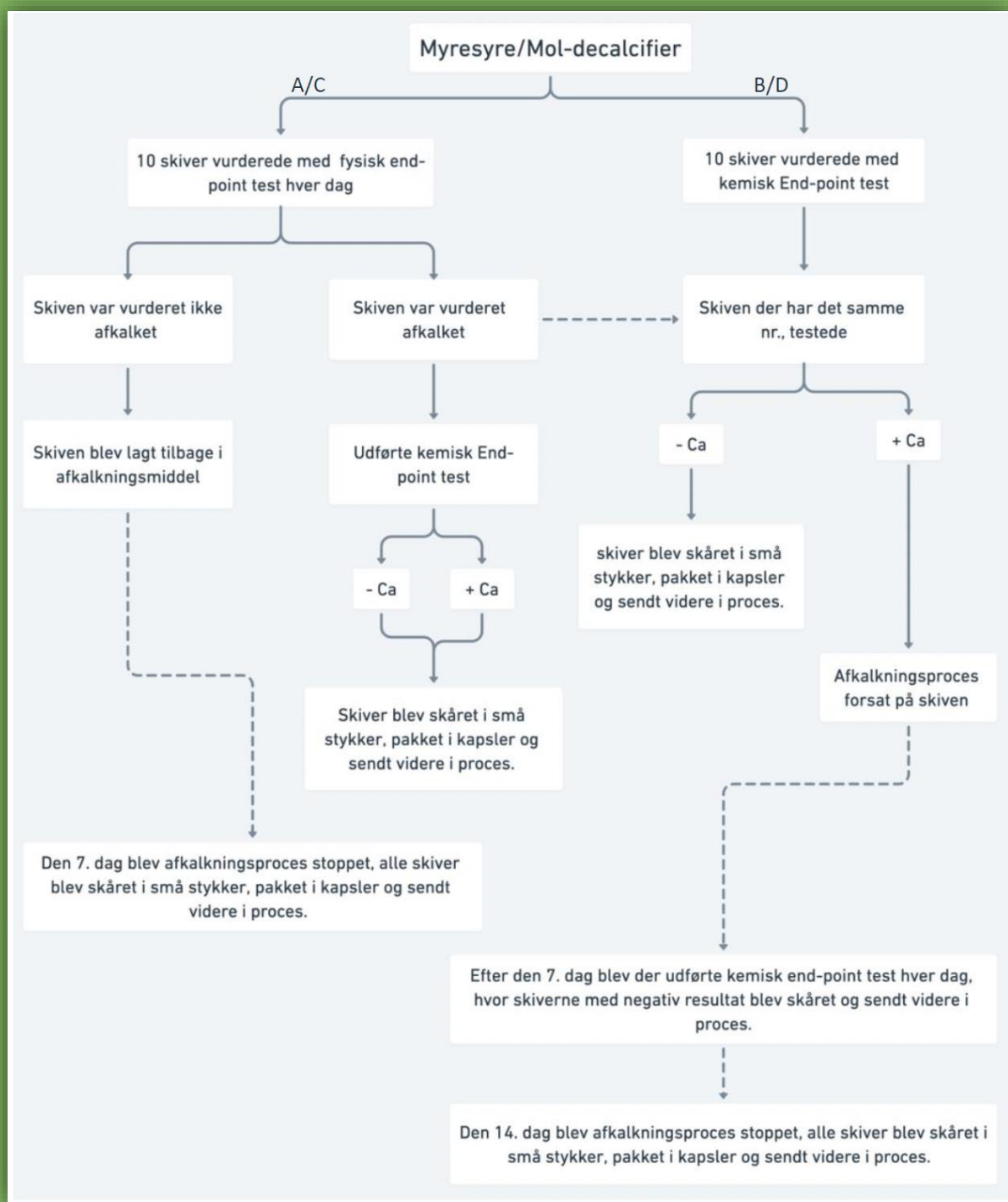
# Opdeling af prøvematerialer







# Frengangsmåde



# Resultater

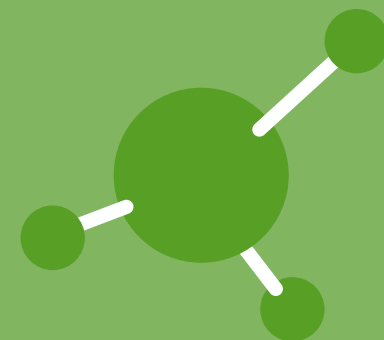
Afkalkningstid

HE-farvning  
og  
vævs morfologi

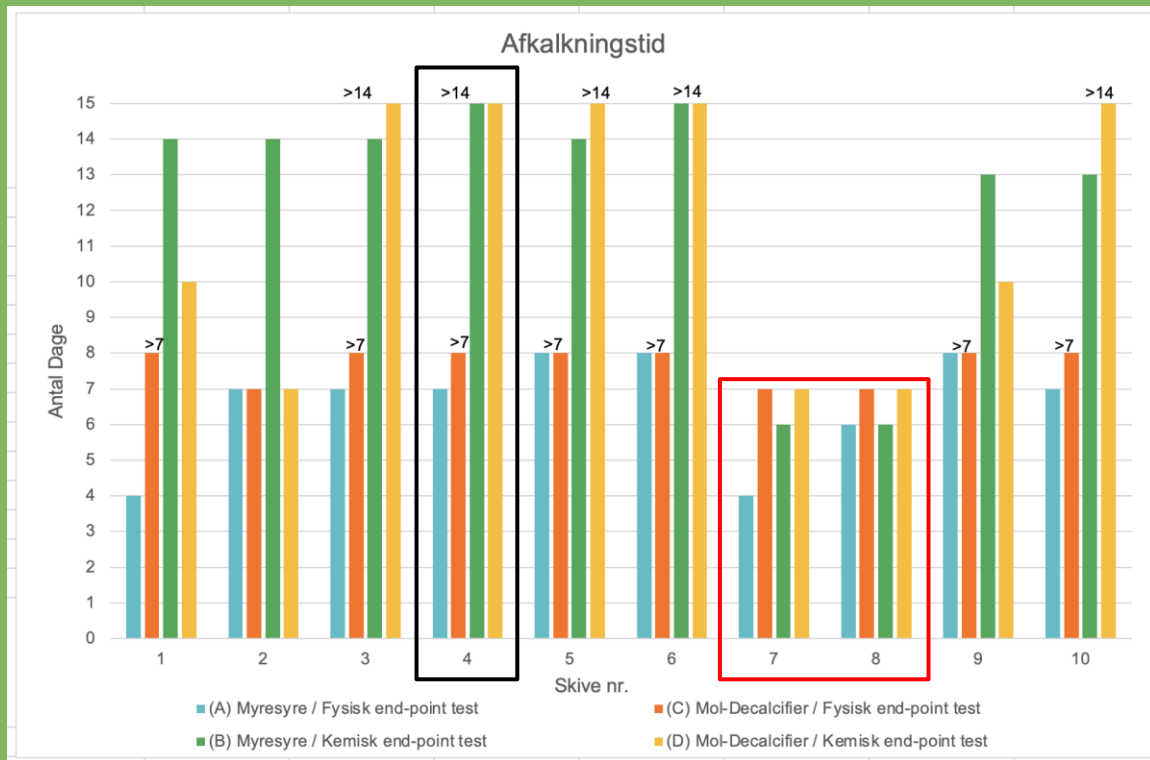
Immunhistokemiske  
farvninger

DNA-kvalitet

Hvornår !!



# Afkalkningstid



Skive nr.	(A) Myresyre Fysisk end-point test			(B) Myresyre Kemisk end-point test		(C) Mol-Decalcifier Fysisk end-point test			(D) Mol-Decalcifier Kemisk end-point test	
	Afkalket/ Ikke afkalket	Afkalkningstid / Dage	Test (+Ca/-Ca)	Afkalkningstid / Dage	Test (+Ca/-Ca)	Afkalket/ Ikke afkalket	Afkalkningstid / Dage	Test (+Ca/-Ca)	Afkalkningstid / Dage	Test (+Ca/-Ca)
1	Afkalket	4	+	14	-	Ikke afkalket	>7	+	10	-
2	Afkalket	7	+	14	-	Afkalket	7	-	7	-
3	Afkalket	7	+	14	-	Ikke afkalket	>7	+	>14	+
4	Afkalket	7	+	>14	+	Ikke afkalket	>7	+	>14	+
5	Ikke afkalket	>7	+	14	-	Ikke afkalket	>7	+	>14	+
6	Ikke afkalket	>7	+	>14	+	Ikke afkalket	>7	+	>14	+
7	Afkalket	4	+	6	-	Afkalket	7	-	7	-
8	Afkalket	6	-	6	-	Afkalket	7	-	7	-
9	Ikke afkalket	>7	+	13	-	Ikke afkalket	>7	+	10	-
10	Afkalket	7	+	13	-	Ikke afkalket	>7	+	>14	+

