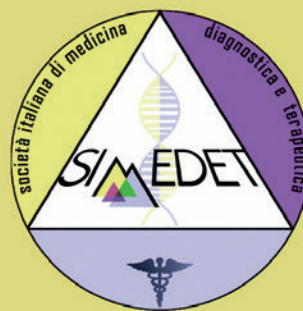


I J P
D T M



"organo ufficiale della"

**SOCIETÀ ITALIANA DI MEDICINA
DIAGNOSTICA E TERAPEUTICA**



VOLUME 2 - NUMERO 2

2019



SIMEDET.EU



PODCAST

Italian Journal of Prevention, Diagnostic and Therapeutic Medicine (IJPDTM)

*Italian Journal of Prevention, Diagnostic and Therapeutic Medicine
IJPDTM Vol2. N°2. 2019. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2019 Simedet. All rights reserved.*

SAFECAPSULE: INNOVATIE IN PATHOLOGISCHE ANATOMIE VOOR HET BEHEER VAN CHEMISCHE EN KLINISCHE RISICO'S IN MEDISCHE INSTELLINGEN

Martina Verri¹, Anna Crescenzi¹, Carmelo Lupo², Roberto Virgili¹

SAMENVATTING

Formaldehyde, een van de belangrijkste fixeermiddelen in de gezondheidssector, is met de EU verordening nr. 895/2014 geherclassificeerd als kankerverwekkende en mutagene stof.

Aangezien er geen geldige alternatieven beschikbaar zijn voor het fixeren van biologische monsters die bestemd zijn voor microscopisch onderzoek, hebben producenten een aantal met formaline voor-ge vulde apparaten met afgifte bij de sluiting op de markt gebracht, die echter verschillende problemen ten aanzien van logistiek en gebruik blijken te vertonen.

Voor een doeltreffend formalinebeheer in overeenstemming met de geldende voorschriften hebben de Università Campus Bio-medico in Rome en het bedrijf Diapath een nieuw apparaat met CE-IVD-markering ontwikkeld: "SafeCapsule". Dit apparaat bestaat uit een houder met een blauwe schroef dop, die vooraf gevuld is met bufferoplossing, en een rode veiligheidscapsule die geconcentreerd fixeermiddel bevat. Het doel van de studie was om de kwaliteiten en de veiligheid van de SafeCapsule tijdens de

werkpraktijk op de pathologische anatomieafdeling te beoordelen. Hiervoor werden een vragenlijst en een serie laboratoriumtests gebruikt. Medische zorgverleners vonden de SafeCapsule ergonomisch, praktisch, gebruikersvriendelijk en 100% veilig.

Uit laboratoriumtests bleek het volgende: behoud van celmorphologie en kleureigenschappen van cellulaire componenten; afwezigheid van fixatie-artefacten; toegankelijkheid van nucleaire, cytoplasmatische en membraan-antigenen; behoud van de bindingsspecificiteit van de sondes in FISH-onderzoeken (herschikking van de ALK- en ROS1-genen, amplificatie van het HER2-gen) en uitvoerbaarheid van moleculair onderzoek (mutaties van het EGFR-gen) dankzij de zuiverheid en de kwaliteit van het geëxtraheerde DNA.

Concluderend kan worden gezegd dat de SafeCapsule:

- chemisch en klinisch risico in vrije omgeving elimineert;
- de technische problemen in samenhang met conventionele apparaten heeft overwonnen;
- een uitstekende fixatie van biologische monsters verzekert, basisvoorwaarde voor een correcte diagnose.

¹UOC pathologische anatomie, Policlinico Universitario Campus Bio-medico, Rome,

²DIAPATH S.p.A, Martinengo (BG)

Sleutelwoorden: Formaldehyde, chemisch/ klinisch risico, SafeCapsule, Pathologische anatomie

This article was published on June 24, 2019, at SIMEDET.EU .
doi.org/10.30459/2019-10 Copyright © 2019 SIMEDET.

ABSTRACT

Formaldehyde, as main fixative of choice in medical services, was reclassified as cancerous and mutagen by European Directive N. 895/2014.

Suitable substitutes to formaldehyde do not exist at the time, so industry has proposed a set of closed-circuit safety devices pre-filled with formalin.

