

Vet aspiratie procedure voor de opsporing van amyloïd

Aspiratie van onderhuids buikvetweefsel is een eenvoudige en poliklinisch uit te voeren procedure (1). Het is belangrijk te realiseren dat het minimaal 10 - 15 minuten kost om de procedure goed uit te voeren zonder nodeloos pijn of bloedingen te veroorzaken en om voldoende materiaal te verkrijgen. De patiënt mag niet bekend zijn met een allergie voor lidocaïne en dient voorafgaande aan de procedure te horen dat een blauwe plek een mogelijk gevolg kan zijn.

Benodigdheden voor de vetaspiratie

Zie figuur 1A voor de benodigdheden: Chloorhexidine oplossing voor het schoonmaken van de huid, een 5 ml spuit verbonden met een 22 Gauge naald voor lidocaïne anaesthetie (figuur 1B), twee 10 ml spuit die via een kraantje/klepsysteem verbonden zijn met 16 Gauge naalden voor vetaspiratie (figuur 1C), pleisters, gaasjes en handschoenen.



Fig 1A. Voorbereiding procedure



Fig 1B. Benodigdheden verdoving



Fig 1C. Vetaspiratie spullen

Vetaspiratietechniek

Een spuit van 10 ml wordt via een klepsysteem verbonden met een naald van 16 Gauge (figuur 2A). Na sluiting van de klep wordt de zuiger naar buiten getrokken, met twee vingers vastgeklemd en het hulsje van de verdovingsnaald hergebruikt door het elegant ondersteboven te plaatsen tussen zuiger en spuit ("Tarek's truuk") om zo de stand van de zuiger te fixeren en onderdruk in de spuit te houden tijdens aspiratie (zie figuur 2B and 2C).



Fig 2A. Sluit klep, hergebruik huls

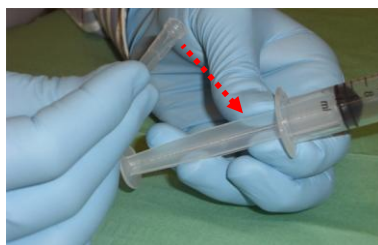


Fig 2B. Zuiger eruit, (Let op huls) ...

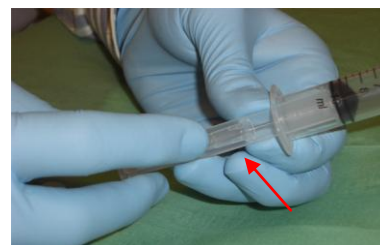


Fig 2C. ... plaats huls, fixeer zuiger.

De huid van de patiënt wordt gemerkt (figuur 3A) en schoongemaakt (met chloorhexidine) aan beide zijden van de navel op circa 7-10 cm afstand. Huid en onderhuids weefsel (drie richtingen, zie onder) worden verdoofd met lidocaïne (elke kant 2 ml=20 mg)(figuur 3B). Verifieer eerst dat de patiënt niet allergisch is voor lidocaïne. Als de naald onder de huid is kan de klep worden geopend om te beginnen met de aspiratie van vetweefsel (figuur 3C).



Fig 3A. Merken van de huid

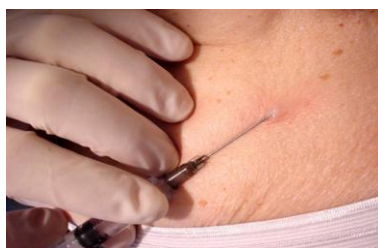


Fig 3B. Verdoven met lidocaïne

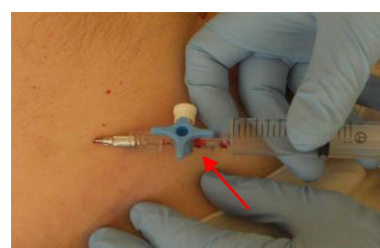


Fig 3C. Geopende klep, aspiratie

De naald kan gericht worden in een drietal richtingen (NO, O en ZO) aan de linker kant van de buik en spiegelbeeldig aan de andere kant. Het opzuigen dient rustig en voorzichtig plaats te vinden in alle drie de richtingen in een heen en weer gaande beweging, waarbij eventueel de naald iets gedraaid kan worden (“licht wrikkend”), waarbij de naald als een hol mes aangezogen vetweefsel lossnijdt van de omgeving. Het is goed te bedenken dat er enige tijd verloopt voordat de naald zich heeft gevuld met vetweefsel en het eerste vet zichtbaar wordt in de top van de spuit (figuur 4A). Na beëindiging van de procedure de prikplaats even afdrukken en met een pleister afdekken (figuur 4B). Het doel van de procedure is om voldoende materiaal te verkrijgen voor microscopische analyse (30 mg) en verder minimaal 30 mg vetweefsel voor immunochemische kwantificering van SAP en de specifieke amyloïd eiwitten. Aspiratie kan aan beide zijden van de navel worden uitgevoerd om zo de minimaal benodigde 60 mg vetweefsel te verkrijgen (figuur 4C).



