

Bachelorproef

Optimalisatie en validatie van het Glypican-3 antilichaam op formol-gefixeerd humaan weefsel met behulp van de Dako Omnis

Stagepromotors:

Gerda Diricx, Hoofdverantwoordelijke labo

Sarah Langendries, Docent Ehb

Ellen Merckx, Docent Ehb

Lieselot Liekens

Departement GDT

Bachelor Biomedische laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Medische
laboratoriumtechnologie

Academiejaar 2023-2024

Voorwoord

Voor mijn eindwerkstage heb ik gedurende drie maanden stage gelopen binnen het labo pathologische anatomie van het AZ Sint-Maarten te Mechelen. Mijn bachelorproef heb ik natuurlijk niet alleen tot een goed einde gebracht. Met die reden wou ik via deze weg alle mensen bedanken die mij tijdens mijn stage geholpen hebben.

Allereerst zou ik graag mijn stagepromotor Gerda Diricx bedanken om mij de kans te geven om stage te lopen binnen dit prachtige labo. Telkens weer kon ik bij haar terecht voor een leuke babbel en advies. Daarnaast wil ik ook Kathleen Dewachter en Dr. Vera Schelfhout bedanken voor de goede begeleiding om mijn eindwerk tot een goed einde te brengen. Met elke vraag kon ik bij hen terecht!

Bovendien had ik mijn bachelorproef niet kunnen schrijven zonder hulp van mijn stagebegeleiders Sarah Langendries en Ellen Merckx. Zonder hun tips and tricks was dit werk zonder twijfel tot een minder mooi resultaat gebracht.

Natuurlijk mag ik ook mijn collega's niet vergeten. Ik ben dit team van laboranten ongelooflijk dankbaar voor de leuke momenten, de adviezen en hulp die ik op elk moment kon vragen en de lekkere traktaties die telkens weer op tafel stonden. Jullie zijn toppers! Ook de andere pathologen en het secretariaat waren erg aangenaam om mee samen te werken. Tevens daar kon ik terecht wanneer ik de hulplijn moest raadplegen of even een babbeltje wou voeren.

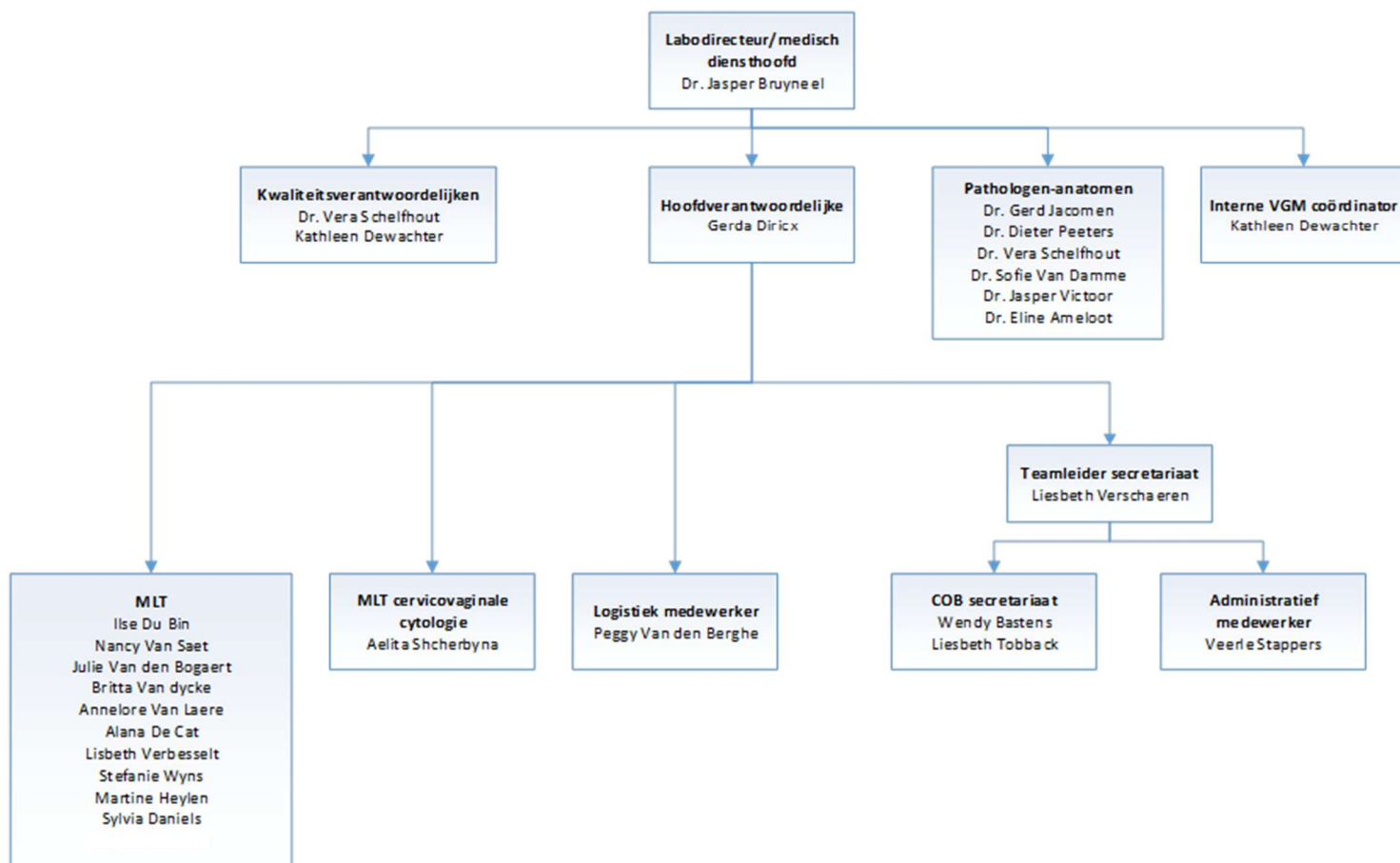
Tot slot zou ik erg graag mijn ouders, vriendje en vrienden bedanken voor hun steun gedurende deze bacheloropleiding. Door hen was mijn motivatie en moed telkens opnieuw aanwezig om mijn opleiding tot een goed einde te brengen.

Lieselot Liekens, Erasmushogeschool, academiejaar 2023-2024



Bron: M-magazine AZ Sint-Maarten (Copyright)

Organigram



Figuur 1: Organigram labo pathologische anatomie (bron: Kathleen Dewachter, kwaliteitsverantwoordelijke)

Inhoudsopgave

Voorwoord.....	1
Organigram.....	2
Afkortingenlijst	5
Abstract English	6
Abstract Nederlands	7
1. Inleiding	8
2. Literatuurstudie	10
2.1 Het ontstaan van benigne en maligne tumoren	11
2.1.1 Hepatocellulair carcinoom.....	12
2.2 Het primaire antilichaam en antigen: Glypican-3	13
2.3 Immuunhistochemie	14
2.3.1 Wat is immuunhistochemie en wat zijn de voordelen van deze techniek.....	14
2.3.2 Beschrijving antigen en tumor-gerelateerde soorten	14
2.3.3 Beschrijving antilichaam en verschil mono-en polyklonale antilichamen.....	16
2.3.4 Principe Immuunhistochemie	17
2.3.5 Detectiemethoden.....	17
2.4 Optimalisatie en validatie van het antilichaam.....	18
2.4.1 Optimalisatie.....	18
2.4.2 Validatie	19
2.5 Het toestel: Dako omnis (Agilent)	21
2.5.1 Opbouw en belangrijke onderdelen toestel	21
2.5.2 Principe toestel (IHC-kleuring).....	22
3. Experimenteel deel.....	24
3.1 Materiaal en methode	24
3.1.1 Inzetten weefsel.....	24
3.1.2 Doorvoerproces	24
3.1.3 Inbedden.....	25
3.1.4 Snijden met de microtoom	25
3.1.5 In de Dako Omnis (IHC-toestel) plaatsen	25
3.1.6 In het kleurentoestel en de afdekker plaatsen	27
3.1.7 Validatie door de patholoog-anatoom	27
4. Resultaten.....	28
4.1 Eerste optimalisatie: Ready to use antilichaam	28
4.2 Tweede validatie: Geconcentreerd antilichaam	29
4.2.1 Resultaten gekozen positieve weefsels.....	29

4.2.2	Resultaten gekozen negatieve weefsels.....	31
5.	Discussie	33
5.1	Discussie eerste optimalisatie: Ready to use antilichaam.....	33
5.1.1	Korte conclusie eerste optimalisatie van het RTU antilichaam	34
5.2	Discussie tweede optimalisatie en validatie: Geconcentreerd antilichaam	34
5.2.1	Discussie gekozen positieve weefsels	34
5.2.2	Discussie gekozen negatieve weefsels	35
5.2.3	Korte conclusie optimalisatie en validatie van het geconcentreerd antilichaam	35
6.	Besluit	36
	Referenties.....	37
	Bijlage	41

Afkortingenlijst

AG	Antigen
AL	Antilichaam
CT	Computer tomografie-scan
DAB	3'3 diaminobenzidine
EBV	Epstein-Barr virus
EKE/EQA	Externe kwaliteitsevaluatie/ Extern quality evaluation
GLP	Glypican
GPI	Glycosylfosfatidylinositol
HCC	Hepatocellulair carcinoom
HPV	Humaan papillomavirus
H&E	Hematoxyline en eosine
HRP	HorseRadisch Peroxidase
Ig	Immuunglobuline
ICH	Immuunhistochemie
IVDR	In vitro diagnostics regulation
MRI	Magnetic resonance imaging
PET	Positron emissie tomografie
RTU	Ready-to-use
TAA	Tumor-geassocieerde antigenen
TSA	Tumor-specifieke antigenen
UZA	Universitair ziekenhuis Antwerpen
WHO	World Health Organization

Optimization and validation of the Glypican-3 antibody on formol-fixed human tissue using the Dako Omnis

Lieselot Liekens

Stagepromotors: Gerda Diricx, Ellen Merckx, Sarah Langendries

Laboratory for pathology, AZ Sint-Maarten, Mechelen, Belgium

Abstract English

Background: 80-90% of liver cancer cases are considered as hepatocellular carcinoma (HCC). This is a tumor arising from the hepatocytes. Because HCC is associated with liver cirrhosis and there is a high risk of metastasis, the survival rate of patients is only 50-70% within five years. One of the tumor markers to detect HCC is Glypican-3.

Goal: The purpose of this thesis is to optimize and validate the monoclonal antibody, Glypican-3. This with the intention to detect HCC in formol-fixed human tissue, within an early stage of cancer.

Method: To achieve this goal, immunohistochemistry (IHC) was used. In this process, the antigen GPC3 would have been detected in tissues, using the antibody. To perform the IHC, the Dako Omnis from Agilent was used. Next on, the sections were validated by the pathologist-anatomist, using predetermined scoring criteria and expectations from NordiQC. It was even possible to distinguish between the results from the ready-to-use (RTU) antibody and the concentrated antibody.

Results: The obtained data indicate that the concentrated antibody meets the desired criteria to complete the test successfully. In the positive control tissues, the antigen-antibody complex can be visualized by the brown precipitation of 3'3 diaminobenzidine. Even the negative control tissues contain the characteristics that were wished for, since only the counterstaining of hematoxylin is detectable. On the contrary, the RTU antibody doesn't meet the requirements and is therefore rejected for further use.

Conclusion: The concentrated antibody got approved to apply routinely on the Dako Omnis. Using Glypican-3, pathologist-anatomists can clearly distinguish between healthy liver tissue and hepatocellular carcinoma. Thus, Glypican-3 turns out quite suitable for early detection of HCC.

Keywords: Glypican-3, antibody, Hepatocellular carcinoma, immunohistochemistry, Dako Omnis

Optimalisatie en validatie van het Glypican-3 antilichaam op formol-gefixeerd humaan weefsel met behulp van de Dako Omnis

Lieselot Liekens

Stagepromotors: Gerda Diricx, Ellen Merckx, Sarah Langendries

Laboratorium voor pathologische anatomie, AZ Sint-Maarten, Mechelen, Belgium

Abstract Nederlands

Achtergrond: 80-90% van de leverkankers worden beschouwd als een hepatocellulair carcinoom (HCC).

Dit is een primaire tumor die ontstaat in de hepatocyten. Doordat HCC wordt geassocieerd met levercirrose en er een groot risico op metastasering bestaat, bedraagt de overlevingskans van patiënten slechts 50-70% binnen de vijf jaar. Een tumormarker om HCC te detecteren, is Glypican-3.

Doel: Het doel van deze bachelorproef omvat het optimaliseren en valideren van het monoklonaal antilichaam Glypican-3, zodat HCC in een vroeg stadium gedetecteerd kan worden in formol-gefixeerd humaan weefsel.

Methode: Om dit doel te bereiken, werd gebruik gemaakt van immuunhistochemie (IHC). Hierbij zal het antigen GPC3 opgespoord worden in weefsels, met behulp van het antilichaam. Het toestel dat voor deze proef gebruikt werd, is de Dako Omnis van Agilent. De kleuring werd vervolgens gevalideerd door de patholoog-anatoom aan de hand van vooropgestelde scoringscriteria en verwachtingen van NordiQC. Er kon eveneens een onderscheid gemaakt worden tussen resultaten van het ready-to-use (RTU) antilichaam en het geconcentreerd antilichaam.

Resultaten: De verkregen data geven aan dat het geconcentreerde antilichaam voldoet aan de gewenste criteria om de test succesvol te volbrengen. Bij het positieve controleweefsel kan het antigen-antilichaam complex gevisualiseerd worden door de bruine neerslag van 3'3 diaminobenzidine. Bij de negatieve controleweefsels was, zoals gewenst, enkel de tegenkleuring van hematoxyline waarneembaar. Het RTU-antilichaam voldoet niet aan de eisen en is afgekeurd voor verder gebruik.

Conclusie: Het geconcentreerd antilichaam werd goedgekeurd voor routinematig gebruik op de Dako Omnis. Aan de hand van Glypican-3 kunnen de pathologen een duidelijk onderscheid maken tussen gezond leverweefsel en HCC. Glypican-3 is dus geschikt om HCC in een vroeg stadium op te sporen.

Kernwoorden: Glypican-3, antilichaam, Hepatocellulair carcinoom, Immuunhistochemie, Dako Omnis

1. Inleiding

Kanker is een ziekte waar iedereen rechtstreeks of binnen een nauwe omgeving regelmatig mee in contact komt. De laatste jaren vertoont deze ziekte een toegenomen prevalentie. Niet alleen in België duikt deze aandoening meer en meer op, ook in de rest van de wereld en vooral in ontwikkelingslanden brengt dit erg veel gevolgen met zich mee. In 2022 werden er over de hele wereld bijna twintig miljoen gevallen aangetroffen. Tegen 2050 verwacht de WHO zelfs een stijging van 75% van het aantal incidenten (Haex, 2024; WHO, z.d.).

Verscheidene soorten kanker zijn tot stand gekomen. Zowel mannen als vrouwen van allerlei leeftijden krijgen hiermee te kampen. Daarnaast is de ene vorm al wat beter te behandelen en detecteren dan de andere. Zo wordt deze ziekte vooral gediagnosticeerd door gebruik te maken van beeldvormende technieken zoals een CT-scan, MRI of PET-scan. Ook biopsies en eventuele bijkomende onderzoeken, kunnen een grote bijdrage leveren voor de detectie van kanker (Kanker, K. O. T., 2023).

