



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP
Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology
(NTNU)

Metodeutprøving av «klar til bruk» fargereagenser til HE-farging av vevsprøver til kreftdiagnostikk

Testing “ready to use” staining reagents for HE staining of tissue for cancer diagnostics

Av / by:

Zeyna Sæter Gunenc
Guro Jøssund

Trondheim, 2022

FORORD

Denne bacheloroppgaven ble gitt av avdeling for patologi, ved St. Olavs hospital i Trondheim, via institutt for bioingeniørfag ved NTNU i 2022.

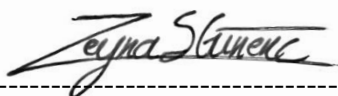
Vi vil først og fremst rette en stor takk til vår veileder på avdelingen, Hilde Aas, som tok seg tid på ettermiddager og kvelder for å bistå med vårt praktiske arbeid. Vi takker også for god bistand til å hente inn informasjon og holde kommunikasjon med eksterne leverandører, i tillegg til å sette opp avtaler internt med dem vi trengte å samarbeide med.

Vi takker også avdeling for patologi, ved St. Olavs hospital, der mange stilte velvillig opp til å bistå der de kunne.

Vi vil også rette en stor takk til vår prosessveileder Asle Grislingås for god og tett veiledning. I tillegg takker vi for gode medmenneskelige samtaler og forståelse da en uforutsett hendelse skjedde i bachelorperioden.

Det har vært en utfordrende periode på grunn av uforutsett sykdom. Vi er imidlertid glade for at vi i alle fall fikk utført alt det praktiske arbeidet sammen.

Vi håper arbeidet vi har gjort legger et godt grunnlag for framtiden innen fargereagenser til bruk på avdeling for patologi, ved St. Olavs hospital Trondheim.



Zeyna Sæter Gunenc

Guro Jøssund

SAMMENDRAG

Dette prosjektet gjennomføres som den avsluttende bacheloroppgaven for bioingeniørutdanningen ved institutt for bioingeniørfag på det naturfaglige fakultet på Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU).

I en tid der antallet krefttilfeller er i økning, kreves det effektiv vevsfarging med god kvalitet, for å sikre pålitelige kreftdiagnoser og raske prøvesvar. I 2017 vedtok EU-kommisjonen nye forordninger for bruken av medisinsk utstyr (MDR) og in-vitro diagnostisk utstyr (IVDR), som innebærer at «in-house» reagenser til vevsfarging ikke kan benyttes. Det er på bakgrunn av dette at prosjektet ble gitt av avdeling for patologi ved St. Olavs hospital Trondheim. Problemstillingen er derfor: Kan IVDR godkjente fargereagenser gi tilfredsstillende fargerresultat og bytte ut nåværende prosedyrer med «In-house» Hematoxylin og Eosin reagenser?

Det ble utført utprøving av fargereagenser fra fire ulike leverandører; Histolab, Sakura, Dako og VWR. For å komme fram til et svar på problemstillingen ble det benyttet en kvalitativ metode, med en subjektiv vurdering av fargerresultatene fra patologer på avdelingen. Utprøvingen av de ulike reagensene innebar justeringer fra leverandørens protokoller for å optimalisere fargerresultatet etter avdelingen for patologi sine preferanser.

På den begrensede tiden til prosjektet var det fargereagenser fra Sakura og Histolab som nådde tilstrekkelige fargerresultater for å kunne sammenlignes med nåværende reagenser, etter avdelingens kvalitetskrav. Konklusjonen på problemstillingen er bygd på en diskusjon av reagensenes tidsbruk, pris, holdbarhet og fargekvalitet.

Kommer med en anbefaling på at Histolab sine IVDR godkjente fargereagenser er best egnet til å erstatte de nåværende «in-house» reagensene, etter kriteriene som er satt for prosjektet. Histolab oppnår derimot ikke patologenes foretrukne fargeintensitet. Det er mulig flere utprøvinger i framtiden vil kunne optimalisere denne fargeintensiteten. Det er også mulig at leverandører videreutvikler sine fargereagenser, og at utviklingen innen dette feltet gir bedre resultater på vevsfarging.

ABSTRACT

This project is carried out as the final bachelor thesis for the Biomedical Laboratory Engineering program at the Department of Biomedical Laboratory Science at the Faculty of Natural Science, at the Norwegian University of Science and Technology (NTNU).

As the number of cancer cases increases, effective tissue staining with good quality is required to ensure reliable cancer diagnostics and rapid test results. In 2017, the European Commission adopted new regulations for the use of medical devices (MDR) and in-vitro diagnostic devices (IVDR), which means that "in-house" reagents for tissue staining can no longer be in use. In this regard, the project was initiated by the Department of Pathology at St. Olav's Hospital Trondheim. The thesis question is therefore: Can IVDR approved staining reagents give satisfactory staining results and replace current procedures with "In-house" Hematoxylin and Eosin reagents?

Staining reagents were tested from four different suppliers: Histolab, Sakura, Dako, and VWR. To provide an answer to the thesis question, a qualitative method was used, with a subjective assessment of the staining results from pathologists. The assessment of the various reagents involved adjustments from the supplier's protocols to optimize the staining result according to The Pathology Department's preferences.

During the limited time of the project, staining reagents from Sakura and Histolab achieved sufficient staining results to be comparable with current reagents, according to the department's quality requirements. A conclusion is drawn from a discussion of the reagents' price, shelf life, use of time, and staining quality.

Conclude that IVDR approved staining reagents from Histolab are best suited to replace the current "in-house" reagents, according to the criteria set for this project. Histolab does, however, not achieve the pathologists' preferred staining intensity. More trials in the future may be able to optimize this staining intensity. Suppliers might also further develop their staining reagents, and the developments in this field might result in improved tissue staining.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
1.0 INNLEDNING	1
1.1 HENSIKT MED PROSJEKTET.....	1
1.2 KREFT.....	1
1.2.1 GENMUTASJONER VED KREFT	2
1.2.2 KREFTTILFELLER I NORGE.....	2
1.3 KREFTDIAGNOSTIKK.....	3
1.3.1 BILDEDIAGNOSTIKK	3
1.3.2 KLINISK PATOLOGI	3
1.3.3. MOLEKYLÆRPATOLOGI.....	3
1.3.4 ANATOMISK PATOLOGI	4
1.4 HISTOPATOLOGI	4
1.4.1 H&E INNEN KREFTDIAGNOSTIKK	6
1.5 H&E FARGEREGENSER.....	7
1.5.1 HEMATOXYLIN	7
1.5.2 EOSIN	8
1.6 HE-REAGENSER OG ULIKE ORGANER.....	8
1.6.1 NYRE	9
1.6.2 HUD.....	9
1.6.3 TONSILLE.....	10
1.6.4 MUSKULATUR	10
1.6.5 COLON	10
1.6.6 PROSTATA HYPERPLASI.....	11
1.6.7 LUNGE.....	11
1.6.8 CERVIX	12
1.6.9 BEINMARG	12
1.7 FEILKILDER VED VEVSFARGING.....	12
1.7.1 FORBEHANDLING.....	12
1.7.2 VANNKVALITET	13
1.7.3 FARGEREGENSER	15
1.8 IN-HOUSE REAGENSER	15
1.9 IVDR	16
1.10 KRAV TIL REAGENSER	16
1.11 PROBLEMSTILLING.....	18

2.0 MATERIALE OG METODE	19
2.1 PRØVEMATERIALE	19
2.1.1 MULTIVEVSBLOKK	19
2.2 UTSTYR OG REAGENSER	19
2.2.1 LABORATORIETS IN-HOUSE H&E FARGEREAGENS	19
2.2.2 H&E FARGEREAGENS FRA HISTOLAB	21
2.2.3 H&E FARGEREAGENS FRA DAKO	21
2.2.4 H&E FARGEREAGENS FRA SAKURA	22
2.2.5 H&E FARGEREAGENS FRA VWR	23
2.2.6 TISSUE TEK PRISMA- SAKURA	24
2.2.7 NANO ZOOMER S60 HAMAMATSU	24
2.3 PRINSIPP	24
2.3.1 FIKSERING	24
2.3.2 DEKALSINERING	24
2.3.3 FRAMFØRING OG KLARING	25
2.3.4 ORIENTERING OG STØPING	25
2.3.5 MULTI TISSUE BLOKK	25
2.3.6 SNITTING	25
2.3.7 FARGEPRINSIPP	25
2.4 METODE	28
2.5 PROSEDYRER OG OPTIMALISERING	29
2.5.1 HISTOLAB	30
2.5.2 SAKURA	31
2.5.3 DAKO	32
2.5.4 VWR	33
3.0 RESULTATER	34
3.1 «IN-HOUSE» H&E FARGEREAGENS	34
3.2 H&E FRA HISTOLAB	35
3.2.1 KOMMENTARER FRA PATOLOGER: HISTOLAB	38
3.3 H&E FRA SAKURA	38
3.3.1 Kommentarer fra patologer: sakura	40
3.4 H&E FRA DAKO	41
3.5 H&E FRA VWR	42
4.0 DISKUSJON	45
4.1 KOMMENTAR PÅ RESULTATER	45
4.2 FARGEREAGENSER: TIDSBRUK OG PRIS	47
4.3 SAKURA VS. HISTOLAB: FARGEKVALITET	48
4.4 SAKURA VS. HISTOLAB: VURDERING FRA PATOLOGER	49

4.5 KONKLUSJON	50
5.0 REFERANSER.....	52
6.0 VEDLEGG:	54
VEDLEGG 1: PROTOKOLL FOR UTPRØVING AV HISTOLAB FARGEREAGENSER	54
VEDLEGG 2: PROTOKOLL FOR UTPRØVNING AV HISTOLAB FARGEREAGENSER MED 70% ALKOHOL	55
VEDLEGG 3: PROTOKOLL FOR DAKO FARGEREAGENSER.....	56
VEDLEGG 4: LABORATORIETS NÅVÆRENDE PROTOKOLL MED «IN- HOUSE REAGENSER».....	57
VEDLEGG 5: PROTOKOLL OPPGITT AV SAKURA FOR SAKURA FARGEREAGENSER	58

1.0 INNLEDNING

1.1 HENSIKT MED PROSJEKTET

Dette bachelorprosjektet ser på reagenser til farging av vevsprøver som brukes til kreftdiagnostikk. Vevsprøver utgjør en viktig faktor i å utforske sykdomsbildet. Farging av slike vevsstrukturer kan synliggjøre anomaliteter som kan tyde på ulike patologiske tilstander. Reagensene som brukes har derfor stor relevans for å kunne stille en sikker diagnose og ikke overse en sykdom hos pasienten.

I 2017 vedtok EU-kommisjonen nye forordninger for bruken av medisinsk utstyr (MDR) og in-vitro diagnostisk utstyr (IVDR). Dette innebærer at reagensene som brukes ved farging av vevssnitt må være eksternt godkjent før bruk. Laboratorier kan derfor ikke lenger ta i bruk «In house» reagenser, som lages internt. Kravet for IVDR godkjenning trer i kraft 26. mai 2022. Her blir det en overgangsordning, slik at kravet for IVDR godkjente fargereagenser må tilfredsstilles innen 26. mai 2024.

Denne bacheloroppgaven ble på bakgrunn av dette gitt av avdeling for Patologi ved St. Olavs hospital i Trondheim. Den nåværende prosedyren med «In house» reagenser til kreftdiagnostikk skal sammenlignes med nye IVDR godkjente reagenser. Funnene skal legge et grunnlag i vurderingen av hvilke reagenser som muligens kan erstatte avdelingens nåværende «in-house» reagenser, med bakgrunn i IVDR kravene.

1.2 KREFT

Kreft er et overordnet begrep på en type sykdom som kan ramme alle deler av kroppen. Forskjellige krefttyper utvikler seg på forskjellige måter, men felles for disse er at kroppen mister kontroll over celledelingen. Denne prosessen kalles neoplasi. Celledelingen skal normalt sørge for at blant annet døde eller skadede celler erstattes med nye.

Denne prosessen styres av ulike gener, og det er mutasjoner i disse som fører til ukontrollert vekst og utviklingen av kreftsvulster. Disse kalles også maligne svulster. Det finnes også godartede, også kalt benigne, svulster. Maligne svulster vokser mer ukontrollert og asymmetrisk enn benigne svulster. Benigne tumorer vokser symmetrisk og er ofte rundere i formen. (1) På grunn av mutasjonene som forandrer måten cellene vokser på, kan maligne svulster metastasere. Det vil si å spre seg videre til andre deler i kroppen. (2) I tillegg kan det

være mindre celledifferensiering i maligne svulster, og man vil kunne se funn av flere umodne celler. (1)

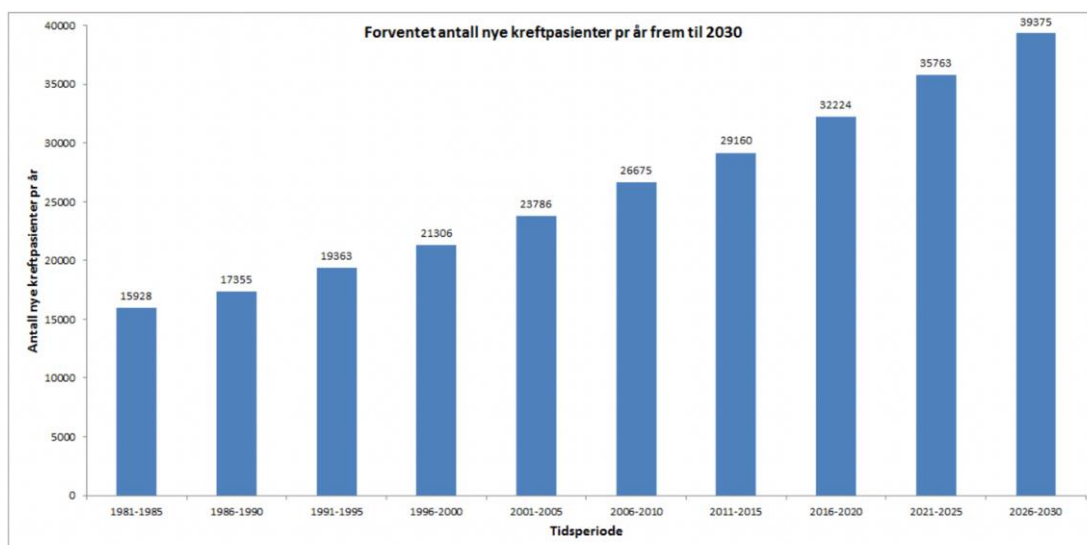
1.2.1 GENMUTASJONER VED KREFT

I store trekk er det mutasjoner i to spesifikke type gener som fører til kreft: Tumor supressor gener og proto-onkogener. Tumor supressorgener kontrollerer celledelingen, retter opp DNA feil og kan om nødvendig kontrollere at en celle dør. (2) Mutasjon i slike gener fører til at cellen kan dele seg ukontrollert.

Alle celler inneholder proto-onkogener. Deres funksjon er å stimulere celledeling, inhibere celledifferensiering, og forhindre celledød. Ved mutasjoner omdannes proto-onkogener til onkogener som overstimulerer disse prosessene. (2)

1.2.2 KREFTTILFELLER I NORGE

I 2020 var det hele 35 500 nye krefttilfeller. (3) Dette antallet er forventet å øke ytterligere, ifølge overlege Tom Børge Johannesen, på grunn av økt befolkning og andel eldre. Ifølge kreftregisteret vil antallet krefttilfeller øke med 42% for menn og 27% for kvinner fram til 2030. (4) Denne forventede økningen er illustrert i figur 1.



Figur 1: Figuren viser den forventede økningen av kreftpasienter per år frem til 2030. X-aksen viser antall nye kreftpasienter per år, og y-aksen viser tidsperiode. Figur tatt fra: (3)

Dersom det blir en slik økning, vil dette være en ekstra belastning på et allerede travelt helsevesen. For å være i forkant av denne økningen, kreves det da effektive og sikre kreftdiagnostiske metoder.

1.3 KREFTDIAGNOSTIKK

Ved mistanke om kreft er det flere undersøkelser som må gjøres for å kunne bekrefte tilstedeværelse av kreft, eller avklare om det er noe annet som kan ha vekket mistanken. For å vise spekteret av kreftdiagnostikk vil de forskjellige undersøkelsene nevnes, før det spisses inn på fagfeltet som er relevant for prosjektet.

1.3.1 BILDEDIAGNOSTIKK

Noen krefttyper kan ikke kjennes eller ses fra utsiden under fysisk eksaminering, men kan avdekkes på andre måter med dagens teknologi. Bildediagnostikk er derfor et verktøy som brukes i vurderingen av kreft. Til kreftdiagnostikk brukes blant annet CT, MRI, Ultralyd, og røntgen (5).

1.3.2 KLINISK PATOLOGI

Ved klinisk patologi tas laboratorietester som kan brukes for å komme fram til en diagnose. Laboratorietester kan for eksempel være undersøkelse av blodprøver og urinprøver. Man undersøker da gjerne kreftmarkører for mistenkt kreftsykdom.

Kreftmarkører er stoffer som enten produseres av kreftcellene selv, eller av kroppen i respons på kreftutviklingen. Unormale verdier på disse stoffene gir en indikasjon på tilstedeværelse av kreft. Kreftmarkører varierer etter hvor i kroppen kreftsvulsten oppstår. Det er noen som er spesifikke for en krefttype, mens andre markører går igjen ved flere ulike typer kreft (6).

Det er derimot ikke foretrukket å bruke slike markører diagnostisk, ettersom det ikke alltid er en klar sammenheng mellom mengde kreftmarkør og påvist kreft. Man kan ha høye verdier av en spesifikk kreftmarkør uten å ha kreft. Kreftmarkører benyttes primært til klassifisering av kreften, estimering av prognose, bestemmelse av behandling og til kontroll av behandlingen (6).

1.3.3. MOLEKYLÆRPATOLOGI

Innenfor molekylærpatologien finnes det også metoder for å diagnostisere kreft. Som nevnt tidligere er det spesifikke gen-mutasjoner som forårsaker kreftutvikling i kroppen. Metoder slik som PCR, gen-sekvensering, og fluorescens in situ hybridisering (FISH) kan brukes for å finne abnormiteter knyttet til spesifikke gener (1). Dette er et stort felt innenfor kreftdiagnostikk, men blir ikke utdypet ytterligere i denne bacheloroppgaven med bakgrunn i relevans for prosjektet.

Immunohistokjemi (IHC) er en annen metode innenfor molekylærpatologien, som visualiserer kreftmarkører i vev. I korte trekk baserer metoden seg på deteksjon av spesifikke antigen i vevet, som tilsatte antistoff binder seg til. Reaksjonen synliggjøres ved hjelp av enzym eller fluorokrom konjugert til antistoff (1).

1.3.4 ANATOMISK PATOLOGI

To viktige fagområder innenfor kreftdiagnostikk er cytopatologi og histopatologi. Disse er undergrener av anatomisk patologi (7). Cytopatologi er undersøkelser av forandringer hos pasienten på et cellenivå. Her står celleforandringer i fokus for å danne en forståelse av sykdomsbildet. Histopatologi betegner undersøkelsen av forandringer i cellearkitekturen, altså anordningen av cellene i forhold til hverandre. I de fleste kreftdiagnoser kreves det histopatologiske undersøkelser for å stille en diagnose (8).

