

## **Histologiska färgningar**

En handbok om histologiska färgningar på patologienheten  
vid Fimlab Vasa.

Maisa Äyhymäki

Examensarbete för (YH)-examen inom social- och hälsovård

Utbildning: Bioanalytiker (YH)

Vasa 2022

## EXAMENSARBETE

Författare: Maisa Äyhymäki

Utbildning och ort: Bioanalytik, Vasa

Handledare: Ulla Penttinen och Jatta Saarenheimo

Titel: Histologiska färgningar

---

Datum: 9.5.2022 Sidantal: 50

Bilagor: 6

---

### Abstrakt

Histologiska färgningar är ytterst viktiga för analyseringen av vävnadsprover, annars kan patologen inte observera de olika vävnadskomponenterna och ställa en diagnos. Olika färgningsmetoder används för olika syften och för att visualisera olika vävnadskomponenter. Med hjälp av dessa kan patologen undersöka patologiska förändringar i celler och vävnader. Syftet med detta examensarbete är att producera en handbok om de olika histologiska färgningarna på patologienheten vid Fimlab Vasa. Handboken är ämnad för studeranden för att stödja inläringen under praktiken, samt även personal och övriga intresserade.

Handboken innehåller information om de olika histologiska färgningsmetoderna, vad de färgar, varför dessa färgningsmetoder används, färgningsmekanismer och färgningsresultatet. De histologiska färgningsmetoderna är HE, PAS, AB-PAS, D-PAS, Giemsa, Leder, järn i vävnad, elastin i vävnad, retikulín i vävnad, kongo röd, AFB och toluidinfärgning. Den teoretiska delen behandlar även histoteknik för att bilda en förståelse för hela laboratorieprocessen inom histopatologi. Handboken innehåller bilder på de olika färgningarna för att visa färgningsresultatet. Dessa bilder är tagna för denna handbok.

---

Språk: svenska

Nyckelord: histologiska färgningsmetoder, histopatologisk diagnostik, histoteknik

## OPINNÄYTETYÖ

Tekijä: Maisa Äyhymäki

Koulutus ja paikkakunta: Bioanalytiikka, Vaasa

Ohjaajat: Ulla Penttinen ja Jatta Saarenheimo

Nimike: Histologiset värjäykset

---

Päivämäärä: 9.5.2022

Sivumäärä: 50

Liitteet: 6

---

### Tiivistelmä

Histologiset värjäykset ovat erittäin tärkeässä roolissa kudoksenäytteiden analysoimisessa. Värjäysten avulla patologi voi havaita eri kudoksenkomponentteja ja tehdä diagnoosin. Värjäysmenetelmiä on monia, värjäys valitaan sen mukaan mitä kudoksenkomponentteja halutaan visualisoida. Näiden värjäyksien avulla patologi voi analysoida patologisia muutoksia soluissa ja kudoksissa. Tämän opinnäytetyön tarkoitus on tuottaa käsikirja värjäyksistä, joita tehdään Fimlab Vaasan patologiainyksikössä. Käsikirja tukee opiskelijoiden oppimista heidän harjoittelujaksonsa aikana patologiainyksikössä. Käsikirja on myös muille aiheesta kiinnostuneille.

Käsikirja sisältää tietoa eri värjäyksistä, mitä ne värjäävät, mihin tarkoitukseen niitä käytetään, värjäysmekanismit sekä värjäystulos. Värjäykset ovat HE, PAS, AB-PAS, D-PAS, Giemsa, Leder, rauta kudoksessa, elastiini kudoksessa, retikuliini kudoksessa, kongopunainen, AFB ja toluidiinivärjäys. Teoriaosuus käsittelee histotekniikkaa, jotta lukija saa syvemmän ymmärryksen histopatologian laboratorioprosessista. Käsikirja sisältää kuvia värjäyksistä, jotka näyttävät värjäyksien lopputuloksen. Kuvat on otettu käsikirjaa varten.

---

Kieli: ruotsi

Avainsanat: histologiset värjäysmenetelmät, histopatologinen diagnostiikka, histotekniikka

## **BACHELOR'S THESIS**

Author: Maisa Äyhynmäki

Degree Programme: Biomedical laboratory science, Vaasa

Supervisors: Ulla Penttinen and Jatta Saarenheimo

Title: Histological stains

---

Date: 9.5.2022

Number of pages: 50

Appendices: 6

---

### **Abstract**

Histological stains are extremely important while analyzing tissue samples. The pathologist cannot observe the different tissue components and give a diagnosis without them. Different techniques are used for different purposes and for the visualization of different tissue components. These techniques help the pathologist analyze pathological changes in the cells and tissue. The purpose of this thesis is to produce a manual of the different stains used at the pathology department at Fimlab Vaasa. This manual is produced for students to support their learning during their practical training at the pathology department. This manual is also for those interested in the subject.

The manual contains information about the different histological stains, what they stain, why they are used, the mechanism of the stains and the result. The histological stains are HE, PAS, AB-PAS, D-PAS, Giemsa, Leder, iron in tissue, elastica van Gieson, reticulin stain, congo red, AFB and toluidine stain. The theory also includes histological techniques which builds an understanding of the whole laboratory process in histopathology. The manual contains pictures of the different stains to illustrate the result. The pictures are produced for this manual.

---

Language: Swedish

Key words: histological stains, histopathological diagnosis, histological techniques

## Innehållsförteckning

1	Inledning .....	1
2	Syfte och frågeställning .....	3
3	Teoretisk bakgrund .....	3
3.1	Histoteknik .....	4
3.1.1	Provtagning och utskärning .....	4
3.1.2	Fixering .....	5
3.1.3	Vävnadsprocessering .....	7
3.1.4	Inbäddning .....	8
3.1.5	Snittning .....	9
3.1.6	Färgning och montering .....	11
3.2	Histologiska färgningsmetoder .....	12
3.2.1	Hematoxylin-Eosin (HE) .....	13
3.2.2	Periodic acid-Schiff (PAS) .....	16
3.2.3	Giemsa .....	23
3.2.4	Leder .....	25
3.2.5	Järn i vävnad .....	26
3.2.6	Elastin i vävnad .....	28
3.2.7	Retikulin i vävnad .....	29
3.2.8	Kongo röd .....	31
3.2.9	Acid-fast bacilli (AFB) .....	33
3.2.10	Toluidinfärgning .....	35
4	Framställning av vävnadspreparat och fotografier .....	36
4.1	Material och metoder .....	36
4.1.1	Provmaterial .....	37
4.1.2	Färgningsautomater .....	38
4.1.3	Framställning av preparat .....	39
4.1.4	Färgning av preparat .....	40
4.1.5	Fotografering av preparat .....	42
5	Resultatet .....	43
6	Diskussion .....	43
6.1	Etiska överväganden .....	45
7	Källförteckning .....	46
	Bilagor	

## 1 Inledning

Inom histopatologi undersöker man patologiska förändringar och deras uppkomstmekanismer i celler och vävnader. Provmaterialet är celler och vävnad från människan, även delar av organ och hela organsystem. Vävnadspreparaten kan vara biopsier, operationspreparat eller autopsier. En biopsi kan till exempel vara en hudförändring eller provbitar som tas under gastroskopi och kolonoskopi. Delar av organ eller hela organ kan till exempel vara en gallblåsa eller en del av tunntarmen som avlägsnats under en operation. Vävnadspreparat undersöks för att diagnosticera sjukdomar eller bekräfta en diagnos. Patologen kartlägger sjukdomens uppkomst samt hur sjukdomarna förändrar den normala vävnadsstrukturen. Sjukdomens art, grad och dess spridning kartläggs. Oftast är det frågan om att undersöka cancer, men även andra sjukdomar undersöks såsom kroniska tarmsjukdomar och autoimmunsjukdomar. (Moewis, 9, 1978; Vasa centralsjukhus, 2021).

Vävnadspreparaten undersöks i mikroskop. För att patologen skall kunna undersöka vävnaden, måste vävnaden först gå igenom en rad av processer som kallas för histoteknik. Vävnaden behandlas så att man kan snitta mikrometers tunna snitt av preparatet som sätts på objektglas för mikroskopering. Mikroskoperingen kräver att vävnadspreparatet är mycket tunt, släpper igenom ljus och är kontrastrikt så att man får en detaljerad bild av vävnaden. För att man skall få fram kontraster och detaljer i vävnaden måste den färgas. Utan färgningen skulle mikroskoperingen inte lyckas. Med hjälp av olika färgningar kan man få fram en detaljerad bild av vävnaden och vävnadskomponenterna. Med de olika färgningarna kan man visualisera cellkärnor, cytoplasma samt intra- och extracellulära komponenter. (Merck, u.å.b; Moewis, 9, 1978).

Inom histopatologi finns även ytterligare analyseringsmetoder såsom immunohistokemiska färgningar för att bedöma prediktiva och prognostiska biomarkörer i många maligniteter till exempel i bröst, gastrointestinalkanalen och lunga.

Immunohistokemi är en teknik där bindningen mellan antikropp och antigen används för att lokalisera specifika antigen i vävnaden. Provet analyseras genom mikroskopering. Exempelvis kan HER2 amplifikationen undersökas vid fall av bröstcancer. Immunohistokemiska färgningar är även en viktig del inom histopatologi, men kommer inte behandlas i detta examensarbete. (Magaki et al., 2019).

Det histopatologiska laboratoriet har en stor del i diagnosticeringen och bekräftandet av diagnoser. Ett stort antal vävnadspreparat anländer till laboratoriet dagligen för att bli analyserade. Vid patologienheten vid Fimlab Vasa hade man 10 541 provfall under år 2021. Histologiska färgningar har en ytterst viktig del i analysprocessen. Utan färger kan vävnaden inte visualiseras. En stor del av de histologiska färgningarna och metoderna har funnits i årtal och därför har även gammal litteratur som Gertraude Moewis bok använts som källa. (J. Saarenheimo, personlig kommunikation, 14 april, 2022).

Histologi	Antal	Procentuell andel
Provfall	10 541	
Block	26 723	
Glas (alla)	34 978	
Immunohistokemiska glas	6203	
HE	26 431	75,56
PAS	1319	3,77
D-PAS	18	0,05
AB-PAS	1426	4,08
Giemsa	1257	3,59
Leder	67	0,19
Toluidin	118	0,34
Elastin	24	0,07
AFB	11	0,03
RNFR	69	0,20
Järn	93	0,27

Tabell 1. Statistik om de histologiska proven och färgningarna på patologienheten vid Fimlab Vasa år 2021. (J. Saarenheimo, personlig kommunikation, 14 april, 2022).

## 2 Syfte och frågeställning

Syftet med detta examensarbete är att producera en handbok om histologiska färgningar för patologienheten vid Fimlab Vasa. Idén till examensarbetet kom från cellbiologen Jatta Saarenheimo på patologienheten vid Fimlab Vasa. Handboken skall ge information om histologiska färgningar, vad de färgar, vad de används för, färgningsmekanismerna och hur färgningsresultatet skall se ut. De histologiska färgningar som behandlas i handboken är färgningar som görs på patologienheten vid Fimlab Vasa. Handboken är till för studeranden för att lära sig om de olika färgningarna under praktikperioden på det histopatologiska laboratoriet, samt ny personal som vill få en inblick i de olika färgningarna. Handboken innehåller information om respektive färgning i form av text och tillhörande bilder som visar färgningsresultatet.

Frågeställningar som examensarbetet skall behandla och svara på:

- Vad färgar de olika histologiska färgningarna och vad används de för?
- Vad är färgningsmekanismerna i de olika färgningarna?
- Hur ser färgningsresultatet ut?

## 3 Teoretisk bakgrund

Den teoretiska bakgrunden kommer att behandla histoteknik och histologiska färgningsmetoder. Den teoretiska bakgrunden behandlar hela laboratorieprocessen inom det histopatologiska laboratoriet såsom provtagning, utskärning, fixering, vävnadsprocessering, inbäddning, snittning, färgning och montering. Den teoretiska bakgrunden ger även information om olika histologiska färgningsmetoder,



färgningsmekanismerna, användningsområden och färgningsresultat. De histologiska färgningarna som tas upp görs på patologienheten vid Fimlab Vasa.

### **3.1 Histoteknik**

Inom histologin studerar man celler och vävnader från djur och växter. Histologi är läran om vävnader och deras normala utseende. Inom histopatologin undersöker man sjukliga förändringar i vävnaderna och deras uppkomstmekanismer. För att kunna studera vävnader i mikroskop måste vävnaden genomgå en rad av olika processer. Histoteknik innefattar provtagning, utskärning, fixering, vävnadsprocessering, inbäddning, snittning, färgning och montering av vävnadsprovet. Allt detta görs för att kunna undersöka vävnaden och ställa en diagnos. Vävnaden måste bevaras så att den är i möjligast ursprunglig form. Vävnaden måste dehydreras, klaras och impregneras för att kunna bli inbäddat i paraffin för att bilda block som kan snittas. Snitten måste vara tunna för att kunna släppa igenom ljus. Snitten lyfts på objektglas och färgas för att genom kontraster kunna få en detaljerad bild över vävnaden i mikroskop. (Alturkistani et al., 2015; Moewis, 9, 1978).

#### **3.1.1 Provtagning och utskärning**

Vävnadsproverna kan vara biopsier, autopsier eller operationsmaterial. Det är en läkare som sköter provtagningen. Biopsier kan tas med biopsitång, kniv, stans eller biopsinål. Vävnadsprov tas för att ställa en patologisk-anatomisk diagnos, PAD. Undersökningen görs för att svara på frågeställningen. Genom undersökningen kan man få information om tumören är benign eller malign, om det är fråga om en inflammatorisk förändring eller degenerativ process. Man kan även få information om tumörens typ, förstadier och differentiering. Vävnaden fixeras omedelbart efter provtagningen. Före utskärning

granskas vävnadspreparatet makroskopiskt med noggrann beskrivning. Vävnadsbitarna kan vara märkta med trådar eller knappnålar för orientering vid provtagningen. Med trådar och knappnålar märks vävnadens orientering i kroppen eller till exempel var tumören befinner sig i vävnaden. Konisat från en gynekologisk loop-behandling märks till exempel med knappnålar med olika färger så man vet vilket klockslag är åt vilket håll i vävnaden. (Moewis, 10–11, 1978; N. Back, personlig kommunikation, 26 april, 2021; Synlab, u.å.).

Vävnaden skärs i 3–4 mm tjocka vävnadsbitar och sätts i kassetter med patientidentifikation. Kassetten följer med i de olika delarna av processen. En skiss över de olika vävnadsbitarnas läge görs för att kunna lokalisera bitarna. Man tar en bild där det märks ut vilka bitar som är utskurna och deras lokalisering i vävnadspreparatet, även numret på kassetten den ligger i märks ut. Vävnadens lokalisering i kroppen kan även märkas med olika färger. Hudexcisioner märks ofta med färger. Hudexcisionens kanter märks med olika färger för att demonstrera lokaliseringen i kroppen. Man kan även sätta knappnålar i kassetterna för att markera att vävnaden skall inbäddas exakt som den ligger i kassetten. Utskärningen sköts av en patolog eller läkare. I vissa laboratorier kan även en bioanalytiker som har fått skolning inom detta ta hand om utskärningen. Mindre bitar som är under cirka 5 mm behöver inte delas och sätts som de är i kassetten. (Moewis, 10–11, 1978; N. Back, personlig kommunikation, 26 april, 2021; Ranjan et al., 2014).

### **3.1.2 Fixering**

Vävnaden fixeras för att det skall bevaras i möjligast ursprunglig form. Vävnaden fixeras direkt efter provtagningen för att förhindra autolys och förruttelse. Cellstrukturen bevaras genom bindningar mellan proteiner. Fixeringen kan ske kemiskt med fixativ eller fysikaliskt genom upphettning och nedfrysning. Det finns fem olika grupper av fixativ som klassas enligt deras verkningsmekanism, det mest använda fixativet är 10 % neutral buffrad formalin. Fixativ kan vara aldehyder, kvicksilver(II)klorid, alkoholer, oxiderande ämnen eller pikrat. Ett bra fixativ förhindrar autolys och förruttelse. Vävnaden får inte byta form eller

volym. Vävnadens struktur och morfologi borde vara i möjligast ursprunglig form, samt att vävnaden borde vara i bra skick inför färgningen. Det finns inget perfekt fixativ, men kraven borde uppfyllas tillräckligt bra. (Gamble & Bancroft, 63–65, 2002; Webpath, u.å.c).