Een laboratoriumtechniek die tegenwoordig vaak gebruikt wordt voor de opsporing van kanker is de immuunhistochemie. Dit omvat een aanvullend onderzoek, dat door de patholoog-anatoom wordt aangevraagd om meer informatie te verkrijgen voor het stellen van de juiste diagnose en behandeling van de patiënt. De methode is gebaseerd op het gebruik van antilichamen. Dit zijn proteïnen die zeer specifiek binden aan antigenen, wat eiwitten zijn die aanwezig zijn in cellen en weefsels, waaronder dus ook op en in tumorcellen. De gebonden antilichamen kunnen aan de hand van een kleurstof zichtbaar gemaakt worden. Zo kan er vastgesteld worden welke antigenen er in de tumor aanwezig zijn. Dit maakt het eveneens mogelijk te evalueren wat de reactie van een tumor op een bepaalde therapie is en hoe agressief de tumor zich gedraagt (Immuunhistochemie, z.d.).

Vooraleer een bepaald antilichaam kan gebruikt worden voor het opsporen en behandelen van kanker, moet deze grondig onder de loep genomen worden. De validatie van dit kleuringsprotocol zal bepalen hoe precies en nauwkeurig de test zal verlopen. Binnen deze bachelorproef zal het glypican-3 antilichaam geoptimaliseerd en gevalideerd worden op formol-gefixeerd humaan weefsel, met behulp van de Dako Omnis. Dit is een toestel dat gebruikt wordt voor het uitvoeren van immunohistochemisch onderzoek.

Het experimenteel gedeelte van deze bachelorproef zal in twee fasen verlopen. Allereerst wordt de test met het antilichaam geoptimaliseerd om het beste kleuringspatroon te verkrijgen. Er wordt daarenboven geëvalueerd of de testresultaten voldoen aan de vooropgestelde performantiecriteria. Voldoen deze niet aan de eisen, dan zullen de parameters van het kleuringsprotocol telkens licht aangepast worden en vervolgens worden beoordeeld door de patholoog-anatoom. Deze arts zal uiteindelijk bepalen welk protocol de beste kleuring heeft opgeleverd voor de beoogde doelstelling. In

de tweede fase, wordt het geschikte protocol gevalideerd op enerzijds het weefsel waarvoor het in de toekomst op vaste basis gebruikt zal worden en anderzijds op negatief weefsel, ter controle (Verbeke et al., 2023). Voorafgaand aan de bachelorproef, werd een literatuurstudie opgesteld die de nodige achtergrondinformatie zal bieden over het verloop van de proef, het onderzochte antilichaam en alles wat er mee te maken heeft.

Samengevat heeft deze proef het doel een antwoord te bieden op volgende onderzoeksvraag: *‘Optimalisatie en validatie van het Glypican-3 antilichaam op formol-gefixeerd humaan weefsel met behulp van de Dako Omnis’*. Eens de gewenste omstandigheden voor het antilichaam verkregen worden, kan dit antilichaam op routinematige wijze gebruikt worden voor het detecteren van antigenen in en op tumoren van onder meer de lever. De optimalisatie en validatie van Glypican-3 is erg cruciaal, om weefsels waarin een antigen minder sterk tot expressie komt, eveneens ook te kunnen analyseren.

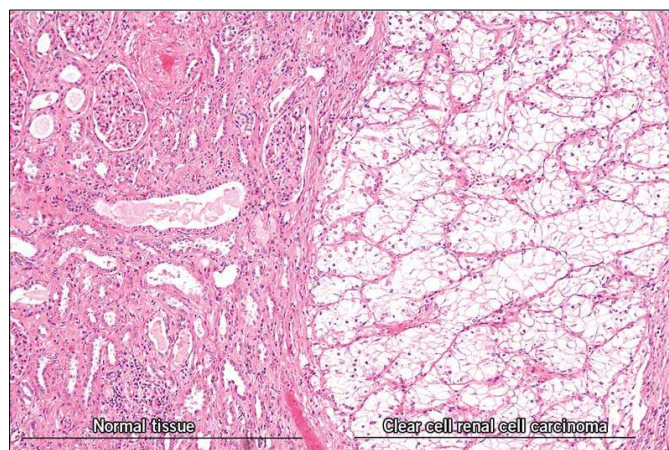
2. Literatuurstudie

Binnen het labo pathologische anatomie worden diverse lichaamsstalen zoals weefsels, organen en vochten onderworpen aan een breed scala van analysetechnieken. Zowel macroscopisch als microscopisch onderzoek vormt een belangrijke tak voor het stellen van een diagnose en het leveren van een bijdrage bij de behandeling van een patiënt (labo pathologische anatomie, 2023).

Macroscopisch onderzoek legt de focus op het observeren en het palperen of aanvoelen van weefsels. Niet alleen bipten, kleine stukjes weefsel die door een medische handeling uit het lichaam worden verwijderd, worden grondig geïnspecteerd (Kanker, K. O. T., 2022). Ook grotere organen en weefsels die tijdens een ingreep weggenomen werden, zullen onder de loep genomen worden. Een eerste inspectie kan alvast veel duidelijk maken over de normaliteit van een letsel. Grootte, gewicht, vorm, kleur en oriëntatie van het weefsel worden gedetailleerd beschreven in het patiëntenrapport. Dit vormt een goede basis voor het microscopisch onderzoek dat vervolgens door de pathologen-anatomen wordt uitgevoerd (labo pathologische anatomie, 2023).

Het microscopisch onderzoek wordt onderverdeeld in twee subgroepen. Enerzijds de cytologie, waarin de structuur van cellen wordt geanalyseerd en een breder beeld gevormd wordt van de moleculaire compositie van deze cellen (Scientific, 2022). Het celonderzoek wordt binnen het AZ Sint-Maarten uitgevoerd op verscheidene lichaamsvloeistoffen, waaronder urine, aspiraten en cervicovaginaal materiaal (labo pathologische anatomie, 2023).

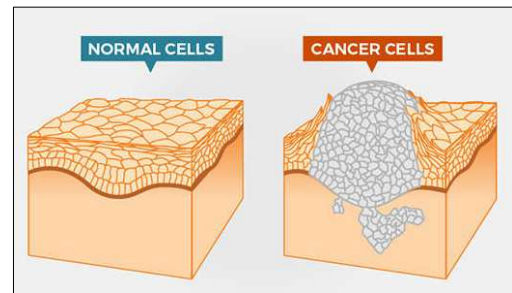
Anderzijds is er ook de histologie, waarbij de structuur en functie van weefsels worden onderzocht. Aan de hand van de hematoxyline-eosine (HE) kleuring kunnen weefselcomponenten van elkaar onderscheiden worden. Bovendien schept deze studie de mogelijkheid om veranderingen binnen de schikking van componenten te kunnen waarnemen (Gurina, T. S., 2023). Een voorbeeld van zo'n verandering is een tumor (Figuur 2). Dit zal wat meer gedetailleerd besproken worden bij punt 2.1.



Figuur 2: Vergelijking normaal weefsel met abnormaal tumorweefsel van het carcinoom. H&E kleuring (bron: Ebertz, 2021)

2.1 Het ontstaan van benigne en maligne tumoren

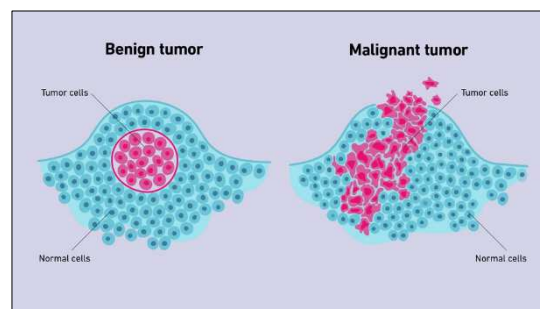
Bij een transmutatie van weefsels wordt binnen de medische sector vaak gesproken over tumoren. Een tumor is een massa weefsel die gevormd wordt door een abnormale en snelle proliferatie van verschillende tumorcellen. Op figuur 3 wordt duidelijk dat door het snel delen en verspreiden, tumorcellen erg dicht bij elkaar komen te liggen, waardoor een grote subcutane (onderhuidse) knobbel gevormd wordt (*What is cancer?*, 2021).



Figuur 3: Opbouw normale cellen en tumorcellen (bron: *What is cancer?*, 2021)

De tumor kan enerzijds goedaardig of benigne zijn (figuur 4, onderaan). Deze opeenhoping van cellen zal niet verder verspreiden naar andere lichaamscompartimenten en daarenboven geen ander weefsel doordringen (Cooper, G. M., 2000). Enkele voorbeelden van een goedaardig gezwel zijn een wrat en een lipoom of ook wel een ophoping van vetweefsel genoemd (*Goedaardige en kwaadaardige tumoren*, 2022). Aan de andere kant kan een tumor ook een kwaadaardig gezwel zijn. Binnen de ziekenhuiscontext krijgt dit de term maligne (figuur 4, rechtsonder). Deze tumorcellen zijn echter wel in staat om het omliggende weefsel binnen te dringen. Daarnaast kunnen ook andere organen aangetast worden, aangezien de cellen in staat zijn om zich via de bloedbaan en het lymfevatenstelsel verder te verspreiden. Dit proces van uitzaaiing wordt ook wel de metastase genoemd (Cooper, G. M., 2000a). Het is door dit fenomeen en de invasie van het omliggend weefsel, dat maligne tumoren in verband gebracht worden met kanker (Cooper, G. M., 2000).

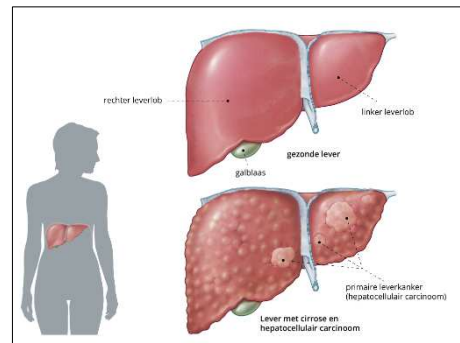
De metastase maakt het bijna onmogelijk om een lokale behandeling toe te dienen. Bovendien leidt het vaak tot een grote uitdaging om de primaire site van de tumor aan het licht te brengen. (Cooper, G. M., 2000). Volgens Duraiyan et al. (2012) is het de dag van vandaag toch mogelijk om de oorsprong van de tumor te bepalen, namelijk aan de hand van de veelbelovende techniek, de immuunhistochemie. Deze zal in deze literatuurstudie besproken worden bij 2.3.



Figuur 4: Verschil benigne en maligne weefsel (bron: *Whelan*, 2023)

2.1.1 Hepatocellulair carcinoom

Een voorbeeld van een maligne tumor is het hepatocellulair carcinoom (HCC) (Figuur 5). Dit is een primaire tumor die ontstaat uit de meest voorkomende levercellen, de hepatocyten. Deze cellen kunnen metastaseren, waardoor ze naar andere plaatsen in het lichaam verschuiven en daar secundaire tumoren kunnen vormen. 80-90% van de gevallen van leverkanker wordt beschouwd als HCC (Kanker, 2022).



Figuur 5: Hepatocellulair carcinoom in beeld (bron: Leverkanker - Oncozon, 2018)

Wereldwijd is HCC de zesde meest voorkomende kanker en vertoont het eveneens een toenemende incidentie binnen de Westerse wereld (Martens et al., 2017). Toch komt het volgens Kanker (2022) minder voor in België. In anno 2021 werden er 1108 gevallen geregistreerd. Wel kan er geconcludeerd worden dat het veel vaker voorkomt bij mannen dan bij vrouwen.

Bijna 80% van de patiënten die te maken krijgt met het HCC heeft vaak een achtergrond met levercirrose. Hierbij zullen gezonde levercellen afsterven en vervangen worden door littekenweefsel (Martens et al., 2017). Chronische ziekten vormen dus bijgevolg een belangrijke risicofactor voor het HCC en kunnen meerdere oorzaken hebben, namelijk hepatitis B en C, overmatig alcoholgebruik en leververvetting als onderdeel van het metabool syndroom (*Hepatocellulair Carcinoom*, 2024; Asafo-Agyei, 2023).

HCC-patiënten hebben vaak een overlevingskans van zo'n 50-70% binnen de vijf jaar. Het is daarom dus erg belangrijk om deze vorm van leverkanker al in een vroeg stadium te detecteren en hoog risicopatiënten grondig op te volgen. De diagnose gebeurt door middel van leverbiopsies, beeldvormende technieken zoals een CT-scan of MRI, bloedonderzoek, biochemische testen en nu dus ook met behulp van de IHC (*Hepatocellulair Carcinoom*, 2024; Asafo-Agyei, 2023).

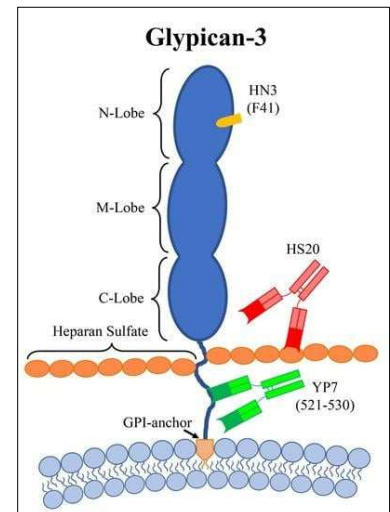
Gelukkig zijn er wel erg veel behandelingsmogelijkheden om enerzijds de patiënt te genezen (curatief opzet) of anderzijds om de levensduur van de zorgvrager te verlengen en zo goed mogelijk de levenskwaliteit te behouden (niet-curatief opzet). De gekozen behandeling zal sterk afhangen van de gezondheidstoestand van de patiënt, de uitgebreidheid van de ziekte op moment van diagnose en de functie van de lever. Enkele voorbeelden omvatten een levertransplantatie, chemotherapie, chemo- en radio embolisatie, radiofrequentie ablatie en immuuntherapie (*Hepatocellulair Carcinoom*, 2024; Asafo-Agyei, 2023).

Een typische tumormarker voor de detectie van dit type tumor, is Glypican-3. Binnen deze bachelorproef zal deze geoptimaliseerd en gevalideerd worden om HCC vroegtijdig op te sporen, zodat bovenstaande behandelingen zo snel mogelijk toegepast kunnen worden.

2.2 Het primaire antilichaam en antigen: Glypican-3

Glypican-3 is een monoklonaal antilichaam dat het Glypican-3 antigen (GPC3) kan detecteren in het hepatocellulair carcinoom (HCC). Dit antilichaam zal voornamelijk gebruikt worden voor *in vitro*-diagnostiek, waarbij testen worden uitgevoerd op weefsels die werden verwijderd bij de patiënt.

GPC3 wordt beschouwd als een typisch tumor-specifiek antigen, aangezien het deel uitmaakt van de oncofetale antigenen. Dit wil zeggen dat dit eiwit tot expressie komt in embryonale structuren, zoals de foetale lever, maar niet bij de overeenstemmende volwassen structuren. Echter kunnen deze antigenen wel terug tot uiting komen in maligne tumoren die uit deze embryonale structuren zijn ontstaan (*NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control.*, 2014). Glypican-3 (Figuur 6) behoort tot één van de zes leden van de GLP-familie, een groep membraangebonden heparinesulfaat proteoglycanen. Het bevindt zich op positie 26 van de lange arm van het X-chromosoom. De glycosaminoglycanen (suikerketens) van deze eiwitten zijn gebonden aan een core-proteïne met een grootte van zo'n 60-70 kDa. Met behulp van het glycosylfosfatidylinositol (GPI)-anker, maken ze verbinding met de oppervlakte van het celmembraan (Guo et al., 2020).