1.4 HISTOPATOLOGI

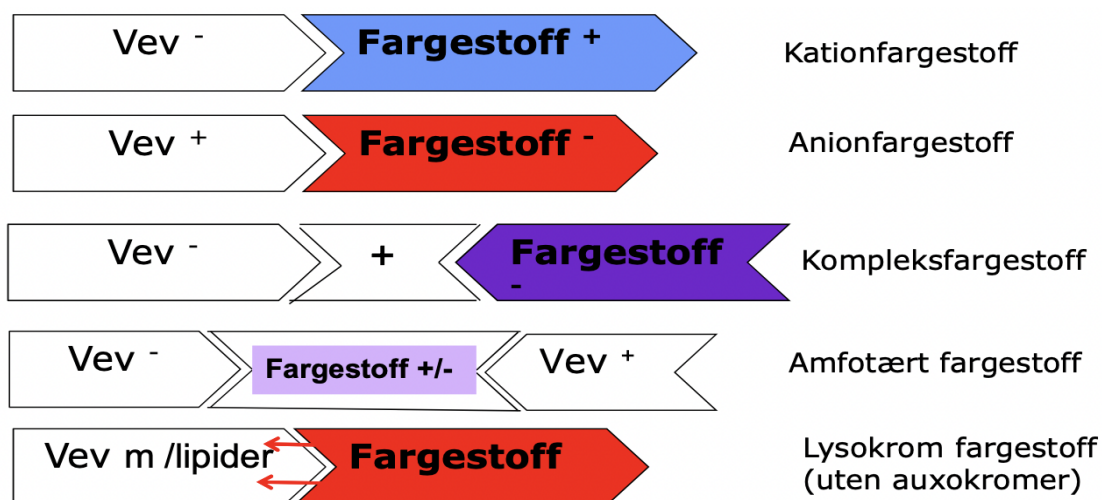
Histopatologi, også kalt histologi, benytter seg av ulike fargeprosedyrer for å synliggjøre forandringer i vev som kan være patologiske. Det blir tatt en biopsi for å få vevsprøve. Da blir biter er vevet fjernet fra kroppen, slik at det kan forbehandles og undersøkes under et mikroskop. På bakgrunn av den forventede økningen i krefttilfeller, kan det som sagt bli en økende belastning på helsevesenet. Ettersom histopatologi er en så sentral del av kreftdiagnostikk for de fleste krefttyper, kan man nok forvente en økning i antall biopsier til utredning på sykehus. For å være tilpasningsdyktig til denne prognosen, er økt effektivitet og kvalitet på laboratorier innen histopatologi viktig.

Histopatologi omhandler å vurdere vevsarkitektur. Celler er fargeløse, og man er derfor avhengig av forbehandling med fargestoffer for å kunne gjøre en slik vurdering under et mikroskop.

Slike fargestoffer har ulik kjemisk komposisjon slik at de fester seg til, og farger ulike deler av vevet. Fargestoff kan deles inn i fem forskjellige kategorier: Kationfargestoff, anionfargestoff, kompleksfargestoff, amfotært fargestoff og lysokrom fargestoff. Hvordan de forskjellige fargestoffene fester seg til vevet er illustrert i figur 2.

Her kan man se at Kation fargestoff er positivt ladede fargestoff som binder seg til negativt ladet vev. Anion fargestoff er negativt ladede fargestoff som binder seg til positivt ladet vev. Kompleksfargestoff er negativt ladede fargestoff som kan binde seg til negativt ladet vev ved

hjelp av et positivt ladet bindeledd. Fargeprinsippene til amfotært og lysokrom fargestoff inngår ikke i denne oppgaven.



Figur 2: Illustrasjon over forskjellige typer fargestoff og hvordan disse binder seg til vevet. De forskjellige fargestoffene er kationfargestoff, anionfargestoff, kompleksfargestoff, amfotært fargestoff, og lysokrom fargestoff. Fargeprinsippene til amfotært og lysokrom fargestoff er ikke relevant for dette prosjektet. Bilde tatt fra: (9).

Som sett i figur 2 er både ladningen til vevet og fargestoffet av relevans for fargereaksjonen. Ulike vevsstrukturer forandrer ladning etter ulike pH verdier. pH er derfor svært relevant ved farging av vev. Tabell 1 viser en oversikt over hvordan forskjellige makromolekyler påvirkes av ulike pH og hvilke vevsbestanddel dette påvirker.

Tabell 1: Tabellen viser hvordan de forskjellige molekylene i vevet påvirkes av ulike pH verdier, og hvor disse inngår i en vevstruktur (10).

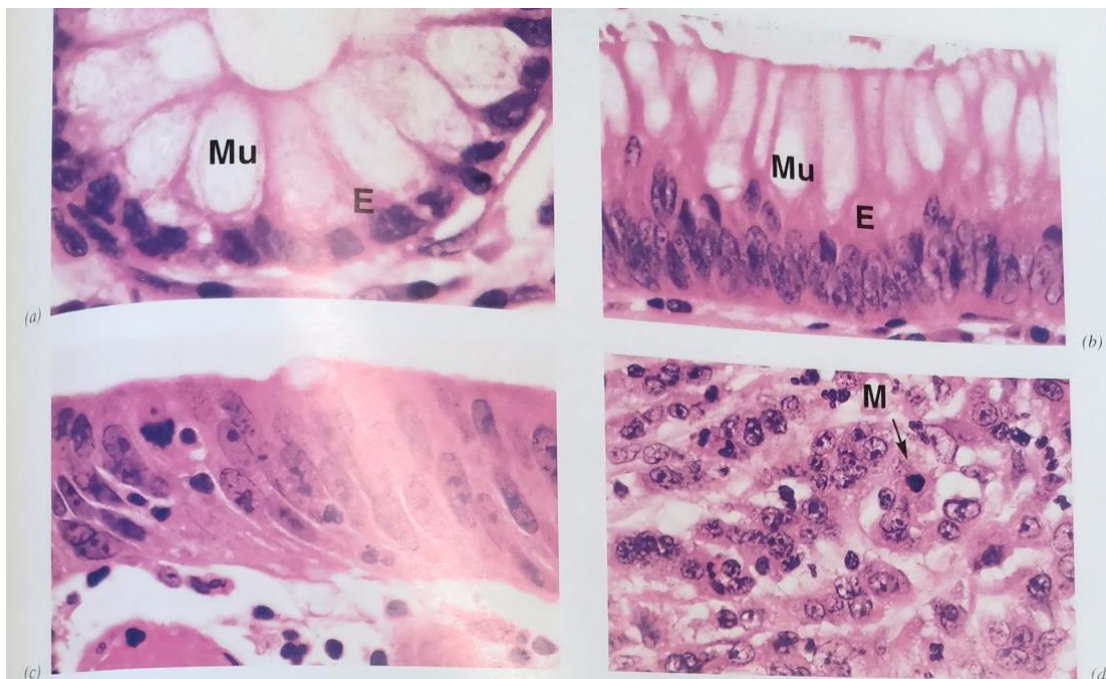
Molekyl	pH verdi	Ionisert gruppe	Hvor de inngår i vevet
Proteiner	pH<7	Aminogrupeer (NH ₂ ⁺ og NH ₃ ⁺)	Over hele vevet
	pH>4	Karboksylogrupeer (COO ⁻)	Cellemembran
Nukleinsyrer DNA/ RNA Fosfolipider	pH= 2-3	Fosfatgrupeer (PO ₄ ⁻)	Cellekjerne, cytoplasma og cellemembran
Sure polysakkarider	pH= 2-3	Sulfatgrupeer (SO ₄ ⁻)	Slim, brusk, bindevev
	pH>4	Karboksylogrupeer (COO ⁻)	Cellemembran

I histologi brukes det forskjellige fargeprosedyrer for å påvise ulike patologiske tilstander. Disse bygger på og utnytter ulike fargeprinsipp for å få spesifikke fargestoffer til å feste seg til og synliggjøre spesifikke komponenter i vevet. Dette gjør det mulig å vurdere mulige patologiske forandringer i vevskomponentene.

1.4.1 H&E INNEN KREFTDIAGNOSTIKK

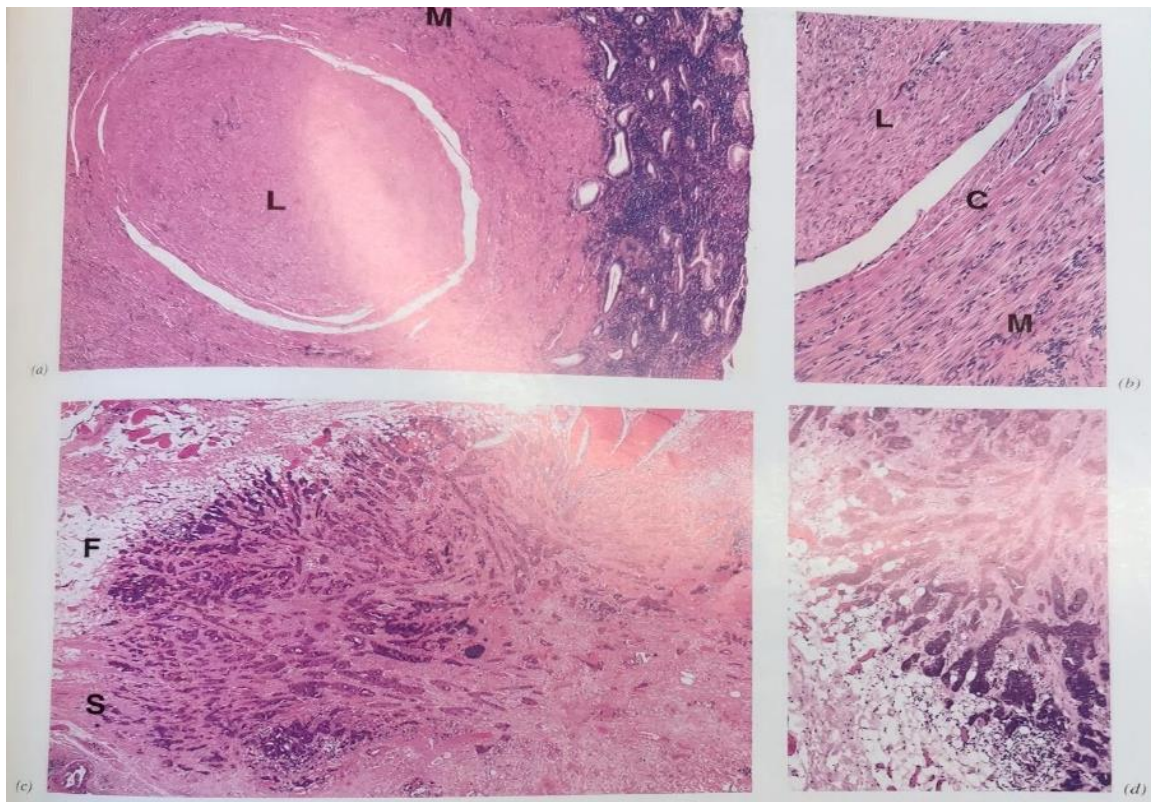
Hematoxylin og Eosin (H&E) er kjente fargereagenser som brukes i vevsfarging. Disse brukes for å se den generelle strukturen til cellene i vevet. Fargereagensene farger kjernestrukturer, cytoplasma, muskulatur, erythrocytter, epitel og bindevev. Man får da en god oversikt over den generelle cellearkitekturen og mulighet til å skille mellom ulike celletyper som er til stede.

En patolog vil da kunne vurdere differensieringsgraden til cellene og se på samhandlingen til cellene i vevet. Dette gjøres ved å vurdere cellearkitekturen. Noen maligne tumorer har en mangel av differensiering, som gjør at cellene i vevet får et annet utseende enn det trenet øyet skulle forvente. Dette illustreres i figur 3. Vevsbildet i (a) viser vanlig slimproduserende sylinderepitel, (b) viser en benign neoplasme. I begge vevene har cellene høy, rektangulær form, med basale kjerner. (c) viser en veldifferensiert malign neoplasme. Disse er også høye, og rektangulære, men har også irregulære og forstørrede kjerner, mangel på slim, og kjernen er ikke plassert basalt. (d) viser en dårlig differensiert neoplasme. Cellene i dette vevsbildet har liten likhet med cellene i normalt vev (11).



Figur 3: (a) viser vanlig tykktarmsvev. (b) viser benign neoplasme i tykktarm. (c) viser veldifferensiert malign neoplasme i tykktarm. (d) viser dårlig differensiert neoplasme fra tykktarm. Bilde tatt fra: (11)

Det viktigste man ser etter ved kreftdiagnostikk på vev, er hvordan tumoren samhandler med vevet rundt. Det er dette som skiller en malign og en benign tumor, slik som nevnt under punkt 1.2 Kreft. Har valgt å illustrere dette med figur 4. Her kan man se at den benigne svulsten i (a) er rund og symmetrisk. Man kan også i (b) se en klar avgrensning fra omkringliggende vev. Den maligne svulsten i (c) derimot, har en ujevn disposisjon og er invasiv. I tillegg kan man i (d) se at kreftcellene har infiltrert omkringliggende vev (11).



Figur 4: (a) Viser en benign neoplasme i myometrium. (b) viser skillet mellom svulst (a) og omkringliggende vev. (c) viser malign neoplasme i bryst. (d) viser skillet mellom svulst (c) og omkringliggende vev. Bilde tatt fra: (11)

1.5 H&E FARGEREGENSER

Fargeprosedyrer med fargereagensene hematoxylin og eosin er kjent til bruk i vevsfarging. Disse løsningene har ulik kjemisk sammensetning slik at de kan farge ulike komponenter i vevet på forskjellige måter.

1.5.1 HEMATOXYLIN

Hematoxylin er ikke et fargestoff i seg selv, men må gjennom en oksidasjonsreaksjon før det anvendes i fargereagenser. Oksidasjon av hematoxylin er en reversibel reaksjon som blir til stoffet hematein. Oksidasjonen kan utføres ved to ulike metoder: naturlig oksidasjon og kjemisk

oksidasjon. Naturlig oksidasjon er en prosess som kan ta tre til fire måneder, og utføres ved at hematoxylin eksponeres for lys og luft. Ved kjemisk oksidasjon brukes natriumjodat eller kvikksølv(II)oksid som oksiderer hematoxylin med én gang. Fargereagenset er dermed umiddelbart klart til bruk, men har som regel kortere holdbarhet enn ved naturlig oksidasjon (12).

Etter fremstillingen av hematein kan fargestoffet behandles på ulike måter for ulikt resultat. Videre behandling av hematein påvirker hvilket vev som blir farget og hvilken farge vevstypene får. Hematein er et negativt ladet molekyl, og er avhengig av et bindeledd dersom det skal klare å farge negativt ladede vevsgrupper. Dette gjør det til et kompleksfargestoff, som er illustrert i figur 2. De mest vanlige bindeleddene er aluminiumsalter, jern eller wolfram (12).

Ved bruk av aluminium som bindeledd omtales fargestoffet som haemalum. Det er kun haemalum som er relevant for prosjektet, så hematein med andre bindeledd kommer ikke til å bli utredet videre i denne oppgaven. Haemalum farger negativt ladede vevsgrupper blå-lilla.

1.5.2 EOSIN

Eosin brukes ved H&E farging for bedre differensiering av de ulike vevsstrukturene. Dette er et anion-fargestoff som binder seg, i motsetning til haemalum, til positive strukturer i vevet, og gir rosa farge. Hvilke vev og cellekomponenter som er positivt ladet avhenger som sagt av pH. Eosin-reagensene pleier å ha lav pH, slik at proteinene i vevet protoniseres og får positiv ladning. Ved høy pH vil proteiner ha negativ ladning, og fargestoffet vil ikke kunne binde seg.

Kommersielt finnes det tre typer eosin: Eosin B, Eosin Y, og etylen eosin. Eosin Y er den mest brukte varianten. Den er mest løselig i vann, men også i alkohol. Etyl eosin er kun løselig i etanol. Eosin B, også kalt erytrosin B, kan være både etanol- og vannløselig. Løseligheten til eosin påvirker utførelsen av vevsfargingen. Dette utdypes under punkt 2.3.6 Fargeprinsipp.

1.6 HE-REAGENSER OG ULIKE ORGANER

I ulike organer finner man ulike vevsstrukturer som ikke nødvendigvis har lik evne til å ta opp forskjellige fargestoffer. Det er derfor viktig å vite hvordan man forventer at de ulike vevene farges av H&E fargereagensene, for å kunne vurdere resultatet. Vevene det tas utgangspunkt i under dette prosjektet følger på neste side:

- | | |
|---------------|------------------------|
| 1. Nyre | 6. Prostata hyperplasi |
| 2. Hud | 7. Lunge |
| 3. Tonsille | 8. Cervix |
| 4. Muskulatur | 9. Beinmarg (Crista) |
| 5. Colon | |

1.6.1 NYRE

Histologisk kan nyren deles inn i to deler: Nyrebarken og nyremargen. Nyrebarken inneholder samlerør og glomerulus, mens nyremargen kun inneholder samlerør. Veggene i samlerørene er bygd opp av enlaget kubisk epitel, der proksimale tubuli inneholder flimmerhår mens distale tubuli er uten flimmerhår. Glomerulus inneholder kapillærer med en indre cellevegg av podocytter og en ytre cellevegg av enlaget plateepitel (13).

Podocytterne i glomerulus inneholder tettpakket kromatin, og man kan ved HE-farging forvente mørke kjerner da mer hematoxylin binder seg her. Det enlagede kubiske epitelet inneholder mindre kromatin, og vil farges lysere av hematoxylin (14).

Det kubiske epitelet i proksimale samlerør har en større mengde granula i cytoplasmaet enn i de distale samlerør. Ved HE farging kan man da forvente at disse har mer rosa farge fra eosin i cytoplasma (14). Flimmerhår burde også kunne sees via en uskarp kant inn mot lumen i proksimale tubuli (13).

1.6.2 HUD

Hudvev inneholder tre ulike lag: Epidermis, dermis og hypodermis. Epidermis kan deles videre inn i flere lag. Disse består av en basalmembran, melanocytter, flere lag med keratinocytter, og keratinisert flerlaget plateepitel øverst i hudlaget (13). Epidermis inneholder også Lagerhans og Merkel celler (15).

Dermis inneholder blant annet svettekjertler, hårsekker, talgkjertler, og nerver (13). Tre typer vev er til stede i dette laget. Disse er kollagen, elastiske fibre, og retikulære fibre (15). Dypest i hudlaget har vi hypodermis, også kalt underhuden, som er bygd opp av løst bindevev bundet til epidermis (16).

Cytoplasma i keratinocytter skal med HE-fargereagenser farges sterkt rosa. Basalceller i basalmembranen skal ha grovt kromatin. Kollagenet, nerver, og muskelceller skal alle bli farget av eosin, men kunne bli differensiert ved å ha forskjellig rosa nyanse. I kjertlene i huden skal de tre celletypene synliggjøres av HE-fargingen (14).

1.6.3 TONSILLE

Tonsiller er lymfeknuter som sitter bakerst i munnhulen. Disse er viktige for immunforsvaret på grunn av deres lokasjon, og at de inneholder immunceller. I korte trekk er tonsille bygd opp av mindre lymfeknuter og flerlaget plateepitel. Det flerlagede plateepitelet danner krypter i vevet av tonsillen. Under epitelet er det mindre lymfeknuter med germinale sentere (17). Germinale sentere er strukturer inne i sekundære lymfoide vev, som responderer på immunforsvaret med blant annet produksjon av antistoffer (18). Disse inneholder lymfocytter og plasmaceller.

B-lymfocytene har store cellekjerner, med 1-3 nukleoler, som ved vevsfarging blir mørk lilla. Små lymfocytter har irregulære kjerner som blir mørkt farget av hematoxylinet. Plasmacellene i tonsillen har en typisk kromatinstruktur som ser ut som et pariserhjul i cellekjernen. Det er da vanlig å se kromatinet farget mørk lilla, med oppklaringer rundt (14). På grunn av mer cytoplasma i celler i det germinale senteret, får dette et lysere utseende. Cellene i ytterkanten rundt det germinale senteret er mindre i størrelse og har mindre cytoplasma, som resulterer i mørkere farge (17).

1.6.4 MUSKULATUR

Tverrstripet muskulatur, også kalt skjelettmuskulatur, er bygd opp av muskelceller og muskelfibre. Muskelfibre er dannet av flere myofibriller, som danner sarkomker. Myofibriller består av aktin- og myosinfibre, og danner et tverrstripet utseende til vevet (13).

Under HE-farging kan man forvente at cytoplasmaet i muskelcellene farges sterkt rosa av eosin. Kjernene blir sterkt lilla farget av hematoxylin. I tillegg skal tverrstripene være synlige.