These devices have shown a lot of technical failure, so the University Campus Bio-medico in collaboration with Diapath company have developed "SafeCapsule", in order to promote an effective management of formalin use in compliance with safety measures and directives.

SafeCapsule (patent pending) is composed by a blue screwcap container pre-filled with buffer solution and a safety red capsule pre-filled with concentrate fixative solution.

The aim of the work is to evaluate all intrinsic SafeCapsule features into the normal work routine. For operators of medical services, SafeCapsule is ergonomic, very handy, safe and easy to use. All lab tests have shown:

- intact cell morphology and cell features staining;
- accessibility of nuclear, cytoplasmic and membrane antigens;
- unaltered probe's specificity on DNA sites investigated (as ALK e ROS1 rearrangements, HER2 amplification) in FISH tests;
- good results in molecular investigations (EGFR mutations).

In conclusion SafeCapsule enables the great fixation of biological samples for right histological examinations; the elimination of chemical and clinical risk into the work place and the overcoming of technical failure of conventional devices.

INLEIDING

Formaldehyde, een kleurloos gas met een penetrante en irriterende geur, wordt geproduceerd en op de markt gebracht als een waterige oplossing met de naam formaline. Het is het fixeermiddel bij uitstek, omdat het gemakkelijk verkrijgbaar is, weinig kost, stabiel is (indien bewaard bij normale temperatuur en beschermd tegen direct zonlicht), ervoor zorgt dat celmorfologie en weefselarchitectuur behouden blijven en gestandaardiseerde protocollen voor histochemisch, immunohistochemisch en moleculair onderzoek garandeert.

Met de EU-verordening nr. 895/2014 is formaldehyde echter geherclassificeerd als kankerverwekkende (categorie 1B) en mutagene (categorie 2) ⁽¹⁾ stof.

Er is vandaag de dag geen fixeermiddel voorhanden dat een geldig alternatief vormt voor formaldehyde. Daarom was het noodzakelijk het risicobeoordelingsdocument bij te werken overeenkomstig de aanwijzingen in titel IX van wetsdecreet 81/08 en technisch-organisatorische en procedurele maatregelen te treffen overeenkomstig de richtlijnen van het ministerie van Volksgezondheid (Richtlijnen Ministerie van Volksgezondheid CSS mei 2015: Traceerbaarheid, verzameling, transport, archivering en bewaring van cellen en weefsels voor diagnostische onderzoeken voor pathologische anatomie) ⁽²⁾ en het aanbevelingsdocument dat is opgesteld door de Società Scientifica di Anatomia Patologica (Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van formaline, geherclassificeerd als "kankerverwekkend"- Richtlijnen SIAPEC-IAP Italiaanse divisie februari 2016) ⁽³⁾.

Om het risico van blootstelling aan formaline en formalinedampen in een vrije omgeving te elimineren of tot het minimum te beperken, hebben producenten verschillende oplossingen op de markt gebracht, bestaande uit "vacuüm" houders met formaline-afgifte bij sluiting. In de dagelijkse praktijk blijken dergelijke houders tal van technische problemen te vertonen, zoals:

1. Grotere afmetingen dan conventionele houders, met logistieke problemen en moeilijkheden bij opslag in het magazijn als resultaat;

2. Instabiliteit van de houder doordat het gewicht in het bovenste gedeelte van de houder geconcentreerd is;

3. Afwezigheid van vloeistof voor het spoelen van tang/naald en afgifte van het biologische monster op het moment van afname;

4. Het is onmogelijk om meerdere afgenomen monsters in een enkele houder bij elkaar te doen na de afgifte van de formaline;

5. Utdrogen van het biologische monster in het geval de afgifte van formaline uitblijft;

6. Problemen bij het bekijken van het monster in de houders met olieachtige gel.

Om de vele problemen van de bestaande apparaten te overwinnen en een doeltreffend beheer van formalinevolgensdenieuweveiligheidsvoorschriften mogelijk te maken, is er een nieuw apparaat voor het verzamelen, bewaren en/of transporteren van biologische monsters ontwikkeld.

Dit apparaat, “SafeCapsule” genoemd, valt onder een patent van de Università Campus Bio-Medico in Rome en het bedrijf Diapath. Na de CE-IVD-markering voor gebruik als medisch hulpmiddel te hebben verworven, is het apparaat in oktober 2018 op de markt gebracht.