Figuur 6: Opbouw Glypican-3 (bron: Fleming & Ho, 2020)

Volgens Guo et al. (2020) komt GPC3 specifiek tot expressie aan de oppervlakte van de HCC-cellen. Dit is in normale omstandigheden vooral in de embryo' en minder bij volwassenen of pathologische levercellen. Doordat het eiwit zich voornamelijk aan de oppervlakte en in het cytoplasma bevindt, is het erg interessant om de doelwitumorcellen te doden met behulp van specifieke geneesmiddelen, zonder dat er effecten zouden ontstaan die niet gelinkt worden aan de tumor. Een ander voordeel van deze positie omvat het opstellen van de diagnose van HCC.

Doordat de GPC3-antigenen in staat zijn om celsignaalroutes te wijzigen, spelen ze een rol in de ontwikkelingsmorphogenese, waarbij ze een bijdrage vormen aan de weefselgroei en de cel proliferatie (*NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control.*, 2014). Zo kunnen ze onder meer de Wnt- en Hedgehog-celsignaleringsroutes regelen, welke bijdragen aan de embryogenese, embryomorfose, de celdifferentiatie en metastase. Daarnaast hebben ze ook nog een andere functie, namelijk het signaleren van de fibroblast-groeifactoren en de botmorphogenese eiwitten (Guo et al., 2020).

Wanneer er een mutatie optreedt binnen dit eiwit kan dit leiden tot het Simpson-Golabi-Behmelsyndroom. Dit syndroom kan zorgen voor pre- en postnatale weefselovergroei, perinatale sterfte, abnormale longontwikkeling, dyplastische nieren, skeletafwijkingen en daarenboven een verhoogd risico op embryonale tumoren in de vroegetijdige kinderjaren (Grozdanov et al., 2006).

2.3 Immunochemie

2.3.1 Wat is immunochemie en wat zijn de voordelen van deze techniek

De techniek waarbij Glypican-3 gebruikt zal worden om HCC op te sporen, is de immunochemie (IHC). Dit is een aanvullend onderzoek dat de patholoog-anatoom aanvraagt, wanneer andere labotesten zoals de standaard H&E-kleuring, onvoldoende informatie bieden (Immuunhistochemie, z.d.). Zowel monoklonale als polyklonale antilichamen kunnen bij deze techniek gebruikt worden om antigenen in een paraffine-ingebed weefsel op te sporen (Duraiyan et al., 2012). Op deze manier kan het type tumor bepaald worden. Daarnaast biedt de IHC-kleuring nog vele andere voordelen binnen het tumor-onderzoek. Naast het tumor-type kan de patholoog-anatoom eveneens bepalen of de tumor benigne of maligne is, wat het stadium en de graad van de tumor is en waar de primaire site van de tumor gelegen is, op basis van de bron waar de metastase is ontstaan. De techniek heeft ook een predictieve rol, aangezien het de reactie van een tumor op een bepaalde behandeling kan voorspellen en zo dus ook gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van geneesmiddelen. Als laatste speelt de IHC een prognostische rol, doordat het iets kan zeggen over de agressiviteit van een tumor en tevens ook over de overlevingskans van de patiënt (Immuunhistochemie, z.d.).

Alvorens het principe van de IHC kort aangehaald wordt, zal er eerst gefocust worden op de antigenen en de antilichamen, welke een hoofdrol spelen binnen deze kleuringstechniek.

2.3.2 Beschrijving antigen en tumor-gerelateerde soorten

Met behulp van de IHC-kleuring kunnen antigenen gedetecteerd worden. Tumorantigenen worden beschouwd als proteïnen die vaak tot expressie komen ter hoogte van de oppervlakte van tumorcellen. Niettemin kunnen deze eiwitten ook in de bloedstroom terechtkomen (Newkirk et al., 2017). Binnen deze groep biomoleculen kan er een onderscheid gemaakt worden tussen de *tumor-geassocieerde antigenen* (TAA's) en de *tumor-specifieke antigenen* (TSA's). De TAA's zullen in hoge levels aanwezig zijn op de tumorcel, maar eveneens ook in lagere levels op gewone cellen. Deze antigenen (AG) worden opgedeeld in verschillende tumortypes. Daarom worden ze ook wel de 'shared' antigenen genoemd. Door een variabele immunogeniciteit, het vermogen om een immuunrespons op te wekken, komen verscheidene patronen tot expressie binnen de TAA's. Hierdoor kan er toch gedifferentieerd worden tussen allerlei tumorsoorten en individuen (Valilou & Rezaei, 2019). Binnen de TAA's kan een onderscheid gemaakt worden tussen vier verschillende soorten, met elk hun specifieke kenmerken.

Allereerst de kankerkiemlijn antigenen of ook wel de kanker-testis antigenen genoemd. Deze proteïnen worden voornamelijk geproduceerd in (testiculaire en ovariële) kiemcellen, maar worden eveneens teruggevonden in tumoren en trofoblast cellen. Een voorbeeld is het melanoma-antigen (MAGE) dat voornamelijk voorkomt bij huidkanker (Akers et al., 2010; Vigneron N., 2015).

De volgende groep van TAA's omvat de gedifferentieerde antigenen. Deze komen tot expressie op tumorcellen en in kleinere mate op het corresponderende gezond weefsel. Binnen deze groep antigenen komen veel eiwitten voor die betrokken zijn bij de melanine biosynthese. Hieronder vallen onder meer de Melan-A en Mart-1, maar ook het carinoembronic AG (CEA) maakt hier deel van uit (Vigneron, N., 2015).

Onder de derde groep vallen de overgeëxprimeerde antigenen. Deze worden standaard geproduceerd in normale genen en komen bijgevolg daar tot expressie. Daarenboven worden ze vaak in grotere mate tot expressie gebracht in tumorcellen in vergelijking met gezonde cellen. Een voorbeeld van deze groep is human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), welke vooral overgeëxprimeerd wordt in epitheliale tumoren zoals in de borstcarcinomen (Vigneron N., 2015; Durgeau et al., 2018).

De laatste groep TAA's zijn de oncofetale antigenen. Deze eiwitten vormen een groot deel van het foetaal weefsel, aangezien ze deel uitmaken van de embryogenese, het proces waarbij de bevruchte eicel verder ontwikkelt tot een embryo (Khan Y. S., 2023). Daarnaast worden deze AG ook geproduceerd door tumoren en in zeer kleine hoeveelheden door volwassen weefsel. Met deze reden vormen deze proteïnen eveneens een potentiële tumormarker, die kan opgespoord worden door monoklonale antilichamen (Wepsic H. T., 1983).

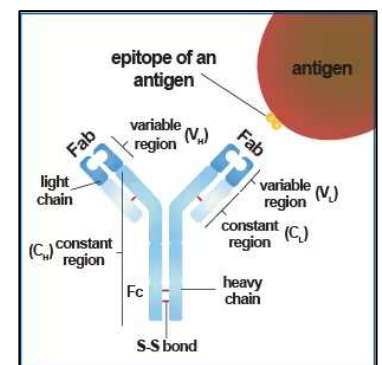
De tumorspecifieke antigenen zijn eiwitten met een erg hoge specificiteit. Dit doordat ze enkel bij tumorcellen voorkomen en niet binnen gewoon weefsel. Bijgevolg worden ze dus de 'private' antigenen genoemd. Ook hier kan een onderscheid gemaakt worden tussen verschillende groepen. Allereerst de oncovirale antigenen, welke alleen voorkomen in tumorcellen als resultaat van virale infecties. Deze eiwitten komen voor bij verscheidene soorten kanker, zoals het cervicovaginale carcinoom en het nasopharyngaal carcinoom. Enkele voorbeelden zijn het *Humaan papillomavirus* (HPV) en het *Epstein-Barrvirus* (EBV) (Vigneron N., 2015).

De andere groep omvat de neo-antigenen. Dit zijn antigenen die door de tumorcellen nieuw aangemaakt worden, wegens tumor-specifieke veranderingen zoals: genomische mutaties, slechte RNA-splicing en virale open-reading frames die werden toegevoegd. In normaal weefsel komen deze AG niet voor (Zhang Z et al., 2021).

2.3.3 Beschrijving antilichaam en verschil mono-en polyklonale antilichamen

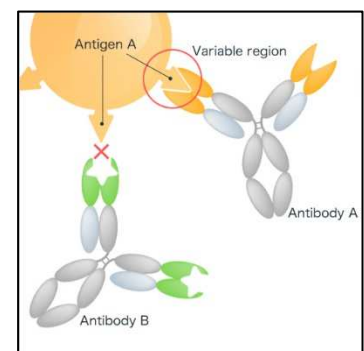
Binnen de immunohistochemie kunnen beide groepen antigenen opgespoord worden met behulp van antilichamen (AL). Hoe dit precies verloopt wordt bij punten 2.3.4 en 2.3.5 in detail besproken. De AL die bij deze techniek gebruikt worden, worden geproduceerd door het immuniseren (opwekken van een immuunrespons) van dieren met het doeleiwit (Mairaville & Martineau, 2021).

Antilichamen of immunoglobulinen (Ig) zijn eiwitten die geproduceerd worden door B-cellen, wat cellen zijn die na contact met een antigen worden omgezet tot een soort van geactiveerde AL-producerende plasmacellen (Vaillant et al., 2023). Deze antilichamen bestaan uit twee zware ketens en twee lichte ketens (figuur 7). Onderaan de Y-vormige structuur bevindt zich een gemeenschappelijk onderdeel dat bij alle immunoglobulines hetzelfde is, namelijk het Fc-gedeelte. Aan de hand van dit segment binden de AL aan de Fc-receptoren van de immuuncellen, waardoor deze cellen in staat worden gesteld om antilichamen te herkennen en hun functie uit te voeren, namelijk het lichaam beschermen tegen gevaar (Zero To Finals, 2019).



Figuur 7: Structuur antilichaam (bron: Antibody Basics, z.d.)

Bovenaan de Y-structuur (figuur 7) wordt de 'paratoop' of 'antigen binding site' teruggevonden. Dit is de variabele regio van de antilichamen en kan bijgevolg in verschillende varianten voorkomen. Door de variatie zal elk type antilichaam binden aan een 'epitooop' (segment) van slechts één antigen (figuur 8, rechts). Met deze reden worden verschillende antilichamen gebruikt om eiwitten te identificeren die gelinkt worden aan een tumor en zo kunnen ze bij de IHC-techniek ook de locatie van deze antigenen in cellen of weefsel opsporen. Hierdoor is het tevens erg belangrijk om tijdens de validatie van een nieuw antilichaam te kijken of het Ig bindt met het epitooop van het juiste target-antigen en niet met aspecifieke eiwitten (Zero To Finals, 2019; *Polyclonal vs Monoclonal Antibodies*, 2024).



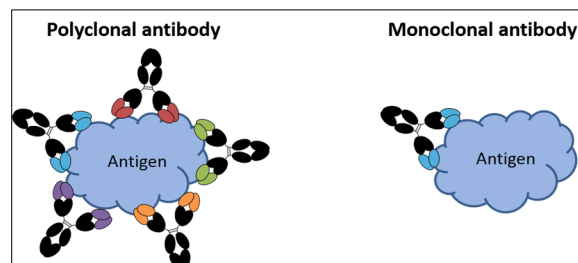
Figuur 8: Specificiteit van de bindingssite voor een specifiek epitooop (bron: Kyowa Kirin, z.d.)

Wanneer een antilichaam bindt met een antigen, wordt het AG-AL complex gevormd. Wanneer bijgevolg een C1-proteïne aan dit complex bindt, zal de klassieke-pathway van het complementsysteem geactiveerd worden en wordt het immuunsysteem in staat gesteld om kankercellen te vernietigen (Zero

To Finals, 2019). Antilichamen hebben vele functies, maar binnen deze bachelorproef zal hierop gefocust worden. Bij het kiezen van het geschikte AL voor het opsporen van een tumor moet er rekening gehouden worden met het verschil tussen mono- en polyklonale antilichamen (Figuur 9).

Een monoklonaal antilichaam (figuur 9) is een eiwit dat door het lichaam wordt gevormd, maar eveneens in grote aantallen in een labo wordt gecreëerd. Elk monoklonaal AL bindt aan een ander epitoom van een antigeen. Ze zijn in staat om kankercellen te markeren, zodat het immuunsysteem ze sneller kan identificeren en vervolgens kan liquideren (*Polyclonal vs Monoclonal Antibodies*, 2024).

Een polyklonaal antilichaam (figuur 9) daarentegen is een mengeling van verschillende monoklonale antilichamen die verkregen worden uit verschillende B-cellijnen. Doordat het meerdere monoklonale AL bevat, zal het aan meerdere epitopen op éénzelfde antigeen kunnen binden. Elk AL zal binden aan een ander uniek epitoom (*Polyclonal vs Monoclonal Antibodies*, 2024).



Figuur 9: polyklonaal vs. monoklonaal antilichaam (bron: Absolute Antibody, 2019)

2.3.4 Principe Immuunhistochemie

De visualisatie van antigenen gebeurt in het algemeen door de toevoeging van verscheidene componenten als het specifiek primair AL, het secundair gelabeld AL, een enzymcomplex en een chromogeen substraat. Ook de wasstappen die tussendoor plaatsvinden, zijn van belang om ongebonden componenten weg te wassen. De details over deze stappen worden besproken bij punt 2.5.2. Bovendien kunnen er twee soorten detectiemethoden gebruikt worden om het AG te visualiseren, namelijk de directe en de indirecte methode (Cell Marque, 2023).

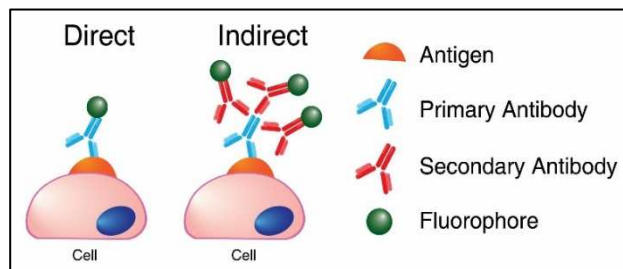
2.3.5 Detectiemethoden

2.3.5.1 Directe methode

Bij de directe methode (figuur 10) zal het doelantigeen rechtstreeks gevisualiseerd worden doordat het primair antilichaam hieraan zal binden. Dit antilichaam is voorzien van een specifiek enzym dat dient als label. Een veelgebruikt voorbeeld omvat het HorseRadisch Peroxidase (HRP). Vervolgens wordt dit complex zichtbaar gemaakt door toevoeging van het geschikte substraat (*IHC Immunodetection / Thermo Fisher Scientific - IE*, z.d.-b).