1.6.5 COLON

Tykkntarmen består av ulike vevstyper. Slimhinnen inn mot lumen, mucosa, består av epitel, bindevev kalt lamina propria og glatt muskulatur. Lamina propria inneholder lymfeårer lymfeknuter og kjertler. I laget rundt mucosa har vi submucosa. Dette er et bindevevslag som inneholder blod- og lymfeårer og noe kalt Meissner plexus. Meissner plexus kontrollerer

bevegelsen til mucosa, og sekresjon av kjertlene. Over submucosa har vi et lag med glatt muskulatur. Disse musklene har ansvar for peristaltiske bevegelser i tykktarmen (19).

Ved HE-farging blir kryptene med slimproduserende epitel synliggjort ved at cellene får lyst rosa cytoplasma, med en mørk lilla og basal kjerne. I tillegg blir slimet i begercellene fargeløst eller kun svakt farget (14).

1.6.6 PROSTATATA HYPERPLASI

Prostata kan deles inn i mukosal sone, submukosal sone og perifer sone. Den mukosale sonen er vevet som ligger direkte rundt urethera. Her ligger det slimhinneepitel og slimkjertler. Den submukosale og perifere sonen er også bygd opp av slimhinneepitel og slimkjertler, men disse knyttes til urethera gjennom kanaler (13). Kjertelveggene består av basalceller, sylinderepitel og neuroendokrine celler. I tillegg kan man ofte finne corpora amylacea, små hyalin strukturer, inne i lumen (20). I tillegg til kjertler består prostata av fibromuskulært stroma, som er bygd opp av glatt muskulatur (13) og kollagene fibre (14). Her kan man også finne blodårer, fibroblaster og nerver (20).

Ved bruk av H&E-fargereagenser blir den glatte muskulaturen og de kollagene fibre i stroma lette å differensiere. I tillegg kan man lett skille mellom den sentrale og den perifere sonen ved at både kjerner og cytoplasma til kjertler i den sentrale sonen, farges mørkere enn i den perifere sonen (14). De neuroendokrine cellene i kjertlene vil ikke kunne synliggjøres med kun HE-farging (20).

1.6.7 LUNGE

Lungene deles inn i hovedbronkier, bronkioler og alveoler.

Hovedbronkiene fra luftrøret inneholder hyalinbrusk, som gir struktur og styrke mot respiratorisk trykk. I tillegg inneholder de kjertler, elastiske fibre og glatt muskulatur. Bronkiolene er oppbygd av glatt muskulatur og elastiske fibre, i tillegg til enlaget epitel. Cellene i epitelet varierer (19). Mengden glatt muskulatur øker med forgreiningene i lungene, og er med på å regulere diameteren og dermed mengden luftutveksling i bronkiolene. (21) Alveolene består hovedsakelig av respiratorisk epitel. I tillegg inneholder alveoler kanaler av pneumocytter. Pneumocyttene kan deles inn i type 1 og type 2 (19).

Cytoplasmaet i epitelet og glatt muskulatur i lungene farges rosa med sterkt lilla fargete kjerner. Bindevevet i hovedbronkiene og kollagenet i bronkiolene farges rosa. Alveolene har ulike typer

pneumocytter. Ved farging kan man se disse som celler med små, tette kjerner som farges kraftig lilla, eller celler som ved farging får blekere kjerner og en tydelig nukleol (14).

1.6.8 CERVIX

Livmorhalsen består av en tykk slimhinne med enlaget sylinderepitel ytterst, og disse cellene produserer og sekreterer slim ved østrogenpåvirkning (14). I transformasjonssonen mot nederste del av cervix er det en overgang til flerlaget plateepitel som fremtrer på oversiden av den sekretoriske slimhinnen. I transformasjonssonen er det økt antall lymfocytter (13).

Ved HE-farging kan man se basalmembranen til sylinderepitelcellene med basale kjerner som farges blå/lilla, rosa cytoplasma og lyst rosa slim i varierende mengde.

1.6.9 BEINMARG

Beinmargen kan deles inn i den røde og den gule beinmargen. Hematopoiesen, produksjonen av blodceller fra stamceller, foregår i et nettverk av retikulære fibre i den røde beinmargen. Den gule beinmargen inneholder større mengder fett, og færre blodceller (19). Beinmargen inneholder også retikulumceller, og makrofager som har i oppgave å destruere ødelagte celler og cellekjerner fra erytrocyttproduksjon (22).

Kjernene i de hvite blodcellene i beinmargen farges sterkt lilla. Cytoplasma i eosinofile granulocytter får oransje-rødt, kornete cytoplasma. Cytoplasma til andre granulocytter farges svakt rosa av eosin.

1.7 FEILKILDER VED VEVSFARGING

Ved vurdering om fargereagensene møter kravet for fargekvaliteten, er det faktorer som ikke er tilknyttet fargereagensene som kan påvirke resultatet. Dette er viktig å være bevisst på under vurdering av resultatet. Det er dermed relevant å se nærmere på ulike feilkilder og deres konsekvens for vurderingen av fargereagensene. På bakgrunn av omfanget til prosjektet, så er det kun feilkilder som er sentrale i oppgaven som inkluderes.

1.7.1 FORBEHANDLING

Feilkilder kan ofte være knyttet til forbehandling av snittet, vist i tabell 2 nedenfor. Her ser man ulike feilkilder, hvordan disse påvirker vevet og deretter hvilke konsekvenser dette kan ha for vurdering av resultatet av prøven.

Tabell 2: Tabell over ulike feilkilder som påvirker farger resultatet, og deres konsekvenser i vurderingen. Informasjonen i tabellen er tatt fra: (23).

Feilkilde	Hvordan vevet påvirkes	Konsekvens for vurdering
Sen fiksering	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kjerner mangler kromatin ○ Kjerner er bleknet eller borte ○ Noen celler kan forsvinne 	Gir inntrykk av utilstrekkelig farging med Hematoxylin og/eller eosin, eller feil under farging.
Ukomplett fiksering	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kjerner er uskarpe ○ Kjernedetaljer er vanskelige å se 	Gir inntrykk av utilstrekkelig farging med Hematoxylin og/eller eosin, eller feil under farging.
Dårlig vevs-prosessering	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kjerner er uskarpe ○ Kjernene er ujevnt farget ○ Kjernedetaljer er vanskelige å se 	Gir inntrykk av utilstrekkelig farging med Hematoxylin og/eller eosin, eller feil under farging.
Uttørking	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kjerner blir pyknotiske. 	Kjerne kan virke overfarget
Over-dekalsifisering	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kjernedetaljer er vanskelig å se ○ Manglende evne til å binde hematoxylin. Resulterer i manglende farging av kjerner og basofile granulocytter. 	Gir inntrykk av utilstrekkelig fargereagens eller feil under fargingen.
Rynker/ bretter i snittet	<ul style="list-style-type: none"> ○ Noen områder har mørkere farge enn andre. 	Gir inntrykk av nedsatt bindingskapasitet for fargemolekyler
Ujevn tykkelse	<ul style="list-style-type: none"> ○ Noen områder har mørkere farge enn andre. 	Gir inntrykk av nedsatt bindingskapasitet for fargemolekyler

1.7.2 VANNKVALITET

Etter forbehandlingen, og under selve fargeprosedyren er det flere stopp prøven skal til før fargereagensene tilføres vevet. Alle disse trinnene er viktige for å få gunstig vevsfarge. Dersom man følger en validert prosedyre med riktig rekkefølge, konsentrasjoner og tider, skal feilkilder kunne unngås. Trinnene og hvordan de bidrar i fargingen beskriver under punkt 2.3.6 Fargeprinsipp.

Et av trinnene i fargeprosedyre med H&E farging av vevssnitt, er at snittene skal påføres vann. Påføring av vann gjøres av forskjellige grunner, slik som å rense snittene mellom de ulike reagensene, eller ekstrahere farge for å oppnå ønsket fargekvalitet. Påføring av vann utføres

også for blåing etter hematoxylin reagenset, dersom vannet inneholder nok mineraler og dermed blir basisk nok for dette trinnet. Mer om blåing etter hematoxylin beskrives under punkt 2.3. Prinsipp.

Det differensieres mellom deionisert vann, destillert vann, RO vann og vann fra kran. Disse har alle forskjellige komponenter, noe som kan påvirke fargingen. Deionisert vann er vann som har gjennomgått en flerstegs renseprosess, og ikke inneholder ioner. Destillert vann er vann som har blitt rensed via en fordampingsprosess. Stoffer som man ikke vil ha i vannet har høyere kokepunkt og fordamper senere enn vann. Man kan slik skille vannet fra disse stoffene. Det finnes heller ikke salt i destillert vann, ettersom salter også kokes ved høyere temperatur. RO vann er behandlet med omvendt osmose. Dette er en prosess der vannet føres gjennom en semi-permeabel membran under trykk, slik at vannmolekylene splittes fra mulige urenheter (24).

Det er flere stoffer i urensed vann som kan påvirke fargingen på forskjellige måter. De forskjellige stoffene og deres mulige påvirkning på vevet finnes i Tabell 3.

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over mulige kontaminanter i urensed vann, og hvordan disse kan påvirke sluttresultatet i farging av vevssnitt (25).

Kontaminant	Påvirkning på fargingen
Jern	Kan ekstrahere farge fra vevet ved å fungere som et bindeledd
Klor	Kan føre til bleking av vevet
Ioner	Kan interferere med noen typer fargestoffer.
Organiske molekyler	Kan føre til oppvekst av bla. bakterier
Bakterier	Kan føre til artefakter i vevet
Partikler	Kan føre til artefakter i vevet
Mineraler (Hardhet)	Kan feste seg på overflaten av snittet
pH	Noen stoffer, slik som sulfur, kan påvirke pH i fargeprosessen. Dette kan føre til at fargereagensene ikke farger vevet slik de skal.

Ifølge en studie gjort av EMD Millipore, så viste HE farging seg å være robust mot ulike urenheter i vann og ga minimal forskjell i fargekvalitet ved bruk av vann prosessert på ulike måter (26). Det er mangel på lignende studier som har blitt utført i ettertid, så det er mulig flere utprøvinger er nødvendig for å etterprøve dette.

1.7.3 FARGEREAGENSER

Behandlingen av fargereagensene kan påvirke farger resultatet. Generelt sett er konsentrasjon av fargereagenser en viktig faktor. Dersom man ikke tar hensyn til at fargeløsninger har høy konsentrasjon av fargestoff i fargeprosessen, kan man ende opp med et overfaget resultat. Dette gjelder også for mindre konsentrerte fargeløsninger. Ved mindre konsentrasjoner kan det kreves lenger tid i fargekar for å oppnå ønsket farger resultat. Tid blir dermed en viktig faktor, og tiden et snitt er i fargeløsningen burde justeres etter behov for å få tydelig farging.

Fargereagensene i seg selv har også noen begrensninger som kan påvirke farger resultatet. Som forklart tidligere gjennomgår hematoxylin et oksidasjonstrinn. Denne oksidasjonen pågår kontinuerlig under eksponering for luft og lys. Dersom hematoxylin over-oksideres omdannes hemateinet til et fargeløst produkt. Det er derfor viktig å være bevisst på holdbarheten til reagensene etter at de er åpnet.

Ved farging av vevet med eosin er pH verdien viktig. pH kan påvirke eosin slik at det ikke klarer å binde seg til vevet. pH påvirker også om vevet er protonisert. Det kan derfor være viktig å forsikre at reagenset verken har for lav eller for høy pH dersom vevet ikke farges som forventet av eosinet. Er pH for høy blir ikke proteinene ionisert, mens er pH for lav så blir fargereagenset i seg selv deionisert. Det er skrevet mer om dette under punkt 2.3.6 Fargeprinsipp.

I tillegg, som skrevet under punkt 1.5.2 Eosin, vil rensetrinnet etter eosin påvirke fargeintensiteten. Det er derfor viktig at protokollen som benyttes tar hensyn til løseligheten til eosin reagenset.

1.8 IN-HOUSE REAGENSER

Noen laboratorier bruker in-house reagenser til H&E farging. Dette vil si at reagensene er egentilvirket, og tilpasset for laboratoriet. Reagensene er da produsert og regulert internt på laboratoriene. Man kan diskutere bruken av in-house reagenser opp mot sporbarhet og sikkerhet, og om bruken av slike reagenser er en god løsning innen helsesektoren.

1.9 IVDR

IVDR er en forkortelse for «in-vitro diagnostisk utstyr», altså medisinsk utstyr som benyttes på laboratoriet. Utstyr som benyttes til in-vitro diagnostikk omfatter reagenser, kalibrator- og kontrollmateriale, analysesett (kit), instrumenter og apparater, og programvare som benyttes innen diagnostikk.

EU-kommisjonen vedtok og innførte i 2017 nye forordninger for bruken av medisinsk utstyr (MDR) og in-vitro diagnostisk utstyr (IVDR) som nå inngår i EØS-avtalen og norsk lov. I 2020 ble det vedtatt en ny lov om medisinsk utstyr som innebærer både MDR og IVDR, men med ulike datoer for ikrafttredelse (27). Kravet for IVDR godkjenning trer i kraft 26. mai 2022. Her blir det en overgangsperiode fram til 26. mai 2024 (28). Under den nye loven har Helse- og omsorgsdepartementet en forskrift for medisinsk utstyr som gir mer utfyllende informasjon for produsenter og forbrukere av medisinsk utstyr i Norge.

Målet med de nye forordningene er å oppnå god sikkerhet og kvalitet for pasienter og laboratorier, og å sørge for god sporbarhet ved hjelp av korrekt dokumentasjon i alle ledd fra produsent til pasientresultat (29). Disse kravene innebærer blant annet at utstyr kan spores gjennom et nytt og internasjonalt system for utstyrsidentifikasjon, og at de har CE-merking som viser at de oppfyller sikkerhetskravene til det europeiske fellesskapet og dermed kan omsettes og sirkulere fritt innen EØS. I tillegg er tidligere regler om risikoklassifisering, ytelseevaluering og sikkerhetsovervåking til dels videreført, men likevel forandret til mer detaljerte og strengere krav. For sykehuslaboratoriene betyr dette at nåværende «In-house» reagenser, altså reagenser som helt eller delvis produseres internt, må erstattes av kommersielle reagenser så lenge de finnes og er tilgjengelige.

1.10 KRAV TIL REAGENSER

Skal IVDR godkjente reagenser bli innført og erstatte tilrettelagte fargeprosedyrer kan det være viktig å sette spesifikke krav. Disse kravene sikrer at reagensene som velges møter behovet til brukeren. I dette tilfellet er brukeren avdeling for patologi ved St. Olavs hospital, Trondheim.

Nye fargereagenser kan farge vevet på forskjellige måter og med forskjellig tidsbruk. Dette kan være aktuelt å se på ved utbytting av reagenser. Tar en eventuell ny prosedyre mye lenger tid enn den nåværende, kan dette på sikt skape store forsinkelser på prøvesvar til pasienten. Avdelingen har satt et krav på at nye fargereagens skal maks bruke 5 minutter lenger tid enn

den nåværende prosedyren. Dette høres kanskje lite ut, men ved farging av flere snitt, kan det dannes kø og forsinkelser i fargeinstrumentet. Jo lenger tid hvert snitt bruker på å bli farget, jo større kan forsinkelsen bli.

En annen viktig faktor er kostnader. Reagenser er et produkt som jevnlig må erstattes. Kostnadene for nye sett med reagenser er da viktig å ta i betraktning ved valg av alternativer til nåværende prosedyre.

Det viktigste behovet som må møtes er fargekvaliteten til reagenset. Patologene som vurderer vevene, er avhengig av god fargekvalitet for å fange opp patologiske tilstander. Dersom reagenser som innføres har dårligere fargekvalitet enn reagenser de er vant med, risikerer man at patologiske tilstander overses. Ideelt sett skal nye reagenser ha like god eller bedre fargekvalitet. I tillegg burde nye reagenser farge vevene tilnærmet likt som de nåværende fargereagensene, slik at man unngår en tilvenningsfase der det er høyere risiko for at patologiske tilstander overses.

Noen av de generelle kravene til fargekvaliteten som laboratoriets nåværende reagenser møter, og som må oppnås for tilnærmet lik farging av vevet, beskrives punktvis nedenfor. Disse kravene er satt på bakgrunn av patologene på avdelingen sine preferanser, og kan avvike ved andre laboratorier.

1. Det skal være god kontrast mellom ulike celle- og vevstyper
2. Vev skal ha tre ulike rosa nyanser
3. Kjernedetaljer og kromatin skal være synlig, og kjernene skal ha en tydelig membran
4. Epitelet i epidermis skal ha rosa skjær. Blå skjær skal unngås.
5. Tverrstriper i muskulatur skal være synlige
6. Erytrocytter skal farges lakserosa, og være lett differensierbare
7. Man skal kunne gjenkjenne eosinofile granulocytter ved rødfarget cytoplasma

1.11 PROBLEMSTILLING

Vevsfarging med hematoxylin og eosin er viktig innenfor kreftdiagnostikk. Med tanke på den forventede økningen i krefttilfeller i Norge, i tillegg til nye krav om IVDR godkjenning, er det hensiktsmessig å finne ut om IVDR godkjente reagenser også opprettholder behovet for økt kvalitet innenfor vevsfarging med hematoxylin og eosin. Problemstillingen er derfor:

Kan IVDR godkjente fargereagenser gi tilfredsstillende fargerresultat og bytte ut nåværende prosedyrer med «In-house» Hematoxylin og Eosin reagenser?

2.0 MATERIALE OG METODE

2.1 PRØVEMATERIALE

For utprøving av IVDR godkjente fargereagenser benyttes parafininnstøpt formalinfiksert vev fra friske individer. Vevene som er benyttet som prøvemateriale i utprøvingen er tidligere benyttet som kontroller for HE fargingen på avdeling for patologi ved St. Olavs hospital.

2.1.1 MULTIVEVSBLOKK

For å kunne vurdere hvordan reagentet påvirker forskjellige vev benyttes det et spekter av forskjellig prøvemateriale. Prøvematerialet settes sammen til en multivevsblokk, slik at de ulike vevene kan farges samtidig.

En multivevsblokk er en blokk som er satt sammen av flere vev. For hvert enkelt prøvemateriale brukes samme kontrollblokk. Fra denne blokken stemples en del av prøvemateriale ut, og settes inn i en ny samlet kassett med alt prøvemateriale. Orienteringen av det ulike prøvematerialet benyttet i dette prosjektet illustreres i tabell 4.

Tabell 4: Tabellen viser en oversikt over vevstype på prøvematerialet som brukes, og hvordan prøvene orienteres i multivevsblokken.

Hud	Lunge	Prostata hyperplasi	Colon	Benmarg fra Crista
Muskel	Tonsille	Cervix	Nyre	

2.2 UTSTYR OG REAGENSER

2.2.1 LABORATORIETS IN-HOUSE H&E FARGEREGENS

Hematoxylin som brukes ved avdeling for patologi ved St. Olavs hospital Trondheim er et in-house reagens, og tillagingen skjer internt. Innholdet er vist i tabell 5, og framgangsmåte for tillaging i tabell 6. Eosinreagentet som brukes er løst i 70% alkohol. Viktig informasjon knyttet til reagensene er samlet i tabell 7. Tabellene kommer på neste side.

Tabell 5: Viser stoffene som brukes ved tillaging in-house hematoxylin reagens, som brukes ved avdeling for patologi, St. Olavs hospital.

Hematoxylin	10 g
Glyserol	400 mL
Iseddiksyre (konsentrert)	200 mL
RO-vann	1400 mL
Perjodsyre	1 g
Aluminiumsulfat	100 g

Tabell 6: Tabellen viser en femtrinns framgangsmåte for tillaging av in-house hematoxylin reagentet, som brukes ved avdeling for patologi, St. Olavs hospital.