Het bestaat uit 2 houders die gescheiden zijn maar aan elkaar kunnen worden gekoppeld:

1. Houder A, die een bepaalde hoeveelheid niet-toxische gebufferde oplossing bevat om de biologische monsters te huisvesten en die geschikt is voor gebruik in een vrije omgeving, zonder chemische afzuigkap;

2. Houder B, die een geconcentreerde fixeeroplossing bevat die giftig/schadelijk is voor de mens.

Het fixeermiddel wordt “in situ” verkregen door het vermengen van de twee oplossingen nadat de van de patiënt afgenomen biologische monsters in de bufferoplossing zijn geplaatst. De twee oplossingen worden vermengd door de houder 2 met de hand vast te schroeven op de houder 1.

Dit systeem biedt verrassende voordelen in vergelijking met conventionele houders, en laat de technische problemen van deze apparaten achter zich. Bovendien is een totale afwezigheid van contact tussen de gebruiker en toxische en schadelijke stoffen en dampen gegarandeerd.

Afbeelding 1. Safecapsule



DOELSTELLINGEN

In overeenstemming met SSPP van de Campus Bio-Medico is een aantal testexemplaren van de SafeCapsule verstrekt, in primis om een oordeel van de gebruikers te verkrijgen ten aanzien van de kwaliteiten en de functionaliteit van het apparaat in de werkp praktijk.

In secundis werd een beoordeling gemaakt van de morfologische conservatie en de biochemische en moleculaire eigenschappen van de monsters (afgenomen van verschillende organen en stelsels) na fixatie in de SafeCapsule.

METHODEN

De “SafeCapsule” werd geïntroduceerd in de werk routines van de chirurgische afdelingen en laboratoria van de pathologisch-anatomische kliniek van de Policlinico Universitario Campus Biomedico.

Om hun beoordeling te geven ontvingen medewerkers een evaluatieformulier om in te vullen. Na het inzamelen van deze vragenlijsten werd een database gemaakt waaruit belangrijke gegevens konden worden geëxtrapoleerd met betrekking tot

de kwaliteiten en functionaliteiten van het apparaat die door de medewerkers het meest op prijs werden gesteld.

Het laboratorium voor pathologische anatomie beschikt over een veiligheidssensor die formalinedampen kan detecteren. Op het moment van aflevering in het laboratorium werden de houders in de buurt van de sensor op de intake tafel gezet om te zien of er dampen werden gedetecteerd.

Na de intake werden de biologische monsters op de gebruikelijke wijze verwerkt en is gekeken naar het vermogen van de SafeCapsule om een adequate conservatie en fixatie van de monsters te garanderen.

Om een correcte histologische diagnose mogelijk te maken en om veranderingen in de structurele kenmerken van het onderzochte weefsel te voorkomen, is een volledige en perfecte fixatie van het biologische monster een basisvoorwaarde ⁽⁴⁾. Om deze reden werd de microscopische evaluatie van weefselmorfologie en -architectuur uitgevoerd aan de hand van laboratoriumtests zoals hematoxyline-eosinekleuring en speciale histochemische kleuringen zoals Giemsa, PAS, Perls, Trichrome kleuring van Masson (DIAPATH kleuringkits).

Een andere analyseprocedure die is uitgevoerd op de monsters waarvoor de SafeCapsule werd gebruikt, is de immunohistochemische test. Deze werd uitgevoerd op paraffine-coupees van de monsters die werden verwerkt om de expressie van specifieke cellulaire eiwitten, hun conservatie en de afwezigheid van fixatie-artefacten (die de toegankelijkheid tot het antigeen door het specifieke, gedurende de reactie gebruikte antilichaam kunnen belemmeren) te beoordelen. De immunohistochemische tests werden uitgevoerd op het geautomatiseerde instrument Dako Autostainer OMNIS, en gedurende de test werden de volgende antigenen beoordeeld:

