

Literatur

1. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. Methods 2014; in press. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.01.022.
2. Cheung CC, *et al.*, Canadian Association of Pathologists–Association canadienne des pathologistes National Standards Committee for High Complexity Testing/Immunohistochemistry. Guidelines for the preparation, release, and storage of unstained archived diagnostic tissue sections for immunohistochemistry. Am J Clin Pathol 2014; 142: 629-633.
3. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med 2011; 135: 537-543.
4. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. Am J Surg Pathol 2000; 24: 1016-1019.
5. Khoury T, *et al.* Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol 2009; 22:1457-1467
6. Qiu J, *et al.* Effect of delayed formalin fixation on estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a study of three different clones. Am J Clin Pathol 2010; 134: 813-819.
7. Fox CH, *et al.* Formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem 1985; 33: 845-853.
8. Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS). Leitfaden des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Immunhistologie. Dokument 71 SD 4 028 (Rev. 1.2) vom 10. November 2013.
<http://www.dakks.de/content/pathologie-0>
9. Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS). Anhang zum Leitfaden des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Immunhistologie. Dokument 71 SD 4 028 A1 (Rev. 1.0) vom 10. November 2013.
<http://www.dakks.de/content/pathologie-0>
10. Kreienberg R, *et al.* Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. AWMF-Register-Nummer: 032-045OL – Kurzversion 3.0, Juli 2012. Senologie 2013; 10(3): 164-192.
11. Hammond ME, *et al.* Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2011; 29(15): e458.
12. Wolff AC, *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. Arch Pathol Lab Med 2014; 138(2): 241-256.
13. Nielsen S. Immunohistochemistry – Review of the technical test approach. NordiQC Workshop in Diagnostic Immunohistochemistry, Aalborg University Hospital, 18-20 September 2013.
<http://www.nordiqc.org/>

Informationen aus erster Hand
www.medac-diagnostics.de



Leitfaden zur Fixierung von Gewebeproben in „Formalin“ – was ist zu beachten?

Bei der Qualitätssicherung und Standardisierung der Immunhistochemie spielen die präanalytischen Schritte, insbesondere die Gewebefixierung, eine entscheidende Rolle. Falsche Fixierung kann die Ursache sein für

- falsch-negative Ergebnisse (keine oder sehr schwache Anfärbung durch Antigenverlust)
- unerwünschte, erhöhte Hintergrundfärbung
- unpräzise (verwaschene), zu blasse bzw. nicht korrekt lokalisierte Immunreaktivität
- Risse im Gewebe (hartes Gewebe) oder anderweitig schlechte Morphologie
- schlechte Erhaltung der Morphologie, insbesondere nach Epitopdemaskierung
- mangelnde Haftung der Gewebeschnitte auf dem Objektträger (Abschwimmen)
- Antigenverlust bei längerer Lagerung des Paraffinblocks (Oxidationsprozess)

Doch was heißt „falsche Fixierung“?

- Zu kurze Fixierung
- Verzögerte Fixierung (nach Gewebeentnahme)
- Falsches Fixativ

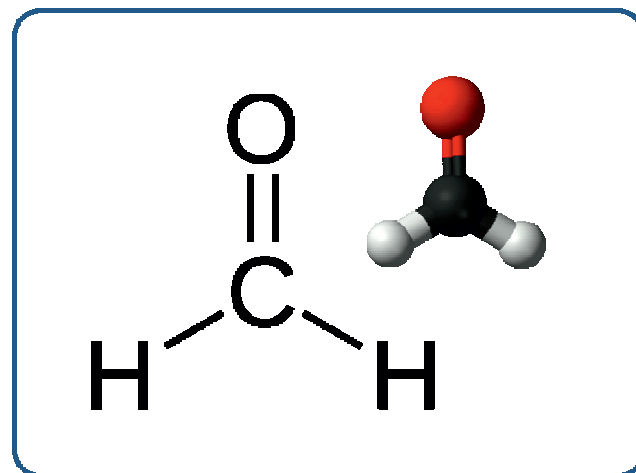
Externe Qualitätssicherungsprogramme wie z.B. NordiQC betonen in ihren Empfehlungen ausdrücklich, dass in der Routine eine **zu kurze (inkomplette) Fixierung** das Hauptproblem darstellt. Je nach Zuschnitt des Gewebes (Gewebedicke etwa 5 mm) sollte die Fixierungszeit, also die Verweildauer der Gewebeprobe in 10% neutral-gepuffertem Formalin (*engl. 10% NBF, neutral-buffered formalin*), **keinesfalls kürzer als etwa 8 Stunden** betragen. Um eine „Unterfixierung“ zu vermeiden wird empfohlen, Gewebeproben von etwa 5-10 mm Durchmesser besser 16-24 Stunden bei Raumtemperatur zu fixieren (Ref. 13)