Aldehyder innefattar formaldehyd och glutaraldehyd, den mest använda är 10 % neutral buffrad formalin. Aldehyderna bildar kovalenta bindningar med proteinerna, speciellt med aminosyran lysin. Aldehyderna denaturerar proteiner till en viss del, men inte på ett sätt att deras struktur skulle förstöras eller att det påverkar antigeniciteten märkvärdigt. Glutaraldehyd ger en förlust på 30 % av DNAs alpha-helixstruktur. Därför är formaldehyd ett bättre val som fixativ vid immunohistokemiska färgningar. Formaldehyd penetrerar bättre men långsamt och ger en sämre morfologisk bild än glutaraldehyd. Glutaraldehyd penetrerar snabbt och är därför ett bra val för elektronmikroskopi. Glutaraldehyd kan till exempel användas vid fixeringen av muskelbiopsier. Aldehyderna är dock giftiga och säkerhetsåtgärder bör beaktas vid arbetet. (Gamble & Bancroft, 63–65, N. Back, personlig kommunikation, 26 april 2002; Webpath, u.å.c).

Kvicksilver(II)klorid reagerar med aminosyrarester i proteiner. Kvicksilver(II)klorid penetrerar vävnaden dåligt men snabbt. Fixativet kan göra vävnaden hård, men det ger en bra nukleär morfologi. Fixativet fungerar bäst för hematopoetisk och retikuloendotelial vävnad. Fixativet innehåller kvicksilver vilket skall tas i beaktan vid avfallshanteringen. (Gamble & Bancroft, 63–65, 2002; Webpath, u.å.c).

Alkoholer som metanol och etanol denaturerar proteiner. Alkoholer används inte vid fixeringen av vävnadsprover, utan används främst vid fixeringen av cytologiska prover. Oxiderande ämnen såsom kaliumpermanganat, kaliumdikromat och osmiumtetroxid oxiderar proteiner. Dessa fixativ används ytterst sällan. Pikrat såsom pikrinsyra har en okänd verkningsmekanism, främst används Bouins lösning. Fixativet ger en nästan lika bra nukleär morfologi som kvicksilver(II)klorid och förorsakar mindre hårdhet av vävnaden.

Pikrinsyra är explosivt, säkerhetsåtgärder vid hanteringen av ämnet bör beaktas. (Webpath, u.å.c).

Fixeringen påverkas av pH, penetrering, volym, temperatur, osmolalitet, koncentration och tid. Fixering sker bäst vid neutralt pH, pH skall vara runt 6–8. Buffrade lösningar används för att minska syrligheten som uppstår vid hypoxi av vävnaden. Vävnaden skall penetreras helt av fixativet, till exempel vid fall av mycket bröstvävnad är det viktigt att skära snitt i vävnaden så att den penetreras helt. Annars kan en del av vävnaden vara ofixerat. För att fixeringen skall lyckas är det viktigt att fixativ finns i överskott, fixativ skall finnas cirka 10 gånger vävnadens volym. Genom upphettning kan fixeringen för snabbas. Osmolaliteten är viktig med tanke på att cellerna krymper i hypertoniska lösningar, medan de svullnar i isotoniska lösningar. Med tanke på koncentration används oftast 10 % formalin. Vävnaden fixeras mellan 6–24 timmar. Det är även viktigt att vävnaden fixeras direkt efter provtagningen. Cellorganeller förstörs och artefakter uppstår ju längre tid det tar för vävnadsprovet att bli fixerat efter provtagning. (Gamble & Bancroft, 69–72, 2002; Rolls, u.å.; Webpath, u.å.c).

### **3.1.3 Vävnadsprocessering**

Efter fixeringen bör vävnaderna behandlas så att de kan bäddas in i paraffin och snittas. Processen där fixerad vävnad behandlas så att vävnaden kan gjutas i block av paraffin kallas vävnadsprocessering. I vävnadsprocesseringen sker en dehydrering, klarning och impregnering av vävnaden. Detta utförs ofta automatiskt av en vävnadsprocessor. För att kunna bädda in vävnaden i paraffin måste vävnaden först dehydreras, det vill säga att vatten avlägsnas från vävnaden på grund av att paraffin är hydrofobiskt. Dehydreringen sker genom en stigande alkoholserie från 70 % till 99 % etanol. Etanol är lösligt med vatten och genom att vävnaden doppas i stigande koncentrationer av alkohol ersätts vattnet i vävnaden med alkohol. En stigande alkoholserie med olika koncentrationer av alkohol

används för att progressivt ersätta vattnet för att undvika förvrängning av vävnadspreparatet. (Rolls, u.å.; Webpath, u.å.c).

Följande steg i vävnadsprocesseringen är klarning. Klarning innebär att man ersätter alkoholen med en klarningslösning som är löslig med paraffin. Det mest använda medlet vid klarning är xylen. Toluen och kloroform kan även användas, mindre giftiga ämnen kan också användas som framställts ur citrusskal såsom histoclear. Alkoholen ersätts med xylen på grund av att alkohol inte är lösligt i paraffin medan xylen är det. Termen klarning kommer från att många klarningslösningar ger en viss klarhet till vävnadspreparatet på grund av deras relativt höga brytningsindex. Klarningen tar även bort en betydande del av fett från vävnaden, som annars bildar en barriär vid inbäddningen i paraffin. Till slut impregneras vävnaden med paraffin som används vid inbäddningen. (Rolls, u.å.; Webpath, u.å.c).

#### **3.1.4 Inbäddning**

För att kunna snitta vävnadspreparatet måste man framställa ett block. Vävnadspreparatet kan antingen frysas ned eller bäddas in i ett flytande medium som stelnar. Detta görs vid en inbäddningsstation. Vid inbäddningen används för det mesta paraffin. Plast och epoxiharts kan även användas. Paraffin är inte vattenlösligt och därför avlägsnas vattnet under vävnadsprocesseringen. Paraffin är en av blandning mättade kolväten med varierande antal kolatomer. Paraffin har en smältpunkt mellan 40–70 grader, paraffin med smältpunkt 54–58 grader används vid inbäddningen. Till paraffinet kan tillsättas olika ämnen som påverkar dess egenskaper. Bivax gör materialet segare, mera elastiskt och att det håller ihop bättre vid snittningen. Ämnen som motverkar kristallbildningen och förbättrar snittningsegenskaperna kan tillsättas såsom plastpolymerer. Uppmjukningsmedlet DMSO (dimetylsulfoxid) kan även tillsättas. (Gamble & Bancroft, 89, 2002; Lyon, 201–205, 1997; Moewis, 46–48, 1978).

Inbäddningen sker vid inbäddningsstationen. En gjutkopp med passlig storlek fylls med paraffin som tappas ur kranen. Vävnadsbiten orienteras med en uppvärmd pincett i gjutkoppen. Gjutkoppen förs över till kylplattan och vävnadsbiten trycks mot gjutkoppen så att vävnadsbiten fastnar och att alla kanter av vävnadsbiten är på samma nivå. Kassetten placeras på gjutkoppen som fylls med mera paraffin. Sedan får paraffinet stelna på kylplattan. Blocket tas bort från gjutkoppen efter att paraffinet stelnat. Orienteringen av vävnadsbiten är viktig då ytan som ligger mot gjutkoppen kommer fram först vid snittningen. Det är viktigt att hela vävnaden kommer fram under snittningen, samt att eventuella förändringar i vävnaden kommer fram. Vävnadsbiten placeras så att snittytan är mot gjutkoppen. Hudbitar placeras så att alla hudlager kommer med på snittet. Tubulära strukturer såsom artärer och sädesledare orienteras så man ser tvärsnitt av dem. Muskelbiopsier skärs longitudinellt och transversellt. (Gamble & Bancroft, 89–90, 2002; Moewis, 49–52, 1978; N. Back, personlig kommunikation, 3 maj, 2021).

### **3.1.5 Snittning**

För att kunna se på vävnaden i mikroskop måste preparatblocket snittas. Man skär 2–4  $\mu\text{m}$  tunna snitt som placeras på objektglas. Preparatblocket snittas med en mikrotom, en mikrotom är ett precisionsinstrument för snittning med jämn kvalitet. Det finns olika mikrotomtyper som rotations- och slädmikrotomer. Fryssnitt snittas med en frysmikrotom, det vill säga kryostat. I en rotationsmikrotom är kniven fast och objekthållaren åker i vertikal riktning med hjälp av en vev vid mikrotomens högra sida. Preparatblocket placeras i objekthållaren och snitt bildas när preparatblocket åker i vertikal riktning mot kniven. En slädmikrotom har en rörlig kniv på en släd som åker i horisontell riktning. Objekthållaren är fast och snitt bildas genom att kniven åker i horisontell riktning mot preparatblocket. Vid snittning används oftast engångsknivar. (Gamble & Bancroft, 94–95, 2002; Moewis, 65–70, 1978).

Vid snittningen skall preparatblocket först trimmas, vilket görs för att få fram vävnaden som skall snittas. Vid trimningen använder man snitt tjocklek från 15  $\mu\text{m}$  uppåt beroende på vävnaden, ibland även mindre tjocklek. Med hårda vävnader finns det risk att bitar lossnar och då vill man använda mindre tjocklek, samt vid liten mängd material så att man inte trimmar bort allt material. Vid trimningen vill man få fram hela vävnaden, man ser till att man har med alla kanter av vävnaden och att vävnaden kommer fram ordentligt. Ofta används en gammal kniv vid trimningen, men kniven får inte vara full av repor för att undvika skador i vävnaden. (Gamble & Bancroft, 95–98, 2002; N. Back, personlig kommunikation, 3 maj, 2021).

Efter trimning är preparatblocket redo att snittas i 2–4  $\mu\text{m}$  tunna snitt. Vid snittning av mjukt material används en mindre vinkel och vid snittning av hårt material en större vinkel. Vid snittning av band används 90 graders vinkel. Preparatblocket måste vara kallt inför snittningen, blocket kyls först på en kylplatta. Kniven skall vara vass för att få bra snitt. Antingen kan man snitta band med sex till åtta snitt eller så kan man snitta enskilda snitt från olika nivåer. I Finland är det vanligare att man tar enskilda snitt från olika nivåer, detta görs även på patologienheten vid Fimlab Vasa. Man tar 1–4 nivåer beroende på typ av prov och vävnadens storlek. Efter att första snittet är taget trimmar man lite djupare in i vävnaden och tar ett till snitt, på så sätt får man olika nivåer av vävnadsprovet. (Gamble & Bancroft, 95–98, 2002; Moewis, 74–80, 1978; N. Back, personlig kommunikation, 3 maj, 2021).

Snittningstekniken kan variera beroende på vävnaden. Snitten lyckas oftast bäst genom snittning med långsam rörelse. Hårt material och vävnad med mycket fett är ofta mycket svåra att snitta. Hårt material kan vara ben, naglar och livmoder. Bröstvävnad och lipom kan ha mycket fett. Ett bra snitt är helt och jämnt. Det skall inte finnas skrynklor eller repor på vävnaden. Snittet skall inte vara för tjockt och vävnaden skall vara hel. Snitten lyfts över i varmvattenbad med hjälp av penslar eller pincett, temperaturen är ofta 10 grader under paraffinets smältpunkt. I varmvattenbadet rätas snitten ut och därifrån fiskas snitten upp på objektglas. Rotationsmikrotomer kan ha en rutschkana med kallt vatten varifrån snitten

antingen åker ner i en skräpkorg eller i ett varmvattenbad när man lyfter bryggan, varifrån snitten fiskas upp på objektglaset. Sedan låter man objektglaset torka. (Gamble & Bancroft, 95–98, 2002; Moewis, 74–80, 1978; N. Back, personlig kommunikation, 3 maj, 2021).

### 3.1.6 Färgning och montering

Färgämnen dissocierar i vatten och för att färgerna skall kunna fästa på vävnaden måste vävnadspreparatet först deparaffineras. Vävnadsprocesseringen görs då i omvänd ordning för att få vatten tillbaka i vävnaden. Först går vävnadspreparaten igenom xylener, hydreras i en sjunkande alkoholserie och till slut förs vävnadspreparatet i vatten. Genom färgning framhäver man olika detaljer och komponenter i vävnaden så att vävnaden kan observeras i mikroskop och patologen kan undersöka vävnaden. Hematoxylin & Eosin (HE) är en rutinfärgning inom histopatologi och ger en överblick över vävnaden. Andra färgningar kallas för specialfärgningar. (Alturkistani et al., 2015; Webpath, u.å.c).

Snitten färgas ofta i en färgningsautomat som även sköter deparaffineringen och hydreringen före färgningen. Färgningsautomaten har en robotarm som doppar korgarna med objektglaset i färgerna. I färgningsautomaten kan olika färgningsprogram inställas, färgningen kan optimeras genom att justera färgningstiderna. Tidigare färgades snitten manuellt. Till färgningsautomaten kan man även installera en täckglasautomat som monterar täckglas på de färgade objektglaset. Täckglasen är gjorda av plast eller glas och skyddar samt bevarar vävnadspreparatet. Täckglas monterades tidigare manuellt. Vid montering används ett genomskinligt och lättorkande medium. Monteringsmedlet skall ha liknande brytningsindex som objektglaset så att det blir osynligt vid mikroskoperingen. Det skall även vara neutralt så att snittet inte skadas. Ofta används medium som innehåller xylol. (Moewis, 105–106, 1978; Sakura, u.å.; Webpath, u.å.c).



### 3.2 Histologiska färgningsmetoder

Färgningen baserar sig på kemiska reaktioner och vissa vävnaders och cellbeståndsdelars förmåga att uppta en bestämd färg. Oftast sker färgning med selektiva färgämnen som fördelar sig enligt vävnadens kemiska egenskaper, det bildas kontraster i strukturerna genom deras förmåga att uppta färg. Färgämnena kan vara naturliga eller syntetiska. Naturliga färger härstammar från djur eller växter, varav den viktigaste färgen är hematoxylin som extraheras från akasiaträd i Sydamerika. Saffran förekommer i en krokusart, indigo i tropiska växter och karmin utvinns från en mexikansk sköldlusart. Syntetiska färgämnen är bensolderivat utvunna ur stenkoltjära. Anilin isolerades 1850 av William Perkin. De naturliga färgämnena har ersatts av syntetiska på grund av att de är billigare, renare och lättare att framställa. Hematoxylin används fortfarande, samt karmin som används som kromosomfärg. (Moewis, 88–91, 1978; Solunetti, u.å.).

Färgämnena klassificeras enligt deras bindningsegenskaper i sura, basiska, neutrala och indifferent färger. Vävnaden färgas av joner med färgande egenskaper, färgämnet binds till vävnadskomponenter med motsatt laddning. Basiska färgämnen kallas katjonfärger och sura kallas för anjonfärger. Anjonfärger är ofta natrium-, kalium-, kalcium- eller ammoniumsalter. Anjonfärger färgar acidofila vävnadskomponenter såsom cytoplasma, acidofila granula, muskel, kollagen, bindväv, erythrocyter och proteiner med överskott av fria aminogrupeer. Anjonfärger är till exempel eosin, pikrinsyra, syrafuchsin och anilinblå. Katjonfärger är ofta klorider, sulfater eller acetat. Katjonfärger färgar basofila vävnadskomponenter såsom cellkärnor, basofila granula, bakterier, brosk, slem, nerver och proteiner med övervägande karboxylgrupper. Katjonfärger är till exempel basisk fuchsin, metylenblå och toluidinblå. (Moewis, 88–91, 1978; Solunetti, u.å.).

När de sura och basiska grupperna i färgämnet är i jämvikt är färgen neutral. Indifferent färger har inga saltbindande sura eller basiska grupper. Neutrala färgämnen färgar blodkroppar och parasiter. Neutrala färgämnen är till exempel en kombination av

metylenblått och eosin. Indifferentia färgämnen färgar fettsubstanser som till exempel sudan svart B. (Moewis, 88–91, 1978).

Färgningsmetoden kan vara direkt eller indirekt. Metoder med färglösningar utan tillsatta kemikalier kallas direkta, medan vissa färgämnen fäster i vävnadskomponenter i närvaro av ett betmedel. Metoder som kräver betmedel kallas indirekta. Betmedel är ofta metallsalter eller hydroxider såsom  $\text{FeCl}_3$  eller kaliumaluminiumsulfat (alun). För att nå den optimala färgningsresultaten kan vävnaden färgas tills man uppnått rätt färgnyans och ton, detta kallas för progressiv färgning. Vävnaden kan även överfärgas och färgöverskottet lösas bort, det vill säga differentieras. Detta kallas för regressiv färgning. Färgöverskottet lösas bort med syra vid basiska färger och tvärtom. Färgerna binds inte lika starkt till alla vävnadskomponenter och vissa avfärgas snabbare. Differentieringen avbryts när alla detaljer framträder tydligt, detta kontrolleras i mikroskop. (Moewis, 93–96, 1978; Solunetti, u.å.).

Snittet kan färgas med flera färgämnen efter varandra, vilket kallas succedanfärgning. Denna metod används vid översiktsfärgningar där cellen färgas först med kärnfärg och sedan med cytoplasmafärg. Flera färgämnen kan även blandas vilket kallas för simultanfärgning. Först färgas cellkärnorna med ett färgämne och sedan motfärgas vävnaden med en lösning innehållande 2–3 olika färgämnen. (Moewis, 93–96, 1978).