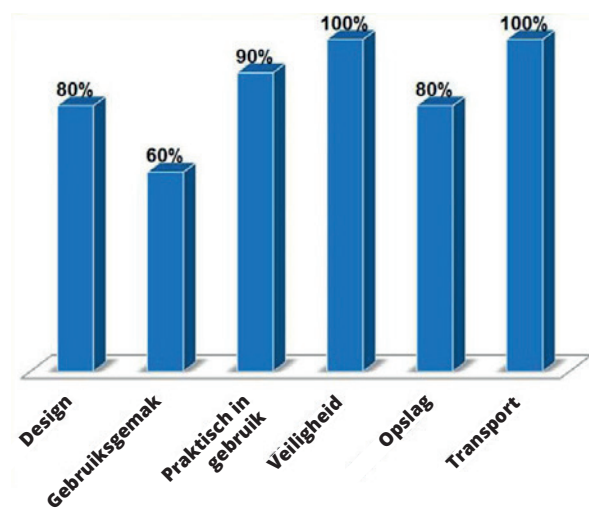
- Nucleair: Receptor voor oestrogeen of ER, receptor voor progesteron of PGR, Ki67, p63, GATA3;
- Cytoplasmatisch: cytokeratinen met een hoog en laag molecuulgewicht of CK, Racemase, Hepar1;
- Membraan: Epitheliaal membraan-antigeen of EMA, CD3, Her2neu.

Op monsters van borst- en longweefsel werd ook een zogeheten FISH-analyse (Fluorescence In Situ Hybridization) uitgevoerd om de aanwezigheid of afwezigheid van herschikking van de ALK- en ROS1-genen te detecteren en lokaliseren (FISH sondekit), iets wat nuttig is voor het karakteriseren van longcarcinoom ⁽⁵⁾, en de amplificatie van het Her2neu-gen (PathVision Probe Kit), essentieel voor het karakteriseren van borstcarcinoom ⁽⁶⁾.

Tot slot zijn onderzoeken van het moleculaire type gedaan, waarbij in primis de zuiverheid en de kwaliteit van het geëxtraheerde DNA van de in de SafeCapsule gefixeerde monsters werd beoordeeld (QIamp DNA FFPE TISSUE QIAGEN) en in secundis werd gezocht naar de voornaamste mutaties van het EGFR-gen met behulp van de PCR-techniek (Easy EGFR Diatech Pharmacogenetics-kit).

RESULTATEN

Na inzameling van de uitgedeelde vragenlijsten zijn de gegevens uitgezet in histogrammen:



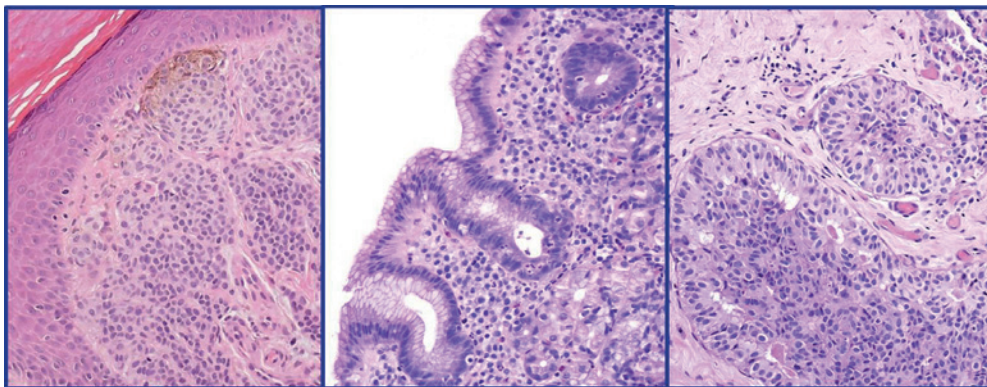
AFB.2 HISTOGRAM VAN DE VERZAMELDE GEGEVENS VOOR DE SAFECAPSULE

Na een beoordeling van de via de vragenlijsten verkregen gegevens wordt duidelijk dat de SafeCapsule:

- in de werkp praktijk ergonomisch, praktisch en gebruikersvriendelijk blijkt te zijn;
- een integriteit van 100% en een perfecte afdichting vertoont, er komt tijdens het transport geen formaline vrij en/of er doet zich geen verlies van biologisch materiaal voor;
- Het gebruik is 100% veilig gebleken, zonder vrijkomende dampen;
- Het apparaat bijzonder op prijs werd gesteld door de medische zorgverleners.