Steg 1	Hematoxylin helles i en 2-liters kolbe, tilsettes glycerol, eddiksyre (konsentrert) og litt av vannet (400mL). Ristes til alt er oppløst (magnetrorer)
Steg 2	Tilsettes deretter periodsyren.
Steg 4	Aluminiumsulfat løses i resten av vannet i en annen kolbe, bruk magnetrorer og gjerne varme så den løses lettere.
Steg 4	De to løsningene slås sammen.
Steg 5	Mål pH. Denne skal ligge mellom 1,8 og 2,2. Løsningen kan brukes umiddelbart.

Tabell 7: Oversikt over holdbarhet, avfallshåndtering og kostnad til laboratoriets nåværende «in- house» reagenser.

Holdbarhet:	Nye reagenser lages hver 14 dag
Avfallshåndtering:	Fargereagensene hematoxylin og eosin skal håndteres som farlig avfall.
Kostnad:	Det lages 2 flasker per tillaging, som varer i 14 dager. 2 liter Eosin er beregnet til å koste ca 1250,- og 2 liter Hematoxylin ca 1.350, -. Kostnaden for 1 uke blir da ca. 1.300, -.

2.2.2 H&E FARGEREAGENS FRA HISTOLAB

Histolab har ferdigproduserte fargeløsninger av Mayer's hematoxylin og alkoholløselig eosin utviklet for progressiv farging. Viktig informasjon knyttet til reagensene er samlet i tabell 8.

Tabell 8: Oversikt over LOT- nummer til Hematoxylin og Eosin reagenser fra Histolab, utløpsdato for hver av reagensene, i tillegg til holdbarhet, avfallshåndtering og kostnad.

LOT- nummer Eosin:	4822020
Utløpsdato eosin:	2023- 12
LOT- nummer Hematoxylin:	2522019
Utløpsdato hematoxylin:	2023-06
Holdbarhet:	Fargeløsningene er holdbare i 18 måneder fra produksjonsdato i uåpnet tilstand, men kun i én uke etter åpning. Etter bruk må reagensene håndteres som spesialavfall.
Avfallshåndtering:	Både hematoxylin og eosin fra Histolab er etanolholdige og klassifiseres som farlig avfall.
Kostnad:	Forbruk på laboratoriet per uke er mellom 2500 og 3000 snitt. For 3000 snitt er forventet å bli 3 flasker av hvert reagens. Forventet kostnad for 3000 snitt er da 1.884, - eks. moms

2.2.3 H&E FARGEREAGENS FRA DAKO

DAKO's protokoll for HE-farging med progressiv fargemetode bruker tre klar-til-bruk reagenser, først Harris' hematoxylin, deretter en blåningsbuffer, og til slutt en modifisert eosinløsning. Harris' hematoxylin kan brukes ved både progressiv og regressiv fargemetode. Den modifiserte eosinløsningen er løst i vann, men fargereagenset er løselig i både vann og etanol. DAKO's blåningsbuffer skal tilføre høyere pH etter farging med hematoxylin, og sikre en detaljert og tydelig blåfarge i cellekjernene. Viktig informasjon knyttet til reagensene er samlet i tabell 9 på neste side.

Tabell 9: Oversikt over LOT- nummer til Hematoxylin og Eosin reagenser fra Dako, utløpsdato for hver av reagensene, i tillegg til holdbarhet, avfallshåndtering og kostnad.

LOT- nummer eosin:	127742
Utløpsdato eosin:	2023- 03-13
LOT- nummer hematoxylin:	127733
Utløpsdato hematoxylin:	2023-08-16
Holdbarhet:	DAKO's løsninger for progressiv HE-farging er holdbare i fem dager etter åpning, eller til farging av 3000 snitt.
Avfallshåndtering:	Hematoxylin-løsningen inneholder etanol og eddiksyre, og er derfor klassifisert som brennbar væske. Fargereagensene hematoxylin og eosin skal håndteres som farlig avfall, mens blåningsbufferen regnes som spesialavfall. (30)
Kostnad:	Forbruk for 3000 snitt er 1 flaske av hvert reagens. Forventet kostnad for 3000 snitt er da ca. 2.738, - eks. moms.

2.2.4 H&E FARGEREAGENS FRA SAKURA

Sakura er produsenten av Tissue-Tek Prisma, instrumentet som benyttes til rutinefarging ved Avdeling for Patologi ved St. Olavs Hospital. HE-reagensene fra Sakura er dermed spesifikt utviklet for bruk sammen med Tissue-Tek Prisma, og kommer med en fargeprotokoll som er bedre tilpasset det aktuelle instrumentet enn fargereagenser fra andre produsenter.

Fargeløsningen hematoxylin i fargesettet fra Sakura består av to komponenter, én konsentrert løsning Mayer's Hematoxylin (3 g/L) og en løsning med oksidasjonsmiddel. Disse delreagensene må blandes og stå i minst 24 timer før fargereagenset tas i bruk. Sakuras hematoxylin får forbedret reproduserbarhet med tanke på gode og jevne fargerresultater fordi det todelte fargereagenset reduserer risikoen for at hematoxylin oksiderer og forandrer seg før det ankommer og tas i bruk ved de ulike laboratoriene. I tillegg inneholder settet et klar til bruk eosin reagens. Viktig informasjon knyttet til reagensene er samlet i tabell 10 på neste side.

Tabell 10: Oversikt over LOT- nummer til Hematoxylin og Eosin reagenser fra Sakura, utløpsdato for hver av reagensene, i tillegg til holdbarhet, avfallshåndtering og kostnad.

LOT- nummer eosin:	210707
Utløpsdato eosin:	2023.06
LOT- nummer hematoxylin:	210707
Utløpsdato hematoxylin:	2023. 06
Holdbarhet:	Ingen begrensning på holdbarhet etter åpning.
Avfallshåndtering:	Den konsentrerte hematoxylin-løsningen er en brannfarlig væske som kan gi alvorlig øyeirritasjon. Sakuras eosin er på lik linje med hematoxylin etanolholdig og regnes som en brannfarlig væske, og rester av begge løsninger skal håndteres som farlig avfall.
Kostnad:	Fire sett kjøpes sammen. Forbruket på et sett er 2500 snitt. Pris for 2500 snitt er 2.875, - eks. moms.

2.2.5 H&E FARGEREGAGENS FRA VWR

Sigma-Aldrich sine VWR fargereagenser kom uten protokoll, og det blir dermed opp til brukeren å vurdere den mest gunstige framgangsmåten, og om det skal være en progressiv eller regressiv fargemetode. VWR benytter Gill 3 hematoxylin. Eosin fra VWR klassifiseres som Eosin Y, og inneholder 1% alkohol. Dette gjør at eosin reagentet er mest vannløselig, noe man bør ta hensyn til ved valg av protokoll. Viktig informasjon knyttet til reagensene er samlet i tabell 11.

Tabell 11: Oversikt over LOT- nummer til Hematoxylin og Eosin reagenser fra VWR, utløpsdato for hver av reagensene, i tillegg til holdbarhet, avfallshåndtering og kostnad.

LOT- nummer Eosin:	HX28229281
Utløpsdato eosin:	2025- 02- 28
LOT- nummer Hematoxylin:	HX26386974
Utløpsdato hematoxylin:	2025- 01- 31
Holdbarhet:	Ingen begrensning på holdbarhet etter åpning.
Avfallshåndtering:	Hematoxylin og eosin reagensene håndteres som farlig avfall
Kostnad:	Forbruk for 3000 snitt er én flaske med hematoxylin reagentet og to flasker med eosin reagentet. Forventet kostnad for 3000 snitt er da 3.660, - eks. moms.

2.2.6 TISSUE TEK PRISMA- SAKURA

Tissue Tek Prisma automatiserer alle prosessene i farging av vevssnitt, inkludert montering av dekkglass. Instrumentet utfører farging av vevssnitt ved dypping i fargekar. Dette gjør at snittene får lik og jevn dekning av reagenser. Fargekar kan plasseres etter behov, og både konfigurasjon og rekkefølge kan stilles inn. Instrumentet gir valgmuligheter for om snittet skal mikses i de ulike karene eller være stillestående. Dersom det er viktig at de enkelte reagenser ikke står lenger enn oppgitt i prosedyren, kan dette stilles inn, slik at reagenset prioriteres dersom det skulle det være kø.

2.2.7 NANO ZOOMER S60 HAMAMATSU

Nano zoomer S60 er et instrument som skanner ferdigfargede vevsprøver, slik at de visuelt kan vurderes av patologer digitalt framfor ved mikroskopi. Instrumentet benytter spektrofotometri for en visuell framstilling av det fargede snittet. Etter innskanning blir bildet overført til et program kalt «IMS- Imaging Mass Spectrometry». Dette er en database som oppbevarer alle innskannede snitt.

2.3 PRINSIPP

Vevsprøver gjennomgår ulike prosesser før og etter at vevet farges som er viktige for gunstige fargerresultater. Det er viktig med god forståelse av trinnene for å forstå ugunstige resultater og hva man kan gjøre for å motvirke og rette opp disse.

2.3.1 FIKSERING

Umiddelbart etter prøvetaking vil vevsprøver legges i en fikseringsvæske. Denne har i oppgave å stoppe all enzymaktivitet, slik at all form for cellemetabolisme og autolyse stoppes. Dette gjør at cellene bevares (31). Det finnes fire typer fikseringsmiddel: aldehyder, oksideringsmiddel, alkohol baserte, og metalliske (32). Ofte benyttes en formalinløsning for fiksering, som inngår under aldehyd fikseringsmiddel. Formalin, i tillegg til å stoppe enzymaktivitet, krysstvinger seg til de polare bindingene i proteinene og stabiliserer vevet. Formalin reagerer sakte med vevsproteiner og trenger derfor lengre tid på å infiltrere vev enn en del andre fikseringsvæsker (33).

2.3.2 DEKALSINERING

Ben og ben/kalkproduserende vev er vanskeligere å snitte enn andre vev, på grunn av en annen fasthet. Beinmargen i dette prosjektet må dermed gjennom en prosess som gjør snittingen

enklere. Dekalsinering ved hjelp av syre eller kompleksdannende stoffer som EDTA før snitting og støping, løser opp kalsium og fosfatavleiringer slik at skjelettvev blir mykere og kan snittes enklere.

2.3.3 FRAMFØRING OG KLARING

Vevet skal etter framføring og eventuell dekalsinering støpes i parafinvoks. Formalin fra fikseringstrinnet er ikke blandbart med parafin. Under framføringssteget utføres derfor en dehydrering der vannet fjernes, og et klaringstrinn der framføringsmiddelet erstattes med en løsning som er blandbar med voksen. Formalin i vevet erstattes da først med økte konsentrasjoner av etanol, og vevet blir dehydrert. Etter dehydreringen, for å fjerne framføringsmiddelet, tilføres xylen som er blandbart med parafinvoksen (31).

2.3.4 ORIENTERING OG STØPING

Etter framføring blir vevsbiten(e) orientert i en kassett etter hva en ønsker å vurdere i vevsprøven, og typen prøvemateriale. Orienteringen kan spille en stor rolle for hvordan vevssnittene blir, og hvordan morfologien sees i de ferdige preparatene. Når orienteringen er utført vil prøvematerialet støpes i en parafinblokk.

2.3.5 MULTI TISSUE BLOKK

Ved tillaging av multivevsblokk stemples deler av parafinstøpt prøvemateriale ut, og settes inn i en ny kassett. Da får vevsbiter med forskjellige opprinnelse plass i en og samme kassett.

Hver vevsbit kan orienteres ulikt for å fremme spesifikke områder i vevet. Prøvematerialene støpes da sammen til en ny parafinblokk. I dette prosjektet ble det laget to vevsblokker, slik at blokken som brukes kan erstattes ved eventuelle problemer i utprøvningsprosessen.

2.3.6 SNITTING

Blokken snittes ved hjelp av mikrotomi. Isblokker bidrar til korrekt fasthet i vevet før snitting, og vannbad etter mikrotomi gjør at snittene strekkes ut og kan plasseres korrekt på objektglass. Etter snitting overføres snittet på et objektglass, og tørkes i 20 minutter i varmeskap på 60°C.

2.3.7 FARGEPRINSIPP

Fargingen av vevssnitt utføres på Tissue-Tek Prisma. Det automatiserte fargeinstrumentet fører snittet gjennom ulike prosesser i fargeprosedyren som følger på neste side.

2.3.7.1 Deparafinering

For at farge skal komme til i vevet må parafinen fjernes. For at denne prosessen kan skje må snittet varmebehandles i varmeskap på 60°C i ti minutter. Deretter tilføres xylen eller tilsvarende kjemikalie som fjerner parafinen.

2.3.7.2 Rehydrering

Ettersom hematoxylin er et vannbasert reagens, innføres vann i vevet. Dette gjøres i en rehydreringsprosess der snittene tas gjennom avtagende alkohol konsentrasjoner, og ender med å stå i vannkar.

2.3.7.3 Hematoxylin

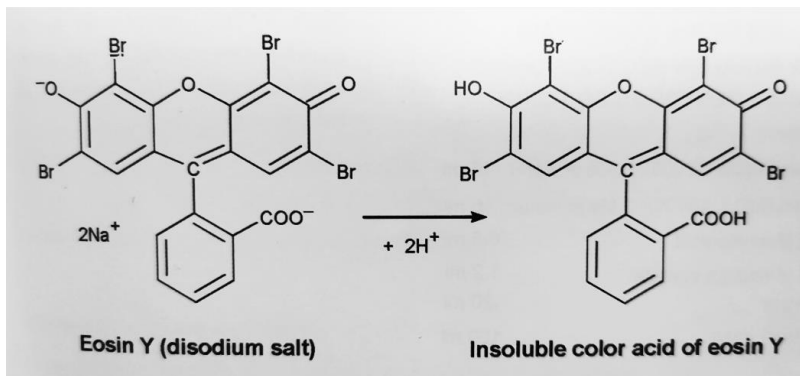
Haemalum har som nevnt evnen til å farge negativt ladede strukturer. I cellekjernene er det strukturer, som ved pH på mellom 2.0 - 3.5 er negativt ladd og blir bundet til fargestoffet (14). Disse strukturene inngår også i RNA i cytoplasma, men i mindre grad. Man kan ta i bruk to forskjellige fargeprinsipper når man farger med denne kjemiske sammensetningen av fargestoffet, disse er progressiv farging og regressiv farging.

Ved progressiv farging, farges cellekjerner og cytoplasma frem til man oppnår ønsket fargeintensitet. Ved regressiv farging derimot, overfarges vevet, og er avhengig av en fortennet syre til å ekstrahere ut den overfløydige fargen. Haemalum som er festet til kjernen, ekstraheres ikke like lett som haemalum festet til andre komponenter. Dette gir en differensiering av de ulike vevskomponentene farget med dette fargestoffet. Hvilket fargeprinsipp som benyttes avhenger av aluminium:hematein-ratioen. Ved høy ratio farges kromatinet saktere enn ved lav ratio. Ved lav ratio overfarges kromatinet lettere (14).

Etter farging med haemalum vil de negative strukturene bli farget røde. For å få ønsket fargerresultat må snittet gjennom et trinn som kalles «blåning». Dette steget toner fargestoffet, og gjør at de rødfargede komponentene i vevet går mot blå. Blåning utføres ved å tilsette en basisk løsning. OH-gruppen fra denne løsningen omdanner aluminiumsaltet til uløselig aluminium hydroxid, som er blått. (34) Eksempler på slike basiske løsninger som brukes på laboratorier er: springvann (pH=5), Scotts TWS (pH=8) og ammoniumhydroksid (pH=10). Disse bruker ulik tid på å omdanne aluminiumsaltet. Mer basiske løsninger slik som ammoniumhydroksid utfører denne prosessen raskere, mens løsninger med lavere pH som springvann bruker lengre tid (14).

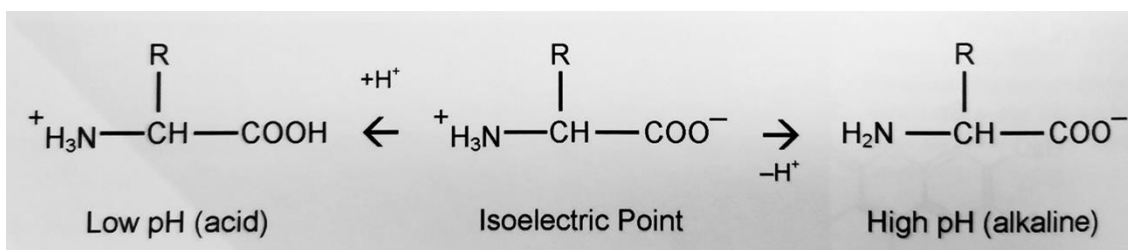
2.3.7.4 Eosin

Erythrocin er som sagt et anion-fargestoff som binder seg til positive strukturer i vevet. Hvilke vev og cellekomponenter som er positivt ladet avhenger av pH. Eosin-reagensene har lav pH, slik at proteinene i vevet protoniseres og får positiv ladning. Ved for høy pH vil proteiner ha negativ ladning, og fargestoffet vil ikke kunne binde seg. Det er derimot viktig at løsningen ikke har for lav pH, for da omdannes COO-gruppen i fargestoffet til COOH, og det vil ikke kunne binde seg til vevet (14). Dette illustreres i figur 5.



Figur 5: Illustrerer hvordan fargestoffet Eosin reagerer på for lav pH. Resulterer i at fargestoffet ikke er ionisert, og dermed ikke kan binde seg til vevet. (Special stains and HE, s. 33)

Fargestoffet skal ved korrekt fargeprosedyre gi vevet tre ulike nyanser av rosa avhengig av vevet det bindes til. Cellens cytoplasma inneholder proteiner og farges rødt eller mørkt rosa. Ved den lave pH'en vil proteinene være protonisert (NH⁺), og binde seg til den negative gruppen i fargestoffet. Dette er vist i figur 6. Kollagene fibre har færre proteiner enn cytoplasma og blir dermed farget svakere rosa (14).



Figur 6: Illustrasjon av hvordan sidegruppene til proteiner påvirkes av ulik pH. Dette påvirker fargestoffets bindingsevne. Man kan se at det kun er ved lav pH at proteinet er positivt ladd og kan bindes til anionfargestoffer. (Special stains and HE, s. 124)

I erythrocytter og granula i både eosinofile granulocytter og paneth-celler, blir fargemolekylene i eosin bundet tettere inntil hverandre. Dette påvirker fargen, slik at den går mot oransje i fargetone (14). I tillegg påvirkes kjernen som tidligere er farget med hematoxylin. Trolig på grunn av positive ladninger i sidekjedene på basiske nukleoproteiner, har eosin en evne til å binde seg her også. Dette gjør at kjernen går fra en blålig farge mot lilla. I tillegg kan det kationiske bindeleddet til hematin binde eosin, og på denne måten også gi lilla farge (14).

Stegene før og etter eosin fargereagenset varierer som sagt etter løseligheten til eosin reagenset, og følger likt løser likt prinsippet. Eksempelvis vil en renseprosess med bruk av vann ekstrahere mer farge enn absolutt alkohol dersom eosin reagenset er vannløselig. Dette gjelder også lavere alkoholkonsentrasjoner som inneholder vann. Man bruker derfor likt følger likt prinsippet for å oppnå ønsket fargeintensitet i sluttresultatet.

2.3.7.5 Dehydrering og klaring

Monteringsmiddelet som brukes i neste trinn, montering av dekkglass, er ikke blandbart med vann. Snittet blir derfor dehydrert ved at det tas gjennom en økende alkoholprosent, som erstatter vannet i vevet. Xylen er løselig med monteringsmiddelet. Derfor plasseres snittene til slutt i to kar xylen.

2.3.7.6. Montering av dekkglass

Snittet beskyttes det til slutt med et dekkglass. Dette gjøres ved hjelp av monteringsmiddelet Pertex, som er xylen basert. Denne prosessen er automatisert på Sakura Tissue-Tek prisma. Snittene settes deretter i avtrekksskap i 20 minutter. Dette utføres for at det miljøfarlige stoffet xylen tørker, og for at dekkglasset fester seg godt på objektglasset.