(Skive tykkelsen i mm) Skive nr.	(A) Myresyre / Fysisk end- point test	(B) Myresyre / Kemisk end- point test	(C) Mol- Decalcifier / Fysisk end- point test	(D) Mol- Decalcifier / Kemisk end- point test
1	2	3	3	2
2	3	3	4-5	3
3	2-3	2	4	2-3
4	2-3	6-7	5-6	4-6
5	4	3	4	2-3
6	3	3	4	3
7	2	2	2	2
8	3	3	3	3-4
9	4	3	4	4
10	4	3	4	4-5

(A) Myresyre / Fysisk end-point test



(C) Mol-decalcifier / Fysisk end-point test



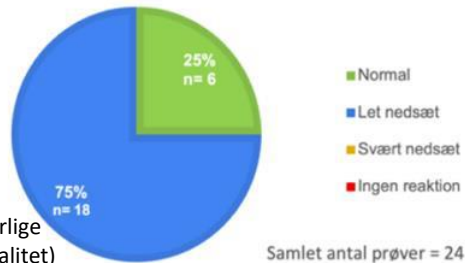




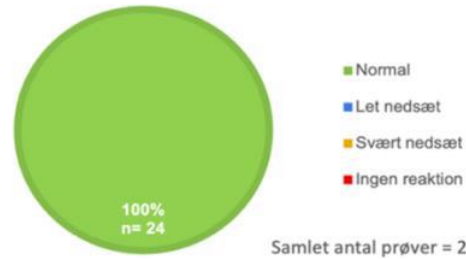
# HE-farvning og vævsmorfologi



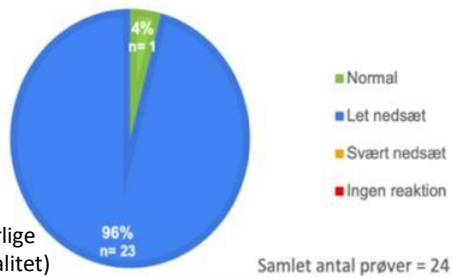
VURDERING AF HE-FARVNING OG MORFOLOGI -  
(A) MYRESYRE / FYSISK END-POINT TEST



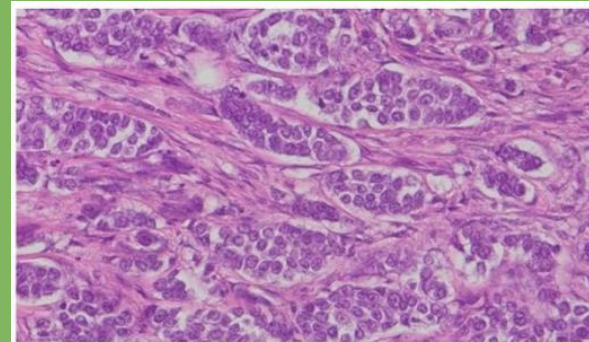
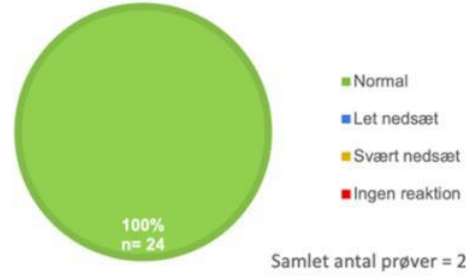
VURDERING AF HE-FARVNING OG MORFOLOGI -  
(C) MOL-DECALCIFIER / FYSISK END-POINT TEST