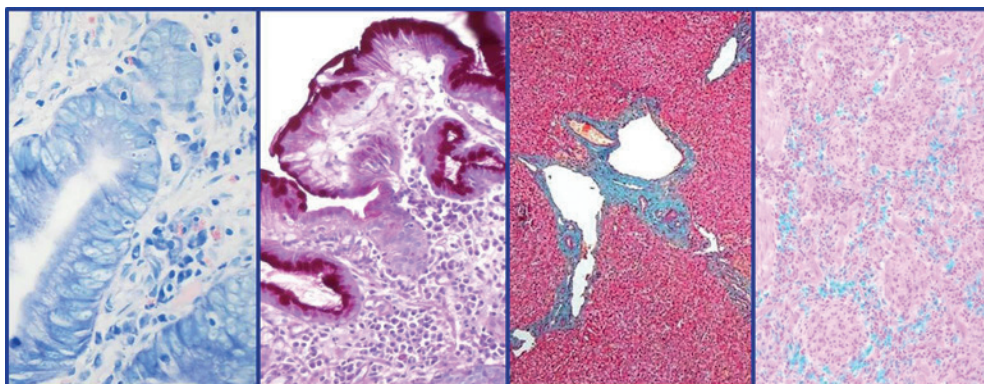
Er geen aanwezigheid van formaldehydegas in de omgevingslucht is vastgesteld.

Bij onderzoek onder de microscoop was in alle onderzochte gevallen de cellulaire morfologie van hoge kwaliteit met behoud van de kleureigenschappen van de cellulaire componenten (basofilie en acidofilie) en met een hoge resolutie in de weergave van de voor diagnose relevante kenmerken.



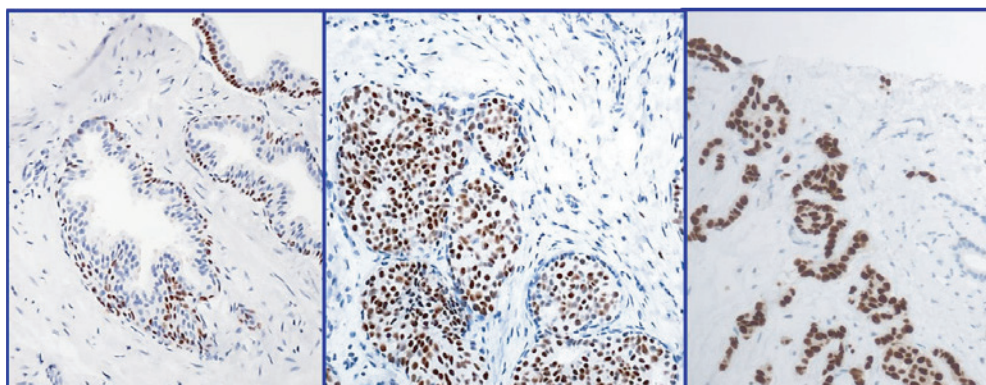
AFB.3 EE-KLEURING OP HUID, MAAGBIOPSIE EN LEVERBIOPSIE

Ook de histochemische kleuringen, gebruikt om specifieke cellulaire bestanddelen te markeren, bleken perfect uitvoerbaar te zijn en consistente resultaten op te leveren, met een uitstekende handhaving van de kleureigenschappen.

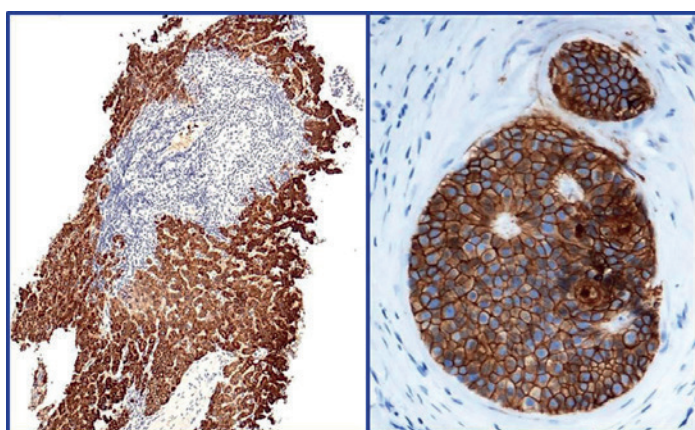


AFB.4 SPECIALE HISTOCHEMISCHE KLEURINGEN: GIEMSA. PAS, TRICHROME KLEURING VAN MASSON EN PERLS

Uit de immunohistochemische tests is een perfect behoud van het antigeen en zijn toegankelijkheid gebleken, alsmede een hoge signaalzuiverheid zonder aanwezigheid van aspecifieke kleuringachtergrond.

