

Invloed van cytologische bewerking op kwaliteit moleculaire diagnostiek bij NSCLC
Ervaringen van een verbeterproject

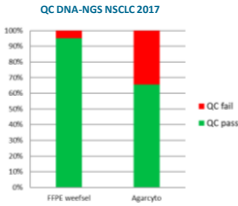
Shoko Vos, MD PhD
Patholoog @Radboudumc
shoko.vos@radboudumc.nl

Sjoerd van Helvert, PhD
KMBP @Radboudumc
sjoerd.vanhelvert@radboudumc.nl

Radboudumc

1

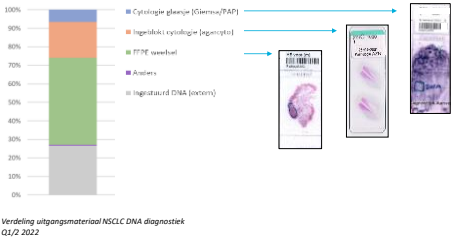
Moleculaire diagnostiek NSCLC: QC op FFPE weefsel versus agarcyto



Radboudumc

2

Moleculaire diagnostiek NSCLC: uitgangsmateriaal



Radboudumc

3

Keuze uitgangsmateriaal voor moleculaire diagnostiek

	Giemsa/PAP
DNA QC	Kan goed werken, verschilt per test
RNA NGS QC (Archer)	-(Giemsa) +/- (PAP)
Bewerkelijk	Ja (afweken dekglasje)
Verbruik gewenst?	Nee, preparaat gaat verloren
Aanwezig?	Ja

Radboudumc

4

Keuze uitgangsmateriaal voor moleculaire diagnostiek

	Giemsa/PAP	Agarcyto
DNA QC	Kan goed werken, verschilt per test	Verschilt per test
RNA NGS QC (Archer)	-(Giemsa) +/- (PAP)	+/-
Bewerkelijk	Ja (afweken dekglasje)	Normaal
Verbruik gewenst?	Nee, preparaat gaat verloren	Ja
Aanwezig?	Ja	Niet altijd

Radboudumc

5

Keuze uitgangsmateriaal voor moleculaire diagnostiek

	Giemsa/PAP	Agarcyto	FFPE weefsel
DNA QC	Kan goed werken, verschilt per test	Verschilt per test	+
RNA NGS QC (Archer)	-(Giemsa) +/- (PAP)	+/-	+
Bewerkelijk	Ja (afweken dekglasje)	Normaal	Normaal
Verbruik gewenst?	Nee, preparaat gaat verloren	Ja	Ja
Aanwezig?	Ja	Niet altijd	Niet altijd

Radboudumc

6

Keuze uitgangsmateriaal voor moleculaire diagnostiek

	Giemsa/PAP	Agarcyto	FFPE weefsel
DNA QC	Kan goed werken, verschilt per test	Verschilt per test	+
RNA NGS QC (Archer)	-(Giemsa) +/- (PAP)	+/-	+
Bewerkelijk	Ja (afweken dekglasje)	Normaal	Normaal
Verbruik gewenst?	Nee, preparaat gaat verloren	Ja	Ja
Aanwezig?	Ja	Niet altijd	Niet altijd

- Voorkeur voor FFPE, maar niet altijd aanwezig
- Indien alleen cytologie: agarcyto beter dan Giemsa/PAP
- Ook bij agarcyto is de NGS kwaliteit regelmatig suboptimaal

→ Verbeteren van NGS kwaliteit op ingeblokt cytologisch materiaal (agarcyto)

Radboudumc

7

Aanknopingspunten voor verbeteren kwaliteit NGS op cytologisch materiaal

- Navraag: zijn er wijzigingen in de kliniek bij afname of transport?
- Fixatie tijd: te lange fixatie (over-weekend) funest voor DNA/RNA kwaliteit.
- Fixatieven vergelijken
- Vergelijk van typen agar
- Verschil waarneembaar tussen agarcyto's waarvan de NGS is gelukt vs. mislukt?
- Optimaliseren protocol bereiden agarcyto
- Minimaliseren van agar in de DNA extractie
- Vervangen van agar voor agarose