### **3.2.1 Hematoxylin-Eosin (HE)**

Hematoxylin-Eosin är den vanligaste histologiska färgningen och används som översiktsfärgning. Färgningen är en kombination av ett surt och ett basiskt färgämne. Hematoxylin är ett basiskt färgämne som färgar sura eller basofila vävnadskomponenter såsom cellkärnor, ribosomer och kornigt endoplasmiskt retikel lila-blå. Eosin är en sur färg som färgar basiska eller acidofila vävnadskomponenter såsom cytoplasma, cellväggar

och det mesta bindväv i olika nyanser av rosa, orange och röd. Vid hematoxylin-eosin-färgning färgas cellkärnorna först med hematein och sedan färgas cytoplasma med eosin. (Anderson & Rolls, u.å.; Gamble & Bancroft, 125, 2002; Webpath, u.å.c).

Hematoxylin extraheras från den innersta veden av *Haematoxylum campechianum* trädet. Vid oxideringen av hematoxylin bildas hematein som är det själva färgämnet. Hematoxylin kan oxideras naturligt eller kemikaliskt. Vid naturlig oxidering utsätts hematoxylin för ljus och luft. Oxideringen är en långsam process som tar 3–4 månader. Ehrlichs hematoxylin är ett exempel på hematoxylin som oxiderats naturligt. Vid kemisk oxidering används ett oxideringsmedel som omedelbart förvandlar hematoxylin till hematein. Vid Mayers hematoxylin används natriumjodat och vid Harris hematoxylin används kvicksilveroxid. Hematein har låg affinitet till vävnaden och kräver betmedel för att binda till vävnaden. Som betmedel används alun, järn eller tungsten. Betmedlet stärker den positiva laddningen av hematein, vilket hjälper bindningen till de negativt laddade vävnadskomponenterna såsom kromatin. (Gamble & Bancroft, 125-126, 2002; Sampias & Rolls, u.å.; Webpath, u.å.c).

De olika hematoxylinerna klassifieras enligt betmedel som används. Det vanligaste betmedlet är alun. Alun ger cellkärnorna en röd färg, färgen förändras till lila-blå vid sköljning med en svagt alkalisk lösning såsom vattenledningsvatten. De mest använda alun hematoxylinerna är Ehrlichs, Mayers, Harris, Coles och Delafields. Hematoxyliner som använder järnsalter används främst i specialfärgningar, på grund av att de visar mera vävnadsstrukturer såsom myelin och elastinfibrer. Exempel på järnhematoxyliner är Weigerts och Verhöeffs. Det finns bara en känd tungstenhematoxylin, vilket är Mallory PTAH färgning som färgar både material från centrala nervsystemet och allmän vävnadsstruktur. Hematoxylin kan både vara en progressiv eller regressiv färgning. Den regressiva färgningen ger en optimalare resultat på stora mängder av glas som skall färgas. Den progressiva färgningen ger bättre resultat vid färgning av enstaka glas, som till exempel vid färgning av fryssnitt. (Gamble & Bancroft, 125-133, 2002; Sampias & Rolls, u.å.; Webpath, u.å.c).

Eosinerna är xantenfärgämnen, eosin uppstår vid en reaktion mellan brom och fluorescein. Inom histopatologi används oftast eosinvarianterna eosin Y och eosin B. Eosin Y är den mest använda inom histopatologi och ger en gulaktig färg, medan eosin B ger en blåaktig färg. Eosin är lösligt i vatten och svårlösligt i alkohol. Ofta tillförs ättiksyra i eosinlösningen för att få en skarpere färgningsresultat. Färgningen differentieras i vattenledningsvatten som fortsätter ytterligare i dehydreringen med alkoholerna. Eosinfärgningen hjälper att skilja mellan olika cellers cytoplasma och olika typer av bindväv genom att färga dem i olika nyanser av rosa, orange och röd. (Anderson & Rolls, u.å.; Sampias & Rolls, u.å.; Gamble & Bancroft, 130, 2002).

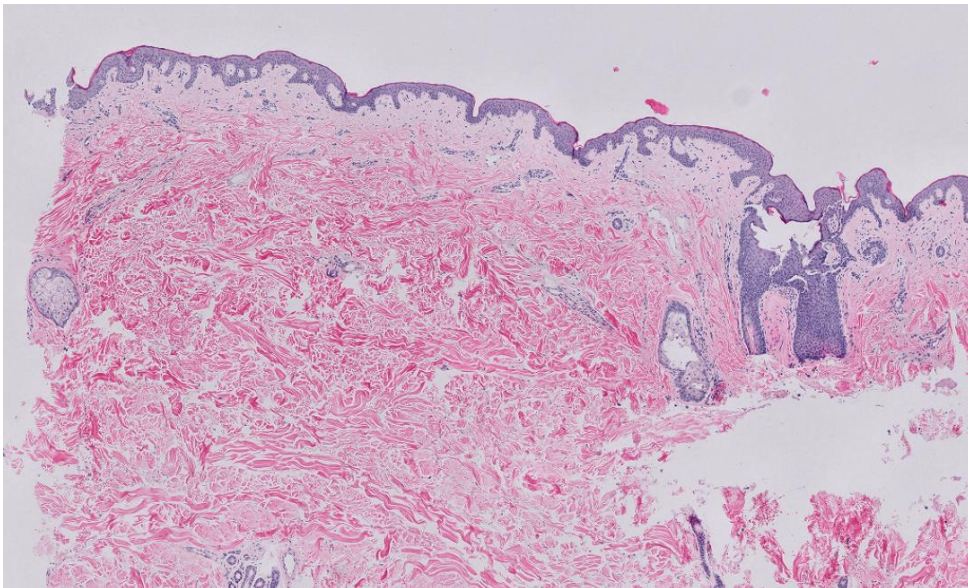


Bild 1. HE-färgning av hud. Förstoring 5x.

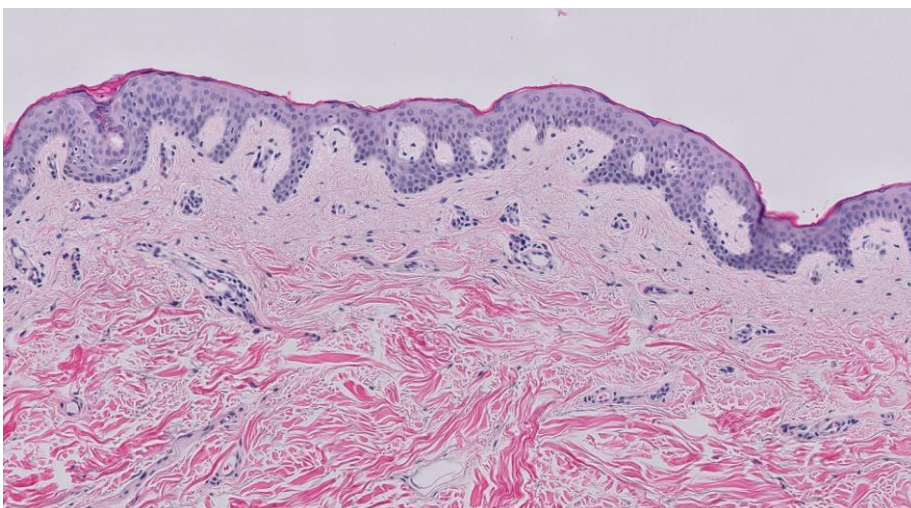


Bild 2. HE-färgning av hud. Hematoxylin färgat cellkärnor, ribosomer och kornigt endoplasmiskt retikel lila-blå. Eosin färgar cytoplasma, cellväggar och det mesta bindväv i olika nyanser av rosa, orange och röd. Förstoring 10x.

Bild 3. HE-glas med snitt från hud.

### 3.2.2 Periodic acid-Schiff (PAS)

Periodic acid-Schiff (PAS) är en selektiv metod för att påvisa kolhydrater, speciellt glykogen och neutrala muciner. Glykogen förekommer i levern, hjärt- och skelettmuskulatur, samt patologiskt i förändrade vävnader. Färgningen kan användas för att påvisa glykogeninlagringar i levern. Neutrala muciner finns till exempel i gastrointestinalkanalerna. Muciner eller slemämnen är en grupp glykoproteiner som bildar en skyddande hinna på epitelcellernas yta i gastrointestinalkanalerna och i luftvägarna, hinnan skyddar mot kemiska och fysikaliska skador. PAS-färgning kan även användas vid påvisning av svamp och som hjälp vid tumördiagnostik, dessutom färgas även basalmembran. PAS-färgningen används för vävnadsprover från levern, huden, övre luftvägarna och gastrointestinalkanalerna. (Färgningsanvisning på Fimlab Vasa patologienhet, 2021; Moewis, 145–147, 1978; Myers, u.å.; VIVO Pathophysiology, u.å.).

Perjodsyra oxiderar -C-C- bindningen i 1,2-glykoler eller i dess amino- eller alkylaminoderivater till dialdehyder som sedan kan färgas med Schiffs reagens. Schiffs reagens är en blandning av basisk fuchsin, saltsyra och natriummetabisulfit. De formade aldehydgrupperna i vävnaden reagerar med Schiffs reagens, parafuksin binds till aldehyderna och bildar en förening som antar en magentafärg, det vill säga anilinröd färg. (Gamble & Bancroft, 173–175, 2002; Moewis, 145–147, 1978).

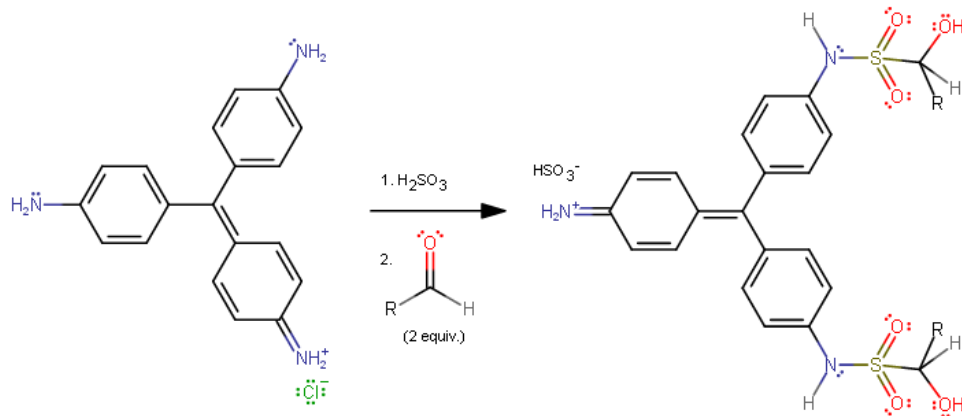


Bild 4. PAS-reaktionen. Till vänster ses Schiff's reagens, i mitten en aldehydgrupp och till höger den magentafärgade föreningen. Reaktionen börjar med svavelsyrlighet. (Nguyen, 2016).

Schiff's reagens bygger på reduktion av basisk fuchsin med svavelsyrlighet eller bisulfit där kinonkonfigurationen i färgämnet omvandlas till en optiskt inaktiv förening, vilket resulterar i en färglös vätska. Kinonringen återbildas vid bindningen till aldehydgrupper i vävnaden och återfår sin ursprungliga färg, vilket resulterar i en PAS-positiv reaktion. Därefter sköljs snittet i rinnande vatten och de PAS-positiva strukturerna får sin optimala färgstyrka. Motfärgning används för att synliggöra den resterande vävnaden. Cellkärnorna motfärgas med hematoxylin och får en lila-blå färg. (Gamble & Bancroft, 173–175, 2002; Moewis, 145–147, 1978; Shedje et al., 2020).

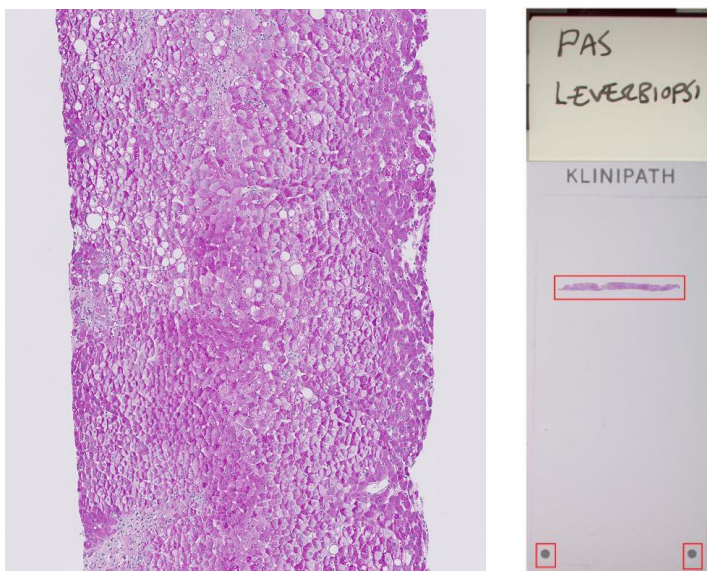


Bild 5. PAS-färgning av leverbiopsi. PAS-positiva strukturer antar en magentafärg. Förstoring 10x.

Bild 6. PAS-glas med snitt från en leverbiopsi.

### 3.2.2.1 Alcian blue periodic acid-Schiff (AB-PAS)

Alcian blue periodic acid-Schiff (AB-PAS) är en metod för att skilja mellan neutrala och sura muciner. Alcian blue färgar sura muciner mörkblå. Alcian blue kan inte färga neutrala muciner, därför färgas neutrala muciner anilinröda med PAS-metoden. AB-PAS-färgningen används vid gastrointestinalkanalens tumördiagnostik, som till exempel vid adenocarcinom. Alcian blue färgar även bågceller och används därför även vid diagnostik av Barretts esofagus. Färgningen används även vid diagnostik av mesoteliom och ateroskleros. (Färgningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; Myers, u.å.; Paskoski & Gowan, 2021).

Alcian blue färgmolekylen är en ftalocyaninring innehållande en kopparatom i mitten. Molekylen innehåller även fyra basiska isotiouroniumgrupper som har en positiv laddning. Alcian blue är en katjonfärg som binds till sura muciner med karboxyl- eller sulfatgrupper vid pH 2,5 genom elektrostatiske attraktion. Alcian blue lyckas inte färga nukleinsyror på grund av sin höga densitet, vilket hindrar den stora färgmolekylens passage in i cellen. Den blåa färgen produceras av kopparatomen i färgmolekylen. Alcian blue binder till olika typer av sura muciner beroende på pH-värde. Vid pH 1,0 färgas sulfaterade muciner och vid pH 2,5 färgas de flesta sura mucinerna. Karboxylgrupperna joniseras inte vid en lägre pH än 2,5, medan sulfatgrupper joniseras vid pH 1 och därmed färgas. I AB-PAS-färgningen färgas sura muciner mörkblå med Alcian blue pH 2,5 och neutrala muciner färgas anilinröda med PAS metoden. Cellkärnorna färgas med hematoxylin. (Bancroft et al., 146–147, 1994; Gamble & Bancroft, 178–179, 2002; Myers, u.å.; Paskoski & Gowan, 2021).

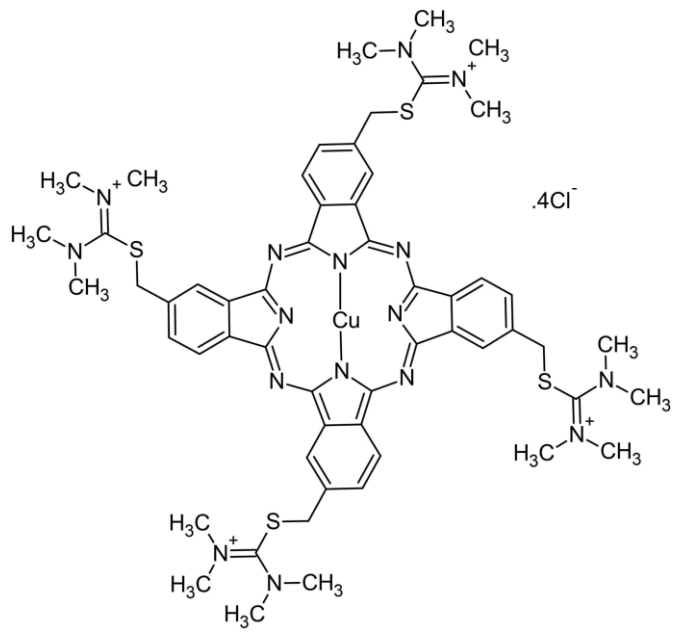


Bild 7. Alcian blue färgmolekylen. (Abcam, u.å.).



Bild 8. AB-PAS-färgning av gastrokopipro. Förstoring 5x.