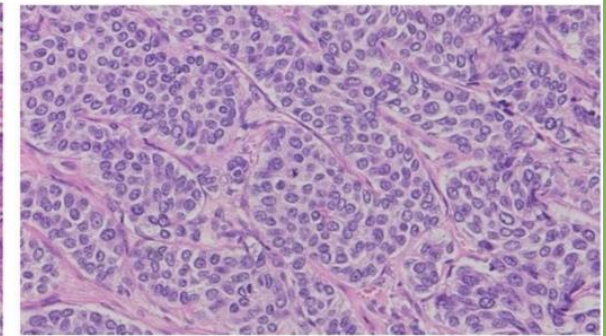
VURDERING AF HE-FARVNING OG MORFOLOGI -  
(B) MYRESYRE / KEMISK END-POINT TEST



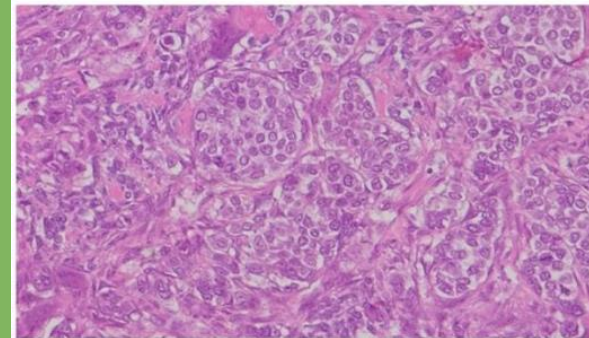
VURDERING AF HE-FARVNING OG MORFOLOGI -  
(D) MOL-DECALCIFIER / KEMISK END-POINT TEST



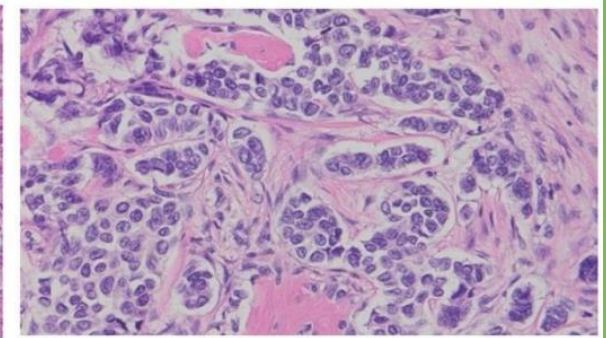
5A - HE (x400 forstørrelse)



5C - HE (x400 forstørrelse)



5B - HE (x400 forstørrelse)



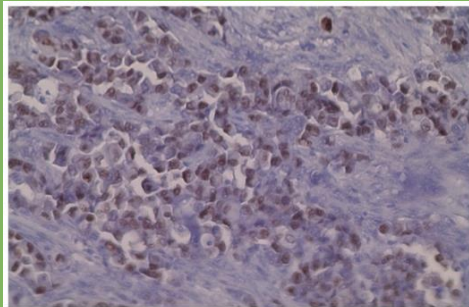
5D - HE (x400 forstørrelse)

(A) Myresyre / Fysisk end-point test  
(B) Myresyre / Kemisk end-point test

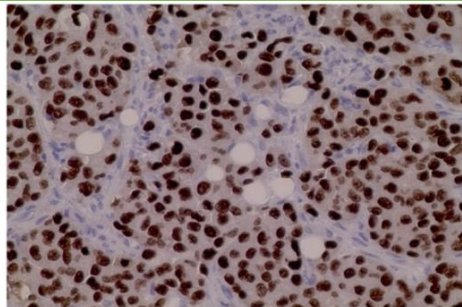
(C) Mol-Decalcifier / Fysisk end-point test  
(D) Mol-Decalcifier / Kemisk end-point test



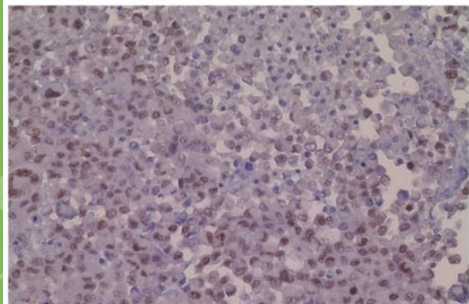
# Immunhistokemiske farvninger



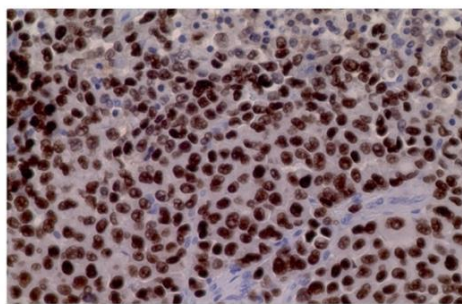
21A - TTF1 (x400 forstørrelse)



21C - TTF1 (x400 forstørrelse)



21B - TTF1 (x400 forstørrelse)