2.3.5.2 Indirecte methode

Bij de indirecte methode (figuur 10) daarentegen zal er gebruik gemaakt worden van een primair antilichaam dat dit keer niet gelabeld is. Om het AG-AL complex toch zichtbaar te maken, zal er bij deze



Figuur 10: Directe en indirecte detectie methode (bron: Secondary Antibodies And Immunoglobulins - Leinco Technologies, 2024)

methode gebruik gemaakt worden van een secundair antilichaam dat wel gelabeld is. Dit antilichaam zal gericht zijn tegen het primair antilichaam. Na het uitvoeren van de wasstappen, zal er opnieuw een chromogeen substraat toegevoegd worden om het complex te kunnen visualiseren (*IHC Immunodetection*

/ *Thermo Fisher Scientific - IE, z.d.-b*). Binnen deze bachelorproef zal deze methode toegepast worden, aangezien deze veel gevoeliger is dan de directe methode. Dit komt doordat het detectiesignaal versterkt wordt door de binding van meerdere moleculen van het secundair gelabeld AL aan het primair ongelabeld AL (Chen et al., 2010).

2.4 Optimalisatie en validatie van het antilichaam

De IHC-kleuring dient binnen het labo pathologische anatomie als tool voor het uitvoeren van een prognose, een diagnose of een predictie. Doordat de resultaten van de testen rechtstreeks invloed uitoefenen op de kosten en de behandeling van de patiënt, is het erg belangrijk om correcte en kwaliteitsvolle resultaten te verkrijgen. Met deze reden is het dus zeer cruciaal dat een antilichaam goed wordt geoptimaliseerd en gevalideerd, alvorens deze definitief in het werkveld te gebruiken (Bordeaux et al., 2010).

2.4.1 Optimalisatie

Alvorens de definitieve validatie van start kan gaan, wordt het kleuringsprotocol van het antilichaam op punt gesteld. Deze stap wordt de optimalisatie genoemd. Hierbij zal een weefsel gekozen worden waarvan zeker is dat dit positief zal aankleuren met het antilichaam en de IHC-stappen die reeds besproken werden bij 2.3.4 en 2.3.5. De gekleurde coupes zullen door de patholoog-anatoom beoordeeld worden aan de hand van vijf scoringscriteria, namelijk de intensiteit, uniformiteit, specificiteit, afwezigheid achtergrond en de tegenkleuring (tabel 1). Een score van 0-4 is onaanvaardbaar, 5-6 wordt beschouwd als borderline en 7-8 is een optimaal resultaat. Voldoet de kleuring niet aan de vooropgestelde scoringscriteria, dan wordt een bepaalde parameter van het protocol aangepast tot het gewenste resultaat verkregen wordt. Slechts bij een score van ≥ 7 , zal de patholoog-anatoom het protocol vrijgeven voor verdere validatie (Maxwell & McCluggage, 2000). Binnen deze bachelorproef wordt gebruik gemaakt van placenta voor de optimalisatie. Dit weefsel werd gekozen op basis van een aangeraden assessment protocol (Run 42) van NordiQC, een externe

kwaliteitsevaluatie (EKE)-instantie die instaat voor het bevorderen van de kwaliteit van IHC. Dit doen ze door onder andere voorbeelden te geven van aanbevolen protocols en weefselcontroles, maar ook info over protocolparameters en de epitopen van antigenen. De protocols worden onder meer opgesteld door het opsturen van blanco coupes die in het labo worden gekleurd en vervolgens door deze organisatie worden geëvalueerd en gerapporteerd. (*NORDIQ - Immunohistochemical Quality Control*, 2014).

2.4.2 Validatie

Volgens de richtlijnen van Sciensano is de validatie afhankelijk van verscheidene factoren, waaronder de methode, oorsprong van de reagentia, het type toestel en het type test. Binnen deze proef gaat het om een type 1 methode, wat betekent dat het antilichaam gebruikt zal worden voor een diagnostisch doeleinde. Het gebruikte toestel, de Dako Omnis, wordt beschouwd als een halfopen toestel waarbij nog andere reagentia gebruikt kunnen worden (Verbeke et al., 2023). Het antilichaam draagt een CE-IVD label, wat wil zeggen dat dit antilichaam voldoet aan de EU eisen voor gezondheid, veiligheid en de milieubescherming (*CE-markering – Certificering, EU-voorschriften - Your Europe*, 2024).

2.4.2.1 Eerste validatie met een ready to use antilichaam

De validatie wordt gestart door gebruik te maken van een RTU antilichaam. Er werd besloten om eerst deze versie van het antilichaam te gebruiken, omdat deze reeds verdund werd door de fabrikant en zo manuele fouten van de laborant werden voorkomen. Bovendien werd er zo voldaan aan de In Vitro Diagnostics regulation (IVDR)-wetgeving, waarin staat dat de oorsprong van het product zo min mogelijk mag aangepast worden door de laboranten, om het beoogde doel te bereiken (Verbeke et al., 2023).

Het gaat om een type 1 test zonder referentie waarbij het antilichaam getest wordt op de juistheid. Onder de term juistheid wordt verstaan: ‘De mate van overeenstemming tussen het gemiddelde van het aantal opeenvolgende meetwaarden en de werkelijke referentiewaarde.’

Om deze karakteristiek te testen, worden op basis van de richtlijnen van NordiQC, vijf positieve weefsels gekozen en vijf weefsels die normaliter een negatief resultaat moeten vertonen. De beoordeling van de coupes wordt wederom uitgevoerd door de patholoog-anatoom met behulp van de tabel met scoringscriteria (tabel 1). Om deze correct te kunnen invullen, werden de weefsels beoordeeld aan de hand van vooropgestelde kleuringscriteria van NordiQC, waaraan de perfecte kleuring met glypican-3 moet voldoen. Deze omvatten (*NORDIQ - Immunohistochemical Quality Control*, 2014):

- Een matige tot sterke cytoplasmatische kleuring van vrijwel alle syncytiotrofoblasten en cytotrofoblasten in de placenta en een zwakke kleurreactie in verspreide stromale en endotheelcellen.
- Een matig tot sterke cytoplasmatische en membraneuze kleurreactie van alle neoplastische cellen in het hepatocelulair carcinoom.
- Een zwakke tot matige cytoplasmatische kleuring van de meeste neoplastische cellen in twee heldercellige ovariumcarcinomen.
- Geen kleurreactie van de normale levercellen en de meeste epitheelcellen in de appendix.
- Geen kleuring van de neoplastische cellen in het sereus ovariumcarcinoom.

90% van de stalen moet voldoen aan de aanvaardingscriteria (tabel 1), waarbij ze een waarde van ≥ 7 moeten verkrijgen om vrijgegeven te worden voor gebruik. Voldoen de validatiecoupes hier niet aan, dan moet de volledige optimalisatie opnieuw gebeuren. Hierbij kan er gekozen worden voor een andere RTU clone of voor de geconcentreerde versie van het antilichaam (Verbeke et al., 2023).

2.4.2.2 Tweede validatie (als nodig) met geconcentreerd antilichaam

Bij een geconcentreerd AL moet de verdunning nog manueel gemaakt worden door het labo zelf. Wanneer gekozen wordt om de validatie aan de hand van deze versie opnieuw te doen, dan zal het nogmaals gaan om een type 1 test. Echter zal bij deze versie wel een referentie gebruikt worden, namelijk het protocol van het Universitair ziekenhuis Antwerpen (UZA). Hierbij zal het kleuringsprotocol nogmaals gecontroleerd worden op de juistheid. Opnieuw worden hiervoor vijf positieve en vijf negatieve weefsels gekozen (Verbeke et al., 2023).

Tabel 1: Aanvaardingscriteria protocol IHC-kleuring (bron: Verbeke et al., 2023; Maxwell & McCluggage, 2000).

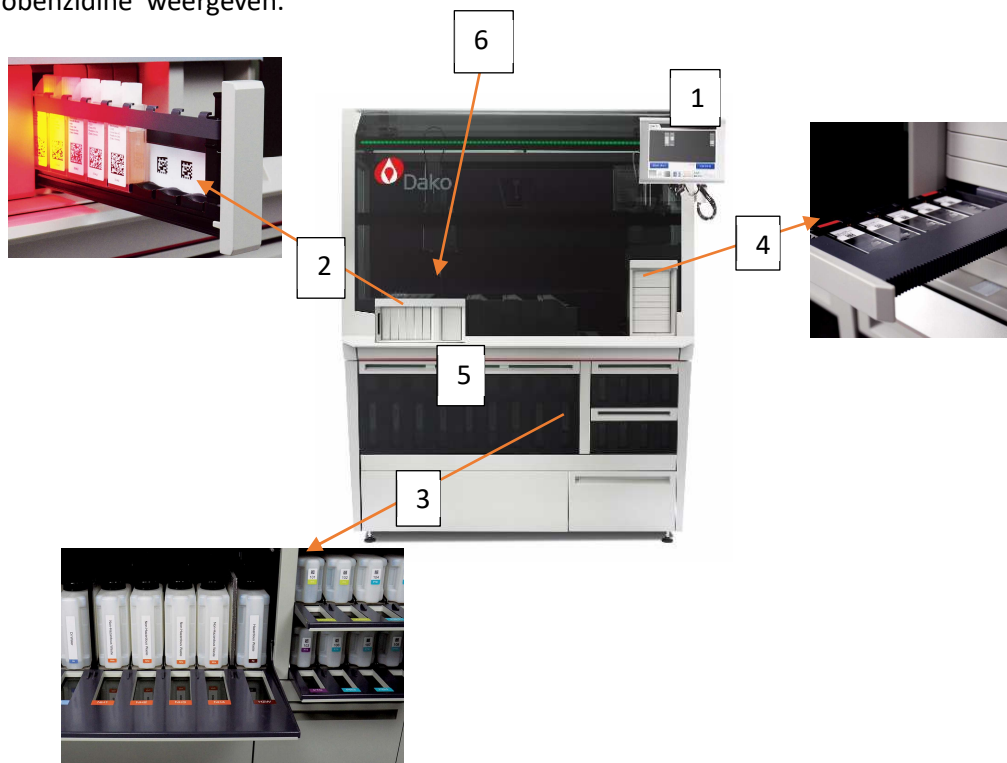
Kleurcriteria	Score-criteria			
Intensiteit	0 (geen)	1 (zwak)	2 (matig)	3 (sterk)
Uniformiteit	0 (geen)	1 (uniform)		
Specificiteit	0 (geen)	1 (specifiek)		
Afwezigheid achtergrond	0 (sterk)	1 (matig)	2 (geen)	
Tegenkleuring	0 (inadequaet)	1 (adequaet)		
Totaal				

2.5 Het toestel: Dako omnis (Agilent)

Voor de IHC-kleuring met glypican-3 werd de Dako Omnis van Agilent (figuur 11) gebruikt. Dit is een volledig geautomatiseerd IHC-toestel, met als doel zoveel mogelijk patiëntenstalen in één dag af te ronden met een zo hoog mogelijke kwaliteit. Dit zorgt voor een snellere turnaround time en daarenboven een snellere patiënt diagnose (A Flexible, Efficient IHC And ISH Stainer For High Throughput | Agilent, z.d.). Alvorens dieper wordt ingegaan op het principe (2.5.2) van het toestel en de IHC-kleuring, worden eerst de belangrijkste onderdelen van het toestel (figuur 11) kort aangehaald.

2.5.1 Opbouw en belangrijke onderdelen toestel

Allereerst omvat het toestel (figuur 11, onderaan) een tablet (1) waarop alle belangrijke gegevens worden weergegeven. Hieronder valt onder meer de weergave van de nodige reagentia, de onderhouden die moeten gebeuren en de indicatie wanneer de kleuringen van de coupes klaar zijn. Daarnaast zijn er speciale lades (2) waarop de vials met reagentia worden geplaatst, zoals het primair AL, de hematoxyline en het endogeen enzym-block. Nummer 3 vormt een weergave van het rek waarop de afvalvaten, de watervaten en de buffers (tris low pH 6 en tris high pH 9 en de wasbuffer) staan. Nummer 4 geeft de lades weer waarop de coupes worden geladen en bij nummer 5 wordt de plaats weergegeven, waarbij coupes na de IHC-kleuring worden verwijderd. Deze schuif is gevuld met puur water. Als laatste wordt de plaats (6) voor de mengstrips voor het chromogeen substraat 3'3 diaminobenzidine weergegeven.



Figuur 11: Onderdelen IHC-toestel, Dako omnis van Agilent. Legende: 1= tablet met weergave van belangrijke informatie, 2= Lades voor nodige reagentia, 3= Rek voor afvalvaten, watervaten en buffers, 4= Lades voor het aanbrengen van de coupes, 5= Plaats voor verwijderen van coupes na IHC-kleuring, 6= plaats voor mengstrips voor 3'3 diaminobenzidine (bron: A Flexible, Efficient IHC And ISH Stainer For High Throughput | Agilent, z.d.)

2.5.2 Principe toestel (IHC-kleuring)

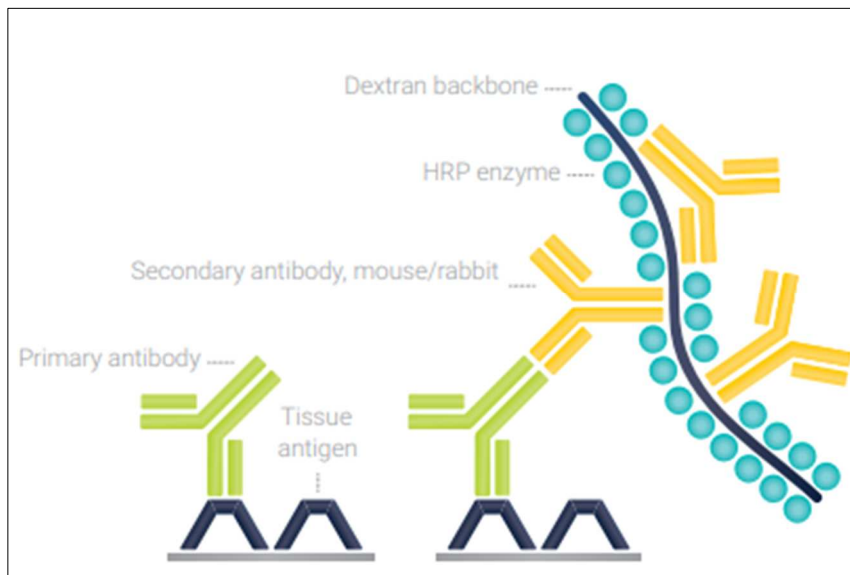
De Dako Omnis (figuur 11) werkt met verschillende diagnose technieken. Echter wordt binnen deze proef gebruik gemaakt van de polymeer-gebaseerde immuunhistochemie met twee stappen, ook wel de EnVision methode genoemd (figuur 12). Het principe van de test is voor elk kleuringsprotocol hetzelfde. In sommige gevallen wordt er ook nog een mouse linker toegevoegd. Dit is een reagens dat extra bindt op het primair antilichaam, om het signaal van dit antilichaam te versterken. Het kleuringsprotocol zal hierbij een sterker kleurcontrast vertonen.