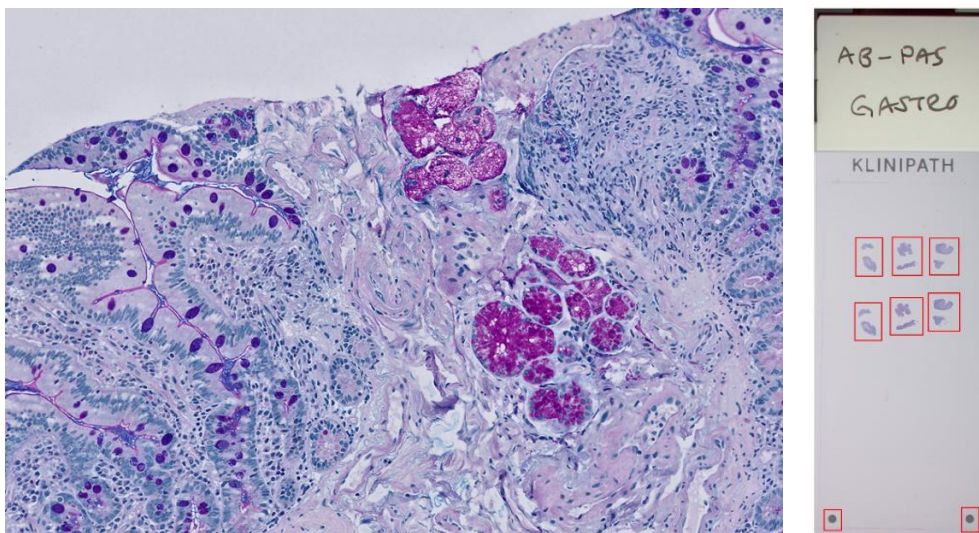


Bild 9. AB-PAS-färgning av gastroskopipro. Sura muciner färgas mörkblåa och PAS-positiva strukturer får en magentafärg. Cellkärnorna färgas lila-blå med hematoxylin. Förstoring 20x.

Bild 10. AB-PAS-glas med snitt från gastroskopipro.

### 3.2.2.2 Diastas periodic acid-Schiff (D-PAS) och diastas alcian blue periodic acid-Schiff (d-AB-PAS)

Färgningen diastas periodic acid-Schiff (D-PAS) används för att differentiera mellan glykogen och neutralt mucin. I D-PAS färgningen avlägsnas glykogen enzymatiskt och neutralt mucin färgas med PAS. D-PAS-färgningen används vid diagnostiken av njurcellscarcinom, hudtumörer, vissa varianter av sarkom och inlagringssjukdomar, som till exempel alfa-1-antitrypsinbrist. Färgningen kan även användas vid misstänkta svampinfektioner. (Färgningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; My pathologyreport.ca, u.å.).

Diastas eller amylas är ett enzym som katalyserar spjälkningen av polysackarider och glykogen. Enzymet produceras i digestionskanalens exokrina körtlar, som till exempel i spottkörtlar och pankreas. Diastaslösningen innehåller alfa-amylas som klyver

polysackarider genom att spjälka  $\alpha$ -1,4 glukosidbindningar. Kedjan spjälks till glukos och maltos som sedan sköljs bort från snittet. Efter behandlingen i diastaslösningen färgas snittet med PAS-metoden och cellkärnorna färgas med hematoxylin. PAS-positiva strukturer såsom neutrala muciner får en anilinröd färg, glykogen däremot som avlägsnats från snittet lämnar ofärgat. (Ellis, u.å.; Gamble & Bancroft, 173, 2002; Sahlgrenska universitetssjukhuset, 2019).

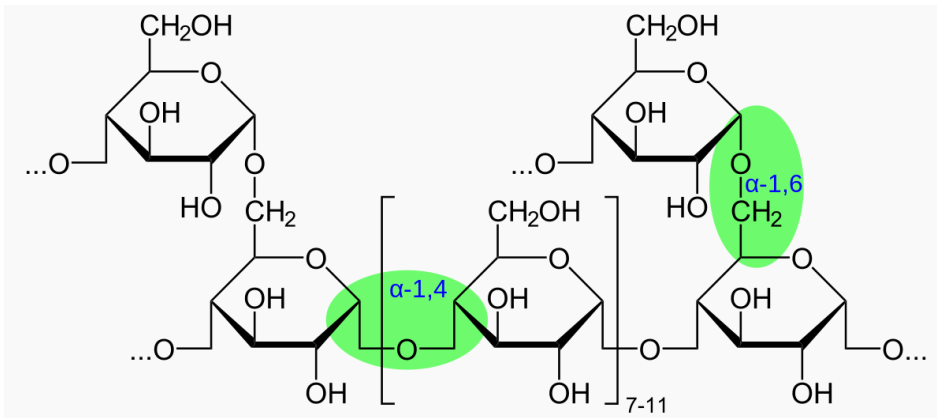


Bild 11. Glykogen med glykosidbindningarna inringade. (Wikipedia, 2010).

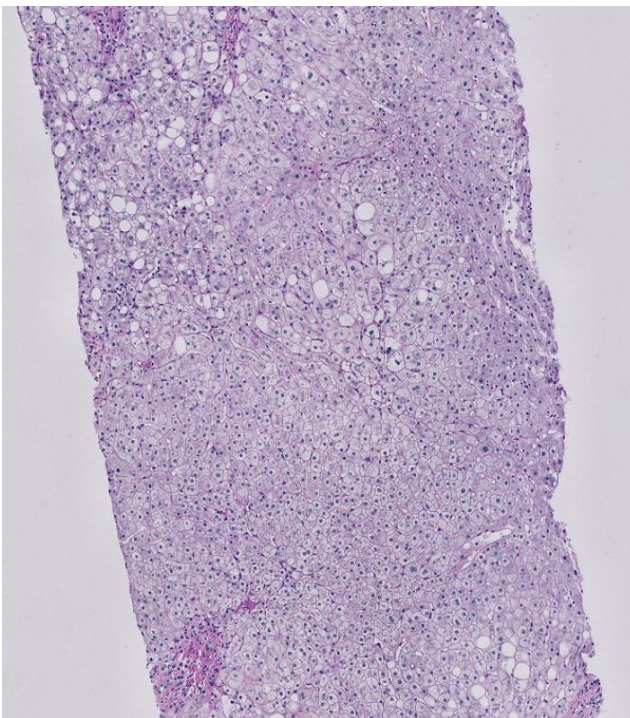


Bild 12. D-PAS-färgning av leverbiopsi. Neutrala muciner får en magentafärg och glykogen lämnar ofärgat. Cellkärnorna färgas lila-blå med hematoxylin. Förstoring 10x.

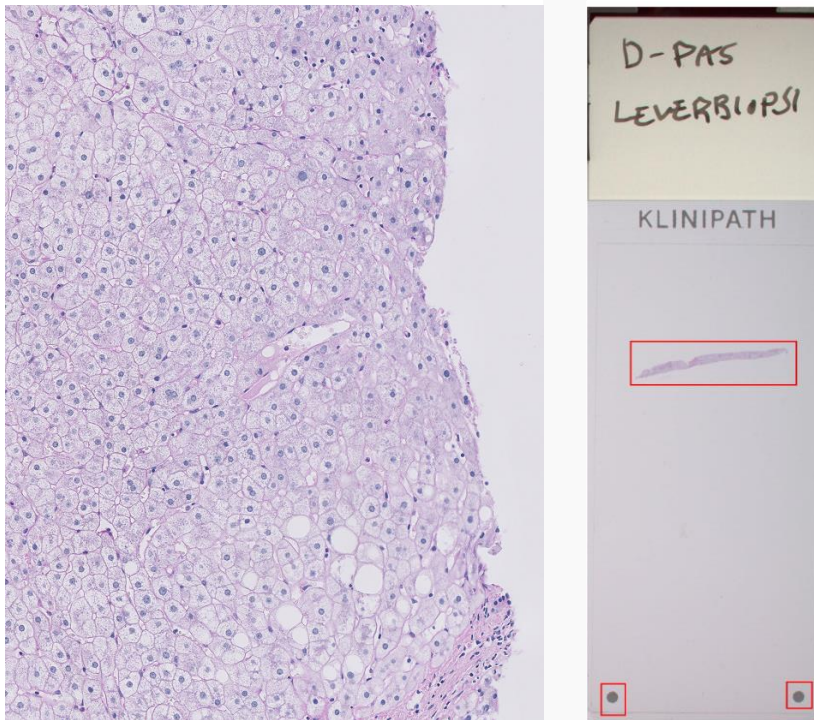


Bild 13. D-PAS-färgning av leverbiopsi. Förstoring 20x.

Bild 14. D-PAS-glas med snitt från en leverbiopsi.

Diastas alcian blue periodic acid-Schiff (d-AB-PAS) färgningen används för att skilja på glykogen och neutrala muciner, samt på grund av att färgningen innehåller alcian blue kan även neutrala och sura muciner skiljas. Glykogen avlägsnas enzymatiskt genom att alfa-amylas spjälkar  $\alpha$ -1,4 glukosidbindningar, kedjan spjälks då till glukos och maltos som sköljs bort från snittet. Därefter färgas de sura mucinerna mörkblå med alcian blue, de neutrala mucinerna anilinröda med PAS och cellkärnorna lila-blå med hematoxylin. Glykogen har avlägsnats och är därmed ofärgat. d-AB-PAS-färgningen används för lungprover. (Ellis, u.å.; Färgningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021).

### 3.2.3 Giemsa

Giemsafärgning används för att påvisa mikroorganismer och mastceller i vävnaden. Färgningen används ofta inom histopatologi för att påvisa infektioner med *Helicobacter pylori* i gastrointestinalkanalen. *H. pylori* kan vara en bakomliggande orsak till kronisk gastrit, magsår och magsäckscancer. Färgningen kan även användas för att påvisa protozoerna *Giardia lamblia* och *Leishmania*. Ansamling av mastceller kan förekomma i vissa hudsjukdomar såsom mastocytos. (Färganvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; Wabinga, 2002).

Giemsa namngavs efter den tyska kemisten Gustav Giemsa och tillhör gruppen Romanowsky-färgningar. Romanowsky-färgningarna innehåller både sura och basiska färger. Färgningen används ofta för mikroskopering av blodutstryk och vid diagnostiseringen av malariaparasiter, men kan även användas inom histopatologi, mikrobiologi och molekylärbiologi. Giemsa är en differentialfärgning som innehåller en blandning av metylenblå, azur och eosin. Metylenblå och azur är basiska färger som binds till sura vävnadskomponenter såsom cellkärnor och ger en blå-lila färg. Eosin är en sur färg och färgar basiska vävnadskomponenter såsom cytoplasma i olika nyanser av rosa, röd och orange. På grund av att giemsa är en differentialfärgning överfärgas snittet och differentieras i syra. (Bancroft et al., 70, 1994; Mokobi, 2021; Webpath, u.å.b).

Giemsafärgningen influeras av pH-värdet. Inom histopatologi används oftast en modifierad version av giemsafärgningen, vilket betyder att pH justerats från 6,8 till 9,0 och ingen differentiering i syra sker. I lägre pH-värden färgas kromatin mer och cytoplasma färgas mindre, högre pH-värden ökar färgningen av cytoplasma. I den modifierade färgningen är kontrasterna mellan vävnaden och organismerna mycket liten. Bakterier och protozoer färgas blåa. Mastcellernas granula innehåller heparin och histamin och får en mörkblå eller

lila färg. Cytoplasma får en ljusblå färg och cellkärnorna färgas blåa. (Färganvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; Jackson et al., 2018; Merck, u.å.a; Rotimi et al., 2000).

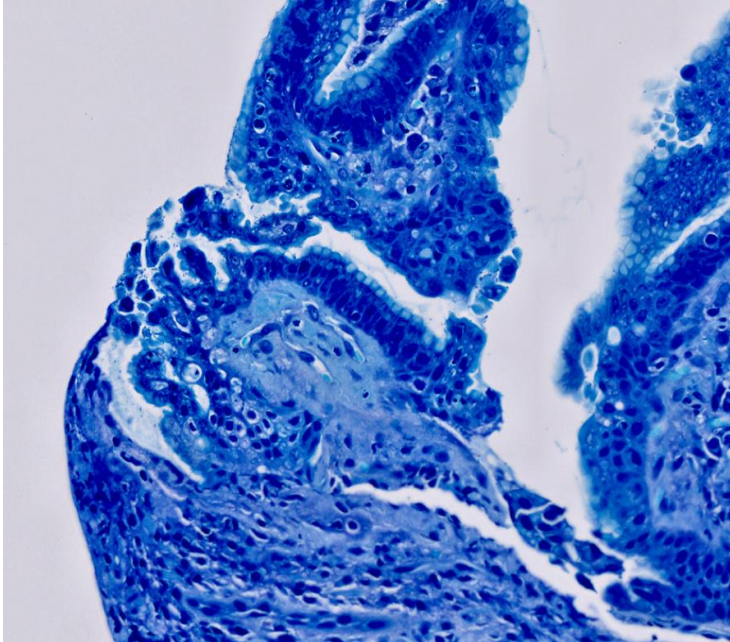


Bild 15. Giemsafärgning av gastroscopipro. Förstoring 20x.

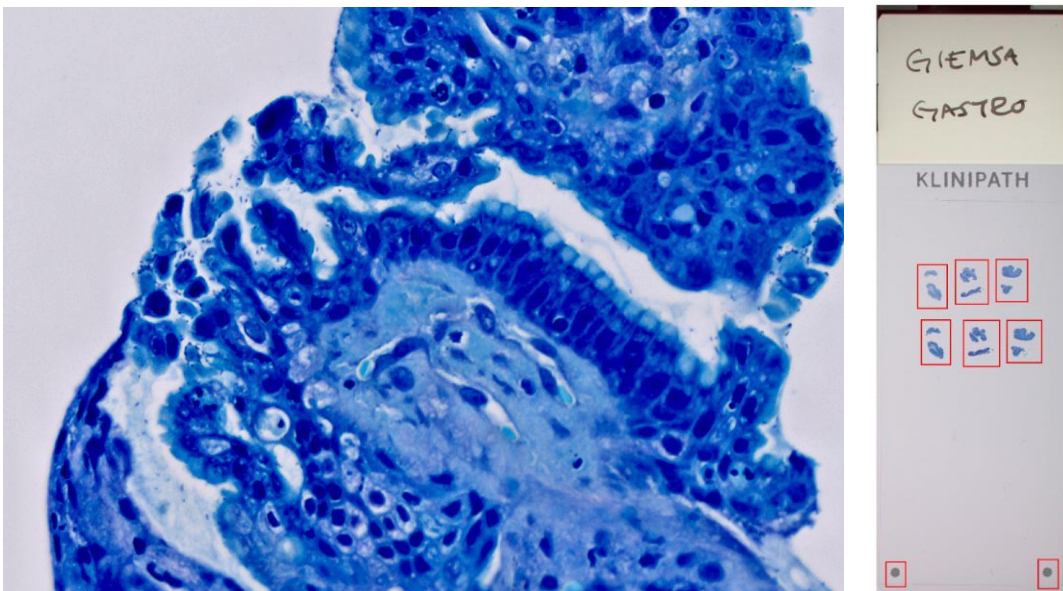


Bild 16. Giemsafärgning av gastroscopipro. Vid klockan 10 ses helikobakterier som färgats blåa. Förstoring 40x.

Bild 17. Giemslaglas med snitt från gastroscopipro.

### 3.2.4 Leder

Leder eller kloroacetatesterasfärgning (CAE) används för att påvisa mastceller och myelopoetiska celler i prover från benmärg. Dessa celler innehåller ett specifikt esteras som använder naftol AS-D kloroacetat i färglösningen som substrat i närvaro av diazoniumsalt. I reaktionen bildas en röd färg som produkt i cellen. I reaktionen sker en enzymatisk hydrolys av esterbindningar och naftolföreningar frigörs. Naftolföreningarna reagerar med diazoniumsalt, i detta fall basen Fast Red Violet LB, vilket bildar depåer av en röd färg vid ställen där enzymaktivitet finns. Vid ställen med enzymaktivitet ses röd granulering. Naftol AS-D kloroacetatesteras reagerar specifikt med celler i granulocytlinjen. Mastceller samt både mogna och omogna granulocyter färgas röda. Monocyter och lymfocyter visar svag eller ingen aktivitet. Cellkärnorna motfärgas med Gill no.3 hematoxylin och får en blå-lila färg. (Färganvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; Lyon, 321, 1997; Merck, u.å.c; Sigma-Aldrich, 2016).