Siste steg er at snittene skannes inn på Nano Zoomer S60 Hamamatsu og blir tilgjengelig på laboratoriets datasystem.

2.4 METODE

Svaret på problemstillingen i dette prosjektet bygges på en kvalitativ metode. Innsamlingen av relevant fagkunnskap og data benyttet for å komme fram til et resultat til problemstillingen, gjøres med litteratursøk og praktisk laboratoriearbeid. Laboratoriearbeidet utføres fysisk i samarbeid med prosjektets veileder på avdeling for patologi. Snittene som brukes i laboratoriearbeidet blir merket med navn, nummer og QR kode til innskanning. Dataene fra det

praktiske arbeidet samles inn på laboratoriets interne database ved hjelp av innskanning på Nano zoomer s60 hamatsu, og blir senere overført via e-post. Jevnlige samtaler med veiledere blir utført fysisk.

Vurdering av fargerresultatene blir gjennomført etter hver utprøving, med hjelp fra veileder. Fargekvaliteten blir vurdert, i tillegg til at ulike metoder for optimalisering av fargekvaliteten blir diskutert. En fortløpende vurdering av fargekvaliteten for hvert reagens setter grunnlaget for neste utprøving med reagenset, hvor justeringer for å optimalisere fargekvaliteten blir tatt i bruk. Snittene med best fargekvalitet blir til slutt utvalgt for videre vurdering. Det blir utført en subjektiv vurdering av disse snittene av patologer ved avdeling for patologi, St. Olavs hospital, Trondheim. Denne vurderingen foregår hovedsakelig enkeltvis, for å minimere påvirkning fra andre patologer. Dersom ingen av snittene fra et reagens nådde god fargekvalitet i løpet av prosjektperioden, blir det ikke utført sluttvurdering av dette reagenset.

Kvalitativ metode kan være en egnet metode til dette prosjektet ettersom vurdering av fargekvalitet på vevssnitt er subjektivt. Med subjektiv vurdering kan det være rom for ulik tolkning. I denne sammenhengen vurderes det at kvalitativ metode er tilstrekkelig for dette prosjektet ettersom det er gjort tidligere utprøvinger på reagenset fra produsent. I tillegg er fargeprosessen automatisert, noe som sørger for bedre repeterbarhet og reproduserbarhet av resultatene. Det kan være interessant å se på om patologene gir samme vurdering av de forskjellige fargereagensene. Dette er patologer som er godt kjent med fargekvaliteten til nåværende reagens, og de er derfor godt egnet til å vurdere om et eventuelt nytt reagens kan erstatte dette, på grunnlag av kravene som er satt. Overensstemmelse mellom vurdering fra patologene vil være et mål for å komme fram til et svar på problemstillingen.

2.5 PROSEDYRER OG OPTIMALISERING

Ved utprøving av fargereagensene tar vi utgangspunkt i protokollen som tilhører hver enkelt produsent. Produsentene har gjort utprøvinger ved egne laboratorier, og kommet fram til en protokoll som skal gi gunstig ytelse av reagenset. Etter mikroskopisk vurdering av resultatene ut ifra protokollen skal mulige justeringer vurderes, for om mulig optimalisere fargekvaliteten.

Faktorer som kan justeres:

- Destillert vann vs. springvann
- Lenger/ kortere tid i fargereagenser
- Med/ uten tilbehørsreagenser fra produsenten
- Alkoholkonsentrasjon etter fargereagenser
- Rekkefølge på protokollen

Framgangsmåten for utprøvingene med eventuelle justeringer som gjennomføres i prosjektet blir beskrevet nærmere for hvert fargereagens.

2.5.1 HISTOLAB

Fargeprotokoll for utføring av farging med Histolab sine fargereagenser ble gitt av produsent. Vedlegg 1 viser den opprinnelige fargeprotokollen fra Histolab. Leverandør angir tørketid for ufargede snitt. Veileder på avdeling for patologi mente at tørketiden ikke burde ha stor betydning for resultatet. For å være sikre, sammenlignes anbefalt tørketid mot tørketider som brukes for nåværende protokoll.

Tørketider: 10 min. x 60°C, 10 min. x 80°C + 10 min. x 60°C, og 30 min. x 35°C + 10 min. x 60°C.

Leverandøren benytter tre bad med xylen som klaringsmiddel, mens det i utprøvingen benyttes fire bad med TissueClear, slik som laboratoriets nåværende fargeprosedyre, for å begrense bruk av det miljøskadelige stoffet xylen i laboratoriet. Dette skal ikke påvirke fargekvaliteten ettersom TissueClear er tilsvarende xylen.

Protokollen anbefaler destillert vann før Mayer Hematoxylin reagenset. Instrumentet har kun tilgang på vann fra kran. Det gjøres da utprøvinger med både RO-vann i bad og med springvann som sirkulerer på instrumentet. Det er ikke oppført spesifikasjoner for temperaturen til vannet, så lunkent vann benyttes. Som utdypet tidligere i oppgaven så er det fordeler med å benytte rensset vann til vevsfarging. På bakgrunn av teorien diskutert under 1.7.2 Vannkvalitet, vil bruk av rensset vann, slik som RO vann, gi en skarpere farge i vevet. Det kan være verdt å merke seg at leverandøren spesifiserte bruk av destillert vann, mens det i prosjektet brukes RO vann med bakgrunn i tilgjengelighet.

I leverandørens protokoll står det at det skal påføres vann før og etter eosin, deretter etterfulgt av 96% alkohol. I et forsøk gjøres det et avvik fra protokollen ved å tilsette 70% alkohol etter vann og før 96% alkohol. Dette vises i vedlegg 2. Dette gjøres etter en e-post utveksling med

Histolab. Eosin fra Histolab er løst i alkohol, likt som laboratoriets nåværende eosin reagens som er løst i 70% alkohol. I den nåværende protokollen skylles snittene kun i sprit, i motsetning til Histolab sine protokoller der snittene skal skylles i vann etter eosin. Histolab svarer at det er mulig å bruke begge, avhengig av hvilken fargeintensitet som er ønskelig internt. Kontaktpersoner på Histolab forklarer at man også kan skylle med vann etter eosin, og deretter 70% etanol og 96% etanol. Ifølge likt løser likt prinsippet vil dette gi en svakere fargeintensitet.

Etter vurdering av snittene etter ovenfornevnte justeringer til protokollen, gjøres utprøvinger på forskjellige tider i eosin, på grunn av den rosa fargeintensiteten. Det gjøres utprøvinger med protokollens anbefaling på 30 sekunder, i tillegg til 45 sekunder og 1 minutt i eosin. Den økte tiden i eosin burde gi vevet en mer intens eosinofil farge. Eosinofil vil si at det tar opp den sterke rosa fargen fra eosinet.

2.5.2 SAKURA

Protokoll for utførelse av fargingen ble gitt av produsent. Vedlegg 5 viser den opprinnelige fargeprotokollen fra Sakura. Leverandøren benytter to bad med xylen som klaringsmiddel, mens det i utprøvingen ble benyttet tre bad med TissueClear som i nåværende fargeprosedyren for å begrense bruk av det miljøskadelige stoffet xylen i laboratoriet. Dette skal ikke påvirke fargekvaliteten ettersom TissueClear er tilsvarende xylen.

I tillegg viser protokollen fra Sakura at snittet skal dyppes i springvann og deionisert vann før hematoxylin. Utføring av fargingen er lik som protokollen, men i tillegg gjøres det en utprøving der snittet kun dyppes i springvann før hematoxylin. Dette gjøres med bakgrunn i tilgjengelighet, ettersom instrumentet på laboratoriet kun har tilførsel på springvann. Det er ikke oppgitt spesifikasjoner for temperaturen for vannet, så lunkent vann benyttes. Som utdypet tidligere i oppgaven så er det fordeler med å benytte renset vann til vevsfarging. På bakgrunn av teorien diskutert under 1.7.2 vannkvalitet, vil bruk av renset vann, slik som RO vann, gi en skarpere farge i vevet. Det kan være verdt å merke seg at leverandøren spesifiserte bruk av destillert vann, mens det i prosjektet brukes RO vann på bakgrunn av tilgjengelighet.

Etter vurdering av snittene etter ovenfornevnte justeringer til protokollen, blir det gjort utprøvinger på forskjellige tider i eosin. Dette er for å optimalisere den eosinofile fargeintensiteten i tilfelle patologene skulle mene at tidligere snitt ble overfaget med eosin. Dette førte til at den eosinofile fargen ble utvisket og svak. Det gjøres utprøvinger med protokollens anbefaling på 3 minutter, i tillegg til 90 sekunder og 2 minutter i Eosin. Disse tidsvariasjonene burde gi vevet mindre fargeintensitet.

Pakningsvedlegget til eosin, fra Sakura, opplyser ikke om hvilket løsemiddel fargereagenset er fortynnet i. Derfor gjøres det også utprøvinger med 30 sekunder i vann etter eosin, i motsetning til protokollens anbefaling om 70% alkohol. Man kan anta at protokollen fra leverandør, med 70% alkohol etter eosin, gir optimal fargekvalitet. Fortsatt kan det være interessant å se på hvordan variabler påvirker fargekvaliteten. Dersom eosin reagenset er mest alkoholløselig burde ikke dette trinnet gi en stor fargeforskjell. Dersom eosin reagenset er vannløselig, blir fargen ekstrahert av vannet, og snittet får en svakere eosinofil fargeintensitet. Det er nyttig å vite hvordan fargereagenset reagerer på vann dersom det senere blir nødvendig å justere fargeintensiteten.

2.5.3 DAKO

Fargeprotokoll for utføring av fargingen ble gitt av produsent. Vedlegg 3 viser den opprinnelige fargeprotokollen fra Dako.

Leverandøren benytter to bad med xylen som klaringsmiddel, mens det i utprøvingen ble benyttet tre bad med TissueClear som i nåværende fargeprosedyre for å begrense bruk av det miljøskadelige stoffet xylen i laboratoriet. Dette skal ikke påvirke fargekvaliteten ettersom TissueClear er tilsvarende xylen.

I tillegg viser protokollen fra Dako at snittet skal dyppes i springvann og deionisert vann før hematoxylin. Utføring av fargingen gjøres likt som protokollen, men i tillegg gjøres det en utprøving der snittet kun dyppes i springvann før hematoxylin. Dette gjøres på bakgrunn av tilgjengelighet, ettersom instrumentet på laboratoriet kun har tilførsel på springvann. Det er ikke oppført spesifikasjoner for temperaturen til vannet, så lunkent vann benyttes. Som utdypet tidligere i oppgaven så er det fordelaktig med å benytte rensset vann til vevsfarging. På bakgrunn av teorien diskutert under 1.7.2 vannkvalitet, burde bruk av rensset vann, slik som RO vann, gi en skarpere farge i vevet. Det kan være verdt å merke seg at leverandøren spesifiserte bruk av deionisert vann, mens det i prosjektet brukes RO vann på bakgrunn av tilgjengelighet.

På bakgrunn av vurderinger av snittet etter overnevnte justeringer, ble det i tillegg gjort utføring med og uten bluing buffer. Bluing buffer har til hensikt å omdanne rødlig hematoxylin farge til blå. På grunn av sterk blåfarge på hematoxylin i snittet ble det satt spørsmål ved om dette steget kunne hoppes over. Denne utprøvingen ble hovedsakelig vurdert med bakgrunn på reagensenes kostnader. Destillert vann etter hematoxylin ble da også fjernet, ettersom dette ble brukt til å skylle bort overflødig hematoxylin før blåing av reagenset.

Teoretisk sett burde dette forårsake at basofile strukturer i vevet ikke får like skarp blåfarge. Basofil vil si vev som farges av basiske stoffer, slik som hematoxylin.

Etter vurdering av snittene gjøres det ikke en utprøving på forskjellige tider. Fargekvaliteten oppnår ikke et resultat som oppfyller kravene til samme grad som tidligere reagenser. For å bespare tid i dette prosjektet, ble det derfor ikke gått videre med flere utprøvinger.

2.5.4 VWR

Leverandøren oppgir ingen anbefalt fargeprotokoll for sine reagenser, og det ble derfor tatt utgangspunkt i avdelingens nåværende HE-fargeprotokoll, vist i vedlegg 4. På grunn av mangel på protokoll, kan en forvente flere utprøvinger før gunstig farging for reagenset er nådd.

Det gjøres også utprøvinger med ulik lengde i hematoxylin og eosin, og kombinasjoner av disse variasjonene, som vist i tabell 12. På bakgrunn av at eosin reagenset kun er løst i 1% alkohol, er det mest vannløselig. Det gjøres derfor også utprøvinger med vann i stedet for alkohol før eosin for at eosin fargereagenset lettere skal komme til i vevet. Bruker lunkent vann i utprøvingen, slik som ved utprøvingen av de andre fargereagensene.

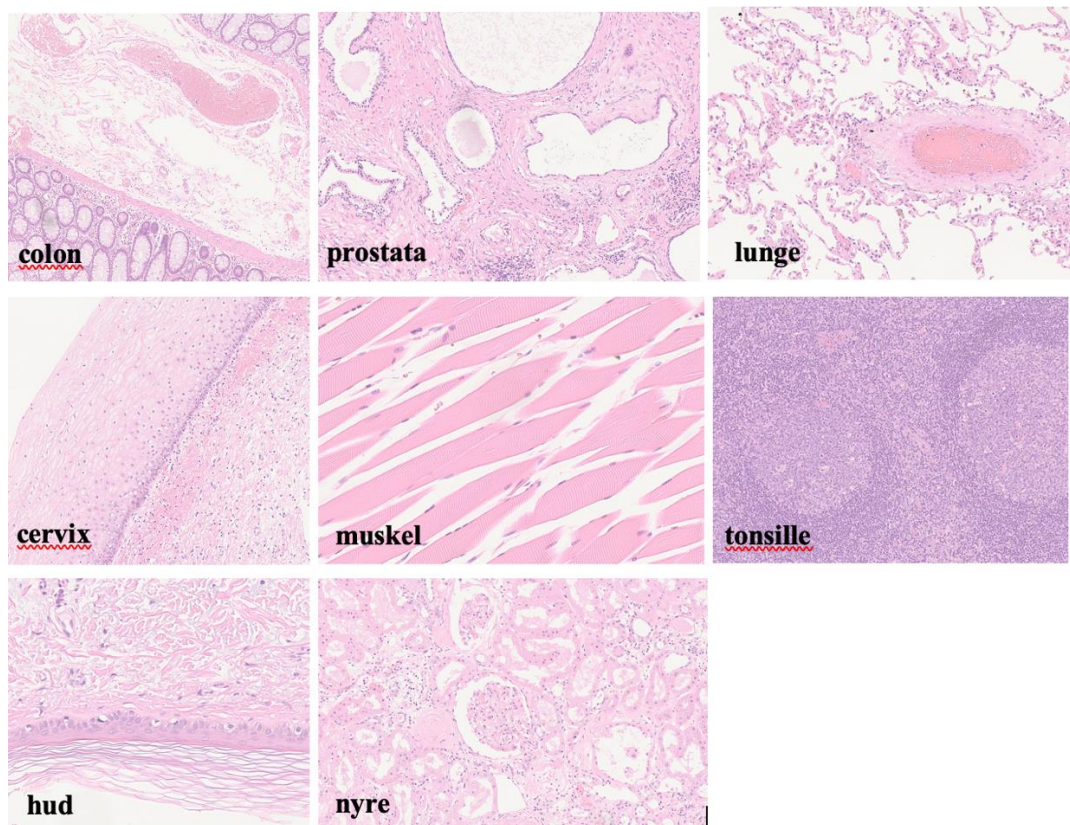
Tabell 12: Oversikt over tidsvariasjoner som viser hvor mange minutter snittene var i både hematoxylin og eosin. De to siste radene i tabellen utføres med tilsats av vann før eosin, i motsetning til etanol.

Hematoxylin	Eosin
3,5 minutter	3 minutter
3 minutter	3 minutter
3,5 minutter	3,5 minutter
3 minutter	3,5 minutter
3 minutter	3 minutter
3 minutter	5 minutter

3.0 RESULTATER

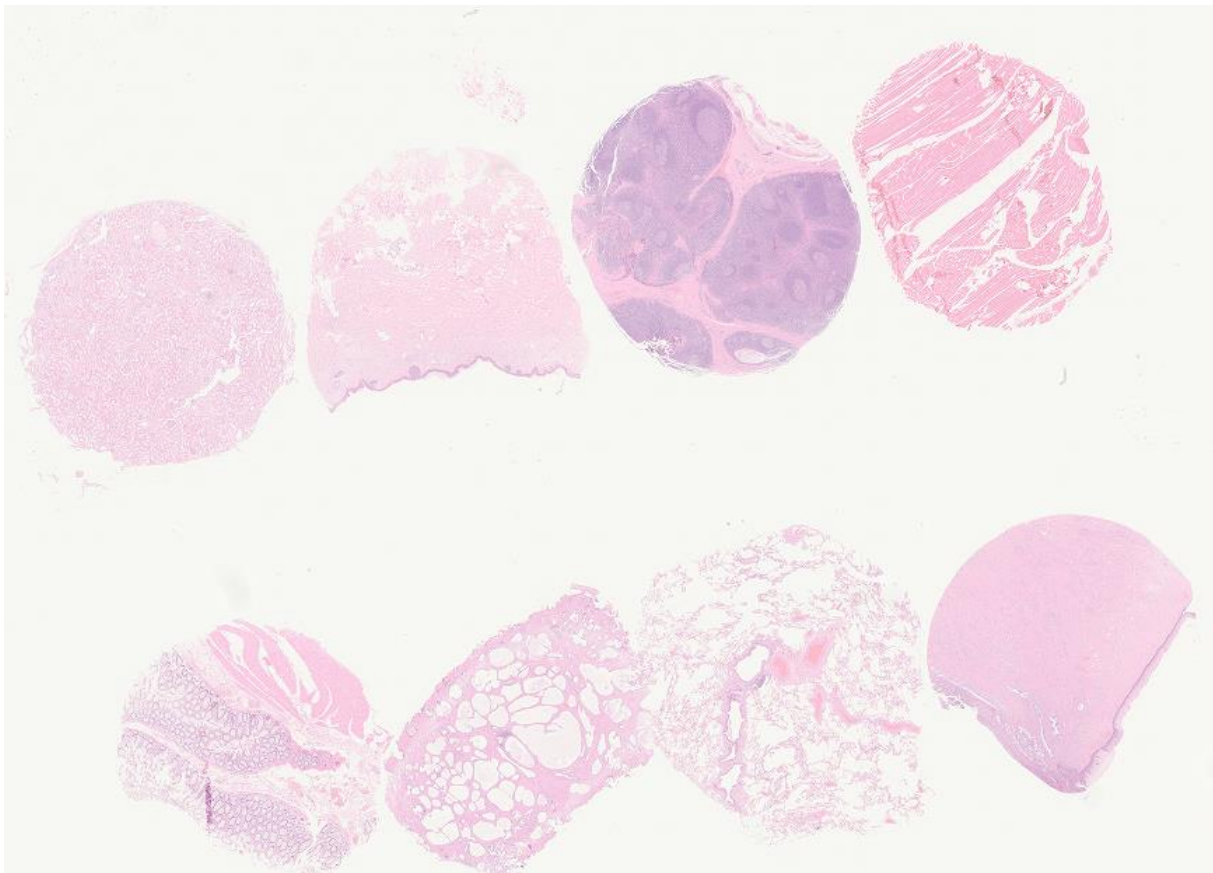
3.1 «IN-HOUSE» H&E FARGEREAGENS

Snitt 1 og 2 ble farget i henhold til laboratoriets nåværende protokoll som vist i vedlegg 4. Snitt 1 ble tatt fra multivevsblokk 1. Resultatet til fargingen vises i figur 7. Ved mikroskopering observeres det god snittkvalitet. Vevssnittet ligger flatt uten folder, og vevet har jevn tykkelse. I tillegg er det ingen luftbobler eller urenheter til stede. Vevene er jevnt farget, og det er jevn fargeintensitet på tvers av vevene. Det er svak rosa farge i cellecytoplasma. Kjernedetaljene er synlige, og kjernene har tydelig membran med synlig kromatin. Epitelet i epidermis har rosa skjær. Erytrocytter er farget lakserosa og er lette å se. Da snittene ble farget med laboratoriets nåværende protokoll var ikke benmarg tilgjengelig. Det er derfor ikke fargerresultater for dette vevet. På tvers av de ulike vevstypene er det tre rosa nyanser, som gir gode kontraster. De spesifikke vevstypene er farget riktig i henhold til 1.6 HE reagenser og ulike organene.



