



Medizinische Universität Graz

## ÖGP / IAP-Austria Frühjahrstagung

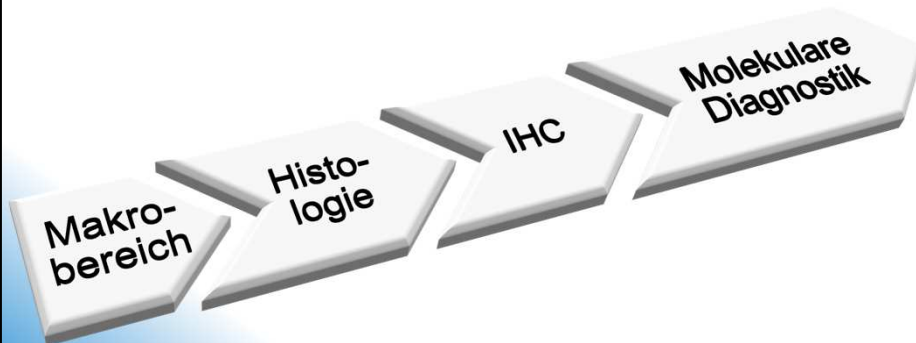
### Molekulares Testing in der Tumorpathologie Tipps, Tricks & Troubleshooting

Silke Jäger  
Pathologie Feldkirch

Martina Wild  
Pathologie Graz

- ❖ Aufschlüsselung intrazellulärer Signalübertragungswege
- ❖ Rasche Zunahme molekularpathologischer Parameter (FFPE-Gewebe)
- ❖ Zugang zu neuen Therapien
- ❖ Verwendung archivierter Paraffinblöcke
- ❖ Archiv – Schatz an genetischer Information

## Weg einer Probe in der Pathologie



Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013

### Makrobereich Fixierung

- ❖ Zellen und Gewebe in natürlichem, momentanen Zustand
- ❖ Bestandteile in Größe, Form unverändert, im normalen Umfeld
- ❖ Moleküleigenschaften, Färbbarkeit, Antigenität und Enzymaktivität nicht verändert
- ❖ Gewebe festigen, schneidbar machen

Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013

## Makrobereich Fixierung

- ❖ Fixierung in neutral gepufferten Formalin (4%)
- ❖ um Autolyse zu verhindern
  - ❖ Gewebe so rasch wie möglich ins Fixans
  - ❖ OP-Präparate gegebenenfalls einschneiden
  - ❖ Bestmögliche Fixierung des Gewebes

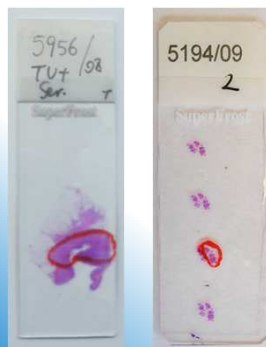
## Makrobereich Problematik

- ❖ Wochenende
- ❖ Spätes Einlangen der OP-Präparate
- ❖ Schlecht oder nicht ausreichend fixiertes Gewebe liefert
  - ❖ Suboptimale Morphologie
  - ❖ Zerstörung oder Beeinträchtigung von Epitopen
- ❖ Verwendung von ungepuffertem Formalin
  - ❖ Ameisensäure kann entstehen – DNA wird zerstört

## Histologie Ablauf

- ❖ Gewebeblöcke werden entwässert
- ❖ Mit Paraffin ausgegossen
- ❖ Geschnitten (3µm) und HE gefärbt
  - ❖ bei Lungenstanzen gleich U-Schnitte mitschneiden (eventuell auch für FISH)
- ❖ Etwaige Sonderfärbungen bzw. IHC

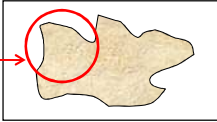
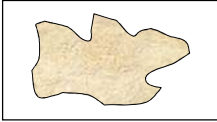

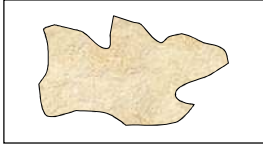
## Molekulare Diagnostik Gewebeauswahl



- ❖ HE Schnitt wird vom Pathologen begutachtet
- ❖ richtige Gewebe?  
KRAS → Colon
- ❖ Tumor / Entzündungsbereich vorhanden
- ❖ Alles oder bestimmtes Areal  
→ markieren

## Molekulare Diagnostik Tumorzellzahl %

Anzahl der Tumorzellen in % wird vom Pathologen angegeben → wichtig für die Wahl der Detektionsmethode

mA 40%			Gesamt HE 10-15%
mA 20%			Gesamt HE ~ 5% ?

Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria Wien, 18. April 2013

## Molekulare Diagnostik Vorbereitung

- ❖ sehr sauberes Mikrotom (Nukleinsäure frei)
- ❖ gekühlter Paraffinblock
- ❖ Objektträger mit markiertem Tumorareal
- ❖ Reaktionsgefäße
- ❖ Sterile Pinzette oder Einmalzahnstocher
- ❖ Einmalskalpell




Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria Wien, 18. April 2013

## Molekulare Diagnostik Durchführung

- ❖ mit dem markierten Schnitt das Tumorareal am Paraffinblock lokalisieren
- ❖ mit Skalpell das Tumorareal markieren
- ❖ den Paraffinblock im Mikrotom einspannen
- ❖ den Schnitt des Tumorareals mit Hilfe einer sterilen Pinzette oder Einmal-Zahnstochern in das Reaktionsgefäß einbringen



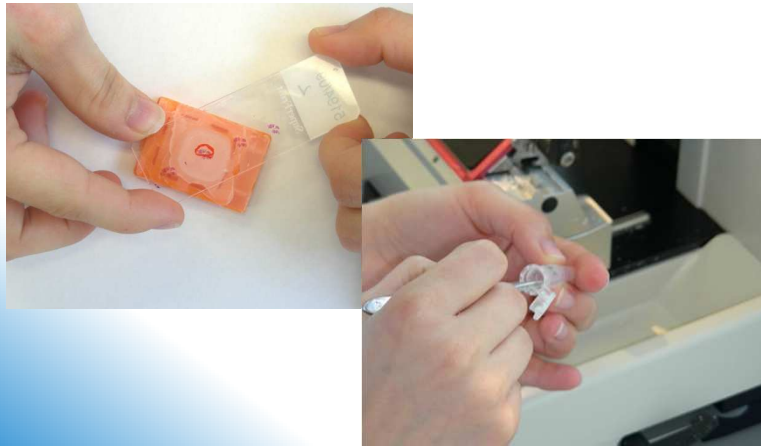
Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013

## Molekulare Diagnostik Achtung!!!

- ❖ Kontamination der Probe vermeiden
  - ❖ nach jeder Probe Mikrotom reinigen
  - ❖ frische Mikrotomklinge benutzen
  - ❖ Werkzeug steril halten
- ❖ Verwechslungen verhindern
  - ❖ Genaue Probenübernahme (Patientenname auf der Zuweisung und am Probengefäß überprüfen)
  - ❖ Verwechslungen beim Schlitze aufziehen verhindern
  - ❖ Anforderung für IHC, MD nochmals alles kontrollieren
    - Name und Probennummer auf der Zuweisung – Nummer am Reaktionsgefäß

## Wie wir es bitte auf keinem Fall machen!



Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013

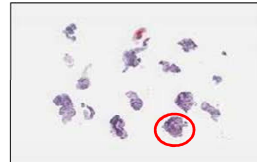
## Molekulare Diagnostik

- ❖ Gewebeverarbeitung - Biopsien
- ❖ Kontamination
  - ❖ „Putzmittel“, räumliche Trennung
- ❖ PCR und Analyse
  - ❖ Kontrollen, Sensitivität, Inhibitoren
- ❖ Schnittstellen

Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013

## Molekulare Diagnostik Biopsien



- ❖ Korrekte Zuordnung außerordentlich wichtig / schwierig  
HE und Block stimmen oft nicht mehr überein

z.B. EGFR Leerschnitte anfertigen

Histologie → HE, IHC → FISH und MD → PCR

- ❖ 1x Anschneiden des Blockes
- ❖ korrekte Entnahme des markierten Areal besser überprüfen
- ❖ Entnahme mittels Kontroll HE nach dem Schneiden absichern

## Molekulare Diagnostik Kontamination



- ❖ Handschuhwechsel
- ❖ Reagenzien
  - ❖ Incidin Liquid (Ecolab) Flächendesinfektionsmittel
  - ❖ LTK 008 License to kill (AL Labortechnik) DNA, RNA, DNase, RNase, Bakterien, Phagen
  - ❖ RNase Away (MBP) RNase und DNA Kontamination
- ❖ UV-Dekontamination
  - ❖ Arbeitsfläche, Pipetten, Extraktionsgeräte
  - ❖ durchgeführt vor / nach Arbeitsschritten, Ende des Tages
  - ❖ Ozonbildung!