Fig 4A. Resultaat in spuit



Fig 4B. Gewicht en afmeting



Fig 4C. Pleister op prikplaats

Als je klaar bent en voldoende vetweefsel hebt verkregen is de gemakkelijkste oplossing: **Sluit de spuiten goed af, stuur ze naar Groningen voor analyse bij kamertemperatuur; zie adres beneden** ➤

Soms kunnen zich echter twee problemen voordoen: volstrekt geen weefsel of juist veel bloed in de spuit.

1. Als er geen vet in de spuit verschijnt of de aspiratie abrupt stopt, kan de naald verstopt zijn. Het simpelste is om de naald uit het weefsel te halen. Normaal wordt dan het in de naald aanwezige vetweefsel met een “plop” in de spuit gezogen. Als het vetweefsel echter de naald volledig verstopt gebeurt dit niet. Het weefsel kan dan worden verwijderd door positieve druk in de spuit te gebruiken. Omdat het vetweefsel explosief kan losraken (“schieten met vet”) dient dit voorzichtig te gebeuren. Het weefsel kan in een schone urine- of sputumcontainer overgebracht worden, waarbij de naald bij de basis goed vast gehouden wordt tegen de spuit aan om te voorkomen dat door de positieve druk in de spuit de naald de spuit eerder verlaat dan het vet de naald (“schieten met naalden”).

2. Als er veel bloed de spuit binnenkomt, zit er niets anders op dan om de naald terug te trekken uit de patiënt. De punctieplaats dient minimaal een minuut afgedrukt te worden en daarna kan de procedure voortgezet worden (met een nieuwe spuit) in een andere richting of aan de andere kant. Pijn wordt niet vaak gezien, is plaatselijk en zelden zo hevig dat meer lidocaïne nodig is. Bij een nefrotisch syndroom kan naast vetweefsel soms enig vocht worden opgezogen. Als er verdenking is op het ontstaan van een blauwe plek kan de punctieplaats enkele minuten nog even afgedrukt worden (bij voorkeur door de patiënt zelf).

- Vetweefsel analyse in het kort -

Nadat de zuiger uit de spuit is getrokken, kan vetweefsel worden verzameld uit de spuit op een leeg glaasje om vet te scheiden van verontreiniging met bloed.

Glaasjes maken voor microscopisch onderzoek

Minimaal vier zichtbare fragmentjes vetweefsel (geen vetdruppels!) dienen gebracht te worden op ieder van drie objectglaasjes (bij voorkeur met een matglas zijkant die met potlood beschreven kan worden). Deze fragmentjes worden geplet in een dun laagje door een tweede glaasje kruiselings op het eerste te plaatsen (figuur 5). Het is belangrijk om in het centrum van de contactoppervlakken van beide glaasjes te drukken om zo te voorkomen dat door het krachtige drukken de glaasjes kunnen breken. De 6 glaasjes met geplet vet dienen dan minimaal een uur te drogen bij kamertemperatuur en daarna gedurende 10 minuten gefixeerd te worden met aceton. Na het drogen worden alle glaasjes definitief

gemerkt voor identificatie doeleinden en kunnen daarna worden bewaard bij kamertemperatuur tot (vervoer naar een diagnostisch centrum voor) kleuring met Congo rood en verdere analyse indien er amyloid aanwezig blijkt te zijn. Vetweefsel mag niet worden bevroren voordat glaasjes zijn gemaakt en gekleurd met Congo rood: het vriezen van vers en ongefixeerd weefsel tast de kwaliteit van het weefsel aan.



Fig 5A. Vier klontjes vetweefsel



Fig 5B. Haakse glaasjes



Fig 5C. "Pletten" van vet

De Congo rood kleuring en microscopisch onderzoek

Het kleuren met alkaline Congo rood dient te worden gedaan volgens de klassieke methode die door Puchtler beschreven is (2). In het kort samengevat:

Voorraad oplossing I: verzadigde oplossing van NaCl in 80% ethanol

Voorraad oplossing II: verzadigde oplossing van NaCl en Congo rood in 80% ethanol

Bereid de werkoplossingen I and II door NaOH toe te voegen (in een uiteindelijke concentratie van 0.01%) vlak voor gebruik en filter vervolgens. Daarna:

- Kleuren gedurende 30 sec met Mayer's Hematoxylin
- Was in stromend kraanwater gedurende 10 min
- Kleur gedurende 30 min in vers gefilterde werkoplossing I
- Kleur gedurende 30 min in vers gefilterde werkoplossing II
- Was kort in ethanol (100%) 2x
- Spoel kort in gedemineraliseerd water 2x
- Bedek de glaasjes met Kaiser's glycerol gelatin en een dekglasje.