Allereerst worden de coupes ondergedompeld in clearify. Deze stap wordt uitgevoerd om de weefsels te deparaffineren. Vervolgens zal de antigen retrieval plaatsvinden, waarbij de antigenen die mogelijks beschadigd werden tijdens de fixatie, terug worden hersteld. Met deze reden wordt deze stap ook wel de doelrecuperatie genoemd. Het reagens dat hiervoor gebruikt wordt is een trisbuffer, met een hoge pH 9. Daaropvolgend wordt het primair (monoklonale) antilichaam toegevoegd, welke binnen deze proef de Glypican-3 omvat. Deze zal binden aan het specifieke epitoom van het antigen waarvoor het bestemd is. Vervolgens wordt het endogeen peroxidase in de weefsels geblokkeerd (endogeen enzymblock). Deze stap is erg cruciaal, aangezien het endogeen peroxidase voor een aspecifieke kleurreactie kan zorgen, wanneer het gelabeld polymeer (secundair. AL) wordt toegevoegd. Voor deze stap zal gebruik gemaakt worden van waterstofperoxide (H_2O_2).

De coupes zijn nu klaar om een druppel van het tweede antilichaam te ontvangen. Dit is een enzymatisch gelabeld polymeer, dat gericht is tegen het primair antilichaam. Binnen deze proef wordt het HRP gebruikt. Doordat deze IHC-techniek een dextraan-skelet bevat (figuur 12, volgende pagina), zullen er meerdere enzymen (HRP's) gebonden zijn en zal dit dus zorgen voor een hogere gevoeligheid en sterkere kleuring. Om het AG-AL complex uiteindelijk te visualiseren, zal het chromogeen substraat 3'3 diaminobenzidine (DAB) toegevoegd worden. Deze stof zal door de omzetting van HRP resulteren in een bruine waarneembare neerslag.

De IHC-kleuring eindigt met een tegenkleuring, zodat de nucleus en de weefselopbouw van de coupes zichtbaar wordt. Deze functie wordt uitgevoerd door hematoxyline, een donkerblauwe basische kleurstof, die vooral zure componenten zal kleuren (kern, ribosomen).

Tussen de stappen door worden de weefsels regelmatig gewassen met puur water en wasbuffer om de goede kwaliteit van de coupes te garanderen (Dako Pathology Education Guides | Agilent, z.d.).



Figuur 12: EnVision methode (bron: (Dako Pathology Education Guides | Agilent, z.d.)

3. Experimenteel deel

3.1 Materiaal en methode

Alvorens de optimalisatie en validatie van het kleuringsprotocol kon plaatsvinden, vond er een geheel proces aan voorbereidingsstappen plaats binnen het labo. Deze waren erg belangrijk om kwaliteitsvolle coupes te verkrijgen, die vervolgens werden voorgelegd aan de patholoog-anatoom. Om een duidelijk overzicht te geven, wordt elke stap hieronder gedetailleerd beschreven.

3.1.1 Inzetten weefsel

Binnen de macro werden de ontvangen barcodes op de potjes met stukken weefsel ingescand met behulp van het programma DaVinci (LIS-systeem). De gepaste cassettes werden geprint (Primate AS van EpreDia) en de weefsels werden door de laboranten in deze cassettes geplaatst. Vervolgens werden deze cassettes zo snel mogelijk in een bak met formaldehyde 4% (CH₂O, MLS) gelegd voor enkele uren. De gebruikte weefsels voor de optimalisatie en validatie worden opgesomd in onderstaande tabel 2.

Tabel 2: Gebruikte weefsels voor optimalisatie en validatie. (bron: Dewachter K., 2024 (Validatieplan Glypican-3))

Positief weefsel	Staalnummers	Negatief weefsel	Staalnummers
Placenta (Optimalisatie en validatie)	21MB10677/8, 22PL7, 22PL5	Appendix	23A52
Yolk sac tumor	17DB12837/8	Lever	23L10
HCC	21DB898/4, 18DB16964/3	Coloncarcinoom	21DB18031/2
Merkel cel tumor	21DB2380/2	Yolk sac tumor (negatief deel)	17DB12837/8
Choriocarcinoom	17DB5396/9	HCC (negatief deel)	21DB898/4, 18DB16964/3

3.1.2 Doorvoerproces

Eens het proces van fixatie voltooid was, werden de cassettes in het doorvoertoestel (Tissue-Tek VIP 6 AI van Sakura) geplaatst. Hierbij werden de weefsels eerst ontwaterd door deze in verschillende alcoholbaden onder te dompelen. Vervolgens werd ethanol (C₂H₆O, Klinipath) verdreven door xyleen (C₈H₁₀, VWR), wat goed oplosbaar is in paraffine (CH₃(CH₂)₂₃CH₃, Q Path). Als laatste werden de weefsels in paraffine gelegd, zodat het tot het celniveau van de weefsels kon doordringen. De weefsels werden hierdoor terug zachter om deze makkelijk te kunnen snijden de volgende dag.

3.1.3 Inbedden

Na overnacht fixatie werden de cassettes uit het doorvoertoestel gehaald en in een paraffine ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{23}\text{CH}_3$, Q Path) bad van 67°C geplaatst. De weefsels werden vervolgens ingebed, waarbij stukjes weefsel in “moules” werden geplaatst. Dit waren metalen vormpjes waaraan een laagje paraffine (Q path) werd toegevoegd, om vervolgens het weefsel er correct in te leggen. Vervolgens werden de moules met uitgebed weefsel op een koelplaat van -6 à -10°C gelegd. De overtollige paraffine aan de zijkant van de cassettes, werd afgesmolten bij 80°C. In afwachting van het snijden, werden ze nogmaals op een koelplaat van -6 tot -10°C gelegd. Alle bovenstaande toestellen zijn van het merk Medite.

3.1.4 Snijden met de microtoom

Bij het snijden met de microtoom (Histocore autocut) werd het weefsel eerst voorgetrimd om overbodige paraffine weg te snijden. Dit opdat er vervolgens coupes gevormd konden worden van het gewenste weefsel. Deze handeling gebeurde steeds bij een dikte van 20 tot 30µm. Eens dit proces voltooid was, vond het echte snijwerk plaats bij een dikte van 3µm. De coupes werden vervolgens in een koud waterbad gelegd bestaande uit kraantjeswater op kamertemperatuur. Met behulp van een gelabeld glaasje werd het gesneden weefsel uit het koud bad opgepikt en vervolgens in een warm waterbad (Pfm medical) geplaatst om het weefsel uit te strekken en definitief te bevestigen op het draagglas. Dit bad bestond uit puur water en had een temperatuur van 50°C. De coupes werden nadien rechtopstaand gedroogd. Om ervoor te zorgen dat de weefsels niet meer van het draagglas schoven, werden ze in rekjes geplaatst om deze gedurende 20 min. in een oven met een temperatuur van 60°C te plaatsen (Ascon Technologic).

3.1.5 In de Dako Omnis (IHC-toestel) plaatsen

Om de optimalisatie te kunnen uitvoeren, werden er telkens andere protocollen opgesteld tot het gewenste protocol verkregen werd. Met deze reden werden er elke keer andere instellingen gebruikt. Echter is het principe van de test wel altijd hetzelfde. Het principe werd reeds beschreven bij punt 2.5.2. Om per protocol een goed overzicht te bieden van de belangrijkste stappen met bijhorende temperatuur, tijd en hoeveelheid vloeistof, werden deze per onderdeel in een tabel (3-5) geplaatst. Het volledige protocol, inclusief wasstappen, kan teruggevonden worden in bijlage (figuur 23-25).

Belangrijk om te vermelden is dat alle stappen geautomatiseerd worden uitgevoerd.

3.1.5.1 Eerste validatie: Ready to use antilichaam

Bij de eerste optimalisatie en validatie werd gebruik gemaakt van een RTU antilichaam, waarbij meerdere protocols werden opgesteld. Deze worden weergegeven in onderstaande tabellen 3 en 4.

Bij het eerste protocol werd gebruik gemaakt van een mouse linker (tabel 3). Bij het tweede protocol (tabel 4) werd bijgevolg geen mouse linker (M^+) gebruikt, om het onderscheid te kunnen waarnemen.

Protocol: Glypican 30' AL + M⁺

Tabel 3: Protocol van de optimalisatie en validatie van de RTU Glypican-3, met mouse linker. Incubatie met primair antilichaam bedraagt 30 minuten Bron: (Dewachter K., 2024)

Stappen	Tijd (Minuten)	Hoeveelheid (mL)	Temperatuur (°C)
Clearify	1:28	8,00	23,5- 29,9
Antigen Retrieval	29:30	125	94,3-97,2
Primair AL (Glypican-3)	30:01	0,200	32
Endogeen Enzymblock	3:01	0,300	32
Mouse linker (Versterken)	10:01	0,300	32
Secundair AL (gelabeld polymeer)	20:01	0,300	32
Substraat chromogeen	5:01	0,300	32
Tegenkleuring	3:01	0,300	32

Protocol: Glypican 30' AL* (Zonder M⁺)

Tabel 4: Protocol van de optimalisatie en validatie van de RTU Glypican-3, zonder mouse linker. Incubatie met primair antilichaam bedraagt 30 minuten Bron: (Dewachter K., 2024)

Stappen	Tijd (Minuten)	Hoeveelheid (mL)	Temperatuur (°C)
Clearify	1:28	8,00	23,5- 29,9
Antigen Retrieval	29:30	125	94,3-97,2
Primair AL (Glypican-3)	30:01	0,200	32
Endogeen Enzymblock	3:01	0,300	32
Secundair AL (Gelabeld polymeer)	20:01	0,300	32
Substraat chromogeen	5:01	0,300	32
Tegenkleuring	3:01	0,300	32

3.1.5.2 Tweede validatie: Geconcentreerd antilichaam

Bij de tweede optimalisatie en validatie werd slechts één protocol opgesteld (tabel 5), welke gebaseerd was op de referentie van het UZA. Dit maal werd er opnieuw gebruik gemaakt van een mouse linker om de kleuring te versterken.

Protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺

Tabel 5: Protocol van optimalisatie en validatie van het geconcentreerd Glypican-3, met mouse linker. Incubatie met primair antilichaam bedraagt 30 minuten. Antilichaam is 1/200 verdund. Bron: (Dewachter K., 2024)

Stappen	Tijd (Minuten)	Hoeveelheid (mL)	Temperatuur (°C)
Clearify	1:26	8,00	22,40
Antigen Retrieval	29:57	125	97,03
Primair AL (Glypican-3)	20:01	0,200	32
Endogeen Enzymblock	3:01	0,300	32
Mouse linker (Versterken)	10:01	0,300	32
Secundair AL (gelabeld polymeer)	20:01	0,300	32
Substraat chromogeen	5:01	0,300	32
Tegenkleuring	3:01	0,300	32

3.1.6 In het kleurentoestel en de afdekker plaatsen

Eens de IHC-kleuring op de Dako omnis de status voltooid kreeg, werden de coupes uit het toestel gehaald en in de Tissue-Tek Prisma Plus (Sakura) geplaatst. Hier werden de coupes gedurende één minuut in ethanol 99,8% (C₂H₆O, Klinipath) geplaatst. Eens dit voltooid was, werd het nogmaals in een bad met ethanol 99,8% geplaatst voor 45 seconden. Het proces binnen deze automatische kleurmachine werd afgerond door de coupes tweemaal in baden met xyleen (C₈H₁₀, VWR) onder te dompelen. De eerste maal voor één minuut en de tweede maal opnieuw gedurende 45 seconden.

De coupes waren nu volledig klaar om afgedekt te worden met speciale tape. Ook dit gebeurde volledig automatisch in de Tissue-Tek film van Sakura. Beide toestellen zijn aan elkaar gekoppeld om het proces makkelijk te laten verlopen. (Dewachter, 2021)

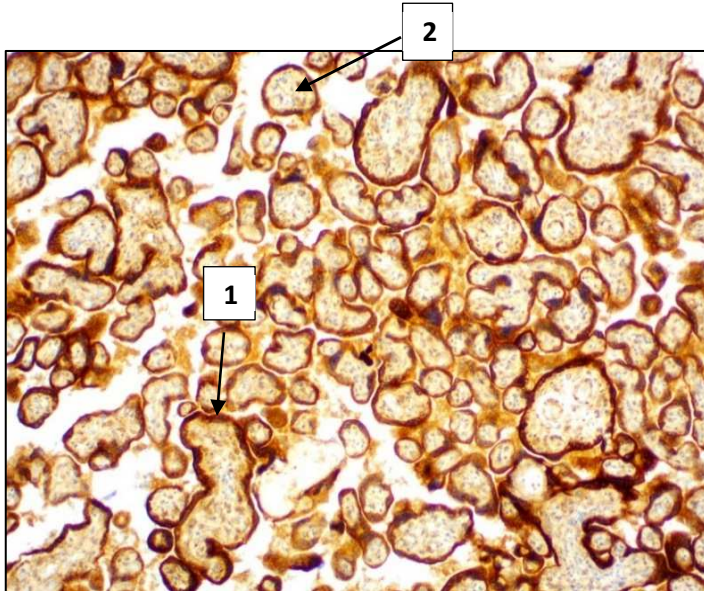
3.1.7 Validatie door de patholoog-anatoom

De procedure en de scorecriteria (Tabel 1) werden reeds beschreven bij punt 2.4.

4. Resultaten

4.1 Eerste optimalisatie: Ready to use antilichaam

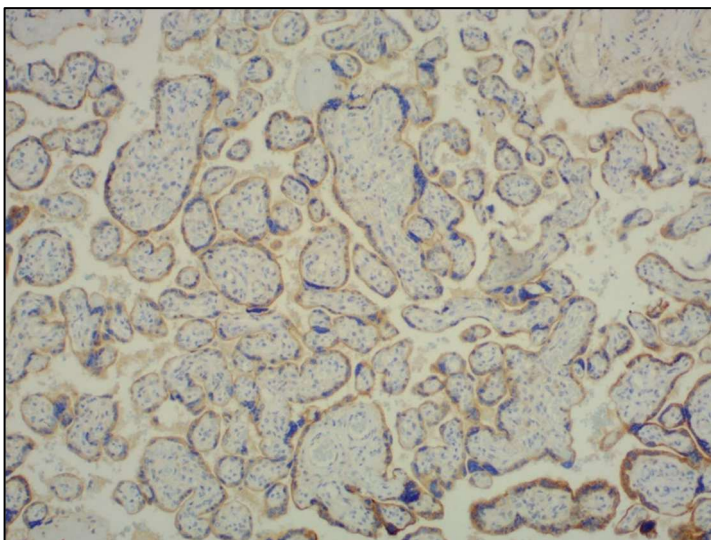
Protocol: Glypican 30' AL + M⁺ op controleweefsel: placenta (22PL5)



Figuur 13: Resultaat protocol: Glypican 30' AL + M⁺ op placenta (Staalnr. 22PL5) bij 10x vergroting. 1= Syncytiotrofoblasten en cytotrofobalsten, 2= Endotheel cellen en stromale cellen in villus (Bron: Dr. Vera Schelfout)

Figuur 13 vormde een erg duidelijke weergave van de bruine neerslag, afkomstig van het chromogeen substraat, DAB. Hierdoor waren de syncytiotrofoblasten en de cytotrofoblasten (1) erg sterk omlijnd. Ook de stromale cellen en endotheelcellen in de villi (2) waren veel te sterk gekleurd. Van de blauwe tegenkleuring, afkomstig van hematoxyline, was bijna niets waar te nemen.