Figur 7: Figuren illustrerer snitt 1. Her er snitt 1 tatt fra multivevsblokk 1, farget med laboratoriets nåværende fargereagenser. Alle vevene er jevnt farget og har samme fargeintensitet. Man kan se tre ulike rosanyanser. Kjernedetaljene er synlige, og kjernene har tydelig membran med synlig kromatin. Epitelet i epidermis har rosa skjær. Muskulaturen er sterkt rosa farget og tverrstripene er synlige. Erytrocytter er farget lakserosa og er lette å differensiere. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av fargerresultatet*

Figur 8 viser snitt 2, som er tatt fra multivevsblokk 2. Vevene i snitt 2 er farget med samme framgangsmåte som snitt 1, og fargerresultatet er tilnærmet likt. Se kommentarer til snitt 1 ovenfor.



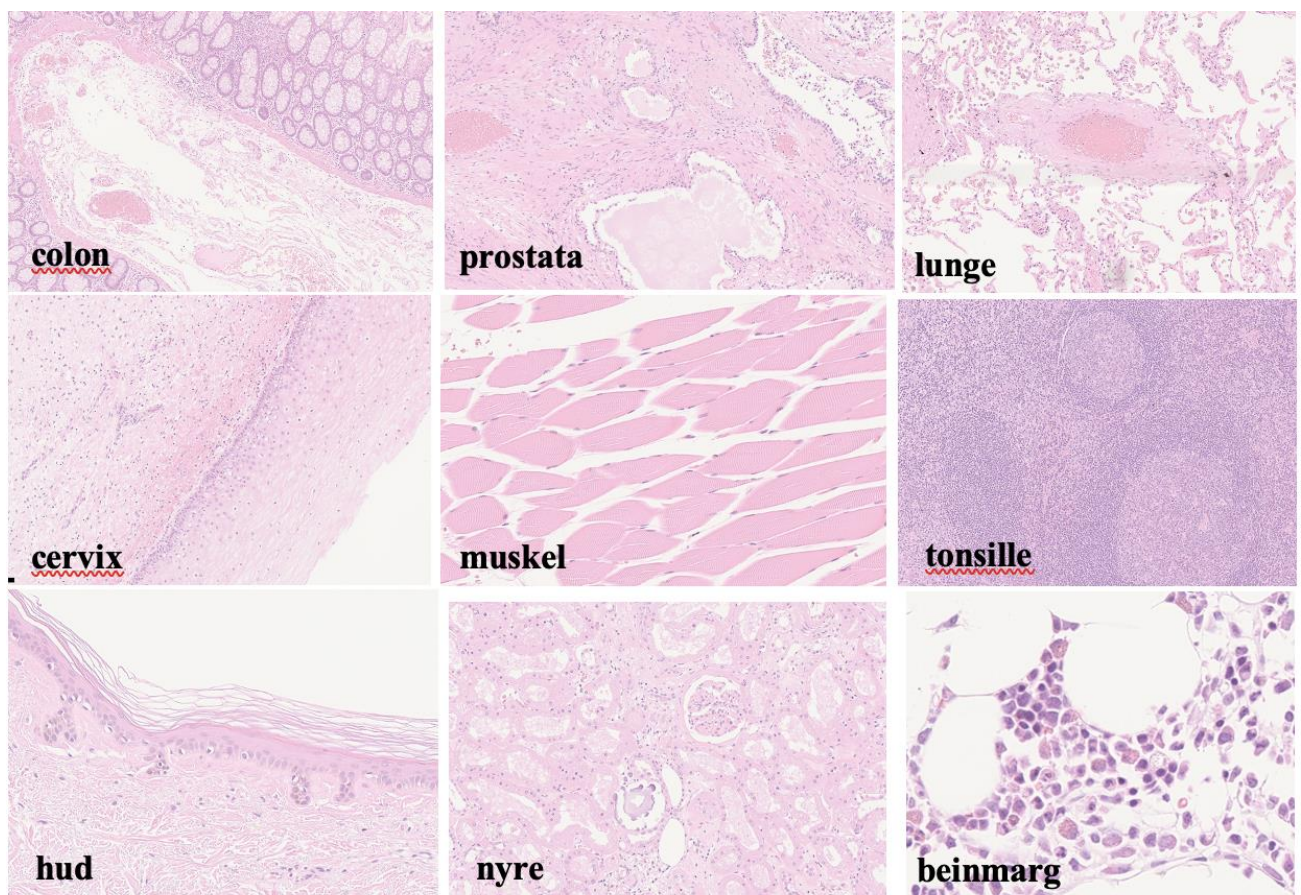
Figur 8: Figuren illustrerer snitt 2. Her er snitt 2 tatt fra multivevsblokk 2, farget med laboratoriets nåværende fargereagenser. Orientering av vevstypene finnes under punkt 2.1 Prøvemateriale. Alle vevene er jevnt farget og har samme fargeintensitet. Man kan se tre ulike rosanyanser. Kjernedetaljene er synlige, og kjernene har tydelig membran med synlig kromatin. Epitelet i epidermis har rosa skjær. Muskulaturen er sterkt rosa farget og tverrstripene er synlige. Erythrocytter er farget lakserosa og er lette å differensiere. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av fargerresultatet*

3.2 H&E FRA HISTOLAB

I utgangspunktet ble protokollen fra leverandøren fulgt. På grunn av kontrast i tørketid i protokollen til Histolab og laboratoriets nåværende prosedyre ble det gjort utprøvinger på tre tørketids- og temperaturvariasjoner. Dette ga ingen forskjell i fargekvaliteten. Videre ble det derfor kun tatt utgangspunkt i snitt med tørketid på 10 minutter i 60°C.

Snitt 3, tatt fra multivevsblokk 1, fulgte protokoll fra Histolab, men med en tørketid på 10 minutter i 60°C. Resultatet fra snitt 3 er vist i figur 9. Ved mikroskopering observeres det god snittkvalitet. Vevssnittet ligger flatt uten folder, og vevet har jevn tykkelse. I tillegg er det ingen luftbobler eller urenheter til stede. Vevene er jevnt farget, og det er lik fargeintensitet på tvers av vevene.

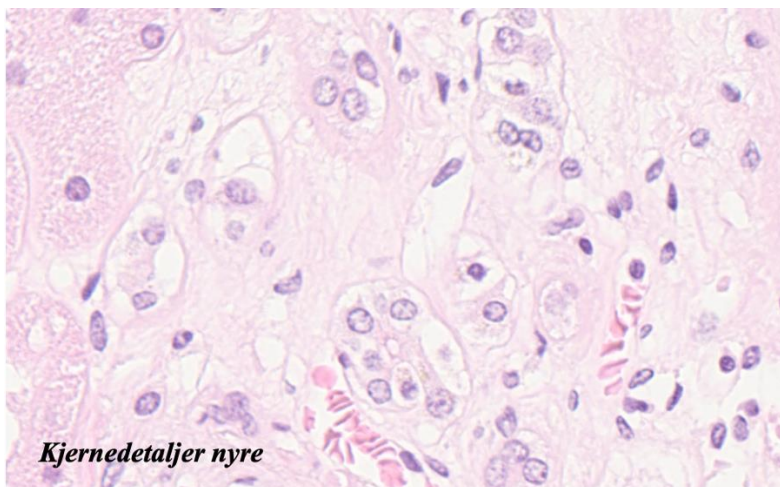
Cellenes cytoplasma ble farget svakt rosa. Cellekjerner blir farget lilla, og kjernedetaljene er tydelige. Erytrocytter i blodårer farges oransje-rosa. I benmarg er det mulig å gjenkjenne eosinofile granulocytter ved at det er tydelig rød skjær i cytoplasma. Epitelet i epidermis er farget rosa uten blåtoner. Muskulatur blir farget sterkere rosa, og tverrstripene er synlige. Dette tilfredsstillende kravene i punkt 1.10 Krav til reagenser. De spesifikke vevstypene er også farget riktig i henhold til 1.6 HE reagenser og ulike organene.



Figur 9: Figuren illustrerer Snitt 3. Her er snitt tatt fra multivevsblokk 1 og farget med histolab fargereagenser. Fargeprosedyren fra produsent ble fulgt, med unntak av en tørketid på 10 minutter i 60°C. De ulike vevene er navngitt. Alle vevene er jevnt farget og har samme fargeintensitet. Cytoplasma har en svak rosa farge, cellekjerner er lilla farget og kjernedetaljer kan klart sees. I tillegg er det kontrast mellom de ulike celle og vevstypene. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av farger resultatet*

De nedenfor nevnte snittene er variasjoner av protokollen utført på snitt 3. Disse utdypes ikke i like stor grad, ettersom de ikke fører til en forbedring i fargekvaliteten.

Snitt 4, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført etter protokoll til leverandør med unntak av at det ble benyttet springvann som erstatning for destillert vann før hematoxylin. Alle vevene ble jevnt farget med samme fargeintensitet, men erstatningen resulterte i svakere eosin farge. Erytrocytter er farget røddlig, og kan lett differensieres. Vevet opprettholdt klare kjernedetaljer. Dette er illustrert i figur 10.



Figur 10: Figuren viser nyre-vev fra snitt 4, tatt fra multivevsblokk 1. Det er en svak rosa farge i cytoplasma til cellene i vevet. Kjernedetaljene er synlige, det er tydelige kjernemembraner og synlig kromatin. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av farger resultatet*

Snitt 5, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført likt som protokollen fra leverandør med unntak av at vann og 70% alkohol ble tilsatt etter eosin. Til forskjell fra snitt 3 resulterte dette i svært svak eosinofil farge.

Snitt 6, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført likt som protokollen fra leverandør med unntak av at snittene ble stående i eosinløsningen i 45 sekunder. Fargeprosedyren ga lik eosinofil fargeintensitet som den originale protokollen, men kjernedetaljene ble noe uklare.

Snitt 7, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført likt som prøve fire, men her ble snittene stående i eosinløsningen i 60 sekunder. Fargeprosedyren ga veldig sterk eosinofil farge over alle vevene, og noe dårligere kjernedetaljer.

Etter vurderingen av resultatene ovenfor, var det snitt 3 som oppnådde en fargekvalitet som oppnådde kriteriene oppgitt under punkt 1.10 Krav til reagenser.

3.2.1 KOMMENTARER FRA PATOLOGER: HISTOLAB

Fire ulike patologer vurderte separat snitt 3.

En av patologene kommenterer fargingen av benmarg, og mente at denne har en fin og god oversikt, men allikevel ikke like jevn og sterk som dagens reagenser. En annen patolog sier seg uenig, og mener at cytoplasma i de eosinofile granulocytene er mer rosa enn rødt, og dermed ikke gir god nok kontrast.

To av patologene mener at spesielt prøven med hud ikke er god nok, da vevet blir for lyst i fargingen. En av patologene som spesialiserer seg på hud kommenterer også at glatt muskulatur rundt hårsekker mangler rødkjær for å lettere kunne differensieres.

Alle patologene sier henholdsvis at fargekvaliteten til snittet er for blek og blassere enn dagens fargeprosedyre. Samtlige mente at vev fra tarm, lymfoide vev, og nyre så ok ut til tross for blassere farge enn de er vant med.

Generelt kan man si at alle mente at fargeprøvene ikke ga like gode kontraster mellom ulike celler og vevstyper som dagens fargeprosedyre. Det som gikk mest igjen blant alle patologene var at vevstypene i snittet ikke var farget til tilstrekkelig fargeintensitet, etter deres preferanse.

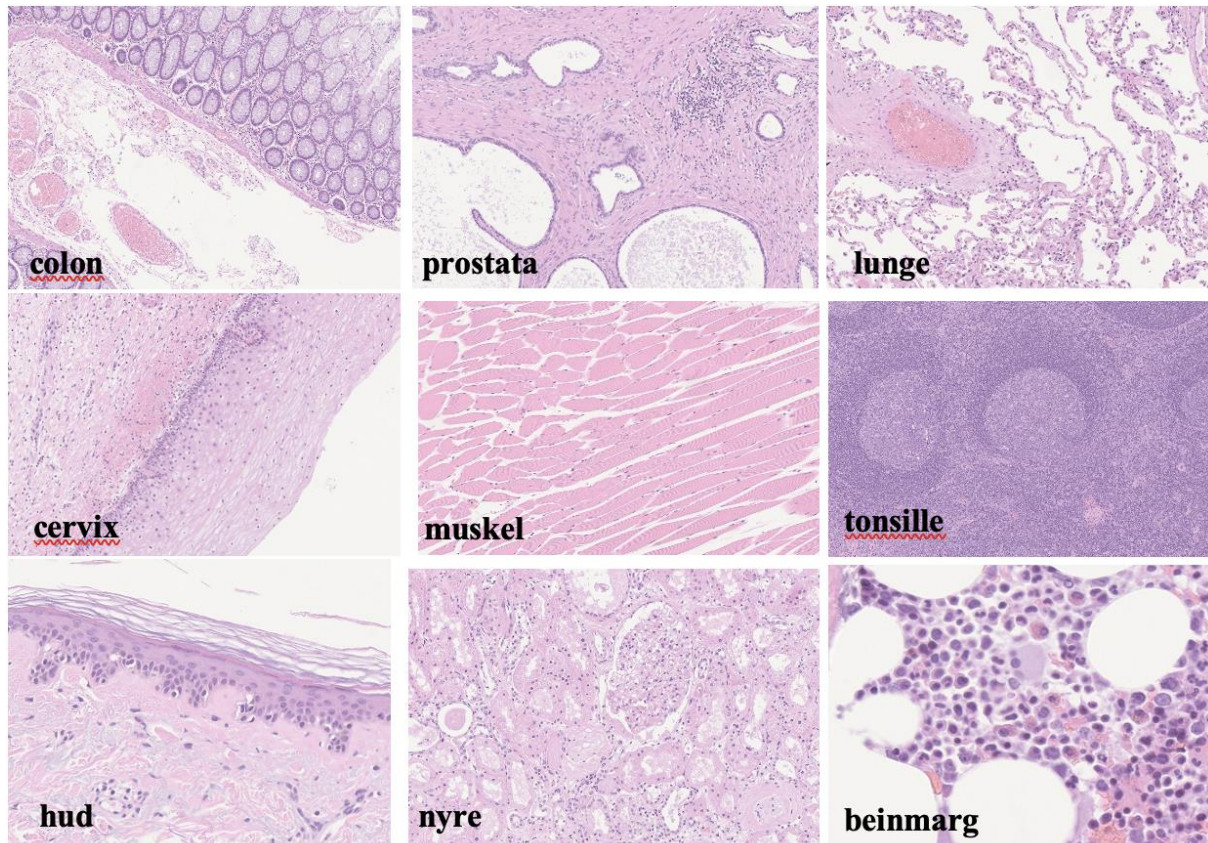
3.3 H&E FRA SAKURA

Ved utprøving av Sakura fargereagenser ble det først tatt utgangspunkt i protokollen som fulgte med. Ved første utprøving ble det observert unormal farging med manglende vevsstruktur. For å være sikker på at ikke noe annet hadde gått galt i fargeprosessen ble prosedyren gjentatt en gang til. Det nye snittet ble kalt snitt 8, og er tatt fra multivevsblokk 1. I tillegg ble prosedyren gjentatt på snitt 9 tatt fra multivevsblokk 2. Dette ga mer overensstemmende resultater. Det første resultatet ble forkastet.

Snitt 8 er vist i figur 11. Ved mikroskopering observeres det god snittkvalitet. Vevssnittet ligger flatt uten folder, og vevet har jevn tykkelse. I tillegg er det ingen luftbobler eller urenheter til stede. Vevene er jevnt farget, og det er lik fargeintensitet på tvers av vevene.

Cytoplasma er rosa farget, og cellekjerner er lilla. Kjernedetaljer kan klart sees. Man kan se klare kontraster i eosinofil farging mellom muskulatur, erythrocytter og cytoplasma.

Muskulaturen er sterkt rosa farget, med noe rødskjær, og tverrstripene kan sees. Erytrocytter har oppnådd en oransje-rosa farge, og kan tydelig differensieres. I tillegg er cytoplasma til basofile granulocytter oransje-rosa. Dette tilfredsstiller kravene i punkt 1.10 Krav til reagenser. Et unntak til dette er epitelet i epidermis, som er rosa med noe blåskjær. De andre vevstypene er farget riktig i henhold til 1.6 HE reagenser og ulike organene.



Figur 11: Figuren illustrerer snitt 8. Her er snitt 8, tatt fra multivevsblokk 1 farget med Sakura fargereagenser. Fargeprosedyren fra produsent ble fulgt. De ulike vevene er navngitt. Alle vevene er jevnt farget og har samme fargeintensitet. Cytoplasma er rosa farget, og cellekjerner er lilla. Kjernedetaljer kan klart sees. Cytoplasma til basofile granulocytter er oransje-rosa. Tre forskjellige rosa toner kan sees. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av farger resultatet*

De nedenfor nevnte snittene er variasjoner av protokollen utført på snitt 8. Disse utdypes ikke i like stor grad, ettersom de ikke fører til en forbedring i fargekvaliteten.

Farging av snitt 9, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført etter protokoll fra leverandør med unntak av at destillert vann før hematoxylin ble byttet ut med springvann. Dette ga ikke noe utslag i fargekvaliteten på snittet.

Snitt 10, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført etter protokoll fra Sakura, med unntak av å ha snittet i eosin i 90 sekunder. Dette førte til at den eosinofile fargen ble utvasket og svak. I tillegg ble vevsstrukturene, spesielt tonsille, overfarget av hematoxylin.

Snitt 11, tatt fra multivevsblokk 1, ble utført med 120 sekunder i eosin. Dette ga stor forskjell fra snitt 10, men svakere eosinofil farge generelt i forhold til snitt 8.

Farging av snitt 12, tatt fra multivevsblokk 1, ble gjort etter protokoll fra leverandør med unntak av at vann ble tilsatt snittene etter eosin. Dette ga ingen forskjell i fargekvaliteten.

Etter vurdering av resultatene ovenfor ble det vurdert at snitt 8 oppnådde en fargekvalitet som var nærmest kriteriene under punkt 1.10 Krav til reagenser.

3.3.1 KOMMENTARER FRA PATOLOGER: SAKURA

Fem patologer vurderte snitt 8, i tre puljer. Det vil si at det var to par som vurderte to og to, mens en av patologene utførte vurderingen individuelt.

Første paret med patologer kommenterte tidlig på at det var synlig mindre farge enn ved vevsfarging med bruk av den nåværende protokollen. I tillegg mente de at vevene i sin helhet ble farget for basofilt, og at de hadde foretrukket mer eosinofil farge. Dette var spesielt et problem i epidermis, hvor de mente av vevet ble for blått.

Det andre paret med patologer brukte lenger tid før de kom til konklusjonen at det var nedsatt fargeintensitet ved bruk av Sakura sine fargereagenser med protokollen som ble fulgt for snitt 8. Etter sammenligning med snitt 1, som er farget med dagens reagenser, syntes de det ble tydelig at snitt 8 var mer blå i fargen. Et annet moment de nevner er at kjernefargen er sterkere hos vevstypene i snitt 8, noe som kan være misvisende når man er vant til svakere kjernefarge.

Siste patologen, som utførte vurderingen av snittet individuelt, mente at mange av vevene ble tilstrekkelig farget ved bruk av Sakura sine fargereagenser. Patologen kommenterte positivt på de fleste vevene. Det var kun tarmvevet som ble utpekt som blass i fargen.