De affiniteit van het weefsel voor Congo rood kan worden onderzocht door de appelgroene dubbelbreking in gepolariseerd licht waarbij natuurlijk een goede microscoop moet worden gebruikt. In ons laboratorium gebruiken we de Olympus BX 50 microscoop, 100 Watt, en twee onderzoekers scoren de glaasjes blind t.o.v. de klinische gegevens en semi-kwantitatief: 0 (negatief, geen appelgroene dubbelbreking detecteerbaar), 1+ (minimale afzetting, <1% v/d oppervlakte), 2+ (weinig, tussen 1% en 10%), 3+ (matig, tussen 10% en 60%), 4+ (overvloedig, >60%) (figuur 6).

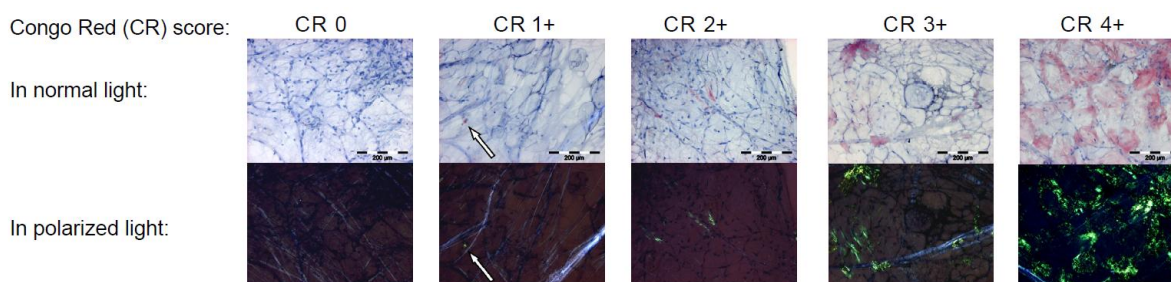


Fig 6. Congo rood scoringsysteem

Vorbereiding en extractie van de vetweefsel aspiraten

Het overgebleven vetweefsel kan worden bewaard in een 2 ml Eppendorf cup (bij -20 C or -80C) tot transport (bij kamertemperatuur bij voorkeur binnen drie dagen en uiterlijk binnen een week) naar ons laboratorium in Groningen (zie voor het adres verderop in de tekst ▶).

Immunochemische kwantificering van de SAP concentratie en amyloïd precursors AA, TTR, kappa, and lambda in vetweefselextracten

Voor kwantificering wordt het gewicht van het weefsel bepaald (het zogeheten nat gewicht). Daarna wordt het drie keer gewassen in een Tris buffer met calcium om mogelijk nog aanwezige bloedresten te verwijderen. Vervolgens wordt SAP geëxtraheerd via incubatie in een Tris buffer met EDTA en de SAP concentratie kan gemeten worden m.b.v. ELISA. Daarna wordt het gewassen vetweefsel geëxtraheerd in een oplossing van Tris en guanidine, gecentrifugeerd en het supernatant van het vetweefselextract wordt verzameld. De totale eiwitconcentratie en amyloid A eiwit concentratie wordt gemeten m.b.v. ELISA zoals beschreven (3). Nederlandse referentiewaarden van patiënten zonder AA amyloïdose: < 12 ng/mg vetweefsel of < 1.3 µg/mg eiwit. TTR en immunoglobuline kappa and lambda lichte keten concentraties kunnen ook worden gemeten via ELISA, Western blot of Nephelometrische methoden.

Informatie en adressen

Klinische vragen en informatie:

Dr. Bouke P.C. Hazenberg (b.p.c.hazenberg@reuma.umcg.nl)

Tel: +31 50 3613432 (secretariaat) of +31 50 3616161 (via oproep)

Fax: +31 50 3619308

Laboratorium vragen en informatie:

Johan Bijzet (j.bijzet@lc.umcg.nl)

Tel: +31 50 3613421

➤ **Adres voor het sturen van glaasjes of spuiten voor amyloïdopsporing en precursor kwantificering:** (Graag een telefoontje of e-mail voor het versturen van materiaal)

Universitair Medisch Centrum Groningen

Dhr. Johan Bijzet, BSc

Lab. Reumatologie, T2.238

HPC EA41

Hanzeplein 1,

9713 GZ Groningen

Nederland

Tel: +31 50 361 3421

Fax: +31 50 361 3591

E-mail: j.bijzet@lc.umcg.nl

Referenties

1. Westermark P. Diagnosis and characterization of systemic amyloidosis by biopsy of subcutaneous abdominal fat tissue. *Internal Medicine Specialist* 1984;5:154-60.
2. Puchtler H, Sweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem* 1962;10:355-63.
3. Hazenberg BP, Limburg PC, Bijzet J, van Rijswijk MH. A quantitative method for detecting deposits of amyloid A protein in aspirated fat tissue of patients with arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58:96-102.

© Bouke P.C. Hazenberg, MD, PhD, reumatoloog
GUARD (Groningen Unit for Amyloidosis Research & Development)
University Medical Center Groningen, The Netherlands

Gereviseerde versie, 18 April 2011