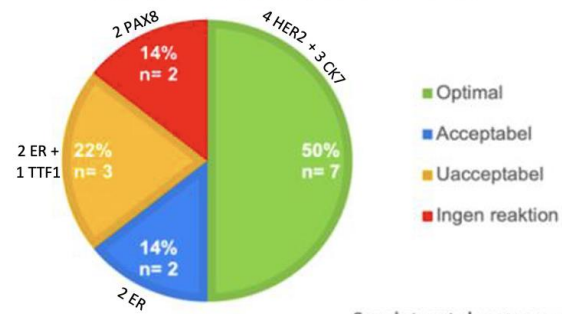


21D - TTF1 (x400 forstørrelse)

(A) Myresyre / Fysisk end-point test  
(B) Myresyre / Kemisk end-point test

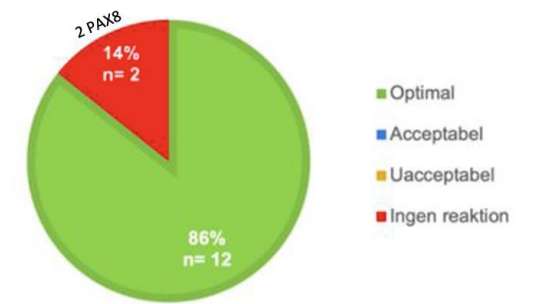
(C) Mol-Decalcifier / Fysisk end-point test  
(D) Mol-Decalcifier / Kemisk end-point test