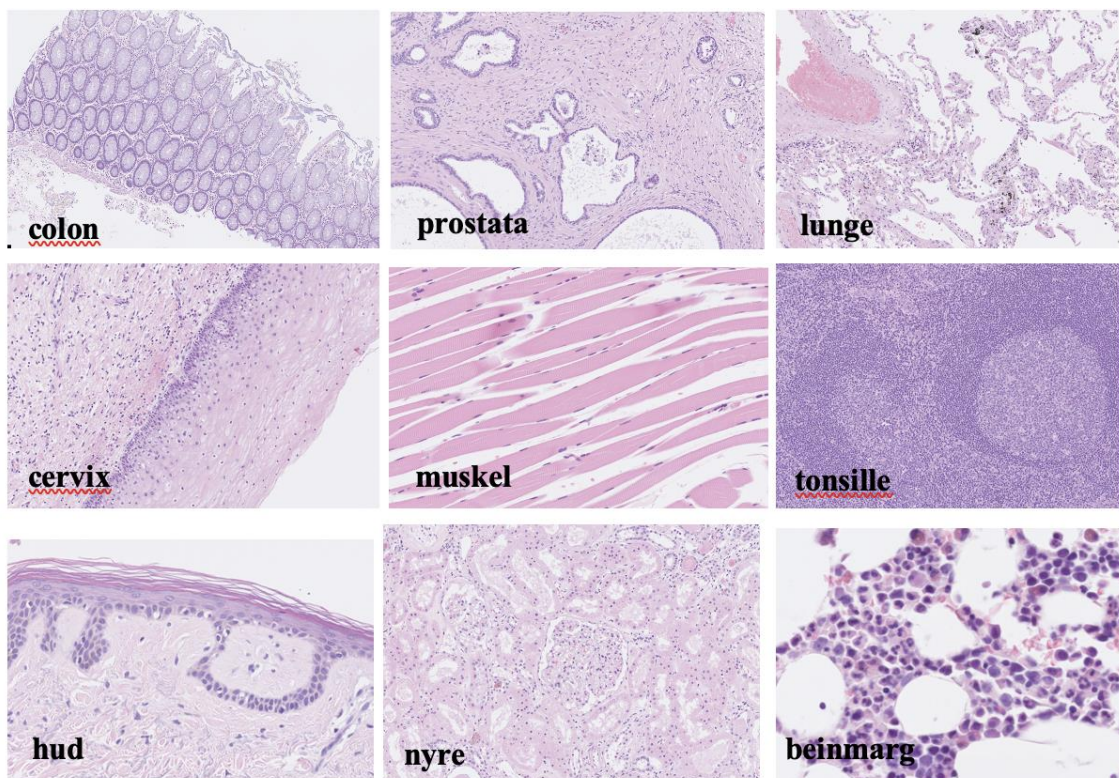
Generelt kan man si at flere var enige om at vevsfarging med Sakura fargereagens ga mer blåskjær enn ønskelig, og at enkelte vev ble blassere i fargen enn de er vant med.

3.4 H&E FRA DAKO

Ved utprøving av Dako fargereagenser ble det først tatt utgangspunkt i protokollen som fulgte med. Dette ble utført på snitt 13, tatt fra multivevblokk 1. I figur 12 kan man se resultatene til snitt 13 etter farging. Ved mikroskopering observeres det god snittkvalitet. Vevssnittet ligger flatt uten folder, og vevet har jevn tykkelse. I tillegg er det ingen luftbobler eller urenheter til stede. Vevene er jevnt farget, og det er lik fargeintensitet på tvers av vevene.

Cytoplasma er svakt rosa farget. Kjerner er lilla farget og kjernedetaljer er tydelige. Muskulatur er sterkt rosa farget, og tverrstriper er synlig. Erytrocytter har en sterk rosa farge. Cytoplasma i eosinofile granulocytter oransje-rosa. Dette tilfredsstillt kravene i punkt 1.10 Krav til reagenser. Vevstypene er også farget riktig i henhold til punkt 1.6 HE reagenser og ulike organene.

Felles for alle vevene er en blålig tone. Dette er spesielt synlig i det keratiniserte plateepitelet i hudvevet, som ifølge kriteriene under punkt 1.10 Krav til reagenser, skal være rosa. Det er også kun to rosa nyanser i vevet, svak rosa og sterk rosa. Dette gir nedsatt kontrast.



Figur 12: Figuren illustrerer snitt 13. Her er snitt 13, tatt fra multivevblokk 1, farget med Dako fargereagenser. Fargeprosedyren fra produsent ble fulgt. Alle vevene er jevnt farget og har samme fargeintensitet. Cytoplasma er svakt rosa farget. Kjerner er lilla farget og kjernedetaljer kan sees. Muskulatur er sterkt rosa farget, og tverrstriper er synlig. Cytoplasma i basofile granulocytter er rosa. Det er en blålig tone over alle vevene, og kun to rosa toner synlig i vevet. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av fargerresultatet*

De nedenfor nevnte snittene er variasjoner av protokollen utført på snitt 13. Disse utdypes ikke i like stor grad, ettersom de ikke fører til en forbedring i fargekvaliteten.

Farging av snitt 14, tatt fra vevsblokk 1, ble utført etter protokollen til Dako, men uten bluing reagenset. Dette ga minimale endringer fra snitt 13, og ble derfor ikke brukt som et utgangspunkt i videre utprøving.

Snitt 15 ble farget i henhold til protokollen fra Dako, men med springvann i stedet for destillert vann. Dette resulterte i at vevet fikk svak eosinofil og basofil farge. Snittet ble derfor ikke brukt som et utgangspunkt i videre utprøving.

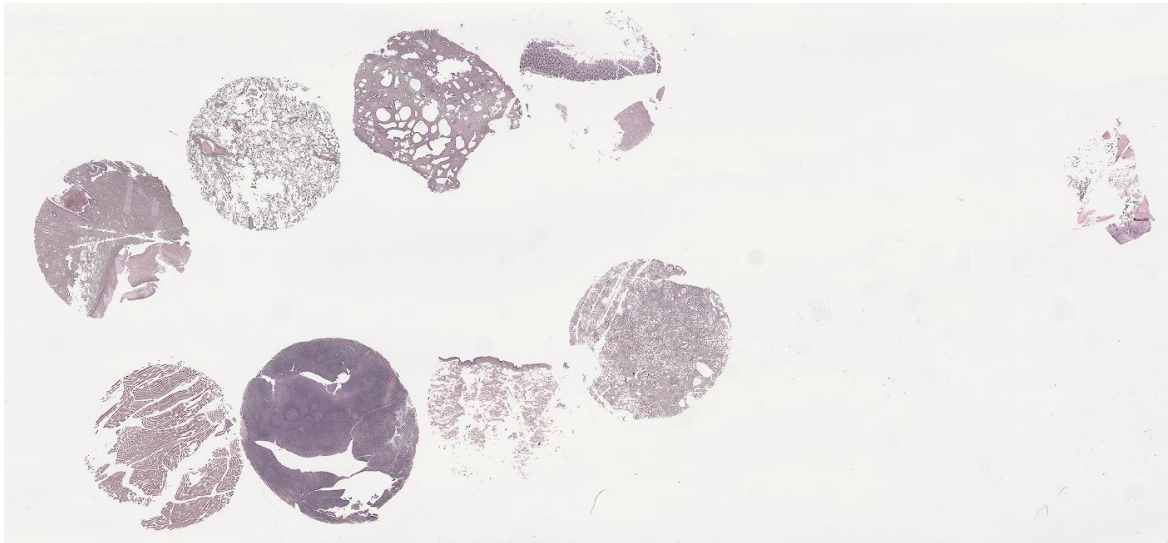
Under tiden som prosjektet var gjennomført oppnådde ikke Dako fargereagensene en fargekvalitet som var sammenlignbar med laboratoriets nåværende fargereagenser, basert på fargekriteriene under punkt 1.10 Krav til reagenser. Vevsprøvene farget med Dako fargereagens ble derfor ikke vist til patologene på avdelingen.

3.5 H&E FRA VWR

VWR sine fargereagenser kom ikke med protokoll. Protokollen fra laboratoriets nåværende fargereagens ble derfor benyttet for å skaffe et utgangspunkt.

Snitt 16, tatt fra multivevsblokk 1, ble farget med VWR sine fargereagenser og protokollen fra laboratoriets nåværende fargereagenser ble fulgt. Ved mikroskopering observeres det god snittkvalitet. Vevssnittet ligger flatt uten folder, og vevet har jevn tykkelse. I tillegg er det ingen luftbobler eller urenheter til stede. Snittet er derimot ujevnt farget på tvers av vevstypene.

Man kan tydelig se stor kontrast på disse resultatene, i figur 13 på neste side, i forhold til resultatene fra laboratoriets nåværende prosedyre i figur 7. Svært lite av eosin fargereagenset har festet seg til vevet. I tillegg er vevene overfarget av hematoxylin, i så stor grad at kjernedetaljer ikke er synlige. Det er kun en svak rosa tone i noen av vevene, og ikke mulig å differensiere mellom cytoplasma, muskulatur og erytrocytter. Dette tilfredsstillende ikke kravene i punkt 1.10 Krav til reagenser, og de spesifikke vevstypene farges ikke riktig i henhold til punkt 1.6 HE reagenser og ulike organene.

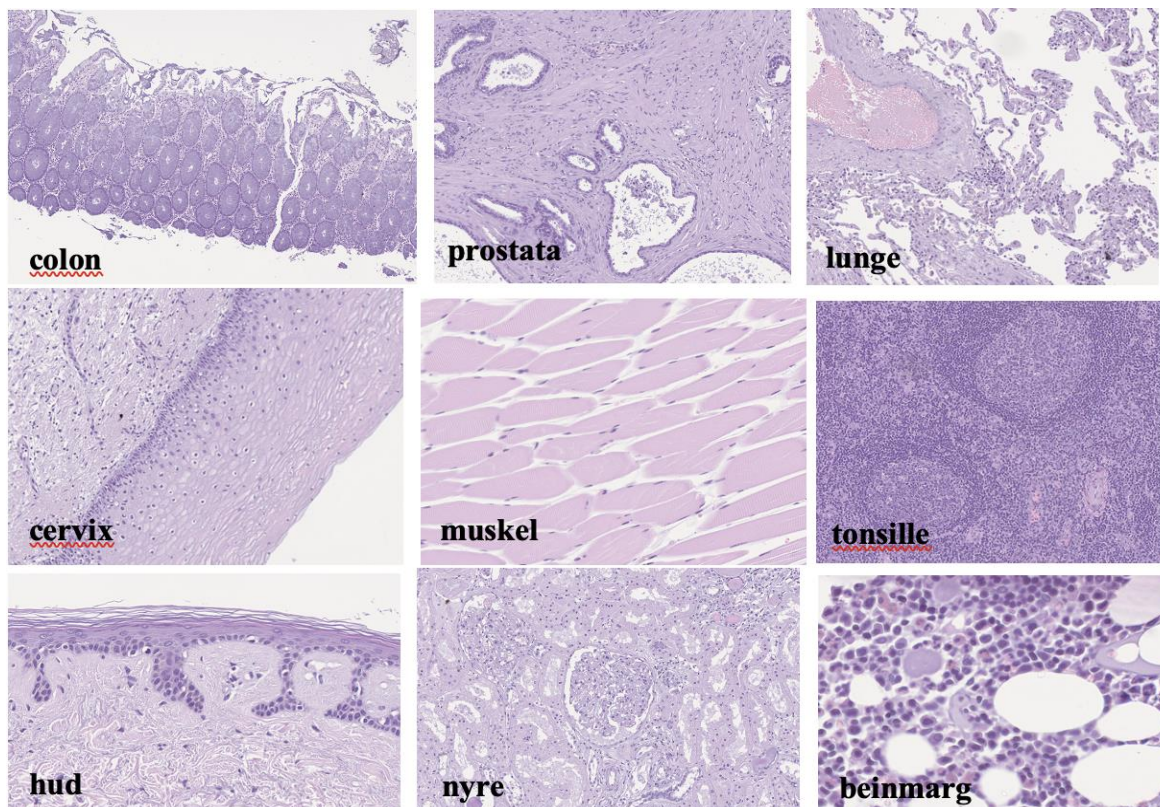


Figur 13: Figuren illustrerer snitt 16. Her er snitt 16, tatt fra multivevsblokk 1, farget med VWR fargereagenser. Fargeprosedyren fra laboratoriets nåværende prosedyre ble fulgt. Orientering av vevene finnes under punkt 2.1 Prøvemateriale. Det er veldig begrenset med eosinofil farge som har festet seg til vevet. Vevene er overfarget med hematoxylin, og kjernestrukturer kan ikke sees. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av farger resultatet*

Ved farging av snitt 17 ble det gjort justeringer på lengden snittet ble farget med hematoxylin og eosin. Snittet lå i fargekar med hematoxylin i 4 minutter, og fargekar med eosin i 3 minutter. Dette gjorde stor forskjell i farger resultatet.

I figur 14 kan man se at alle vevene i snitt 17. Ved mikroskopering observeres det god snittkvalitet. Vevssnittet ligger flatt uten folder, og vevet har jevn tykkelse. I tillegg er det ingen luftbobler eller urenheter til stede. Vevene er jevnt farget, og det er lik fargeintensitet på tvers av vevene.

Cytoplasma er svakt rosa farget. Kjerner er lilla farget og kjernedetaljer kan sees. Kjernene har tydelig kjernemembran og kromatinet er synlig. Epitelet i epidermis er svært blåfarget. Muskulatur er svært svakt rosa farget, og tverrstriper er noe synlig. Erytrocytter er svakt rosa farget. Eosinofil farge i benmarg er noe ujevn, der kun noen av de eosinofile granulocytterne har klart rødskjær i cytoplasma. Generelt sett er det sterk basofil farge i vevene, som tyder på overfarging med hematoxylin. Vevet er også kun farget med en rosa nyanse, som gir dårlige kontraster. Dette tilfredsstillende ikke kravene i punkt 1.10 Krav til reagenser. I tillegg er de spesifikke vevstypene ikke riktig farget i henhold til punkt 1.6 HE reagenser og ulike organene. Dette på grunn av for basofil farge i alle vevene.



Figur 14: Figuren illustrerer snitt 17. Her er snitt 17, tatt fra multivevsblokk 1, farget med VWR fargereagenser. Fargeprosedyren fra laboratoriets nåværende prosedyre ble fulgt, men snittene blir farget i 4 minutter i hematoxylin og 3 minutter i eosin. Cytoplasma er svakt rosa farget, og kjerner er lilla farget og kjernedetaljer kan sees. Muskulatur er svakt rosa farget, og tverstriper er noe synlig. Vevet er kun farget med en rosa nyanse, og gir dårlige kontraster. Det er sterk basofil farge i vevet, som tyder på overfarging med hematoxylin. *Fargekvaliteten avtar ved innskanning, så bildet er ikke en nøyaktig representasjon av farger resultatet*

De nedenfor nevnte snittene er variasjoner av protokollen utført på snitt 17. Disse utdypes ikke i like stor grad, ettersom de ikke fører til en forbedring i fargekvaliteten.

Snitt 18 til 22 ble farget i henhold til tabell 4 under punkt 2.5.4 VWR. Disse variasjonene ga ugunstige fargerresultater. Ved å øke tiden snittene sto i eosin, ble det observert en økt rosa fargeintensitet, men dette på bekostning av differensieringen. Det ble mer rosa farge i vevene, men ikke flere rosa nyanser, og det forble dårlige kontraster. Det ble ikke observert fargeendring i vevet ved korte ned tiden snittene sto i hematoxylin. Ved tilsetning av vann før eosin fargereagenset ble det ikke observert endring i farger resultatet. Disse snittene blir derfor ikke brukt som utgangspunkt for videre vurdering.

Under tiden som prosjektet var gjennomført oppnådde ikke VWR fargereagensene en fargekvalitet som var sammenlignbar med laboratoriets nåværende fargereagenser, basert på fargekriteriene under punkt 1.10 Krav til reagenser og punkt 1.6 HE reagenser og ulike organene. Vevsprøvene farget med VWR fargereagens ble derfor ikke vist til patologene på avdelingen.

4.0 DISKUSJON

For å kunne komme frem til en vurdering av de ulike fargereagensene, slik at det eventuelt kan munne ut i en anbefaling, må det gjøres en samlet vurdering av resultatene.

4.1 KOMMENTAR PÅ RESULTATER

De fleste resultatene ved utprøvinger av Histolab fargereagenser ga forventede resultater. Tørketiden ga, som tidligere antatt, ingen forandringer i fargekvaliteten. Ved bruk av springvann i stedet for RO vann, ble fargekvaliteten noe nedsatt. Dette stemmer overens med hypotesen under punkt 2.5.1 Histolab. Dette kan tyde på at det har vært urenheter i vannet fra kranen, som har påvirket fargingen av vevet. Forslaget fra Histolab om å følge skylling i vann etter eosin med 70% alkohol, ga forventet effekt på fargekvaliteten. På bakgrunn av løseligheten til eosin fra Histolab, vil høyere konsentrasjoner av alkohol ekstrahere fargen fra vevet. Ved en slik utprøving på snitt 5, ble det oppnådd svært svak eosinofil farge, som bekrefter dette. Snittet som ble tatt i eosinløsningen i dobbelt av tiden anbefalt fra leverandør, fikk en forventet økning i fargekvaliteten. Snittet som sto i eosin fargereagenset i 45 sekunder, i motsetning til protokollens anbefalte tid på 30 sekunder, ga liten forandring i den eosinofile fargeintensiteten. Dette viser at en økning på 15 sekunder ikke var tilstrekkelig for å øke mengden fargereagens som ble tatt opp i vevet.

Lignende utprøvinger ble utført for fargereagenser fra Sakura, i tillegg til leverandørens protokoller. Til forskjell fra Histolab, ga utbytting av RO vann med springvann, ingen forskjell i fargekvaliteten på snittet. Dette kan tyde på at fargereagensene fra Sakura er motstandsdyktig mot urenheter. Det ble også gjort utprøvinger med nedsatt tid i eosin reagenset. Dette ga, som forventet, en svakere eosinofil farge i vevet. Med utprøvinger med vann etter eosin, i stedet for 70% alkohol var vevet like klart og hadde samme fargeintensitet. Dette kan tyde på at Sakura sitt eosin fargereagens er alkoholløselig. Hvis dette er tilfellet kan man i framtiden, dersom det er ønskelig, justere fargeintensiteten med andre alkoholprosentert i steget etter eosin.

Farging med Dako sine fargereagenser ga uventede resultater. Ved å følge protokollen fra produsenten ble fargerresultatet generelt ganske blått. I tillegg var det kun to rosa nyanser i vevet, som ga dårlige kontraster mellom celle og vevstyper. Vevene så ikke ut til å ha blitt

overfarget av hematoxylin, ettersom den rosa fargen fra eosinet har kommet fram der den skal være, og kjernedetaljene ble tydelige. Ved utprøving uten blåing buffer ble det uforventet lite fargeforandringer i vevet. Slik som utprøvningsprosessene til de ovenfornevnte reagensene, ble det for Dako fargereagenser også utført en utbytting av RO vann med springvann, før hematoxylin. Dette resulterte i for svak vevsfarge, som kan tyde på at det har vært urenheter i vannet fra kranen, som har påvirket fargingen av vevet.