Protocol: Glypican 30' AL* (Zonder M⁺) op controleweefsel: placenta (22PL5)



Figuur 14: Resultaat protocol: Glypican 30' AL op placenta (Staalnr. 22PL5), zonder M⁺ bij 10x vergroting. (Bron: Dr. Vera Schelfout)*

Figuur 14 werd beschouwd als het tegenovergestelde resultaat van figuur 13. De intensiteit is hierbij erg zwak (tabel 6). De bruine kleur van DAB was amper waar te nemen op de foto en vooral de kernen (blauwe bolletjes) sprongen er sterk bovenuit. De syncytiotrofoblasten en de cytotrofoblasten zijn slechts licht aangekleurd. De stromale cellen en endotheelcellen binnen de villi waren zelfs niet aangekleurd.

Tabel 6: Resultaten scoringscriteria voor de kleuringsprotocollen van de eerste optimalisatie: Glypican 30' AL* en Glypican 30' AL + M*. I= intensiteit, U=uniformiteit, S= specificiteit, A= afwezigheid achtergrond, T= tegenkleuring. Zie tabel 1 op pagina 20 voor verklaring van onderstaande getallen (Bron: Dewachter K., 2024)

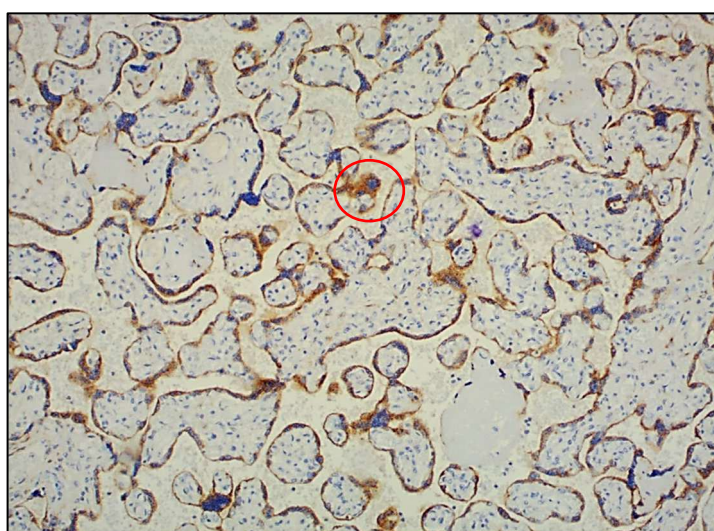
Weefsels	Evaluatie						Aankleuringscriteria
	I	U	S	A	T	Totaal	
Placenta 22PL5 (fig. 13)	3	1	1	0	1	6	Niet oké
Placenta 22PL5 (fig. 14)	1	1	1	2	1	6	Niet oké

4.2 Tweede validatie: Geconcentreerd antilichaam

4.2.1 Resultaten gekozen positieve weefsels

Protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺

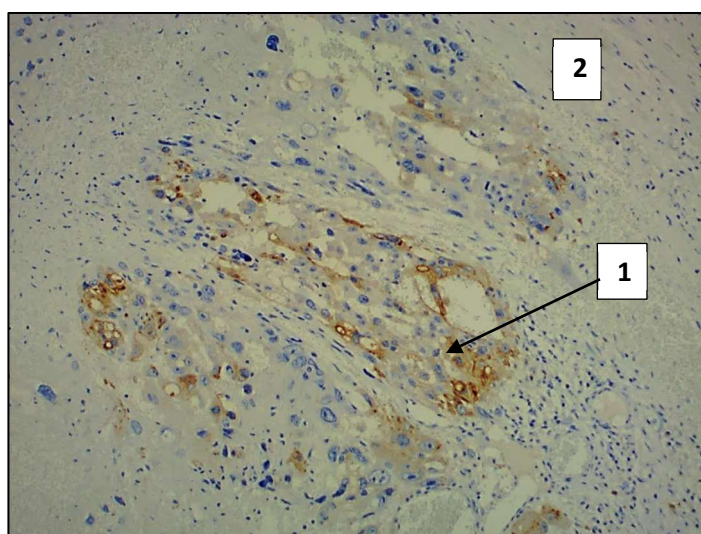
4.2.1.1 Placenta (22PL7)



Figuur 15: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op placenta (22PL7) bij 10x vergroting. Rode cirkel= Bloed (bron: Dr. Vera Schelfout).

Op figuur 15 had de placenta een goede intensiteit en uniformiteit. Zowel de syncytiotrofoblasten en cytotrofoblasten waren erg mooi waarneembaar. De stromale cellen en endotheelcellen zijn zwak aangekleurd, zoals gewenst. Daarnaast waren ook de kernen goed aangekleurd door de hematoxyline. De achtergrondkleuring was afwezig. Slechts enkele resten bloed, die veel voorkomen bij een placenta, waren hier te vinden als bruine vlekken (rode cirkel).

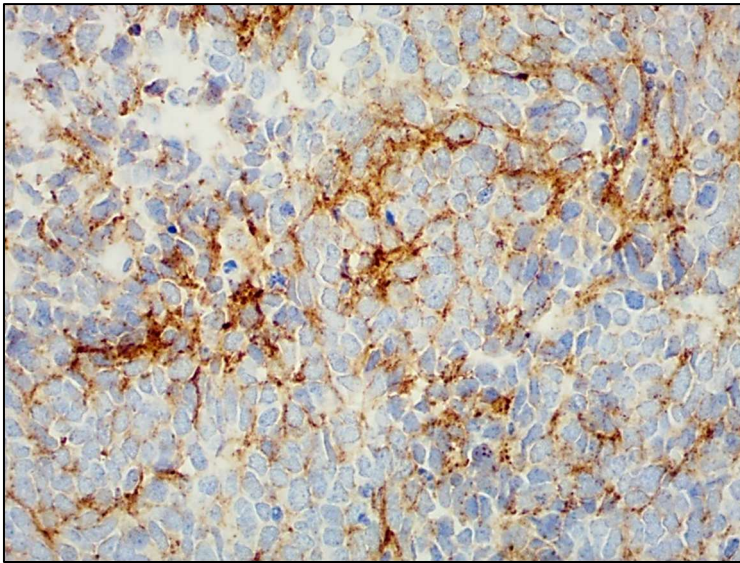
4.2.1.2 Choriocarcinoom (17DB5396/9)



Figuur 16: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op choriocarcinoom (17DB5396/9) op 10x vergroting. 1= tumorweefsel en 2= normaal weefsel (bron: Dr. Vera Schelfout).

Figuur 16 was een prima weergave van een positief resultaat op de kleuring met Glypican-3. Er kon een duidelijk onderscheid waargenomen worden tussen tumorale weefsel (1), waarbij de DAB het AL-AG complex duidelijk heeft gevisualiseerd en het normaal weefsel (2), waarbij enkel de blauwe kernen aanwezig waren.

4.2.1.3 Merkelceltumor (21DB2380/2)

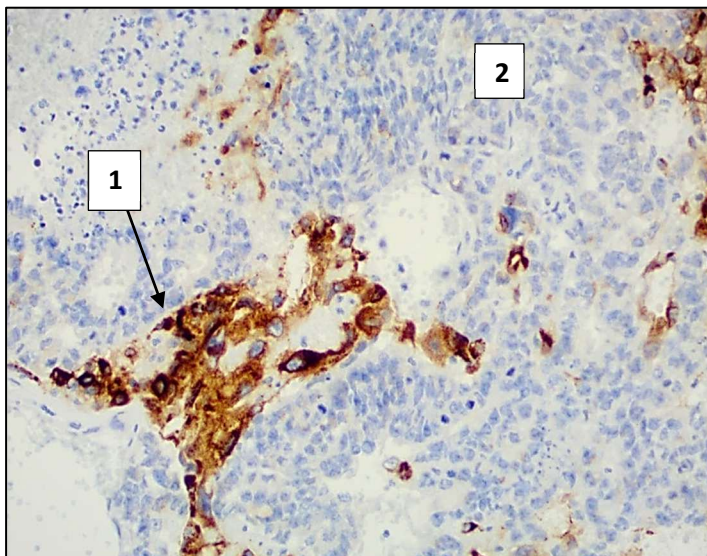


Figuur 17: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op merkelceltumor (21DB2380/2) bij 40x vergroting (bron: Dr. Vera Schelfout).

Alle merkelcellen vertonen een duidelijke kleuring. Ook de celkernen zijn goed aangekleurd door de hematoxyline (figuur 17).

Een volledige merkelceltumor kan gevisualiseerd worden op deze figuur.

4.2.1.4 Yolk sac tumor (17DB12837/8)

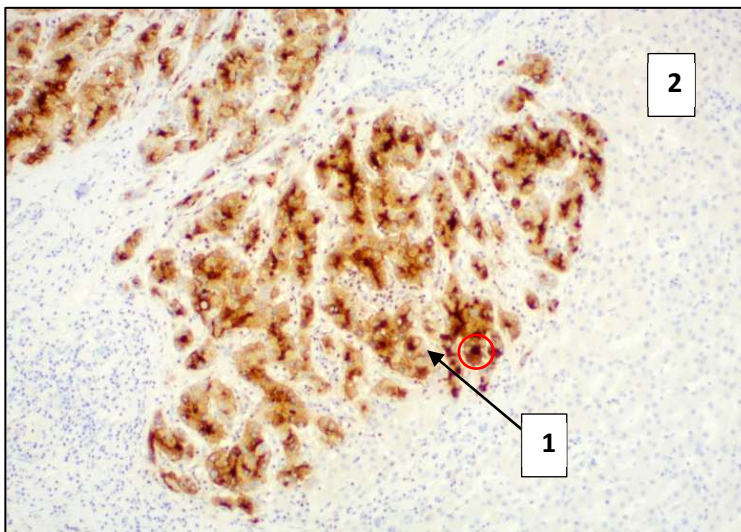


Figuur 18: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op yolk sac tumor (17DB12837/8) bij 20x vergroting. 1= tumor en 2= gezond weefsel (bron: Dr. Vera Schelfout).

Ook de yolk sac tumor (figuur 18) vertoonde de gewenste positieve kleuring. Opnieuw kon er tumorweefsel (1) waargenomen worden. Deze droeg de bruine kleur van het chromogeen substraat, DAB.

Het gezond weefsel vertoonde opnieuw een blauwe kleur van hematoxyline (2).

4.2.1.5 Hepatocellulair carcinoom (21DB898/4)



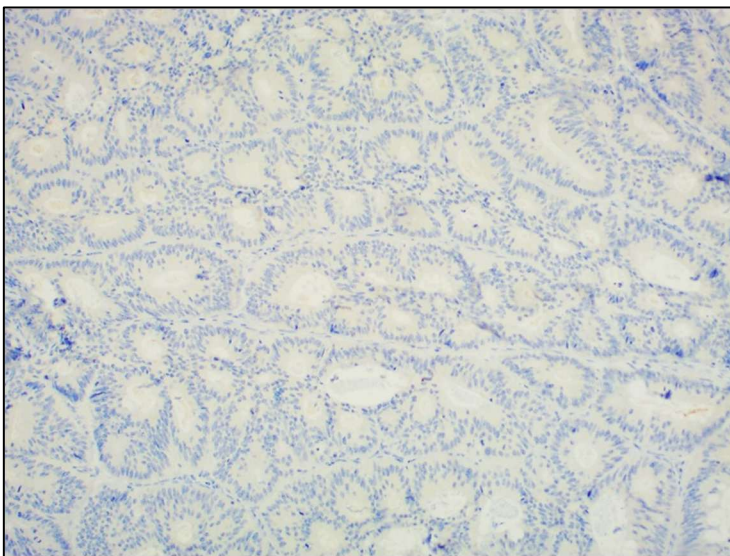
Figuur 19: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op HCC (21DB898/4) met 10x vergroting. 1= Tumor en 2= gezond leverweefsel. Rode cirkel= Neoplastische cel (bron: Dr. Vera Schelfout).

Op figuur 19 kon opnieuw een duidelijk onderscheid waargenomen worden tussen tumoraal weefsel (1) en gezond leverweefsel (2). Daarnaast waren ook de neoplastische cellen, aangeduid met een rode cirkel, sterk bruin aangekleurd. Dit wijst op een goede positieve aankleuring.

4.2.2 Resultaten gekozen negatieve weefsels

Protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺

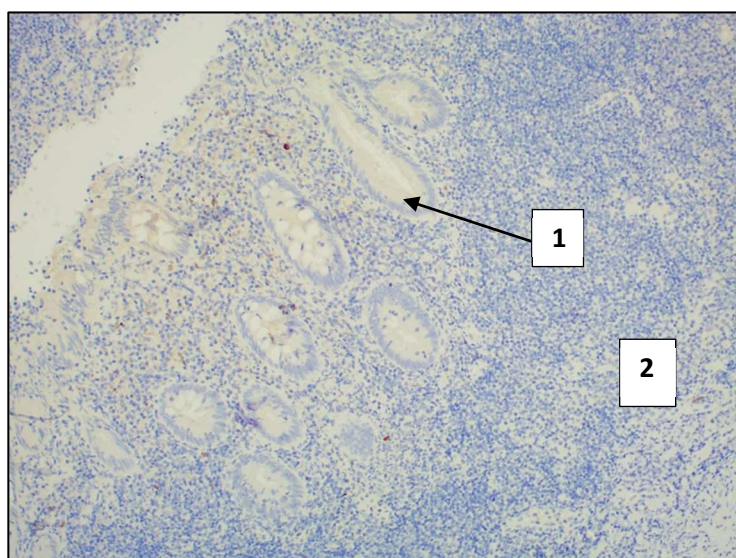
4.2.2.1 Coloncarcinoom (21DB18031/2)



Figuur 20: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op coloncarcinoom (21DB18031/2) bij 10x vergroting (bron: Dr. Vera Schelfout).

Alle cellen van het coloncarcinoom vertonen een negatief resultaat. De kleuring voldoet aan de gewenste kenmerken (figuur 20).

4.2.2.2 Appendix (23A55)



Figuur 21: Resultaat protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M+ op appendix-weefsel (23A55) bij 10x vergroting. 1= Epitheliale cellen, 2= ontstoken weefsel/cellen (bron: Dr. Vera Schelfout).

Ook het appendix-epitheel, dat wordt weergegeven in figuur 21, vertoonde het gewenste resultaat. Het gehele weefsel droeg de blauwe kleur van hematoxyline. Er werd geen neerslag van DAB gedetecteerd.

De epitheliale cellen (1) in het cytoplasma zijn heel licht aangekleurd. Het ontstoken weefsel (2) daarentegen is donkerblauw van kleur.

Tabel 7: Resultaten scoringscriteria voor de kleuringsprotocollen van de tweede optimalisatie en validatie: Glypican CM 1/200 30' AL + M+. I= intensiteit, U=uniformiteit, S= specificiteit, A= afwezigheid achtergrond, T= tegenkleuring. Zie tabel 1 op pagina 20 voor de verklaring van onderstaande getallen (bron: Dewachter K., 2024)

Weefsels	Evaluatie						Aankleuringcriteria
	I	U	S	A	T	Totaal	
Placenta (22PL7)	3	1	1	2	1	8	Oké
Choriocarcinoom (17DB5396/9)	3	1	1	2	1	8	Oké
Merkelceltumor (21DB2380/2)	3	1	1	2	1	8	Oké
Yolk sac tumor (17DB12837/8)	3	1	1	2	1	8	Oké
HCC (21DB898/4)	3	1	1	2	1	8	Oké
Coloncarcinoom (21DB18031/2)	3	1	1	2	1	8	Oké
Appendix (23A55)	3	1	1	2	1	8	Oké

5. Discussie

Bij de uitvoering van de analyses was het de bedoeling volgende onderzoeksvraag te beantwoorden: *‘Optimalisatie en validatie van het Glypican-3 antilichaam op formol-gefixeerd humaan weefsel met behulp van de Dako Omnis’*. In onderstaande discussie worden de resultaten per onderdeel besproken.