## VURDERING AF IMMUNFARVNINGER - (A) MYRESYRE / FYSISK END-POINT TEST



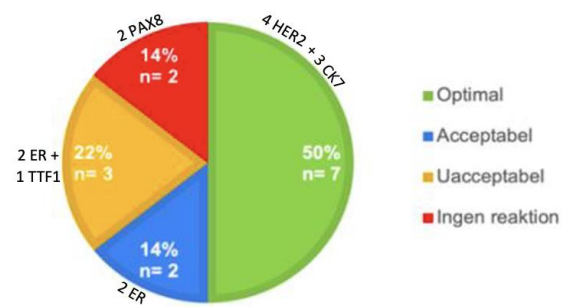
Samlet antal prøver = 14

## VURDERING AF IMMUNFARVNINGER - (C) MOL-DECALCIFIER / FYSISK END-POINT TEST



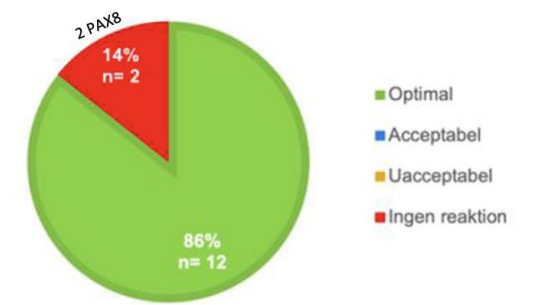
Samlet antal prøver = 14

## VURDERING AF IMMUNFARVNINGER - (B) MYRESYRE / KEMISK END-POINT TEST



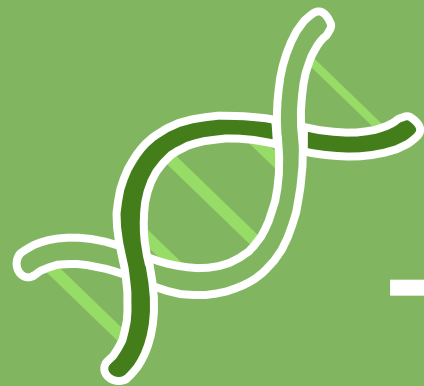
Samlet antal prøver = 14

## VURDERING AF IMMUNFARVNINGER - (D) MOL-DECALCIFIER / KEMISK END-POINT TEST



Samlet antal prøver = 14



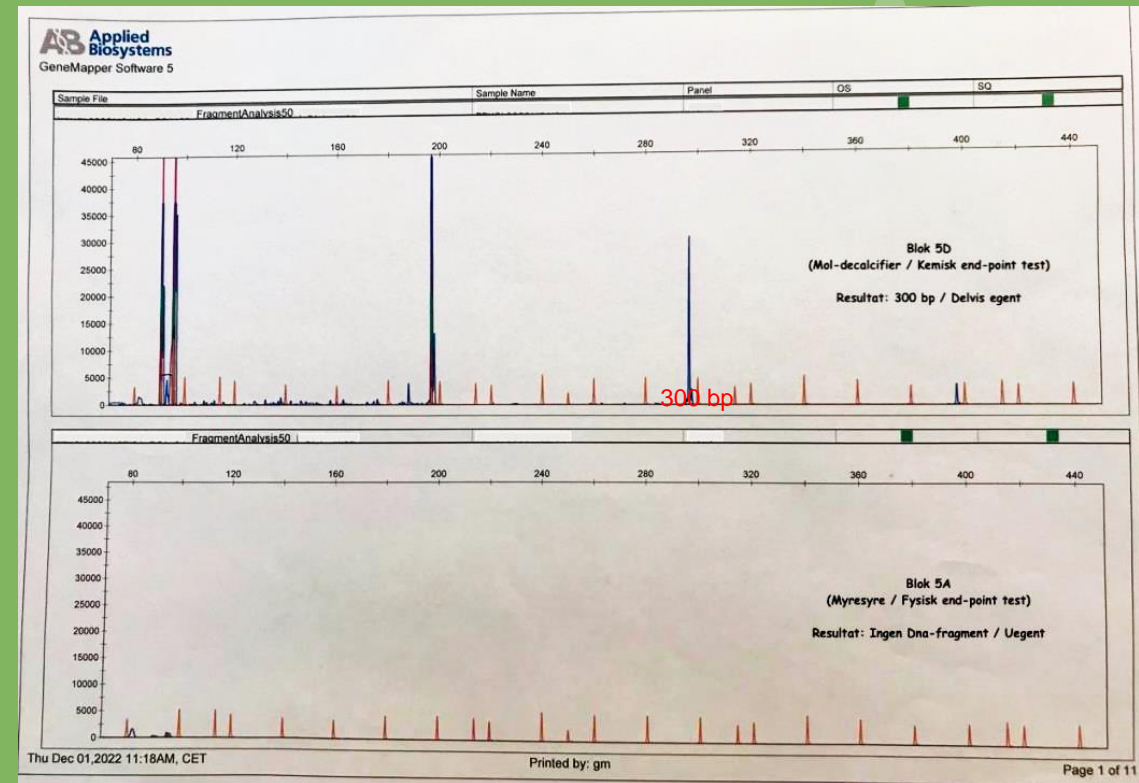


# DNA-kvalitet

Blok nr.	(A) Myresyre / Fysisk end-point test	(B) Myresyre / Kemisk end-point test	(C) Mol-Decalcifier / Fysisk end-point test	(D) Mol-Decalcifier / Kemisk end-point test	(E) EDTA / Kemisk end-point test
5	Uegent	Uegent	300 bp	300 bp	400 bp
12	Uegent	Uegent	Uegent	Meget svag 300 bp	300 bp
20	Uegent	Uegent	Meget svag 300 bp	Meget svag 300 bp	Meget svag 300 bp
21	Uegent	Uegent	Svag 300 bp	Meget svag 300 bp	300 bp

Fragment str.	
Egnet	≥ 400 bp
Delvis egnet	300 bp
Uegent	≤ 300 bp

Pos kontrol	600 bp
Neg kontrol	0



PCR-Comprehensive Assay DNA / RNA

## Ion Reporter

- Home
- Samples
- Analyses
- Workflows
- Admin

Overview Launch My Variants

### Analysis Results

Analysis Name: 22Rig700037030102\_compR\_RNA\_v1\_93f61f85-... Cancer Type: Unknown Fusion: ...  
 Total Unmapped Reads: 4202696 Pool-1 Mapped Fusion Reads: 1087935 Pool-2 Mapped Fusion F

## Ion Reporter

- Home
- Samples
- Analyses
- Workflows
- Admin

Overview Launch My Variants

### Analysis Results

Analysis Name: 22Rig700037030101\_compD\_v1\_21e85565-019... Cancer Type: Unknown MAPD: 0.310 Tumor Cellularity Percentage: 100% (manual)

Summary OncoPrint Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Locus	Genotype	Ref	Type	N. Genes	S...	Exon	Transcript	Coding	Amino Acid Change	Variant Effect
chr3:178952085	A/G	A	SNV	PIK3CA	+	21	NM_006218.4	c.3140A>G	p.His1047Arg	missense
chr12:12870932	A/AG	A	INDEL	CDKN1B	+	1	NM_004064.4	c.160_161insC	p.Glu54GlyfsTer71	frameshiftInsertion
chr17:7579470	CG/C	CG	INDEL	TP53	-	4	NM_000546.5	c.216delC	p.Val73TrpfsTer50	frameshiftDeletion



# Hvornår???

---

- Børn



- Lungekræft



- Ukendt primær tumor !!!!