Radboudumc

8

Aanknopingspunten voor verbeteren kwaliteit NGS op cytologisch materiaal

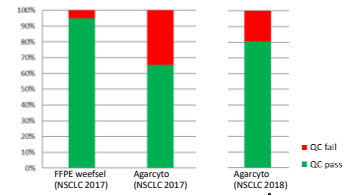
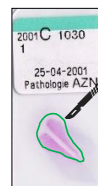
- Navraag: zijn er wijzigingen in de kliniek bij afname of transport?
Nee, dus geen verklaring voor recente verslechtering in kwaliteit
- Fixatie tijd: te lange fixatie (over-weekend) funest voor DNA/RNA kwaliteit.
Blijkt niet de oorzaak, doorvoer meestal snel en meestal geen cytologie op vrijdag
- Fixatieven vergelijken
Twee fixatieven vergeleken vanwege noodgedwongen overstap: kleine verschillen, lastig te vergelijken
- Vergelijk van typen agar
Twee producten vergeleken: één product was beter, kleine verschillen, lastig te vergelijken
- Verschil waarneembaar tussen agarcyto's waarvan de NGS is gelukt vs. mislukt?
Geen aanknopingspunten gevonden
- Optimaliseren protocol bereiden agarcyto
Enkele verbeteringen aangebracht, maar geen duidelijke verbetering in NGS kwaliteit als gevolg
- Minimaliseren van agar in de DNA extractie
- Vervangen van agar voor agarose

Radboudumc

9

Minimaliseren van agar in de DNA extractie

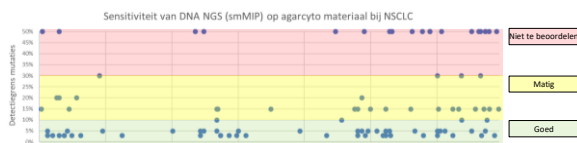
- Agar wordt gewonnen uit zeewier
- Bestaat uit hoofdc componenten agarose en agaropectine
- Agaropectine bevat mogelijk componenten die PCR reacties verstoren



Radboudumc

10

Blijvend wisselende kwaliteit NGS analyse op agarcyto



- Mogelijk veroorzaakt door veranderingen in leveranciers van agar of verschillen per batch

Radboudumc

11

Vervangen van agar voor agarose

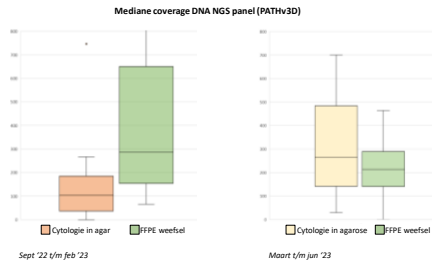
Van agarose is bekend dat dit niet verstorend werkt bij moleculaire analyses.
Omdat agar grotendeels bestaat uit agarose is gekozen voor een beperkte validatie

- Pilot experiment met 2 samples (agar vs. agarose)
- Materiaal verzamelen voor validatie
- Juiste concentratie agarose bepalen (1,5%)
- Testen doorvoeren, snijden, kleuringen
- Testen moleculaire analyses

Radboudumc

12

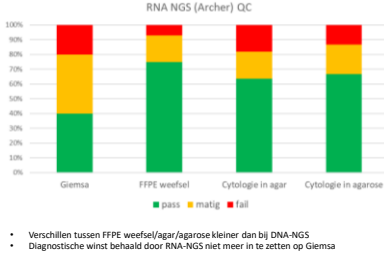
Vervangen van agar voor agarose leidt tot 2,5x hogere coverage bij DNA-NGS



Radboudumc

13

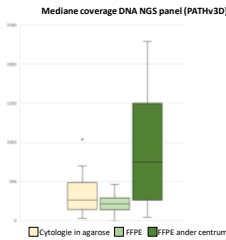
RNA NGS QC op verschillende soorten uitgangsmateriaal



Radboudumc

14

Vergelijk DNA NGS coverage met ander centrum



Radboudumc

15