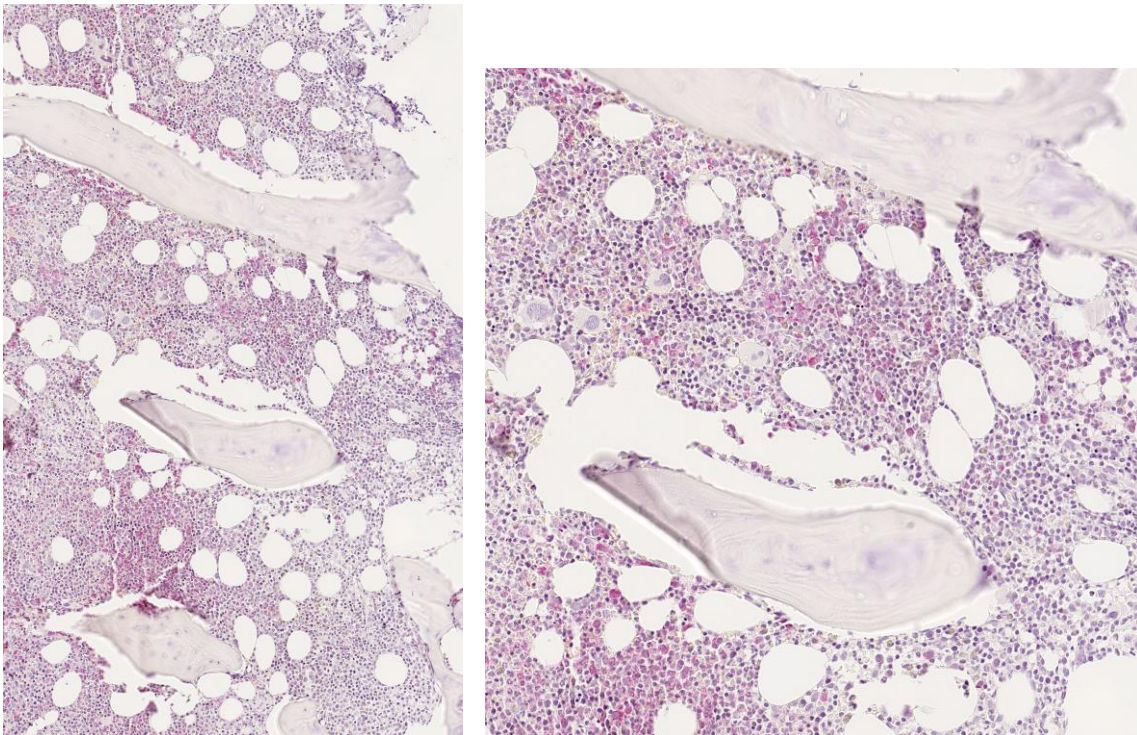


Bild 18. Lederfärgning av benmärg. Förstoring 10x. Bild 19. Lederfärgning av benmärg. Förstoring 20x.

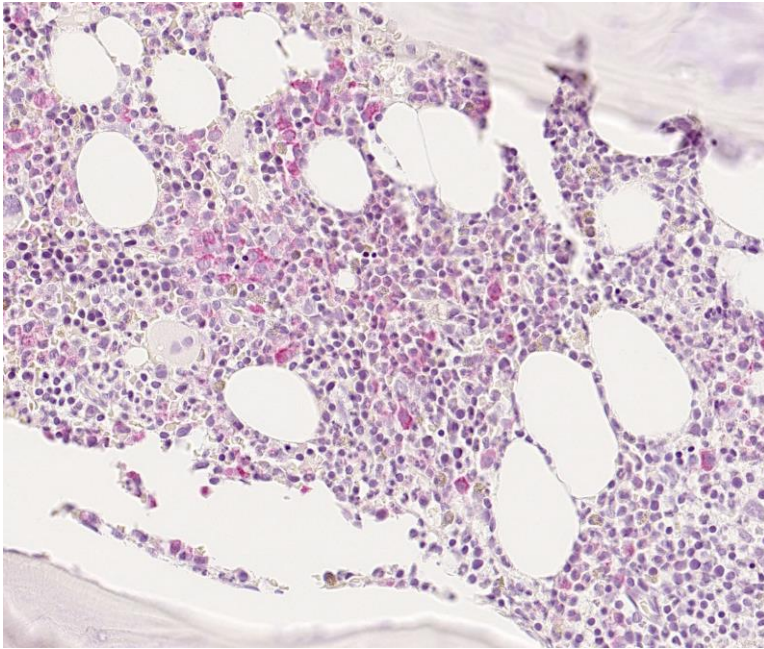


Bild 20. Lederfärgning av benmärg. Mastceller samt både mogna och omogna granulocyter färgas röda. Förstoring 40x.

### 3.2.5 Järn i vävnad

Preussiskt blått eller berlinerblå används för att påvisa järn i vävnaden. Järn behövs vid bildningen av hemoglobin i erythrocyter. Järnet upptas i tunntarmen och transporteras därifrån till benmärgen. Järn lagras i benmärgen och mjälten. Järn kan lagras i form av  $\text{Fe}^{3+}$  svagt bundet till ett protein som hemosiderin. Om kroppens järnlager är fulla kan järn lagras i andra organ. Stora järndepåer ses vid hemokromatos och hemosideros. Benmärgsbiopsier färgas ofta med preussiskt blått för att utvärdera järnlagret i benmärgen. (Bancroft et al., 207–208, 1994; Hughes et al., 2004; Webpath, u.å.d).

Järn är olösligt i alkaliska lösningar men lösligt i sura lösningar. I denna metod frigörs  $\text{Fe}^{3+}$  från det bundna proteinet med hjälp av saltsyra och järn(III)klorid formas. Järnet reagerar då med kaliumferrocyanid och bildar olöslig ljusblå järnferrocyanid, vilken är färgen preussiskt blått eller berlinerblå. Cellkärnorna motfärgas med neutralrött och får en röd

färg. Cytoplasma får en rosa färg. (Bancroft et al., 207–208, 1994; Gamble & Bancroft, 244–245, 2002; Stainsfile, 2019).

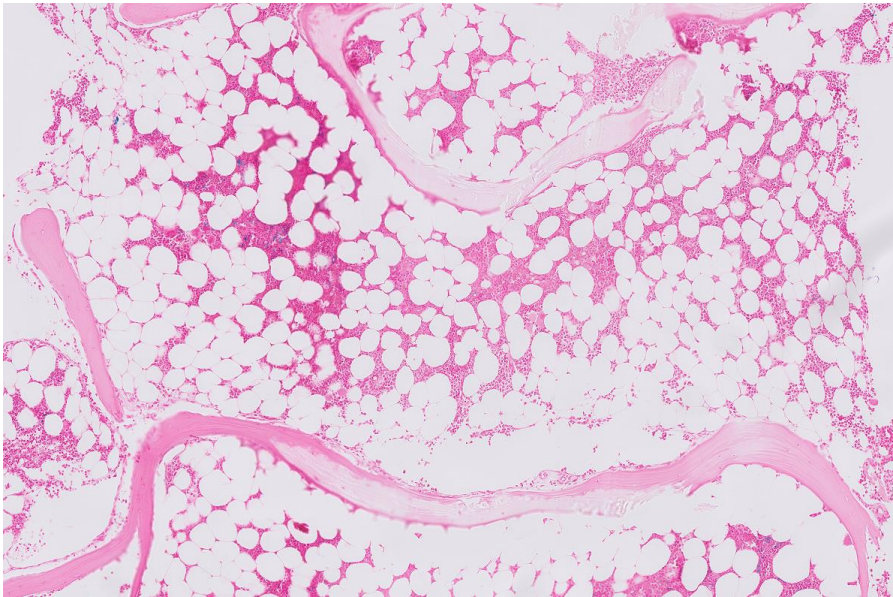


Bild 21. Järnfärgning av benmärg. Förstoring 10x.

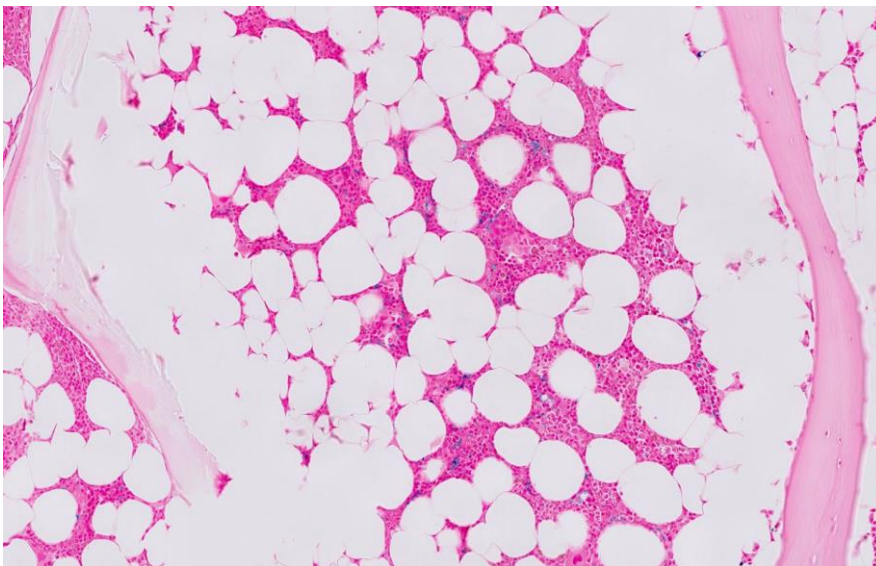


Bild 22. Järnfärgning av benmärg. Järn antar en ljusblå färg. Förstoring 20x.

Bild 23. Järnglas med snitt från benmärg.





### 3.2.6 Elastin i vävnad

Elastica van Gieson används vid färgningen av bindväv och kollagen. Elastiska fibrer består av elastin polymerer och elastiska mikrofibriller. Dessa bildar tredimensionella nätverk i den extracellulära matrixen i bindväv, såsom dermis i huden, lunga, hjärta och blodkärlsväggar. Med färgningen kan man påvisa atrofi i elastisk vävnad såsom vid lungemfysem, förtunning och avsaknad av elastiska fibrer vid ateroskleros samt andra vaskulära sjukdomar. (Bancroft et al., 54–55, 1994; Sigma-Aldrich, 2020a; Webpath, u.å.a).

Vid färgning med elastica van Gieson behandlas vävnaden först med ett positivt laddat hydrofobiskt resorcin-fuksin-färgämne. Resorcin-fuksin-färg finns i överskott och har affinitet mot sura och negativt laddade elastiska fibrer. Efter differentiering med alkohol eller vattenledningsvatten färgas kärnorna med Weigerts järnhematoxylin. Sista skedet i färgningen är motfärgning med van Gieson som innehåller fuksinsyra och pikrinsyra. Dessa färgar färgar olika vävnadsstrukturer samtidigt. Fuksinsyra färgar kollagenfibrer rosaröda, medan pikrinsyra färgar muskelfibrer, erythrocyter och gliafibrer gula. Elastiska fibrer färgas mörkblå-lila och kärnorna får en svartblå-brun färg. (Biognost, 2019; Sigma-Aldrich, 2020a; Ventana medical systems, 2016).

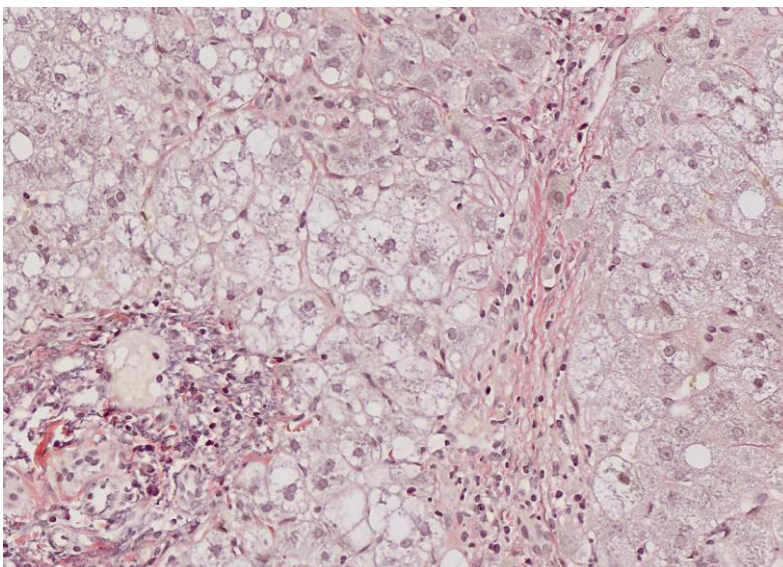


Bild 24. Elastinfärgning av leverbiopsi. Kollagenfibrer färgas rosaröda. Muskelfibrer, erythrocyter och gliafibrer färgas gula. Elastiska fibrer färgas mörkblå-lila och kärnorna får en svartblå-brun färg. Förstoring 20x.

Bild 25. Elastinglas med snitt från en leverbiopsi.

### 3.2.7 Retikulin i vävnad

Retikulin nuclear fast red (RNFR) är en silverfärgning och görs för att påvisa retikulin i vävnaden. Retikulin är tunna fibrer som är anslutna till grövre kollagenfibrer. De ger ett nätverk av stöd åt organ som levern, mjälten och njurarna. Färgningen demonstrerar onormala mönster av retikulin i dessa organ vid patologiskt tillstånd. Retikulinfibrer är väl definierade fibrer och vid till exempel nekros eller levercirros är mönstren diskontinuerliga. Färgningen används även vid differentialdiagnos av vissa tumörtyper. Retikulin har en karakteristisk ställning i relation till tumörcellerna i vissa tumörtyper. (Gamble & Bancroft, 141–142, 2002; Sigma-Aldrich, 2020b; Ventana medical systems, 2018).

Denna silverfärgning baserar sig på Gordon och Sweets metod. Metalliskt silver kan precipitera på retikulin och silversalterna kan sedan demonstreras. Kaliumpermanganat oxiderar vävnaden för att öka färgningen av retikulin. Oxalsyra avlägsnar överskott av kaliumpermanganat. Ammoniumjärn(III)sulfat formar en metallorganisk förening, den metallorganiska föreningen ersätts sedan av silver. Ett reduktionsmedel som formalin tillsätts för att utveckla silvret till synligt silver. Guldchlorid tillsätts för bättre kontrast och klarhet. Tiosulfat avbryter reaktionen och avlägsnar silver som inte reagerat. Vävnaden motfärgas med nuclear fast red som ger en kontrasterande bakgrund. Retikulin färgas svart mot en rosaröd bakgrund. (Sigma-Aldrich, 2020b; Ventana medical systems, 2018; Webpath, u.å.e).

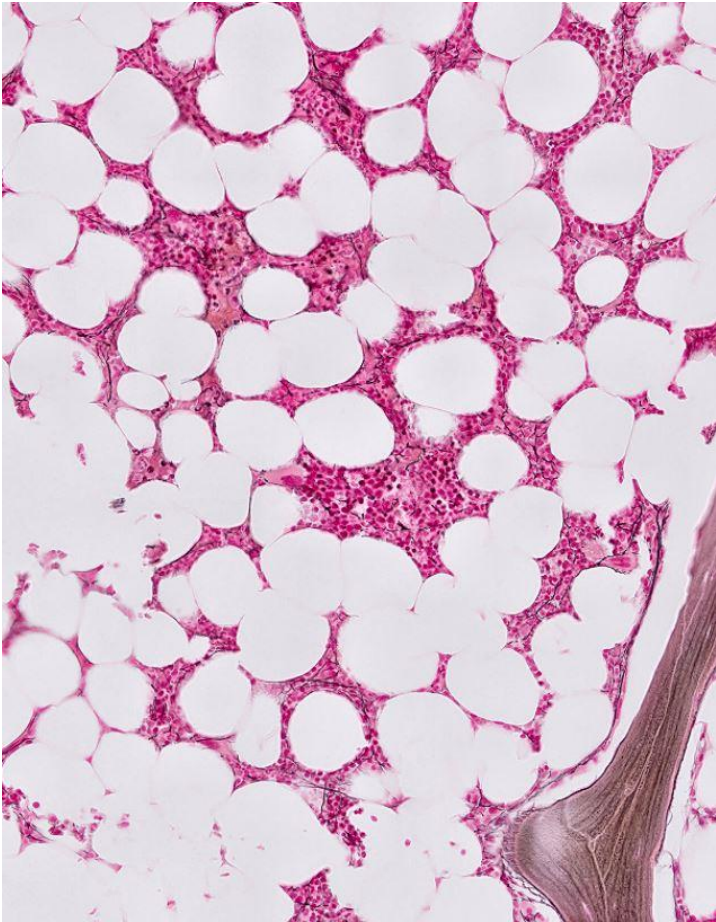


Bild 26. Retikulinfärgning av benmärg. Förstoring 10x.