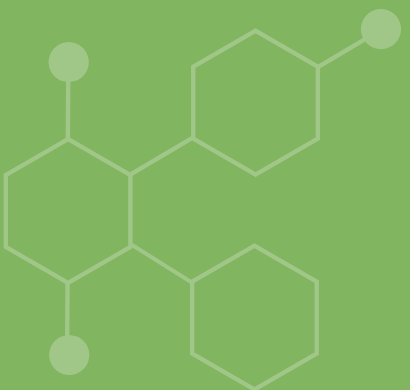
Perspektivering  
Miljø



# Arbejds miljø / affaldshåndtering



Afkalkningsmiddel	Myresyre/formalin	MOL DECALCIFIER
Faresætninger	 Fare: H301+H311+H331 - H314 - H317 - H341 - H350 - H370.	 Fare: H315 - H318
Affaldsgruppe / Bortskaffelse	Gruppe H	Gruppe H
CO2 udledning	???	???





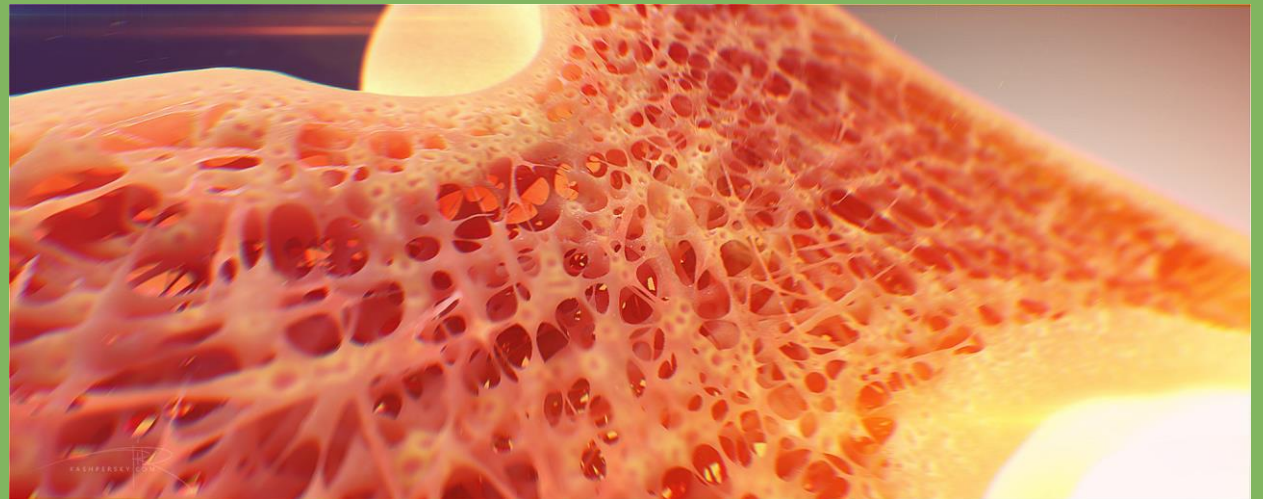
## Konklusion



Ved anvendelsen af Mol-decalcifier opnås:

- bedre analysekvalitet
- bedre bevaret morfologi, antigenisiteten og DNA-kvalitet
- Muligheden for at udføre flere analyser → mere nøjagtig diagnose og mere målrettet behandlingsforløb.
- Afkalkningstid gennemsnitligt 2-3 dage længere end myresyre.
- Mindre sundhedsskadelig og bedre arbejdsmiljø.

Det samlede diagnostiske billede bliver markant forbedret





# Hvad nu?

- Implementering i laboratorie.
- Live-trail.
- Gerne afprøve på Bone-station 😊.





# Tak for opmærksomheden

Har I spørgsmål?

Kontakt info.:

Samah Assi  
[samah.assi.01@regionh.dk](mailto:samah.assi.01@regionh.dk)  
42 34 54 24

Camilla Christine Qvist  
[camilla.qvist@regionh.dk](mailto:camilla.qvist@regionh.dk)  
**21827315**