Pathologische Labors sollten auch auf ihre Einsender einwirken, dass die Zeit zwischen Gewebeentnahme und Überführen in ein Gefäß mit frischem Fixativ möglichst nicht länger als **30 Minuten** beträgt. Diese Verzögerung, auch als **warmer Ischämiezeit** bezeichnet, kann eine Ursache für falsch-negative Ergebnisse sein. Möglichst kurze Ischämiezeiten sollten stets sichergestellt werden, wenn nötig mit logistischer Unterstützung der Einsender, z.B. durch Bereitstellung mit geeignetem Fixativ gefüllter Probengefäße. Fixierungszeiten sind möglichst zu dokumentieren.

Die obigen Empfehlungen bilden die Grundlage und Voraussetzung für gute IHC-Färbungen und werden häufig unterschätzt. Ihre exakte Einhaltung ist insbesondere bei Auftreten der oben aufgelisteten Färbeprobleme stets zu überprüfen.

Ein häufiges Missverständnis betrifft immer wieder die Begriffe *Formalin* und *Formaldehyd*, die **nicht** als Synonyme aufzufassen sind!

- Formalin ist Markenname & Synonym für eine **gesättigte wässrige Formaldehyd-Lösung (ca. 37%)**. Das eigentliche Standardfixativ der Pathologie ist jedoch eine **1:10 Verdünnung** dieser gesättigten Formaldehydlösung **in physiologischem PBS Puffer** (pH 7,2-7,4). Genau diese Gebrauchslösung verbirgt sich hinter dem viel zitierten *10% neutral-gepufferten Formalin*.
- Formaldehyd** ist dagegen der Trivialname für die **chemische Verbindung CH₂O**, synonym auch als *Methanal* bezeichnet (=„Methan-aldehyd“). Der Name Formaldehyd leitet sich von dem lateinischen Namen *Formica* (Waldameise) ab, da *Formaldehyd* durch Oxidation in Ameisensäure überführt werden kann.



10% neutral-gepuffertes Formalin (10% NBF) ist mit Sicherheit das gebräuchlichste Fixativ in der Routinehistologie, und es bezeichnet die *Gebrauchslösung*, in der das Gewebe zur Fixierung 16-24 Stunden eingelegt wird zwecks *kompletter* Fixierung. **10% NBF entspricht einer 3,7%igen Formaldehydlösung (Volumen/ Gewicht-Prozent) bzw. 4% (Gewicht/Gewicht) Formaldehyd**. Diese Lösung hat nur eine begrenzte Haltbarkeit, da das Formaldehyd mit der Zeit zu Ameisensäure oxidiert, was an einem sinkenden pH-Wert trotz PBS-Pufferung erkennbar ist. Als Daumenregel sollte 10% neutral-gepuffertes Formalin **nicht länger als 3 Monate** nach Ansatz im Gebrauch sein. Die Lösung sollte farblos und klar sowie frei von Präzipitaten sein. Der pH-Wert ist zu überprüfen und sollte nicht unter einen Wert von **6,5** sinken.

Wenn die **gesättigte Formaldehyd-Stammlösung (ca. 37%)** farblos und klar ist und keine Präzipitate aufweist, kann die Lösung in einer *gut verschlossenen* Flasche (→ Vermeidung der Oxidation zu Ameisensäure) unter Lichtabschluss auch über längere Zeiträume bei Raumtemperatur gelagert werden.