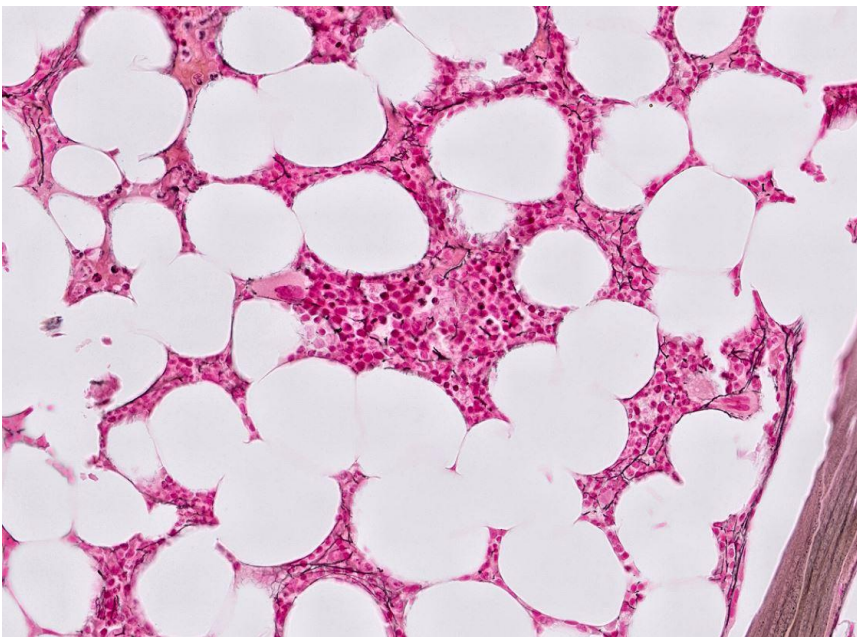


Bild 27. Retikulinfärgning av benmärg. Retikulinfibrerna syns i svart. Förstoring 20x.



Bild 28. Retikulinglas med snitt från benmärg.

### 3.2.8 Kongo röd

Kongo röd är en färgning som används vid identifieringen av amyloidos. Amyloidos är en grupp sjukdomar där amyloid ackumuleras i vävnaden. Amyloid är ett olösligt proteinaggregat som består av proteinfibriller. Amyloid uppkommer från felveckade proteiner. Amyloid kan till exempel hittas i lever, njure, mjälte eller hjärnan. Mängden amyloid i vävnaden ökar med tiden och ju mera amyloid som ackumulerats desto sämre blir organets funktion. Utvecklingen av neurodegenerativa sjukdomar såsom Alzheimers och Parkinsons sjukdom tros vara en följd av ackumulering av amyloid i nervvävnaden. (Sigma-Aldrich, 2021; Yakupova et al., 2019).

Kongo röd är ett surt azofärgämne som utgörs av två identiska halvor bestående av en fenyling bundet till en naftalen del genom en azogrupp. Azogrupper består av två kväveatomer med dubbelbindning mellan dem,  $-N=N-$ . Fenyलगrupparna är bundna till varandra genom en difenylbindning. Kongo röd bildar vätebindningar med vävnadskomponenterna och färgar flera vävnadskomponenter, men har en större affinitet till amyloid. För att förbättra specificiteten till amyloid kan en alkoholmetod användas tillsammans med en högre jonhalt och pH. Kongo röd kan även användas som pH-indikator som har en blålila färg vid pH 3 och röd färg vid pH 5. (Gamble & Bancroft, 311–313, 2002; Pubchem, 2022; Sigma-Aldrich, 2021).

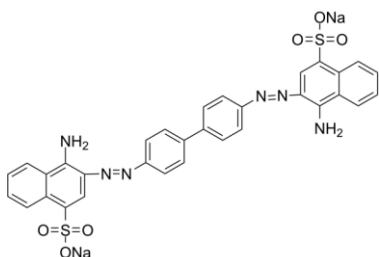


Bild 29. Kongo röd färgmolekyl. (MedChemExpress, u.å.).

Vid färgning med kongo röd används en positiv kontroll som består av vävnad med redan känd amyloidos. Den positiva kontrollen används för att se om färgningen lyckats. Kongo röd färgar amyloid, elastiska fibrer och eosinofil granula röd. Cellkärnorna motfärgas med hematoxylin och får en blå färg. Kongo röd ger en orangeröd färg om man tittar på glaset med ljusmikroskop, men om man tittar på glaset under polariserat ljus har amyloid en äppelgrön färg. (Sigma-Aldrich, 2021; Wiklund, 2019).

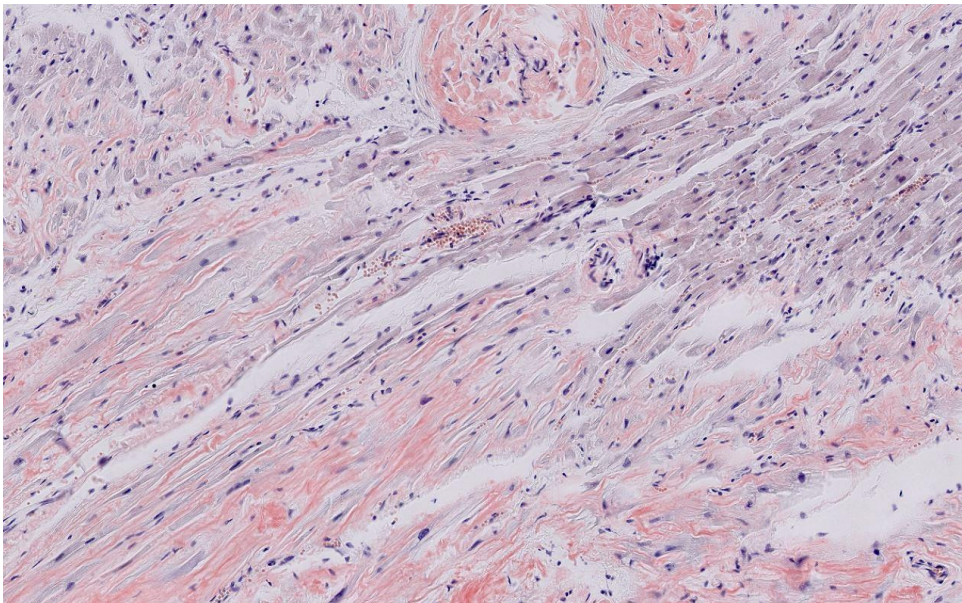


Bild 30. Färgning av hjärtmuskel med kongo röd. Amyloid, elastiska fibrer och eosinofil granula får en orangeröd färg. Cellkärnorna färgas blåa med hematoxylin. Förstoring 5x.

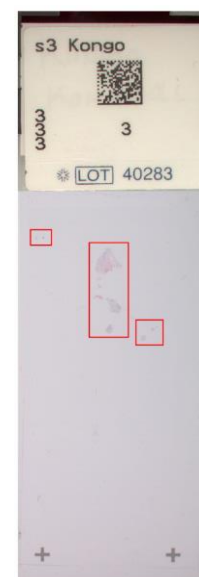
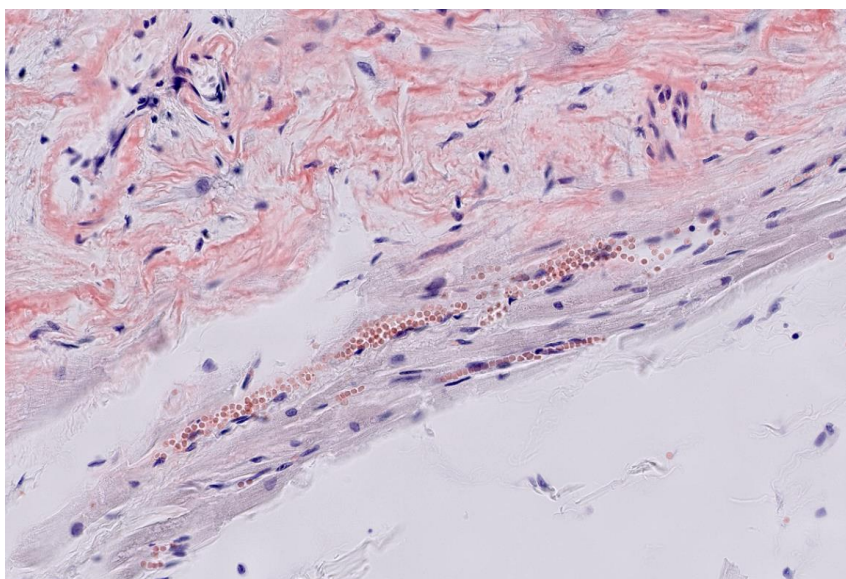


Bild 31. Färgning av hjärtmuskel med kongo röd. Förstoring 20x.

Bild 32. Kongo röd-glas med snitt från hjärtvävnad.

### 3.2.9 Acid-fast bacilli (AFB)

Acid-fast bacilli (AFB) det vill säga syrafast färgning är en metod för att påvisa syrafasta mykobakterier. Färgningen används ofta inom histopatologi vid påvisning av *Mycobacterium tuberculosis* i prover från lunga. *M. tuberculosis* orsakar tuberkulos. Mykobakteriernas membran är rika på lipider och innehåller mykolsyror som är vaxliknande fettsubstanser, vilket gör membranerna hydrofoba och svår att penetrera. Därför färgas inte mykobakterier med vattenlösliga färger såsom gramfärgning. Mykobakterierna är även resistenta mot syror och alkohol och kallas därför syrafasta stavar. I AFB-färgningen används basiskt fuchsin och fenol som diffunderar lätt in i mykobakterien. (Chen et al., 2012; Moewis, 126, 1978; Mokobi, 2020).

Det finns två olika metoder för syrafast färgning. Ziehl-Neelsen metoden är en differentialfärgning där karbol-fuchsin upphettas så att färgen kan penetrera cellväggen. Kinyoun metoden kräver ingen upphettning och cellväggen penetreras genom att öka koncentrationen av basisk fuchsin och fenol. Karbol-fuchsin är en basisk färg som binds till negativa bakteriekomponenter såsom mykolsyra. Det bildas ett starkt komplex som hålls kvar vid avfärgningen med salpeter-, svavel- eller saltsyra som spätts med alkohol. Snittet motfärgas med metylenblått som ger en kontrastfärg så att de röd- eller rosafärgade mykobakterierna kan ses. (Alpha-Tec Systems, 2019; Moewis, 126, 1978; Mokobi, 2020; Tankeshwar, 2021).

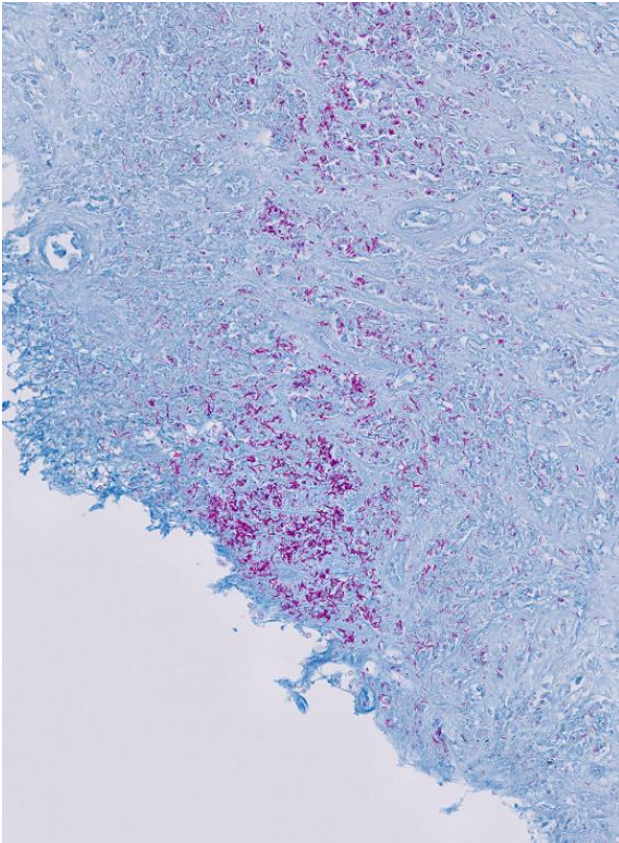


Bild 33. AFB-färgning av lunga. Förstoring 5x.

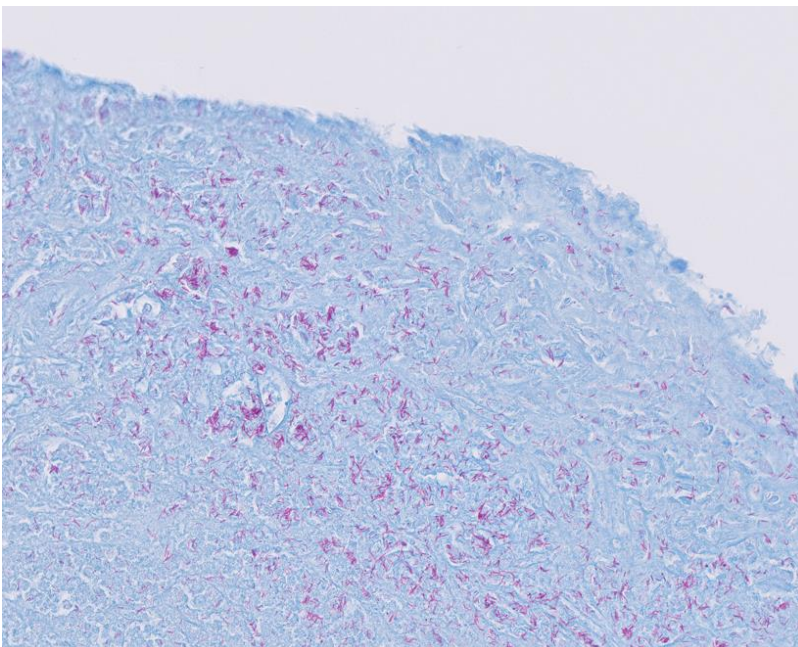


Bild 34. AFB-färgning av lunga. Mykobakterierna får en röd eller rosa färg. Förstoring 10x.

Bild 35. ABF-glas med snitt från lunga.

### 3.2.10 Toluidinfärgning

Toluidin har många olika användningsområden. Toluidin framhäver vävnadskomponenter såsom mastcellernas granula, muciner och brosk. Toluidin används även vid identifieringen av dysplasi och karcinom i munhålan. Toluidin används också vid färgningen av fryssnitt på grund av den snabba färgningsprocessen som tar 10–20 sekunder. Färgningen ger en klar överblick över cellerna och vid fall av immunofluorescens-prover görs färgningen för att se att vävnaden är rätt väg. Vävnaden är rätt väg när alla hudlager syns. (J. Saarenheimo, personlig kommunikation, 23 februari, 2022; Sridharan & Shankar, 2012).

Toluidin är en katjonfärg som färgar sura vävnadskomponenter såsom sulfater, karboxylater och fosfatradikaler. Toluidin har affinitet för nukleinsyror och binder därför till vävnader med mycket DNA och RNA. Toluidin hör till tiazinerna och är delvis lös i både vatten och alkohol. Toluidinblå färgar vävnader metakromatiskt, vilket är ett fenomen där färgen reagerar med vävnaden och producerar en annan färg än den ursprungliga färgen och resterande vävnaden. Metakromasi är selektivt och bara vissa vävnadskomponenter kan färgas metakromatiskt. I detta fenomen absorberas ljus i olika våglängder beroende på koncentrationen och omgivningen. Färgen byts utan att den kemiska strukturen förändras. Metakromasi kan bara uppstå om det finns fria elektronegativa grupper på vävnadens yta. Glukosaminoglykan, mastcellernas granula och brosk färgas metakromatiskt och får en lila färg. Bakgrunden färgas ortokromatiskt och får en blå färg. Färgningens selektivitet och intensitet beror på pH, färgkoncentrationen, färgningstiden, temperaturen och dehydreringen. (Bergholt, 2019; IHC world, u.å.; Sridharan & Shankar, 2012).



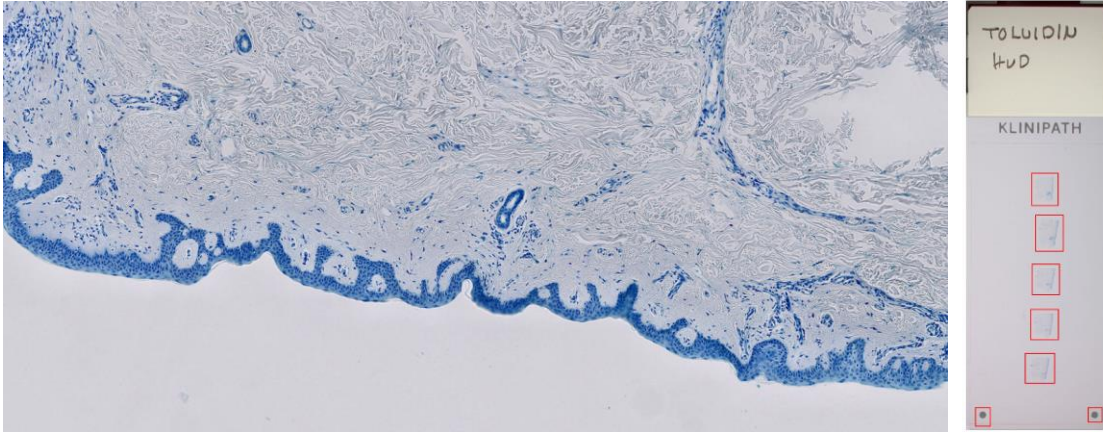


Bild 36. Färgning av hud med toluidin. Bakgrunden får en blå färg. Förstoring 5x.