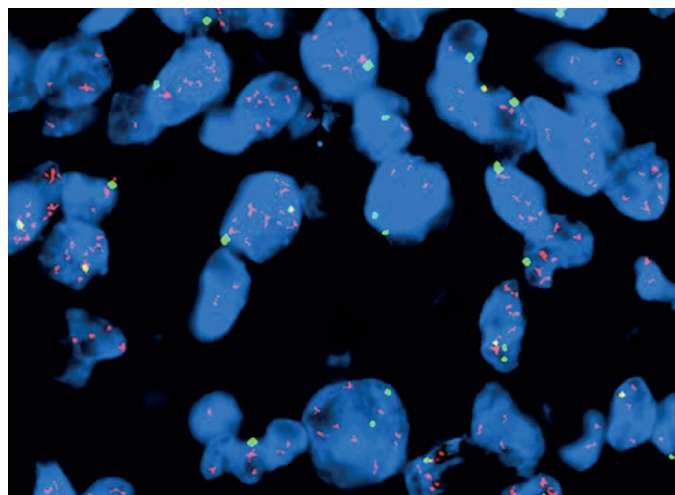


AFB.5 IMMUNOHISTOCHEMISCHE REACTIES VOOR NUCLEAIRE ANTIGENEN (P63, ER, GATA3)



AFB.6 IMMUNOHISTOCHEMISCHE REACTIES VOOR HET CYTOPLASMISCHE ANTIGEN, HEPAR1, EN MEMBRAAN-ANTIGEN, HER2NEU

De FISH-test bleek uitvoerbaar met uitstekend behoud van de bindingsspecificiteit van de sondes.



AFB.7 FISH VOOR AMPLIFICATIE VAN HET HER2NEU-GEN

Verder vertoonde het uit gefixeerde biologische monsters geëxtraheerde DNA een goede concentratie en A260/280-verhouding en bevestigden daaropvolgende mutatie-analyses dat de met SafeCapsule gefixeerde monsters perfect bruikbaar zijn voor moleculair onderzoek.

BESPREKING

De veiligheid van de werkplek is een actueel en bijzonder belangrijk thema. In de gezondheidssector zijn werknemers vaak blootgesteld aan potentieel schadelijke stoffen, denk aan de bereiding van chemotherapeutische geneesmiddelen of, zoals in het geval van histologisch onderzoek, het gebruik van aldehyde-fixeermiddelen. In werkruimtes waar routinematig formaldehyde wordt gebruikt, worden over het algemeen chemische afzuigkappen gebruikt voor het hanteren van monsters.

Dergelijke apparaten zijn, in verband met de beschikbare ruimte en kostenaspecten, echter niet toepasbaar in behandelruimtes, endoscopiekamers of operatiekamers, waar de monsters worden verzameld en in fixeermiddel worden geplaatst. Vandaar de noodzaak tot het ontwikkelen van vooraf gevulde houders met afgifte na sluiting, die het vrijkomen van formalinedampen uitsluiten.

In de afgelopen jaren werden vele verschillende apparaten op de markt gebracht, waarvan het merendeel gebaseerd is op houders met een vacuümkamer waarin het monster wordt geplaatst en een kamer met formaline, die na het sluiten van het apparaat vrijkomt om het monster te fixeren. Hoewel deze oplossing over het algemeen effectief is in termen van milieubescherming, blijkt het gebruik ervan ingewikkeld, zowel om logistieke redenen (verdubbeling van de totale afmetingen) als vanwege praktische problemen, zoals moeilijkheden bij het inbrengen van het monster in de vacuümkamer en de onmogelijkheid om een tweede monster in te brengen nadat het fixeermiddel eenmaal is afgegeven.