5.1 Discussie eerste optimalisatie: Ready to use antilichaam

Protocol: Glypican 30' AL + M⁺ op controleweefsel: placenta

Zoals reeds eerder vermeld in de literatuurstudie, werd de placenta verkozen als ideaal controleweefsel voor de optimalisatie van het protocol voor Glypican-3. Hierbij is het de bedoeling dat de high expressor cellen, namelijk de trofoblasten, een matig tot sterke kleuring vertonen. De stromale cellen en endotheelcellen (low expressors) daarentegen, moeten een zwakke expressie uitstralen.

Er kan dus geconcludeerd worden dat het protocol (figuur 13) niet voldoet aan de verwachtingen. Niet alleen de trofoblasten komen veel te sterk tot expressie, ook de low expressor cellen voldoen niet aan het gewenste resultaat, aangezien ook zij te sterk zijn aangekleurd. Deze vals-positieve resultaten kunnen uiteindelijk leiden tot foutieve conclusies, opgesteld door de patholoog-anatoom.

Ondanks het ongunstige resultaat, blijkt uit tabel 6 dat het protocol wel uniform en specifiek is en bovendien een adequate tegenkleuring vertoont. Dit alles, samen met een te expliciete achtergrond en intensiteit, leidt tot een score van 6 (borderline). De patholoog-anatoom heeft geconcludeerd dat de kleuring met het RTU antilichaam nog verder geoptimaliseerd moet worden.

Een mogelijke reden voor deze ondermaatse kleuring omvat de toevoeging van een mouse linker. Dit heeft er wellicht toe geleid dat de intensiteit te fel is toegenomen. De adjunctie van deze linker kan bij een vervolgonderzoek aan de kant geschoven worden. Anderzijds kan het zijn dat tijd (30 min.) voor de vrijstelling van het antigen en de incubatie met het primair AL te lang of te kort was. Ook dit kan in rekening gebracht worden voor de verdere optimalisatie van het protocol.

Protocol: Glypican 30' AL* (Zonder M⁺) op controleweefsel: placenta

Dit protocol (figuur 14) vertoont het tegenovergestelde resultaat. De intensiteit is erg zwak, hierdoor zijn de trofoblasten niet goed zichtbaar en kunnen de stromale cellen niet waargenomen worden. Wederom kan geconcludeerd worden dat het protocol niet voldoet aan de vooropgestelde eisen. De achtergrondkleuring is echter wel afwezig (tabel 6), wat wijst op een beter kenmerk dan het protocol met de mouse linker. Daarenboven is de uniformiteit, sensitiviteit en tegenkleuring ook in orde (tabel 6). Ook dit protocol moest verder geoptimaliseerd worden, aangezien voor een tweede maal een eindscore van 6 verkregen werd (tabel 6).

De reeds uitgevoerde analyse van *NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control* (2014) bevestigt eveneens dit resultaat. Volgens de organisatie kwam een te zwakke kleuring regelmatig voor bij de andere laboratoria die de optimalisatie met de RTU versie van Glypican-3 uitvoerden. Vaak konden de high expressor cellen, zoals de trofoblasten bij de placenta en de neoplastische cellen van het HCC, wel gevisualiseerd worden. De low expressor cellen (bijvoorbeeld stromale cellen) daarentegen, konden enkel aan de hand van het geoptimaliseerde protocol waargenomen worden. De reden voor deze minder goede resultaten lag vaak bij een te lage concentratie van het primair antilichaam (Glypican-3). Dit zorgde eveneens voor een te lage gevoeligheid om het antigen te visualiseren. Ook bij dit protocol (figuur 14) kan dit een verklaring vormen voor het verkregen resultaat.

Een andere mogelijke duiding kan wederom de incubatietijd met het antilichaam zijn, welke nog niet op punt staat. Een derde reden omvat de afwezigheid van de mouse linker bij dit protocol.

5.1.1 Korte conclusie eerste optimalisatie van het RTU antilichaam

Na het uitvoeren van meerdere pogingen om het protocol op punt te stellen, blijkt de uiteindelijke validatie niet te voldoen aan de gewenste criteria. Met deze reden werd gekozen om hiervan de resultaten niet te tonen en een nieuwe optimalisatie te starten met de geconcentreerde versie van het antilichaam.

5.2 Discussie tweede optimalisatie en validatie: Geconcentreerd antilichaam

Gedurende de tweede optimalisatie werd gekozen om het protocol van het UZA meteen toe te passen. Dit hospitaal had de validatie met Glypican-3 reeds uitgevoerd en het gewenste resultaat verkregen. De eerste coupe met protocol CM 1/200 30' AL + M⁺ werd dadelijk goed gekeurd door de patholoog-anatoom. Hierdoor kon de validatie meteen van start gaan. De verkregen resultaten worden hieronder weergegeven.

5.2.1 Discussie gekozen positieve weefsels

Protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺

5.2.1.1 Placenta

De kleuring van de placenta (figuur 15) ligt in lijn met het resultaat (figuur 22, in bijlage) dat wordt weergegeven in het protocol (run 42) van *NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control* (2014). Deze uitkomst voldoet dus met zekerheid aan de verwachtingen.

Uit dit resultaat kan eveneens afgeleid worden dat er niets mis was met de aanwezigheid van de mouse linker bij figuur 13. Daarnaast is ook de incubatietijd van 30 minuten hetzelfde gebleven als bij de eerste optimalisatie met het RTU antilichaam (figuur 13 en 14). Ook hier is dus niets mis mee. Hoogstwaarschijnlijk was de concentratie van het RTU antilichaam verschillend van het geconcentreerd AL. De concentratie van het geconcentreerd AL kon hoger of lager zijn, doordat dit sterker of net minder

sterk verdund werd door de laborant. Doordat de concentratie van het geconcentreerd AL dus niet gekend is, kan er niet met zekerheid gezegd worden dat dit de oorzaak vormt voor het minder goede resultaat.

5.2.1.2 Choriocarcinoom, Merkelceltumor en Yolk sac tumor

Ook het choriocarcinoom (figuur 16), de merkelceltumor (figuur 17) en de yolk sac tumor (figuur 18) voldoen aan de verwachtingen. Bij alle figuren kan er een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen het tumorale weefsel en het gezond weefsel, zoals reeds vermeld bij de resultaten. De bruine neerslag, gevormd door DAB, wijst op een geslaagde positieve kleuring.

5.2.1.3 Hepatocellulair carcinoom

Figuur 19 vertoont het resultaat van het hepatocellulair carcinoom. De neoplastische cellen zijn duidelijk aangekleurd, hieruit kan opgemaakt worden dat het protocol voor Glypican-3, het gewenste effect vertoont voor het detecteren van dit soort carcinoom. Het onderscheid tussen een tumor en het gezond leverweefsel is duidelijk waarneembaar. Dit voldoet dus ook aan de verwachtingen die werden opgemaakt bij *NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control* (2014).

Naar de toekomst toe, zou het handig zijn om aan de hand van deze tumorkleuring te kijken of het gaat om een metastase of primaire tumor. Daarenboven zou het volgens de pathologen-anatomen erg handig zijn om Glypican-3 samen met een ander antilichaam, namelijk Arginase, te gebruiken om een onderscheid te maken tussen HCC en cholangiocarcinomen, welke ontstaan uit de galwegen.

5.2.2 Discussie gekozen negatieve weefsels

Protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺

5.2.2.1 Coloncarcinoom en appendix

Eveneens de negatieve weefsels, waaronder het coloncarcinoom (figuur 20) en de appendix (figuur 21), liggen in rechte lijn met de vooropgestelde prognose en resultaten van *NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control* (2014). Beide vertonen enkel de negatieve kleuring van hematoxyline (blauw). De bruine neerslag van DAB is afwezig, wat wijst op een perfect negatief resultaat.

5.2.3 Korte conclusie optimalisatie en validatie van het geconcentreerd antilichaam

In het algemeen kan geconcludeerd worden dat de optimalisatie en validatie met het geconcentreerde antilichaam geslaagd is. Alle weefsels kregen een eindscore van 8 (tabel 7). De uniformiteit, specificiteit en intensiteit zijn perfect. Daarnaast is er geen achtergrondkleuring aanwezig en is de tegenkleuring adequaat. Dit geeft aan dat deze kleuring een concordantie vertoont van 100% voor de juistheid. Binnen deze bachelorproef wil dit zeggen dat het kleuringsprotocol voldoet aan de gewenste kleuringscriteria en verwachtingen.

6. Besluit

Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat de optimalisatie en validatie van Glypican-3 op formol-gefixeerd humaan weefsel geslaagd is. Het kleuringsprotocol voor Glypican-3 is goedgekeurd en vrijgegeven om te gebruiken bij routinematige IHC-kleuringen op de Dako Omnis.

Pathologen-anatomen zullen in de nabije toekomst hepatocellulair carcinomen makkelijker kunnen opsporen en sneller een diagnose kunnen stellen voor de behandeling van de patiënt.

Referenties

Absolute Antibody. (2019, 17 september). Antibodies as Tools | Absolute Antibody. <https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibodies-as-tools/>

Akers, S. N., Odunsi, K., & Karpf, A. R. (2010). Regulation of cancer germline antigen gene expression: implications for cancer immunotherapy. *Future oncology (London, England)*, 6(5), 717–732. <https://doi.org/10.2217/fon.10.36>

Antibody basics. (z.d.). Novus Biologicals. <https://www.novusbio.com/support/general-support/antibody-basics.html>

Asafo-Agyei, K. O. (2023, 12 juni). *Hepatocellular carcinoma*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559177/>

Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., Anagnostou, V., & Rimm, D. (2010). Antibody validation. *BioTechniques*, 48(3), 197–209. <https://doi.org/10.2144/000113382>

Cell Marque. (2023). Glypican-3 (1G12) Mouse Monoclonal Antibody: Voor In vitro Diagnostisch Gebruik (IVD). In *Cell Marque* (Nr. CMC44420050). Millipore Sigma.

Chen, X., Cho, D. B., & Yang, P. C. (2010). Double staining immunohistochemistry. *North American journal of medical sciences*, 2(5), 241–245. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2241>

Cooper, G. M. (2000). *The development and causes of cancer*. The Cell - NCBI Bookshelf. Geraadpleegd op 30 januari 2024, van <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Dako Pathology Education Guides | Agilent. (z.d.). <https://www.agilent.com/en/dako-pathology-education-guides>

Dewachter, K. (2021). *Toestelvalidatiedossier VIP6*. Labo Pathologische Anatomie.

Dewachter, K. (2024). *Validatieplan Glypican-3*. Labo Pathologische Anatomie.

Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(6), 307. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100281>

CE-markering – certificering, EU-voorschriften - Your Europe. (2024, 2 juni). Your Europe. https://europa.eu/youreurope/business/product-requirements/labels-markings/ce-marking/index_nl.htm#:~:text=Die%20CE%2Dmarkering%20geeft%20aan,als%20ze%20elder%20gemaakt%20zijn

Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(Suppl 2), S307–S309. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100281>

Ebertz, A. (2021, 30 juli). *Cancer Ecology: The Big Picture of Tumour Development*. The DNA Universe BLOG. <https://the-dna-universe.com/2021/07/29/cancer-ecology-the-big-picture-of-tumour-development/>

Fleming, B. D., & Ho, M. (2020). Development of Glypican-3 Targeting Immunotoxins for the Treatment of Liver Cancer: An Update. *Biomolecules*, 10(6), 934. <https://doi.org/10.3390/biom10060934>

Goedaardige en kwaadaardige tumoren. (2022, september). Kanker.nl. Geraadpleegd op 30 januari 2024, van <https://www.kanker.nl/algemene-onderwerpen/wat-is-kanker/algemeen/goedaardige-en-kwaadaardige-tumoren>

Gurina, T. S. (2023, 1 mei). *Histology, staining*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/#:~:text=Medical%20Histology%20is%20the%20microscopic,the%20tissue%20may%20have%20undergone>.

Grozdanov, P., Yovchev, M. I., & Dabeva, M. D. (2006). The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells. *Laboratory Investigation*, 86(12), 1272–1284. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700479>

Guo, M., Zhang, H., Zheng, J., & Liu, Y. (2020). Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer*, 11(8), 2008–2021. <https://doi.org/10.7150/jca.39972>

Haex, G. (2024, 1 februari). WHO voorspelt 75% meer kankergevallen tegen 2050: “Vooral deze mensen worden er de dupe van”. *HLN*. Geraadpleegd op 25 maart 2024, van <https://www.hln.be/gezondheid/who-voorspelt-75-meer-kankergevallen-tegen-2050-vooral-deze-mensen-worden-er-de-dupe-van~a077f37f/?referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>

Hepatocellulair carcinoom. (2024, 22 januari). UZ Leuven. Geraadpleegd op 19 februari 2024, van <https://www.uzleuven.be/nl/hepatocellulair-carcinoom-hcc>

NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control. (2014, 9 december). Geraadpleegd op 16 februari 2024, van <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=48>

Immuunhistochemie. (z.d.). Radboudumc. Geraadpleegd op 14 februari 2024, van <https://www.radboudumc.nl/afdelingen/pathologie/alles-over-pathologisch-onderzoek/soorten-pathologisch-onderzoek/immuunhistochemie>

IHC Immunodetection | Thermo Fisher Scientific - IE. (z.d.). <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-immunodetection.html>

Kanker, K. O. T. (2022, 31 augustus). *Wat is een biopsie?* Alles over Kanker. Geraadpleegd op 27 januari 2024, van <https://www.allesoverkanker.be/definities/biopsie>

Kanker, K. O. T. (2022, 19 september). *Wat is leverkanker?* Alles Over Kanker. Geraadpleegd op 19 februari 2024, van <https://www.allesoverkanker.be/leverkanker/wat-is-leverkanker>

Khan, Y. S. (2023, 17 april). *Embryology, Week 1*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554562/#:~:text=Introduction,fetus%20with%20primitively%20functioning%20organs>.