Bild 37. Toluidinglas med snitt från hud.

## 4 Framställning av vävnadspreparat och fotografier

Detta examensarbete utmynnar i en handbok med information om de olika färgningarna som finns på patologienheten vid Fimlab Vasa. Handboken innehåller bilder som visar färgningsresultatet, detta ger en djupare förståelse för den skriftliga informationen om färgningen. Examensarbetet är experimentellt och i denna del tas det upp planeringen och utförandet av den praktiska delen.

### 4.1 Material och metoder

Examensarbetet innehåller bilder som tagits på de olika histologiska färgningarna för att demonstrera hur de ser ut. Vävnadsproverna har snittats och färgats innan fotografering. Färgningarna är olika rutin- och specialfärgningar som görs på patologienheten vid Fimlab Vasa. Examensarbetets praktiska del utfördes i september och oktober 2021. De sista bilderna för arbetet togs i februari 2022. Det skriftliga arbetet påbörjades i november 2021.

#### 4.1.1 Provmaterial

Som provmaterial användes övningsblock, kontrollblock och gamla patientblock. Övningsblocken är gjorda på rester från vävnadspreparat som används vid övningen på snittning. Provmaterialet vid kongo röd och AFB-färgningen är från kontrollblock med känd amyloidos och tuberkulos som används vid dessa färgningar för att se om de lyckats. En del av provmaterialet är från gamla patientblock där de olika vävnadskomponenterna som de olika färgningarna visualiserar finns.

Färgning	Vävnadsprov
HE	Hud och appendix
PAS	Tonsill och leverbiopsi
AB-PAS	Gastroskopi
D-PAS	Leverbiopsi
D-AB-PAS	Gastroskopi
Giemsa	Gastroskopi
Leder	Benmärg
Järn	Benmärg
Elastin	Leverbiopsi
Retikulin	Benmärg
Kongo röd	Kontrollblock hjärtmuskel
AFB	Kontrollblock lunga
Toluidin	Hud

Tabell 2. Tabell över vävnadstyperna som användes vid respektive färgning.

#### 4.1.2 Färgningsautomater

Vid färgningen användes färgningsautomaterna Sakuras Tissue-Tek Prisma® och VENTANA BenchMark special stains system. Tissue-Tek Prisma® är en automatiserad färgningsautomat som kan köra flera färgningar samtidigt. Färgningsautomaten kan köra flera olika färgningsprogram som kan justeras för att få den optimala färgningsresultaten. De olika lösningarna är i olika behållare i automaten och en robotarm flyttar korgarna med objektglas i de olika behållarna enligt färgningsprogram. 60 glas kan färgas per körning. Täckglasautomaten Tissue-Tek Film® kan även integreras till färgningsautomaten, vilket bildar en helt automatiserad färgnings- och monteringsprocess. (Sakura, u.å.; VWR, u.å.).



Bild 38. Färgningsautomat Tissue-Tek Prisma® med täckglasapparaten Tissue-Tek Film®. (Sakura, u.å.).

Roche diagnostics VENTANA BenchMark special stains system är en färgningsautomat som används vid specialfärgningar. Färgningsautomaten kan köra flera olika färgningsprogram samtidigt. Provkarusellen rymmer upp till 20 glas. Reagenserna för färgningsautomaten är färdiga att användas. Automaten har en helt automatiserad färgningsprocess med automatiserad deparaffinering och färgning. Efter färgningen bör glasen dock föras

manuellt igenom en stigande alkoholserie och xylener för att kunna montera täckglas. (Roche diagnostics, u.å.).



Bild 39. Färgningsautomaten VENTANA BenchMark special stains system. (Roche diagnostics, u.å.).

#### 4.1.3 Framställning av preparat

Vävnadspreparaten snittades med en vattenrotationsmikrotom där snitten åker ner i ett varmvattenbad varifrån de sedan fiskas upp på objektglas. Preparaten snittades till 3  $\mu$ m tunna snitt. De flesta snitt sattes på objektglas från Klinipath, medan snitten som färgas med VENTANA BenchMark special stains system sattes på Superfrost® glas. Orsaken till detta är att snitten hålls bättre fast på Superfrost® glas. Innan snittning kyls preparatblocken ner på en kylplatta, detta gör snittningen lättare. Kniven måste även vara vass för att få bra snitt. Oftast tar man 1–4 snitt beroende på vävnadens storlek. Men i många fall togs bara ett snitt för att spara på material. Flera preparat hade mycket knappt med material såsom leverbiopsin och gastroskopiproven.

#### 4.1.4 Färgning av preparat

HE, PAS, AB-PAS och giemsa färgades på Sakuras Tissue-Tek Prisma® färgningsautomat. Se bilaga 1, 2, 3 och 4 för att se färgningsprogrammen för dessa färgningar. Efter färgningen förde färgningsautomaten glaset till den tillhörande täckglasautomaten Tissue-Tek Film® där de färgade glaset fick täckglas. D-PAS och D-AB-PAS sattes i diastaslösning innan färgning. Innan man sätter glaset i diastaslösningen skall de först deparaffineras. Snitten deparaffinerades i färgningsautomaten, se bilaga 5 för deparaffineringsprogrammet. Diastaslösningen innehåller 50 mg diastas, 85 mg pankreatin och 50 ml destillerat vatten. Lösningen blandas om i 20 min med magnetomröraren på medelhastighet. Glaset sätts i enzymlösningen i 30 min och sköljs därefter i rinnande vatten i 5 min. Därefter färgas glaset i färgningsautomaten. D-PAS färgas enligt samma färgningsprogram som för PAS utan deparaffineringen i början, så programmet börjar från steg 10 (se bilaga 2). D-AB-PAS färgas enligt samma färgningsprogram som för AB-PAS utan deparaffineringen, programmet börjar från steg 10 (se bilaga 3). (Färgningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021).

Järn, elastin, retikulin, kongo röd och AFB färgades med Roche diagnostics VENTANA BenchMark special stains system. Snitten för dessa färgningar sattes på Superfrost® glas så att snitten hålls bättre på plats under färgningen. Se bilaga 6 för färgningsprogrammen för dessa färgningar. Efter färgningen förs glaset manuellt genom en stigande alkoholserie och xylener före montering av täckglas. Glaset som färgats med järn, retikulin och AFB doppades först några gånger i 96 % etanol för att få bort färgrester och täckglaset av olja som automaten satt på glaset. Därefter sattes glaset 2 x 30 s i 96 % etanol, 2 x 30 s i absolut etanol och 2 x 30 s i xylen. Täckglaset monterades i täckglasautomaten. Glaset som färgats med kongo röd sattes 2 x 30 s i absolut etanol och 2 x 30 s i xylen. Därefter monterades täckglas manuellt. Glaset som färgats med elastin torkades två gånger med filterpapper för att avlägsna färgrester, det vill säga blottning. Det är viktigt att man gör det direkt efter

färgning så att färgningsresultatet blir optimalt. Efter blottningen sattes glaset i 2 x 30 s absolut etanol och 2 x 30 s i xylol. Därefter monterades täckglaset i täckglasautomaten. (Snittningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; Färgningsanvisningsanvisning för VENTANA Roche, 2017).

Lederfärgningen gjordes manuellt. Benmärgsbiopsin måste dekalCIFieras innan snittning i till exempel EDTA, så att det går lättare att snitta det hårda materialet. Snittet måste deparaffineras innan färgning, detta gjordes i färgningsautomaten med deparaffineringsprogrammet (se bilaga 5). Efter deparaffineringen och hydreringen färgades snittet. Snittet färgades med Naphthol AS-D Chloroacetate (Specific Esterase) Kit från Sigma-Aldrich. (Webpath, u.å.c).

Reagenserna skall vara i rumstemperatur i minst 30 min innan färgning och destillerat vatten skall värmas till 37 grader. Därefter blandas reagenserna. Till motfärgningen Gill no. 3 hematoxylin blandas 10 ml Gill no. 3 hematoxylin och 40 ml destillerat vatten. Till färglösningen blandas först 1 ml Fast Red Violet LB Base med 1 ml natriumnitritlösning. Lösningen får stå i 2 min och därefter tillsätts 40 ml 37 grader varmt destillerat vatten och 5 ml Trizmal 6,3 buffert koncentrat, lösningen får då en gul färg. Till slut tillsätts 1 ml Naftol AS-D kloroacetat och lösningen får en röd färg. Snittet färgas i 15 min med lösningen på värmeplattan skyddat från ljus. Efter färgning sköljs snittet i 4 min i rinnande destillerat vatten, därefter motfärgas cellkärnorna i Gill no. 3 hematoxylin i 1 min. Efter motfärgningen sköljs snittet i 10 min i rinnande destillerat vatten och förs sedan igenom en stigande alkoholserie och xylener. Glaset doppas 3 x 5 dopp i 96 % etanol, 2 x 5 dopp i absolut etanol, 5 dopp i xylol och till sist 5 min i xylol. Till slut monteras täckglas på snittet i täckglasautomaten. (Färgningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021; Sigma-Aldrich, 2016).

Toluidin färgades också manuellt. Innan färgningen deparaffinerades snittet i färgningsautomaten (se bilaga 5). Vid färgning fick glaset först vara 15 s i toluidin, sedan doppas glaset 15 ggr i rinnande vatten och därefter förs glaset igenom en stigande

alkoholserie och xylener. Glaset doppas 3 x 5 doppar i 96 % etanol, 2 x 5 doppar i absolut etanol, 5 doppar i xylen och 5 min i xylen. Därefter monteras täckglas i täckglasautomaten. (Färgningsanvisning på patologienheten vid Fimlab Vasa, 2021).

#### 4.1.5 Fotografering av preparat

Efter att alla färgningar gjorts började fotograferingen av glaset. Först provades fotografering med mobiltelefonens kamera genom mikroskop. Bilderna blev bra, men till slut beslöts det att glaset skulle skannas med Philips Intellisite Pathology Solution (PIPS) systemet. PIPS-systemet innehåller UFS glasskannern och ImageManagementSystem-bildanalyseringsprogrammet (IMS), versionen 3.2. Glaset skannades med glasskannern och bilderna togs från IMS-bildanalyseringsprogrammet. (J. Saarenheimo, personlig kommunikation, 22 mars, 2022).



Bild 40. Glasskannern Philips Intellisite Pathology Solution systemet. (Philips, 2018).

## 5 Resultatet

Resultatet visas i kapitel 3.2 i samband med de olika färgningsmetoderna. Bilderna och färgningarna lyckades överlag bra. Bilderna från D-AB-PAS-färgningen inkluderades inte eftersom färgningsresultatet inte var optimalt. Färgningen tas upp i samband med D-PAS-färgningen. Bilderna visar olika förstoringar av preparatet och en bild på själva glaset för att visa hur färgningen ser ut på glaset. De olika förstoringarna ger en helhetsbild och en mera detaljerad bild på preparatet. Förstoringen varierar beroende på vävnad och de vävnadskomponenter som visualiseras. Förstoringarna är från 5x till 40x. Bilden på glaset visar hur färgningen ser ut på vävnaden med blotta ögat. Det hjälper identifieringen av de olika provtyperna och färgningarna.

Bilderna på glaset är även tagna med en glasskanner. Först provades mobiltelefonens kamera vid fotograferingen men ljuset var inte optimalt. Därför togs även bilderna på glaset från IMS-bildanalyseringsprogrammet. Dock ringar bildanalyseringsprogrammet in de delar av glaset som den skannat, vilket inte är önskvärt, men bilderna används för att de har en bättre kvalitet. Dessutom har många glas bara ett snitt för att spara på vävnaden i blocken som använts. Oftast har ett glas 1–4 snitt beroende på vävnadens storlek.

## 6 Diskussion

Syftet med examensarbetet var att framställa en handbok om de olika histologiska färgningsmetoderna på patologienheten vid Fimlab Vasa. Handboken innehåller information om de olika färgningarna, vad de färgar, varför de används och



färgningsmekanismerna. Handboken innehåller även bilder om de olika färgningarna i olika förstoringar samt bild på objektglaset.

Frågeställningarna inför arbetet var:

- Vad färgar de olika histologiska färgningarna och vad används de för?
- Vad är färgningsmekanismerna i de olika färgningarna?
- Hur ser färgningsresultatet ut?

Frågeställningarna för examensarbetet blev besvarade. Informationen om de olika färgningsmetoderna besvarar vad de är och varför de används. Färgningsmekanismerna för de olika färgningarna kommer fram. Handboken innehåller även bilder på de olika färgningarna som visar färgningsresultatet.

Denna handbok är till stor nytta för studeranden inom bioanalytik under praktikperioden på patologienheten. Handboken ger mycket information om färgningsmetoder och histoteknik, vilket stöder inläringen under praktiken. Handboken kan även vara till nytta för ny personal och för andra som är intresserade av ämnet. Färgningsmetoderna som behandlas är färgningar som görs på patologienheten vid Fimlab Vasa, men informationen berör allmänt histopatologi, vilket innebär att även andra än praktikanter och personal på patologienheten vid Fimlab Vasa har nytta av handboken. Det finns inga tidigare examensarbeten på svenska som behandlar histologiska färgningsmetoder. Däremot finns det ett arbete på finska "Kuvallinen histologian värjäysohjekansio Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorioon" gjord av Vuokko Kamunen där färgningsanvisningar gjorts för de olika färgningarna som görs på patologienheten vid Länsi-Pohja sjukvårdsdistrikt. Examensarbetet innehåller information om olika histologiska färgningsmetoder på finska.

Information i kortare version kan tas från detta examensarbete och laga infoblad med information om de olika färgningsmetoderna. Dessa infoblad kan innehålla information om vad dessa färgningsmetoder färgar, vid vilka sjukdomsdiagnoser används färgningen, färgningsmekanismen och hur färgningsresultatet ser ut.

Detta examensarbete behandlade bara de histologiska färgningsmetoderna på patologienheten vid Fimlab Vasa. Som fortsättning kan man leta information om andra färgningsmetoder som inte kommer fram i handboken. Denna handbok behandlar inte immunohistokemiska färgningar som även görs på patologienheten vid Fimlab Vasa. Det skulle också vara ett intressant område att arbeta vidare på inom detta temaområde.

## **6.1 Etiska överväganden**

Examensarbetet är gjort enligt en god etisk och vetenskaplig praxis. Korrespondenten har bekantat sig med ämnet som examensarbetet behandlar och gjort en plan för arbetet. Korrespondenten tar hänsyn till andra forskares arbete och uppger källor på korrekt sätt utan att plagiera. Examensarbetet är inom ramarna av ämnet den behandlar och svarar på dess syfte och frågeställningar. Korrespondenten är opartisk, informationen och resultaten i examensarbetet redovisas ansvarsfullt med öppenhet och på korrekt sätt utan att de snedvrids. Korrespondenten har bekantat sig med de etiska riktlinjerna för examensarbeten och har bekantat sig med lagen om personuppgifter och dataskydd. Examensarbetet kräver inte hantering av personuppgifter, vävnadsproverna som används är anonyma och inga personuppgifter har hanterats. Dessutom utförs ingen forskning på människor så inget samtycke krävs. Vävnadsproverna som hanteras är övningsblock för studeranden och rester som inte används för diagnostik. Den experimentella delen utförs på Fimlab Vasas patologienhet, vilket innebär att deras riktlinjer samt tystnadsplikt kommer att följas. (Arene, 2017; Forskningsetiska delegationen [TENK], u.å.).

## 7 Källförteckning

Abcam. (U.å.). *Alcian Blue 8GX, Cationic dye (ab145250)*. Hämtad 2022-03-25 från <https://www.abcam.com/alcian-blue-8gx-cationic-dye-ab145250.html>

Alpha-Tec Systems. (2019). *Ziehl-Neelsen Stain Set, Ziehl-Neelsen Carbofuchin Stain, TB Decolorizer, Methylene Blue Counterstain [PDF]*. Tillgänglig: <https://www.alphatecsystems.com/files/dfu/L003564.C%20--%20Ziehl-Neelsen%20Stain%20Set.pdf>

Anderson, J. & Rolls, G. (U.å.). *An introduction to routine and special staining*. Leica biosystems. Hämtad 2022-01-23 från <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>

Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global journal of health science*, 8(3), 72–79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>

Arene. (2017). *Etiska rekommendationer för examensarbeten på yrkeshögskolor [PDF]*. Tillgänglig: <http://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2018/ETISKA%20REKOMMENDATIONER%20F%C3%96R%20EXAMENSARBETEN%20P%C3%85%20YRKESH%C3%96GSKOLOR.pdf>

Bancroft, J. D., Cook, H. C., Stirling, R. W. & Turner, D. R. (1994). *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Churchill Livingstone.