## Molekulare Diagnostik Kontamination

- ❖ Räumliche Trennung: PRÄ- und POST PCR Bereich
  - ❖ Bereich für Extraktion
  - ❖ DNA von RNA trennen → eigene Pipettensätze, Tubes, Ständer
  - ❖ „MasterMixRaum“ – nur Reagenzien
  - ❖ PCR-Maschinen / Analyse der PCR-Produkte
- ❖ Aerosole
  - ❖ PCR-Produkten verteilen sich beim Öffnen der Platten/Tubes in der Luft
- ❖ NO-GO: PCR-Produkte in den PRÄ-PCR Bereich zu bringen!

Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013

## Molekulare Diagnostik PCR und Analyse

- ❖ Einfach-, Doppel-, Dreifachansätze
  - ❖ Material, Vorgabe IVD-Kit, Schwierigkeit der Interpretation der Ergebnisse, Kosten – Nutzen Rechnung
- ❖ Kontrollen
  - ❖ Positiv- / Negativ Kontrollen → Ergebnis valide J/N
  - ❖ Translokations-, Erregernachweis → humanes Kontroll Gen ( $\beta$ -Globin, PBGD, G-6PDH, HPRT, ABL...)
  - ❖ Erreger Kits: Interne Kontrollen (IC) werden bei der Extraktion zur Probe beigefügt
- ❖ Inhibitoren - Erkennung

## Molekulare Diagnostik PCR und Analyse

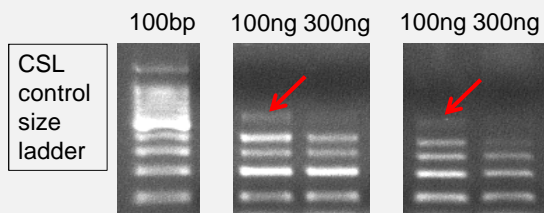
1. Beispiel: Melanomproben  
enthalten häufig Melanin (Farbstoff) = Inhibitor

DHPLC: → schlechtes / kein Ergebnis  
Pyrosequenzieren: zusätzliche Aufreinigung  
durch Vakuumpräparation → gute Ergebnisse



2. Beispiel: Klonalität  
2 Konzentrationen

↑ eingesetzte DNA  
= ev. ↑ an Inhibitoren



## Molekulare Diagnostik PCR und Analyse

- ❖ PCR Zyklusanzahl: Limitierung nach oben ~ 40/45 Zyklen
  - ❖ kann zu falsch positiven Ergebnissen führen
- ❖ Nested PCR → Erhöhtes Kontaminationsrisiko
  - ❖ Material überführen von der I. in die II. PCR
- ❖ Kontrolle der Methode mit Hilfe anderer Assays
  - ❖ Backup-Methode: JAK2 V617F DHPLC / RealTime quantitativ
- ❖ Sensitivität einer Methode kennen → Grenzen
  - ❖ Welche Mindestmenge an Tumorzellen, DNA/RNA, muss man einsetzen um eine optimale Sensitivität erreichen zu können?
  - ❖ Was kann passieren, wenn man weniger einsetzt?

## Molekulare Diagnostik PCR und Analyse

1. Beispiel: BCR-ABL Quantifizierung  
Referenzgen ABL (RNA Qualität)  
10.000 ABL Kopien → optimale Sensitivität

Pat: 1.000 ABL Kopien → NICHT VALIDE!

RNA Qualität zu schlecht um eine korrekte Aussage zu treffen  
→ nicht verwertbar

2. Beispiel: Klonalität  
100ng und 300ng DNA → optimale Sensitivität

Pat: 20ng  
Ergebnis: ~ prominenter Peak → KLONAL / PSEUDOKLONAL?

Ausgangspool an Zellen ev. nicht repräsentativ  
→ Einzelzellen vermehrt?

## Molekulare Diagnostik Schnittstellen

Pathologe A markiert Areal → BMA A schneidet + extrahiert  
BMA B macht PCR und Analyse → Pathologe B befundet mit BMA B

- ❖ Kommunikation
- ❖ Informationstransfer
- ❖ Vermeidung von Informationsverlust
- ❖ ausführende BMA in den Befundungsprozess mit einbinden  
→ 4 Augen Prinzip
- ❖ Korrelation herstellen zwischen der histologischen Beschreibung, Material (Menge, Qualität) und den Ergebnissen aus IHC, MD



**Makro-bereich**   **Histo-logie**   **IHC**   **Molekulare Diagnostik**

**Herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!**

silke.jaeger@lkhf.at  
+43 5522 303 3420

martina.wild@medunigraz.at  
+43 316 385 80044

Frühjahrstagung ÖGP / IAP-Austria

Wien, 18. April 2013