Kyowa Kirin. (z.d.). <https://www.kyowakirin.com/antibody/basics/specificity.html>

Labo pathologische Anatomie. (2023, 6 september). AZ Sint-Maarten. Geraadpleegd op 27 januari 2024, van <https://www.azsintmaarten.be/professionals/labo-pathologische-anatomie>

Leverkanker - Oncozon. (2018, 26 november). Oncozon. <https://www.oncozon.nl/overzicht-ziektebeelden/leverkanker/>

Maxwell, P., & McCluggage, W. G. (2000). Audit and internal quality control in immunohistochemistry. *Journal of clinical pathology*, 53(12), 929–932. <https://doi.org/10.1136/jcp.53.12.929>

Mairaville, C., & Martineau, P. (2021). Antibody Identification for Antigen Detection in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Using Phage Display and Naïve Libraries. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.3390/antib10010004>

Martens, S., Verslype, C., Maleux, G., Verbist, J., Cuyle, P. J., Carton, S., Moons, V., & De Bruecker, Y. (2017, 15 september). *Behandeling van het hepatocellulair carcinoom*. Geraadpleegd op 19 februari 2024, van <https://tvgg.be/nl/artikels/behandeling-van-het-hepatocellulair-carcinoom>

Newkirk, K. M., Brannick, E. M., & Kusewitt, D. F. (2017). Neoplasia and tumor biology. In *Elsevier eBooks* (pp. 286–321.e1). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35775-3.00006-0>

NORDIQ - Immunohistochemical Quality Control. (2014, 9 december). Geraadpleegd op 16 februari 2024, van <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=48>

Polyclonal vs Monoclonal Antibodies. (2024). Pacific Immunology. Geraadpleegd op 9 februari 2024, van <https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/>

Scientific, M. (2022, 20 januari). Histology Vs. Cytology. *The lab report*. Geraadpleegd op 25 maart 2024, van <https://www.mercedesscientific.com/blog/Histology?ID=1642521407031>

Secondary Antibodies and Immunoglobulins - Leinco Technologies. (2024, 16 januari). Leinco Technologies. <https://www.leinco.com/secondary-antibodies/>

Valilou, S. F., & Rezaei, N. (2019). Tumor antigens. In *Elsevier eBooks* (pp. 61–74). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814039-0.00004-7>

Vaillant, A. A. J., Jamal, Z., Patel, P., & Ramphul, K. (2023, 28 augustus). *Immunoglobulin*. StatPearls - NCBI Bookshelf. Geraadpleegd op 25 maart 2024, van <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>

Verbeke, H., Van Hecke, D., Bauraing, C., Dierick, A. M., Colleye, O., Dalle, I., Dewachter, K., Guiot, Y., Lequeu, R., Vanderheyden, N., Zwaenepoel, K., & Croes, R. (2024). Belgian Recommendations for Analytical Verification and Validation of Immunohistochemical Tests in Laboratories of Anatomic Pathology. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 32(1), 1–16. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000001165>

Vigneron N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed research international*, 2015, 948501. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>

Wepsic H. T. (1983). Overview of oncofetal antigens in cancer. *Annals of clinical and laboratory science*, 13(4), 261–266.

What is cancer? (2021, 11 oktober). National Cancer Institute. Geraadpleegd op 30 januari 2024, van <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

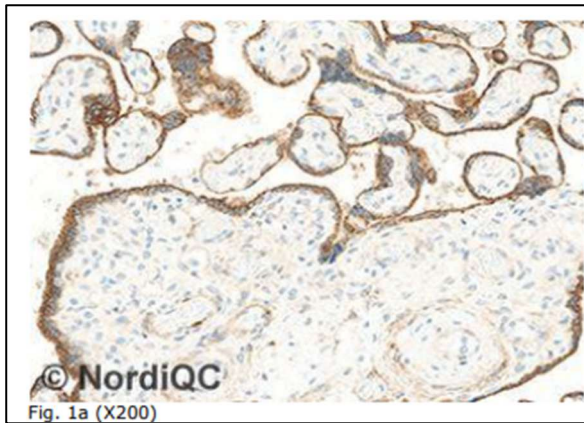
Whelan, S., PhD. (2023, 18 april). *Benign vs Malignant Tumors*. Cancer Research From Technology Networks. <https://www.technologynetworks.com/cancer-research/articles/benign-vs-malignant-tumors-364765>

WHO. (z.d.). *Cancer today*. Geraadpleegd op 25 maart 2024, van <https://gco.iarc.fr/today/en>

Zhang, Z., Lu, M., Qin, Y., Gao, W., Li, T., Su, W., & Zhong, J. (2021). Neoantigen: a new breakthrough in tumor immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672356>

Zero To Finals. (2019, 11 februari). *How do monoclonal antibodies work? Rituximab, infliximab, adalimumab and others* [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=h6sGMaf6Yew>

Bijlage



Figuur 22: Resultaat optimale kleuring voor Glypican-3 volgens NordiQC (bron: NORDIQC - Immunohistochemical Quality Control (2014))

Protocol: Glypican 30' AL + M+ op controleweefsel: placenta

Geschiedenis

Gebeurtenis	Details	Ernst	Datum	Locatie	Gebruiker
Objectglasje aangevraagd	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*)	Informatie	29/01/2024 10:10:37		kdewachter
Objectglasje toegewezen aan abonnee	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*) toegewezen aan Dako Link Omnis	Informatie	29/01/2024 10:10:37		kdewachter
Label voor objectglasje afgedrukt	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*)	Informatie	29/01/2024 10:10:39		kdewachter
Objectglasje geladen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*) in rek 073	Informatie	29/01/2024 16:03:39	Omnis 3	juvandenbogaert
Was verwijderen in twee fasen IHC	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Oplosmiddel: 8 mL van Clearify Clearing Agent, batch 170674 uit fles 303, Transportvloeistof: DI Water, Temperatuur: 23,18 °C (23,1 °C - 23,4 °C), Incubatie boven: 16 s, Incubatie onder: 1:12 min, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 3:04:46	Omnis 3	
Wassen bij was verwijderen in twee fasen IHC	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: DI Water, Incubatie: 1:13 min, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 3:13:58	Omnis 3	
Doelrecuperatie IHC	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 125 mL van EnV FLEX TRS, High pH, batch 41556655 uit fles 305, Temperatuur: 97 °C (96,9 °C - 97,2 °C), Incubatie: 29:30 min, Koelvloeistof: DI Water.	Informatie	30/01/2024 3:51:21	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 900 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 10:25 min, Cycli: 2.	Informatie	30/01/2024 4:03:26	Omnis 3	
Primair antilichaam	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 200 µL van Glypican RO RTU vial, batch V0003652 uit vial KdkkW, Incubatie: 30:01 min.	Informatie	30/01/2024 4:33:35	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 5:08 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 4:38:43	Omnis 3	
Endogeen enzymblok	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 300 µL van EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, batch 41645377 uit vial 1yNL, Incubatie: 3:01 min.	Informatie	30/01/2024 4:41:52	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 4:45 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 4:46:38	Omnis 3	
Secundair reagents	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 300 µL van EnV FLEX+ Mouse LINKER, batch 41659459 uit vial 1kuFJ, Incubatie: 10:01 min.	Informatie	30/01/2024 4:56:46	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 5:37 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:02:24	Omnis 3	
Gelabeld polymeer	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 300 µL van EnV FLEX/HRP, batch 41617506 uit vial 1gndN, Incubatie: 20:01 min.	Informatie	30/01/2024 5:22:32	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:03 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:24:35	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 3:00 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:27:35	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: DI Water, Incubatie: 31 s, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 5:28:22	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:21 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:30:58	Omnis 3	
Substraatchromogeen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 300 µL van EnV FLEX Substrate Working Solution,				
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:44 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:38:51	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: DI Water, Incubatie: 32 s, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 5:39:38	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:30 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:42:23	Omnis 3	
Tegenkleuren	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 300 µL van Hematoxylin, batch 41649802 uit vial 1jUe, Incubatie: 3:01 min.	Informatie	30/01/2024 5:45:31	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:41 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:48:13	Omnis 3	
Objectglasje gekleurd	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*)	Informatie	30/01/2024 5:50:42	Omnis 3	
Wassen	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*). Reagents: DI Water, Incubatie: 2:15 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:50:43	Omnis 3	
Objectglasje voltooid	Objectglasje 22PL5-02 (Glypican 30' AL + M*)	Informatie	30/01/2024 7:37:48		maheylen

Figuur 23: Volledige procedure voor protocol Glypican 30' AL + M+ (bron: K. Dewachter).

Protocol: Glypican 30' AL* (Zonder M+) op controleweefsel: placenta

Geschiedenis

Gebeurtenis	Details	Ernst	Datum	Locatie	Gebruiker
Objectglaasje toegewezen aan abonnee	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*) toegewezen aan Dako Link Omnis	Informatie	29/01/2024 10:10:37		kdewachter
Objectglaasje aangevraagd	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*)	Informatie	29/01/2024 10:10:37		kdewachter
Label voor objectglaasje afgedrukt	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*)	Informatie	29/01/2024 10:10:39		kdewachter
Objectglaasje geladen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*) in rek 073	Informatie	29/01/2024 16:03:39	Omnis 3	juvandenbogaert
Was verwijderen in twee fasen IHC	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Oplosmiddel: 8 mL van Clearify Clearing Agent, batch 170674 uit fles 303, Transportvloeistof: DI Water, Temperatuur: 23,18 °C (23,1 °C - 23,4 °C), Incubatie boven: 16 s, Incubatie onder: 1:12 min, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 3:04:46	Omnis 3	
Wassen bij was verwijderen in twee fasen IHC	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: DI Water, Incubatie: 1:13 min, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 3:13:58	Omnis 3	
Doelrecuperatie IHC	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 125 mL van EnV FLEX TR5, High pH, batch 41556655 uit fles 305, Temperatuur: 97 °C (96,9 °C - 97,2 °C), Incubatie: 29:30 min, Koelvloeistof: DI Water.	Informatie	30/01/2024 3:51:21	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 900 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 11:16 min, Cycli: 2.	Informatie	30/01/2024 4:04:18	Omnis 3	
Primair antilichaam	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 200 µL van Glypican RO RTU vial, batch V0003652 uit vial KdkkW, Incubatie: 30:01 min.	Informatie	30/01/2024 4:34:27	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 3:56 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 4:38:24	Omnis 3	
Endogeen enzymblok	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 300 µL van EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, batch 41645377 uit vial 1HyNL, Incubatie: 3:01 min.	Informatie	30/01/2024 4:41:32	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:00 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 4:43:32	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 19:09 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:02:42	Omnis 3	
Gelabeld polymeer	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 300 µL van EnV FLEX/HRP, batch 41617506 uit vial 1gndN, Incubatie: 20:01 min.	Informatie	30/01/2024 5:22:51	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:02 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:24:54	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:41 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:27:35	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: DI Water, Incubatie: 30 s, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 5:28:22	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:36 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:31:14	Omnis 3	
Substraatchromogeen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 300 µL van EnV FLEX Substrate Working Solution, batch 41613619 uit EnV FLEX Substrate Buffer, batch 41613619 uit vial 1iGc6 + EnV FLEX DAB+ Chromogeen, batch 41659467 uit vial 1iNuN + EnV FLEX Substrate Buffer, batch 41613619 uit vial 1iGc6, Incubatie: 5:01 min.	Informatie	30/01/2024 5:36:23	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:48 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:38:51	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: DI Water, Incubatie: 31 s, Cycli: 1.	Informatie	30/01/2024 5:39:38	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:48 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:42:42	Omnis 3	
Tegenkleuren	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 300 µL van Hematoxylin, batch 41649802 uit vial 1jUe, Incubatie: 3:01 min.	Informatie	30/01/2024 5:45:50	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41645193 uit fles 301, Incubatie: 2:22 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:48:13	Omnis 3	
Objectglaasje gekleurd	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*)	Informatie	30/01/2024 5:50:42	Omnis 3	
Wassen	Objectglaasje 22PL5-03 (Glypican 30' AL*). Reagens: DI Water, Incubatie: 2:14 min, Cycli: 10.	Informatie	30/01/2024 5:50:43	Omnis 3	

Figuur 24: Volledige procedure voor protocol Glypican 30' AL* Zonder M+ (bron: K. Dewachter).

Protocol: Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺

Geschiedenis

Gebeurtenis	Details	Ernst	Datum	Locatie	Gebruiker
1 Objectglasje toegewezen aan abonnee	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺) toegewezen aan Dako Link Omnis	Informatie	22/02/2024 13:26:49		kdewachter
1 Objectglasje aangevraagd	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺)	Informatie	22/02/2024 13:26:49		kdewachter
1 Label voor objectglasje afgedrukt	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺)	Informatie	22/02/2024 13:26:50		kdewachter
1 Objectglasje geladen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺) in rek 154	Informatie	22/02/2024 15:26:50	Omnis 1	SWY
1 Was verwijderen in twee fasen IHC	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Oplosmiddel: 8 mL van Clearly Clearing Agent, batch 173077 uit fles 103, Transportvloeistof: DI Water, Temperatuur: 22.47 °C (22.4 °C - 22.5 °C), Incubatie boven: 16 s, Incubatie onder: 1:10 min, Cycli: 1.	Informatie	23/02/2024 3:55:17	Omnis 1	
1 Wassen bij was verwijderen in twee fasen IHC	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: DI Water, Incubatie: 40 s, Cycli: 1.	Informatie	23/02/2024 4:03:56	Omnis 1	
1 Doelrecuperatie IHC	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 125 mL van EnV FLEX TRS, High pH, batch 41625829 uit fles 105, Temperatuur: 97.03 °C (96.9 °C - 97.3 °C), Incubatie: 29:57 min, Koelmiddel: DI Water.	Informatie	23/02/2024 4:41:45	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 900 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 3:02 min, Cycli: 2.	Informatie	23/02/2024 4:45:56	Omnis 1	
1 Primair antilichaam	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 200 µL van A 1/200, batch 1838995glypican uit vial Kdkle, Incubatie: 20:01 min.	Informatie	23/02/2024 5:06:05	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 3:08 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 5:09:14	Omnis 1	
1 Endogeen enzymblok	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 300 µL van EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, batch 41617560 uit vial 1gA87, Incubatie: 3:01 min.	Informatie	23/02/2024 5:12:22	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:46 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 5:15:09	Omnis 1	
1 Secundair reagens	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 300 µL van EnV FLEX+ Mouse LINKER, batch 41640496 uit vial 1hAzy, Incubatie: 10:01 min.	Informatie	23/02/2024 5:25:17	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:46 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 5:28:04	Omnis 1	
1 Gelabeld polymeer	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 300 µL van EnV FLEX/HRP, batch 41625809 uit vial 1gUmg, Incubatie: 20:01 min.	Informatie	23/02/2024 5:48:12	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:00 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 5:50:12	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:44 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 5:52:57	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: DI Water, Incubatie: 31 s, Cycli: 1.	Informatie	23/02/2024 5:53:43	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:21 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 5:56:19	Omnis 1	
1 Substraatchromogeen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 300 µL van EnV FLEX Substrate Working Solution, batch 41649393 uit EnV FLEX Substrate Buffer, batch 41649393 uit vial 1h500 + EnV FLEX DAB+ Chromogen, batch 41617523 uit	Informatie	23/02/2024 6:01:27	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:25 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 6:03:53	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: DI Water, Incubatie: 31 s, Cycli: 1.	Informatie	23/02/2024 6:04:39	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:22 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 6:07:17	Omnis 1	
1 Tegenkleuren	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 300 µL van Hematoxylin, batch 41613664 uit vial 1h5MX, Incubatie: 3:01 min.	Informatie	23/02/2024 6:10:25	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: 4500 µL van Wash Buffer, batch 41659525 uit fles 102, Incubatie: 2:24 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 6:12:50	Omnis 1	
1 Objectglasje gekleurd	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺)	Informatie	23/02/2024 6:16:05	Omnis 1	
1 Wassen	Objectglasje 24PL5-01 (Glypican CM 1/200 30'AL +M ⁺). Reagens: DI Water, Incubatie: 3:01 min, Cycli: 10.	Informatie	23/02/2024 6:16:06	Omnis 1	

Figuur 25: Volledige procedure voor protocol Glypican CM 1/200 30' AL + M⁺ (bron: K.Dewachter)