Vor einer Lagerung von Formalin über mehr als **1 Jahr** wird abgeraten. Bereits geöffnete Flaschen mit 37%iger Formaldehydlösung sollten möglichst **innerhalb eines halben Jahres** verbraucht werden. Die Einkaufsmengen von Formalin sind dem zu erwarteten Verbrauch anzupassen, um Verfall zu vermeiden. Formaldehyd sollte generell bei Raumtemperatur gelagert werden, weil niedrige Temperaturen die Bildung von *Trioxymethylen* (=1,3,5-Trioxan, zyklisches Trimer von Formaldehyd, das sich bei saurem pH bildet) fördern, erkennbar an einem weißen Niederschlag. Präzipitate oder Kristalle können bei der weiteren Verarbeitung des Gewebes Probleme bereiten. Formalinlösungen wird häufig Methanol als Stabilisator zugesetzt, als Schutz vor der Bildung von Formaldehyd-Polymeren (=Paraformaldehyd).

Fixierung

Zum Verständnis der Fixierung ist es wichtig, sich vor Augen zu halten, dass 10% NBF das Gewebe relativ schnell durchdringt, *jedoch langsam fixiert*: etwa **1 Millimeter pro Stunde**. Die Temperatur hat starken Einfluss auf die Kinetik der Gewebefixierung. Bei zu *kurzen* Fixierungszeiten (weniger als 8 Stunden bei Raumtemperatur), bei zu *geringer* Formaldehydkonzentration oder in der Kälte kommt es folglich zu einer *unvollständigen* Fixierung (ein Teil des Gewebes wird bei der Einbettung nur alkoholfixiert). Formaldehyd ist im Gegensatz zu koagulierenden Alkoholen ein *kreuzvernetzendes* Fixativ: durch Bildung von Methylenbrücken werden u.a. bestimmte Aminosäureseitenketten der Proteine miteinander kreuzvernetzt, was zu einer Deformation der dreidimensionalen Proteinstruktur und damit der Veränderung von Epitopen führt. Dieser Prozess wird im Zuge der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung (*engl. antigen / epitope retrieval*) wieder rückgängig gemacht – v.a. durch *hydrolytische Spaltung* der Methylenbrücken. Probleme mit zu kurzer Fixierung zeigen sich bei vielen immunhistochemischen Markern, wie z.B. Vimentin, vor allem jedoch bei semi-quantitativen, prädiktiven Markern wie ER, PR, Her2, Ki-67. Dies ist ein wesentlicher Grund für die Etablierung von Empfehlungen und Leitfäden für die präanalytischen (v.a. Fixierung & Retrieval) und analytischen (IHC-)Protokollschritte, die zu einer besseren Standardisierung der Ergebnisse über die Laborgrenzen hinweg führen soll.

In der Regel gibt erst die detaillierte Rezeptur bzw. die Standardvorgehensweise (SOP) darüber Auskunft, ob ein geeignetes Protokoll für die Gewebefixierung zum Einsatz kommt. Das Standardfixans erhält man nach 1:10 Verdünnung der Formalinstammlösung [37% Formaldehyd in Wasser] in PBS-Puffer pH 7.2. Leider gehen nicht alle publizierten Leitfäden (z.B. DAkkS, Ref. 8, 9) auf die Details der Gewebefixierung ein. An dieser Stelle sei auf die Literaturliste sowie auf die CAP/ASCO-Guidelines für die Hormonrezeptoren und Her2 verwiesen (Ref. 11, 12). Eine längere Lagerung aufgezogener Paraffinschnitte vor der IHC-Färbung ist zu vermeiden (Ref. 2). Es herrscht Konsens, dass ohne eine sorgfältige Validierung der Lagerbedingungen für das betreffende Antigen bereits aufgezogene Gewebeschnitte möglichst nicht länger als **1-2 Wochen** gelagert werden sollten, bevor sie immunhistochemisch gefärbt werden. Eine weitergehende Empfehlung lautet sinngemäß, angefertigte Schnitte noch „innerhalb der gleichen Arbeitswoche“ zu färben und nicht länger zu lagern – auch bei 2-8 °C nicht.