Niet op de laatste plaats moet er rekening mee worden gehouden dat wanneer het fixeermiddel niet wordt afgegeven, vanwege een defect of door vergeetachtigheid, het monster onherstelbaar wordt beschadigd door uitdroging. Het SafeCapsule-project, waarop patent is aangevraagd, heeft al deze moeilijkheden overwonnen door een niet-schadelijk (geen pictogrammen nodig) en gebufferd vloeibaar

deel te scheiden van een geconcentreerd toxisch deel, dat pas wordt toegevoegd na voltooiing van de procedures voor monsterafname bij de patiënt. Na het vastschroeven van de bovenste capsule worden de twee stoffen onmiddellijk met elkaar vermengd, opdat de productie van het fixeermiddel “in situ” compleet en snel is. De studies die we hebben uitgevoerd naar de morfologie, het behoud van antigene eigenschappen en de handhaving van de vereisten voor moleculair onderzoek en FISH hebben aangetoond dat de formaline-oplossing, gereconstitueerd op het moment dat de SafeCapsule wordt gesloten, over alle kwaliteiten beschikt die noodzakelijk zijn voor moderne histologische diagnostiek en absoluut vergelijkbaar is met formaline-oplossingen die al kant en klaar zijn op het moment van gebruik. Dit gegeven wordt met name belangrijk als wordt gekeken naar de talrijke moleculaire pathologie-onderzoeken die momenteel vereist zijn op met formaline gefixeerd en in paraffine ingesloten materiaal ⁽⁷⁾.

Iets wat bijzonder opviel, was de tevredenheid van de werknemers over het gebruiks- en transportgemak die uit de vragenlijst bleek. Het meest gewaardeerde aspect was de veiligheid, getest aan de hand van een speciale sensor, afgesteld volgens de internationale normen.

CONCLUSIES

Concluderend kunnen we stellen dat:

- De SafeCapsule bijzonder op prijs werd gesteld door medische zorgverleners vanwege zijn transportveiligheid, praktische gebruik en veiligheid. Het apparaat isolatie van schadelijke componenten in een vrije omgeving mogelijk maakt, waardoor het chemische en klinische risico wordt geëlimineerd;

- De kwaliteit en functionaliteit van de SafeCapsule overwinnen de logistieke en technische problemen van conventionele apparaten;
- SafeCapsule verzekert een optimale conservatie en fixatie van biologische monsters, een basisvoorwaarde voor een correcte histologische diagnose.

BIBLIOGRAFIE

- 1- Verordening (EU) nr. 605/2014 van de Europese Commissie van 5 juni 2014 tot wijziging van, met het oog op de invoering van gevaarenindicaties en veiligheidsaanbevelingen (...) van de Europese verordening nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels.
- 2- Italiaans Ministerie van Volksgezondheid – Consiglio Superiore di Sanità Sezione I : Linee Guida Tracciabilità, Raccolta, Trasporto, Conservazione e Archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di Anatomia Patologica (Richtlijnen voor traceerbaarheid, verzameling, transport, archivering en bewaring van cellen en weefsels voor diagnostische onderzoeken voor pathologische anatomie).
- 3- Note relative all'utilizzo della formalina, ri-classificata "cancerogena" - Linee di indirizzo SIAPEC-IAP Divisione Italiana (februari 2016) (Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van formaline, geherclassificeerd als "kankerverwekkend"- Richtlijnen SIAPEC-IAP Italiaanse divisie februari 2016) (3.)
- 4- Donczo B, Guttman A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Jun 5;155:125-134. doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.065. Epub 2018 Apr 2. Review. PubMed PMID: 29627729.
- 5- Barbareschi M, Barberis M, Buttitta F, Doglioni C, Fiorentino M, Fontanini G, Franco R, Marchetti A, Rossi G, Troncone G. Predictive markers in lung cancer: a few hints for the practicing pathologist. *Pathologica.* 2018 Mar;110(1):29-38. Review. PubMed PMID: 30259911.
- 6- Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017 Mar 18;389(10074):1134-1150. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8. Epub 2016 Nov 17. Review. PubMed PMID:27865536.
- 7- Fairley JA, Gilmour K, Walsh K. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *Curr Drug Targets.* 2012 Nov;13(12):1475-87. Review. PubMed PMID: 22974391.