Bergholt, N. L., Lysdahl, H., Lind, M., & Foldager, C. B. (2019). A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*, 10(3), 370–374. <https://doi.org/10.1177/1947603518764262>

Biognost. (2019). *Elastica-van Gieson kit [PDF]*. Tillgänglig: <https://www.biognost.com/wp-content/uploads/2020/02/ELASTICA-VAN-GIESON-KIT-IFU-V1-EN2.pdf>

Chen, P., Shi, M., Feng, G. D., Liu, J. Y., Wang, B. J., Shi, X. D., Ma, L., Liu, X. D., Yang, Y. N., Dai, W., Liu, T. T., He, Y., Li, J. G., Hao, X. K., & Zhao, G. (2012). A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), 1166–1170. <https://doi.org/10.1128/JCM.05756-11>

Ellis, R. (U.å.). *PAS diastase staining protocol*. IHCWORLD. Hämtad 2022-02-01 från [http://www.ihcworld.com/protocols/special\\_stains/pas\\_diastase\\_ellis.htm](http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/pas_diastase_ellis.htm)

Forskningsetiska delegationen [TENK]. (U.å.) *God vetenskaplig praxis (GVP)*. Hämtad 2021-03-25 från <https://tenk.fi/sv/forskningsfusk/god-vetenskaplig-praxis-gvp>

Gamble, M. & Bancroft, J. D. (2002). *Theory and practice of histological techniques* (5th ed.). Churchill Livingstone.

Glykogen glycosidic bond. (2010, 14 december). I *Wikipedia*. Hämtad 2022-03-25 från [https://fi.m.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Glykogen\\_glycosidic\\_bond.svg](https://fi.m.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Glykogen_glycosidic_bond.svg)

Hughes, D. A., Stuart-Smith, S. E., & Bain, B. J. (2004). How should stainable iron in bone marrow films be assessed?. *Journal of clinical pathology*, 57(10), 1038–1040. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015834>

IHC world. (u.å.). *Toluidine blue staining protocol for mast cells*. Hämtad 2022-03-15 från [http://www.ihcworld.com/protocols/special\\_stains/toluidine\\_blue.htm](http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/toluidine_blue.htm)

Jackson, J., Grabis, D., & Manav, C. (2018). *Giemsa: The universal diagnostic stain [PDF]*. MilliporeSigma. Hämtad 2022-02-04 från <https://www.cellmarque.com/cmsial-literature/304-Giemsa-Academia.pdf>

Lyon, H. (1997). *Theory and strategy in histochemistry: A guide to the selection and understanding of techniques*. DSR forlag.

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 289–298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)

MedChemExpress. (U.å.). *Congo red*. Hämtad 2022-03-25 från [https://www.medchemexpress.com/Congo\\_Red.html](https://www.medchemexpress.com/Congo_Red.html)

Merck. (U.å.a). *Giemsa stain, modified solution*. Hämtad 2022-02-04 från <https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/product/sigma/32884>

Merck. (U.å.b). *Histology/Histopathology*. Hämtad 2022-04-13 från [https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/applications/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/histology?gclid=CjwKCAjw6dmSBhBkEiwA\\_W-EoMIEngXDVucHa3u5H8gPWTVJilk29CiZntBm1r\\_w-p8HnGHM8x8DxoCiQkQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/applications/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/histology?gclid=CjwKCAjw6dmSBhBkEiwA_W-EoMIEngXDVucHa3u5H8gPWTVJilk29CiZntBm1r_w-p8HnGHM8x8DxoCiQkQAvD_BwE)

Merck. (U.å.c). *LEUCOGNOST®- Simplified cytochemical staining-system for differentiation of leukaemias and myelodysplastic syndromes [PDF]*. Hämtad 2022-02-06 från [http://www.tecnigen.cl/documento\\_tcl.php?documento=758](http://www.tecnigen.cl/documento_tcl.php?documento=758)

Moewis, G. (1978). *Histopatologisk teknik*. AWE/Geber.

Mokobi, F. (2021). *Giemsa stain – Principle, procedure, results, interpretation*. Mikrobenotes. Hämtad 2022-02-04 från <https://microbenotes.com/giemsa-stain-principle-procedure-results-interpretation/>

Mokobi, F. (2020). *Ziehl-Neelsen staining – Principle and procedure with results*. Mikrobenotes. Hämtad 2022-02-19 från <https://microbenotes.com/ziehl-neelsen-staining/>

Myers, R. (U.å.). *Special stain techniques for the evaluation of mucins*. Leica biosystems. Hämtad 2022-01-27 från <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>

My pathology report.ca. (U.å.). *Periodic acid Schiff plus diastase (PAS-D)*. Hämtad 2022-02-01 från <https://www.mypathologyreport.ca/periodic-acid-schiff-plus-diastase-pas-d/>

Nguyen, T-S. [Truong-Son N.]. (2016, 5 januari). *How does a Schiff reagent react with an aldehyde?* [Inlägg i diskussionsforum]. Organic chemistry. <https://socratic.org/questions/565148aa11ef6b7b303a39e0>

Paskoski, N. & Gowan, C. (2021). *The alcian blue stain for histology*. National society for histotechnology. Hämtad 2022-02-01 från <https://www.fixationonhistology.com/post/the-alcian-blue-stain-for-histology>

Philips. (2018). *LabCorp Philips intelligisite pathology solution*. Hämtad 2022-05-07 från <https://www.philips.com/a-w/about/news/media-library/20180628-LabCorp-Philips-IntelliSite-Pathology-Solution-03.html>

Pubchem. (2022). *Congo red*. Hämtad 2022-03-06 från <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Congo-red>

Ranjan, R., Singh, L., Arava, S. K., & Singh, M. K. (2014). Margins in skin excision biopsies: principles and guidelines. *Indian journal of dermatology*, 59(6), 567–570. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.143514>

Roche diagnostics. (U.å.). *BenchMark special stains system*. Hämtad 2022-04-30 från <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/benchmark-special-stains.html>

Rolls, G. (U.å.). *An introduction to specimen processing*. Leica biosystems. Hämtad 2021-03-20 från <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-specimen-processing/>

Rotimi, O., Cairns A., Gray S., Moayyedi, P. & Dixon, M. F. (2000). Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods *Journal of Clinical Pathology*, 53, 756-759. Tillgänglig: <https://jcp.bmj.com/content/53/10/756>

Sahlgrenska universitetssjukhuset. (2019). *Amylas, total*. Hämtad 2022-02-01 från <https://www.sahlgrenska.se/for-dig-som-ar/vardgivare/laboratoriemedicin/analyslistan/amylas-total/>

Sakura. (U.å.). *Tissue-Tek Prisma® Plus automated slide stainer*. Hämtad 2022-01-17 från <https://www.sakuraus.com/Products/Staining/Tissue-Tek-Prisma-Plus.html>

Sampias, C. & Rolls, G. (U.å.). *H&E staining overview: A guide to best practices*. Hämtad 2022-01-23 från <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices/>

Shedge, S. A., Roy, P., Shedge, A., & Doshi, M. A. (2020). Periodic Acid Schiff (PAS) Staining: A Useful Technique for Demonstration of Carbohydrates. *Medico Legal Update*, 20(2), 353–357. <https://doi.org/10.37506/mlu.v20i2.1129>

Sigma-Aldrich. (2016). *Naphthol AS-D chloroacetate esterase and  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase [PDF]*. Tillgänglig:

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/310/799/91.pdf>

Sigma-Aldrich. (2021). *Microscopy congo red staining [PDF]*. Tillgänglig: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/702/410/101641-en.pdf>

Sigma-Aldrich. (2020a). *Microscopy elastica van Gieson staining kit [PDF]*. Tillgänglig: [https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Elastica-van-Gieson-staining-kit,MDA\\_CHEM-115974#documentation](https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Elastica-van-Gieson-staining-kit,MDA_CHEM-115974#documentation)

Sigma-Aldrich. (2020b). *Microscopy reticulín silver plating kit acc. to Gordon & Sweets [PDF]*. Tillgänglig: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/292/858/100251-en.pdf>

Solunetti. (U.å.). *Färgningsmetoder*. Hämtad 2022-01-22 från <https://www.solunetti.fi/se/histologia/varjaysmenetelmat/>

Sridharan, G., & Shankar, A. A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 16(2), 251–255. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>

Stainsfile. (2019). *Perls' prussian blue for hemosiderin*. Hämtad 2022-02-13 från <http://stainsfile.info/stain/pigment/perls.htm>

Synlab. (U.å.). *Patologis-anatominen diagnoosi, PAD*. Hämtad 2022-01-15 från <https://www2.synlab.fi/laboratoriokasikirja/tutkimuskuvaukset/patologisanatominen/>

Tankeshwar, A. (2021). *Ziehl-Neelsen technique – AFB staining*. Microbe online. Hämtad 2022-02-19 från <https://microbeonline.com/ziehl-neelsen-technique-principle-procedure-reporting/>

Vasa centralsjukhus. (2021). *Kudosnäyte*. Hämtad 2022-04-13 från <https://www.vaasankeskussairaala.fi/potilaille/hoito-ja-tutkimukset/tutkimukset/patologian-alan-tutkimukset/kudosnayte/>

Ventana medical systems. (2016). *Elastic staining kit*. Roche.

Ventana medical systems. (2018). *Reticulum II staining kit*. Roche.

VIVO Pathophysiology. (U.å.). *Mucus and mucins*. Hämtad 2022-01-27 från <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/topics/mucins.html>

VWR. (U.å.). *Tissue-Tek® Prisma® Plus Automated Slide Stainer, Sakura Finetek*. Hämtad 2022-04-30 från <https://us.vwr.com/store/product/23767558/tissue-tek-prisma-plus-automated-slide-stainer-sakura-finetek>

Wabinga H. R. (2002). Comparison of immunohistochemical and modified Giemsa stains for demonstration of *Helicobacter pylori* infection in an African population. *African health sciences*, 2(2), 52–55. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2141568/#R5>

Webpath. (U.å.a). *Elastic tissue fibers – Verhoeff's van Gieson (EVG) [PDF]*. Hämtad 2022-03-25 från <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/EVG.PDF>

Webpath. (U.å.b). *Giemsa – Harleco rapid – Helicobakter [PDF]*. Hämtad 2022-02-04 från <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/GIEMSA.PDF>

Webpath. (U.å.c). *Histotechniques*. Hämtad 2021-03-20 från <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html>

Webpath. (U.å.d). *Iron – Prussian blue reaction – Mallory's method [PDF]*. Hämtad 2022-02-13 från <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/IRON.PDF>

Webpath. (U.å.e). *Retic – Gordon and Sweet's method – reticular fibers [PDF]*. Hämtad 2022-04-10 från <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/RETIC.PDF>

Wiklund, M. (2019, 20 februari). Kongo röd är gold standard vid misstänkt amyloidos.

*Biomedicinsk analytiker*. Hämtad 2022-03-06 från

<https://biomedicinskanalytiker.org/2019/02/20/kongo/>

Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., & Bobylev, A. G. (2019). Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20181415.

<https://doi.org/10.1042/BSR20181415>

## Bilaga 1. Färgningsprogram för HE

Steg	Lösning	Tid
1	Startstation	-
2	Torkstation	10 min
3	Xylen	5 min
4	Xylen	5 min
5	Absolut etanol	3 min
6	Absolut etanol	3 min
7	96 % etanol	3 min
8	96 % etanol	3 min
9	Destillerat vatten	2 min
10	Colens hematoxylin	6 min
11	Sköljning med vattenledningsvatten	10 min
12	Eosin	1 min 30 s
13	96 % etanol	2 min
14	96 % etanol	2 min
15	96 % etanol	2 min
16	Absolut etanol	2 min
17	Absolut etanol	2 min
18	Xylen	4 min
19	Slut av program	



## Bilaga 2. Färgningsprogram för PAS

Steg	Lösning	Tid
1	Startstation	-
2	Torkstation	10 min
3	Xylen	5 min
4	Xylen	5 min
5	Absolut etanol	3 min
6	Absolut etanol	3 min
7	96 % etanol	3 min
8	96 % etanol	3 min
9	Destillerat vatten	2 min
10	Perjodsyra	5 min
11	Sköljning i vattenledningsvatten	3 min
12	Schiffs reagens	12 min
13	Sköljning i vattenledningsvatten	10 min
14	Mayers hematoxylin	6 min
15	Sköljning i vattenledningsvatten	10 min
16	96 % etanol	3 min
17	96 % etanol	3 min
18	96 % etanol	3 min
19	Absolut etanol	3 min
20	Absolut etanol	3 min
21	Xylen	4 min
22	Slut av program	

## Bilaga 3. Färgningsprogram för AB-PAS

Steg	Lösning	Tid
1	Startstation	-
2	Torkstation	10 min
3	Xylen	5 min
4	Xylen	5 min
5	Absolut etanol	3 min
6	Absolut etanol	3 min
7	96 % etanol	3 min
8	96 % etanol	3 min
9	Destillerat vatten	2 min
10	3 % ättiksyra	10 s
11	Alcian blue	30 min
12	3 % ättiksyra	10 s
13	Sköljning i vattenledningsvatten	5 min
14	1 % perjodsyra	5 min
15	Sköljning i vattenledningsvatten	1 min
16	Schiffs reagens	12 min
17	Sköljning i vattenledningsvatten	10 min
18	Mayers hematoxylin	6 min
19	Sköljning i vattenledningsvatten	10 min
20	96 % etanol	3 min
21	96 % etanol	3 min
22	96 % etanol	3 min
23	Absolut alkohol	3 min
24	Absolut alkohol	3 min
25	Xylen	5 min
26	Slut av program	

## Bilaga 4. Färgningsprogram för giemsa

Steg	Lösning	Tid
1	Startstation	-
2	Torkstation	10 min
3	Xylen	5 min
4	Xylen	5 min
5	Absolut etanol	3 min
6	Absolut etanol	3 min
7	96 % etanol	3 min
8	96 % etanol	3 min
9	Destillerat vatten	2 min
10	Giemsa	30 min
11	Sköljning i vattenledningsvatten	3 s
12	96 % etanol	3 s
13	96 % etanol	5 s
14	Absolut etanol	30 s
15	Absolut etanol	1 min
16	Xylen	5 min
17	Slut av program	

## Bilaga 5. Deparaffineringsprogram

Steg	Lösning	Tid
1	Startstation	-
2	Torkstation	10 min
3	Xylen	5 min
4	Xylen	5 min
5	Absolut etanol	3 min
6	Absolut etanol	3 min
7	96 % etanol	3 min
8	96 % etanol	3 min
9	Sköljning i vattenledningsvatten	1 h
10	Slut av program	

## Bilaga 6. Färgningsprogram I VENTANA BenchMark special stains system

Järn	Elastin	Retikulin	Kongo röd	AFB
Deparaffinering	Deparaffinering	Deparaffinering	Deparaffinering	Deparaffinering
Baking	Baking	Baking	Baking	Baking
Uppvärmning till 61 grader. Inkuberas 8 min.	Uppvärmning till 61 grader. Inkuberas 8 min.	Uppvärmning till 61 grader. Inkuberas 8 min.	Uppvärmning till 61 grader. Inkuberas 8 min.	Uppvärmning till 61 grader. Inkuberas 8 min.
Optimering av motfärgningens intensitet.	Optimering av färgningens intensitet. Inkubering 16 min.	Uppvärmning till 45 grader.	Optimering av färgningens intensitet.	Optimering av färgningens intensitet. Täckglas av vätska. 200 µl AFB core stain. Inkuberas i 16 min.
Täckglas av vätska. 200 µl iron NFR. Inkuberas i 12 min.		Täckglas av vätska. 300 µl reticulin oxidizer. Inkuberas i 4 min.	Uppvärmning till 37 grader.	Optimering av anilinblås intensitet. 300 µl aniline blue AFB. Inkuberas i 4 min.
		Täckglas av vätska. 200 µl reticulin decolorizer. Inkuberas i 8 min.	Täckglas av vätska. 300 µl congo red stain. Inkuberas i 20 min.	
		Täckglas av vätska. 300 µl reticulin sensitizer. Inkuberas i 12 min.	Optimering av hematoxylinets intensitet. Täckglas av vätska. 100 µl congo red hematoxylin. Inkuberas i 4 min.	
		Optimering av silverfärgningens intensitet. Täckglas av vätska. 200 µl reticulin II silver A. inkuberas i 16 min.		
		Optimering av motfärgningens intensitet. Inkubering i 4 min.		