Farging med VWR sine fargereagenser var mer uklar enn med fargereagenser fra de andre produsentene, på grunn av mangelen på en tilhørende protokoll. Ved å ta utgangspunkt i laboratoriets nåværende prosedyre, ble ikke vevene farget optimalt. Dette er slik man kunne forventet. Justeringer med lengden snittene ble behandlet i både eosin og hematoxylin hjalp fargerresultatet betraktelig. Fortsatt ble vevet for blått, og eosinet farget ikke vevene tilstrekkelig. I et forsøk på å tilsette vann før eosin fargereagenset, ga dette uforventet ingen forskjell i fargerresultatet, som tyder på at den svake rosa fargen ikke kom av reagensets problemer med å komme til i vevet. Det ble også gjort et forsøk på å øke tiden snittene lå i eosin. Da ble kun fargeintensiteten økt, men nyansene forble de samme. Dette resulterte i at vevet fortsatt hadde dårlige kontraster. Dette kan komme av at vevet har blitt overfarget med hematoxylin. Dette vil forhindre eosin fargen til å bli tatt opp i vevet på riktig måte, og gi blåskjær over hele snittet. På den andre siden, ble det gjort utprøvinger der snittene ble latt i hematoxylin i 3 minutter i stedet for 4. Dette ga minimale forandringer i fargerresultatet. For å vite nøyaktig hva som kan ha skjedd og hvordan man kan optimalisere fargerresultatet ville man vært avhengig av å vite mer om ingrediensene til reagensene fra VWR og utføre flere utprøvinger.

For Dako og VWR fargereagenser gikk det igjen en manglende eosinofil farge i vevet, selv med utprøvinger og variasjoner i protokollene. Dette er mulig har sitt grunnlag i produsentens preferanse for hvordan reagensene skal farge vevet. Ettersom vevsfarging er en subjektiv vurdering fra en patolog, så vil ulike patologer være vant til å se ulike vev farget på ulike måte, så lenge kontraster mellom celler og vev er tilstrekkelige for å stille en diagnose. Produsentene kan derfor ha tilsett at reagensene skal farge vevet slik de gjorde. For spesifikt VWR sine fargereagens kan en plausibel grunn for at fargekvaliteten ikke ble tilstrekkelig, etter kriteriene utpekt for dette prosjektet, være tidsbegrensningen til antall utprøvinger som ble rukket å gjennomføre under prosjektets tidsrom. Ettersom VWR reagensene ikke kom med en protokoll fra leverandøren, var det flere muligheter for tillaging av en protokoll som gir laboratoriet foretrukket vevsfarging. Derfor, ved eventuelle videre undersøkelser, kan det gjøres flere

utprøvinger for å optimalisere farger resultatet med VWR. Man kan eksempelvis prøve å bytte ut 70% alkohol etter eosin med en høyere alkoholprosent. Ettersom eosin fra VWR er vannløselig, vil en høyere alkoholprosent ekstrahere mindre farge fra vevet, som mulig forbedrer fargekvaliteten.

For å oppsummere, etter flere utprøvinger med forskjellige justeringer på de ulike protokollene, ble det til slutt snitt 3 og snitt 8 som utmerket seg. Snitt 3 ble farget med Histolab sine fargereagenser og snitt 8 ble farget med Sakura sine fargereagenser, begge etter leverandørens protokoll. Under tiden som prosjektet ble gjennomført oppnådde ikke Dako og VWR fargereagensene en fargekvalitet som var sammenlignbar med laboratoriets nåværende fargereagenser.

4.2 FARGEREAGENSER: TIDSBRUK OG PRIS

I tillegg til et krav på fargekvaliteten, ble det også satt et krav om at farging med et nytt reagens, ikke skal overskride nåværende prosedyres tidsbruk med mer enn 5 minutter. Den totale tidsbruken for den nåværende prosedyren er 35 minutter, hvis man ser bort fra 10 minutters tørketid før fargeprosessen. For både Histolab, Dako og Sakura var snittet med best fargekvalitet farget etter protokollen fra produsenten. Protokollen for Histolab sine fargereagenser kan man regne seg fram til at tar 34 minutter og 30 sekunder. Protokollen for Dako tar 39 minutter, mens protokollen for Sakura tar 37 minutter. VWR fulgte laboratoriets nåværende protokoll, men med 4 minutter i hematoxylin og 3 minutter i eosin. Dette kan regnes ut ifra den nåværende protokollen til å ta 36 minutter. Her er det som man kan se, veldig lik varighet, og farging ved bruk av alle reagensene er innenfor kravet på maks 5 minutter mer enn den nåværende prosedyren.

Kostnad er også en viktig faktor når det kommer til valg av nytt reagens. Den nåværende kostnaden for fargereagenser med et forbruk på 1 uke er ca. 1.300,-. Forventet kostnad ved bruk av Histolab sine fargereagenser for 3000 snitt er 1.884,-. Forbruket på en uke er rundt 3000 snitt, så dette er ikke langt over dagens utgifter. Dako har en litt høyere prisklasse, der forventet kostnad for 3000 snitt er ca. 2.738,-. Dette er over dobbelt så høye utgifter som ved dagens fargereagens. Sakura ligger på en prisklasse lik Dako, der forventet pris for 2500 snitt er 2.875,-. VWR sine fargereagenser var de dyreste. Forventet kostnad for 3000 snitt var 3.660,-. Dette er nesten den tredoblede prisen i forhold til dagens reagenser. Ettersom Dako og VWR ikke nådde en fargekvalitet tilsvarende kriterier fra avdelingen, er det mest relevant å sammenligne

Sakura og Histolab. Skal man velge nytt reagens kun ut fra pris, er det klart Histolab fargereagenser som er billigst. Avgiftene for Sakura sine fargereagenser ligger generelt langt over denne prisklassen.

Prisen må også sees i sammenheng med holdbarhet. Fargereagenser for Histolab er holdbar i 1 uke, mens Sakura sine fargereagenser ikke har noen holdbarhetsbegrensninger. Dette kan bety at man er nødt til å kjøpe Histolab reagenser oftere. Dette kommer ikke til å ha noe å si på avdeling for patologi ved St. Olav Trondheim, der forbruket er mellom 2500 og 3000 snitt i uken. På mindre laboratorier derimot, kan dette være noe å tenke på. Er det ukentlige forbruket halvert, så vil man ved bruk av Sakura sine fargereagenser kun måtte kjøpe nye reagenser hver andre uke, mens man uansett må skifte ut Histolab fargereagenser hver uke. Det vil si at prisen for Sakura og Histolab sine fargereagenser blir tilnærmet lik. Ser man da fra et miljøperspektiv, vil det da kunne være gunstig å benytte fargereagenser fra Sakura. På grunn av den korte holdbarheten på fargereagenser fra Histolab vil et mindre ukeshforbruk innebære unødvendig kasting av fargereagens.

4.3 SAKURA VS. HISTOLAB: FARGEKVALITET

Reagensene fra Sakura og Histolab viste under dette prosjektet de mest lovende resultatene. Det er da hensiktsmessig at fargekvaliteten til disse vurderes opp mot hverandre.

Både Sakura og Histolab sine fargereagenser farget vevet jevnt, og alle vevene fikk jevn fargeintensitet. I tillegg ble kjernedetaljene ved bruk av begge hematoxylin reagenser tydelige, og ga klare kjernemembraner. Ved farging med Sakura, i motsetning til Histolab, ble epitelet i epidermis farget rosa med noe blåskjær. Histolab farget epidermis rosa, uten blåtoner. Begge produsentene farger muskulatur sterkt rosa, og tverrstriper er synlige. Erytrocytter og cytoplasma i eosinofile granulocytter oppnår også riktig fargekvalitet, og kan dermed tilstrekkelig differensieres.

Når det kommer til selve fargeprosessen, viste Sakura sine fargereagenser ingen forskjell i fargekvalitet ved bruk av springvann i stedet for RO vann, i motsetning til Histolab sine fargereagenser. Dette kan tyde på mindre påvirkelighet til mulige utenheter i springvann. Derfor, ved å bytte til Sakura fargereagenser, er det mulig det ikke er avgjørende med bruk av RO vann. Dette er noe som må bekreftes ved videre utprøvinger.

4.4 SAKURA VS. HISTOLAB: VURDERING FRA PATOLOGER

Verken fargeresultatene på Sakura eller Histolab fikk en helt positiv vurdering fra patologene. Det var gode momenter med begge fargeresultatene, men patologene var enige om at begge fargereagensene ga en blassere farge enn de var vant med. I tillegg ble det kommentert på hudvevet ved bruk av begge reagensene. Her var ikke den eosinofile fargen tilstrekkelig. Spesifikt for Sakura, slik som også observert under punkt 4.3 Sakura vs. Histolab: fargekvalitet, er det kommentert at epitelet i epidermis blir for blått for avdelingens preferanse.

Det er mulig mye av vurderingene knyttes til personlig preferanse. Det er viktig å ta hensyn til fargingen patologene er vant med, ettersom stor forandring i fargeresultat fra dette, kan øke sjansen for at en diagnose blir oversett. Fortsatt kan det være vanskelig å finne fargereagenser som farger vevet på akkurat samme måten som deres nåværende reagenser. Det viktigste er da å finne en løsning som blir så jevnstilt som mulig.

For å bespare tiden til patologene på avdelingen, ble vurderingsprosessen utført muntlig, og på kort tid. Det var derfor vanskelig å stille ekstra spørsmål, eller kategorisere svarene opp mot hverandre. Ideelt sett skulle vurderingsprosessen vært standardisert, og patologene skulle vurdert vært enkelte vev opp mot kjente kriterier. For en framtidig undersøkelse skulle vev med en kjent diagnose også ha blitt farget, slik at det er lettere å vurdere om en diagnose kan fanges opp med ulike fargereagenser. Dette krever derimot god tid og tilgjengelighet blant patologene som skal vurdere snitt, noe som det ikke var tilgang på under denne prosjektperioden.

Ettersom dette er en subjektiv vurdering er det også viktig å kommentere at den enkelte patologens mening om utbytting av reagenser også kan spille inn i vurderingen. Dersom patologen som vurderer snittene har motforestillinger til denne forandringen kan dette påvirke hvordan snittet blir vurdert. For å unngå dette kunne flere snitt ha blitt presentert til vurdering, uten at fargereagensene er spesifisert. Da vil vurderingen skje kun basert på den faktiske kvaliteten til vevsfargingen.

4.5 KONKLUSJON

Det er klart at avdelingens nåværende fargeprosedyre, med «In-house» reagenser, er gunstig for patologene på avdelingen. De er godt vant med og fornøyde med hvordan vevene farges med bruk av disse reagensene. Dersom man skal kjøpe inn og ta i bruk nye fargereagenser, bør valget, basert på utprøvingene gjort i dette prosjektet, bli mellom Sakura og Histolab. Fra et økonomisk perspektiv så er Histolab et rimeligere alternativ. For laboratorier med et mindre forbruk, kan kostnader for begge reagensene utgjøre det samme. For mindre laboratorier vil da Sakura være gunstigere, sett fra et miljøperspektiv, siden det hadde blitt mer svinn med Histolab.

Problemstillingen til dette prosjektet var: Kan IVDR godkjente fargereagenser gi tilfredsstillende fargerresultat og bytte ut nåværende prosedyrer med «In-house» Hematoxylin og Eosin reagenser? Verken Sakura eller Histolab farget vevene helt tilfredsstillende på alle vevstyper. Basert på kommentarer fra patologene, tyder det på at vevssnitt farget med Histolab fargereagenser etter protokollen, allikevel er nærmere det patologene på avdelingen er ute etter. Kravet til fargekvalitet kan imidlertid variere på tvers av laboratorier, og denne vurderingen kan derfor avvike. Fortsatt så må svaret på problemstillingen trekkes på bakgrunn av kravene som er satt i dette prosjektet. For å da svare på problemstillingen så kan ikke de IVDR godkjente fargereagensene brukt under dette prosjektet erstatte de nåværende prosedyrene med «In-house» reagenser. Dersom en anbefaling skal gis, vil H&E fargereagensene fra Histolab være de som viste mest lovende fargerresultat ut ifra kriteriene som er gitt.

Det at fargekvaliteten på fargereagensene ikke oppnår alle kravene satt under prosjektet, kan imidlertid påvirke overgangen til IVDR godkjente reagenser. Det kan oppstå et ønske om å beholde bruken av «in-house» reagensene på bakgrunn av gunstigere fargekvalitet. Dette kan føre til en forsinkelse i implementeringen av IVDR godkjente reagenser.

Dette vil igjen kunne påvirke leverandører av disse reagensene. Kravet om IVDR godkjente reagenser er en nylig inntredende lov, som fører til økt etterspørsel av kommersielle reagenser og økt krav om at disse møter behovet til ulike laboratorier. Ved å ta utgangspunkt i kravene brukt i dette prosjektet, er det rom for de kommersielle aktørene til å videreutvikle og forbedre kvaliteten ved bruk av deres H&E fargereagenser.

Et slikt fokus på videreutvikling innen fargereagenser til vevsfarging, vil på sikt kunne føre til bedre pålitelighet innenfor kreftdiagnostikk. Dette er spesielt viktig, i lys av de nye IVDR kravene. Faktorer som kvalitet og pålitelighet skal ikke nedprioriteres, da disse faktorene er

svært viktige innen kreftdiagnostikk, både for pasient, pårørende og sykehus. Basert på at de kommersielle fargereagensene ikke oppnådde forventet resultat etter avdelingens ønsker, kan det tyde på at kvaliteten har blitt skadelidende på bekostning av de nye IVDR kravene. Dette er som sagt basert på interne krav, og vurderingen kan avvike.

Dette prosjektet, ble utført på en begrenset tidsperiode. Det var derfor også begrenset med tid som kunne brukes til utprøving av de forskjellige reagensene. Det er mulig at en ved flere utprøvinger kan oppnå ønsket fargekvalitet etter behovet til avdelingen. Dette prosjektet setter da et utgangspunkt for videre forsøk.

5.0 REFERANSER

1. Baandrup U, Prætorius P, Fenger C, Græm N, Jacobsen GK. Almen Patologi, Teori og praksis. 1 ed. Knutzen T, Johansen IK, editors. Danmark: FADL's Forlag Aktieselskab; 2000. 68-77 og 276-7 p.
2. O'Connor A. Pathology crash course. 3 ed. Szar DH, editor. China: Elsevier limited; 2007. 17-21 p.
3. Krefte i Norge [Internett]. Folkehelseinstituttet; 2014 [updated 2022; cited 2022 20/03]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/ikke-smittsomme/kreft/>.
4. Johannesen TB. Stor økning i krefttilfeller [Internett]. Kreftregisteret: Institutt for populasjonsbasert kreftforskning; 2014 [cited 2022 20/03]. Available from: <https://www.kreftregisteret.no/Generelt/Nyheter/Stor-okning-i-krefttilfeller-fram-mot-2030/>.
5. How cancer is diagnosed [Internett]. Cancer.gov: National Cancer institute; 2019 [cited 2022 19/03]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>.
6. Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6 ed. St. Louis Missouri: Saunders elsevier; 2008. 337- 41 p.
7. Robertson S. What is pathology [Internett]. News medical, life sciences; 2021 [cited 2022 20/03]. Available from: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Pathology.aspx>.
8. Regional kreftplan 2014- 2021. In: RHF HN, editor. 2013.
9. Revå BW. Rutinefarge og utvalgte spesialfarger, teori og praksis med fokus på kvalitetssikring. In: sør-øst H, editor. Sykehuset i Vestfold HF: Nito; 2016.
10. Kiernan JA. Histological and histochemical methods, theory and practice. 4 ed. Bloxam Oxfordshire: Scion publishing Ltd; 2008.
11. Stevens A, Lowe JS, young B. Weather's basic histopathology, a colour atlas and text. 4 ed: Elsevier science limited; 2002. 68-71 p.
12. Bancroft J, Gamble RM. Theory and practice of histological techniques. London: Churchill livingstone; 2008.
13. Ross MH, Pawlina W, Barnash TA. Atlas of Descriptive Histology. USA: Sinauer Associations Inc publisher; 2009.
14. Kumar G, kiernan J. Education guide: Special stains and HE. 2 ed. Carpinteria, CA USA: Dako; 2010.
15. Gartner LP, Hiatt JL, Strum JM. Cell biology and histology. 6 ed. Baltimore: Lippincott Williams & wilkins; 2011. 189- 215 p.
16. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. Clin Dermatol. 2014;32(1):3-13.
17. Eroschenko VP. Atlas of histology with functional correlations. Baltimore: Lippincott williams & wilkins; 2008. 208 p.

18. Huang C. Germinal Center Reaction. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1254:47-53.
19. Gartner LP. *Textbook of histology.* 4 ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2017. 404- 35 p.
20. Snitt 5- lymfeknute [Internett]. Oslo: UIO; Udatert [cited 2022 21/03]. Available from: <https://studmed.uio.no/elaring/fag/anatomi/dlolph5/mikro/index.php?articleID=3390>.
21. Sand O, ØV S, Haug E, Bjålie J. *Menneskekroppen fysiologi og anatomi.* 3 ed. St. Olavs plass Oslo: Gyldendal Akademisk; 2018.
22. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):548-65.
23. Brown RW. *Histologic preparations, Common problems and their solutions.* Illinois: College of american pathologists; 2009. 4-12, 38-47 p.
24. Deionisert vann vs. destillert vann. Hva er forskjellen. [Internett]. LanLangCorp; 2019 [cited 2022 10/04]. Available from: <http://m.no.waterfiltermediasupplier.com/info/deionized-water-vs-distilled-water-what-s-the-36619724.html>.
25. Water for histology: Impact of water [Internett]. Merck Millimore; 2021 [cited 2022 20/04]. Available from: <https://www.merckmillipore.com/NO/en/water-purification/learning-centers/applications/biomedical/histology/water-impact/v0Kb.qB.bUIAAAFAKKEQWTs8,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1>.
26. Riche E, Macrea E, Lange W, Mabic S. *The importance of water quality in the histology laboratory:* Sakura; 2008.
27. Nytt regelverk om medisinsk utstyr [Internett]. Legemiddelverket: Statens legemiddelverk; 2021 [cited 2022 20/03]. Available from: <https://legemiddelverket.no/medisinsk-utstyr/regelverk-for-medisinsk-utstyr/nytt-regelverk-om-medisinsk-utstyr#lover-og-forskrifter-om-medisinsk-utstyr>.
28. IVDR overgangsbestemmelser [Internett]. Regjeringen; 2021 [cited 2022 20/03]. Available from: <https://www.regjeringen.no/no/sub/eos-notatbasen/notatene/2021/des/ivdr-overgangsbestemmelser/id2892998/>.
29. Europaparlaments- og rådsforordning (EU) 2017/746, av 5. april 2017, om medisinsk utstyr til in vitro- diagnostikk og om oppheving av direktiv 98/79/EF og kommisjonsbeslutning 2010/227/EU, (2021).
30. Dako Harris Hematoxylin & Dako modified eosin In: Dako, editor. Y. Yishun avenue: Agilent Technologies Singapore; 2020.
31. cook D, warren P. *Cellular pathology An introduction to techniques and applications.* 3 ed: Scion publishing Limited; 2015.
32. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):400-5.
33. Kiernan J. Formaldehyde, formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do.;8(1):8-13.
34. gregorios JHB-. *Common staining solutions used. Histopathologic techniques.* 2 ed: Goodwill trading CO. INC; 2006. p. 139.

6.0 VEDLEGG:

VEDLEGG 1: PROTOKOLL FOR UTPRØVING AV HISTOLAB FARGEREAGENSER

Step	Station	Solution Name	Time	Delay	Mix
1	S*	Start Station	--:--:--	--	--
2	D*	Drying Station	0:10:00	**	OFF
3	29	Tissue Clear	0:04:00	**	ON
4	21	Tissue Clear	0:04:00	**	ON
5	22	Tissue Clear	0:04:00	**	ON
6	23	Alcohol 100%	0:02:00	**	ON
7	15	Alcohol 95%	0:02:00	**	ON
8	14	Distilled Water	0:01:00	**	ON
9	13	Hematoxylin	0:05:00	50%	ON
10	W*	Wash Station	0:05:00	**	ON
11	12	Eosin	0:00:30	==	ON
12	W*	Wash Station	0:00:30	**	ON
13	11	Alcohol 95%	0:00:30	**	ON
14	2	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
15	1	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
16	9	Xylene	0:02:00	**	ON
17	17	Xylene	0:02:00	**	ON

VEDLEGG 2: PROTOKOLL FOR UTPRØVNING AV HISTOLAB FARGEREAGENSER MED 70% ALKOHOL

Step	Station	Solution Name	Time	Delay	Mix
1	S*	Start Station	--:--:--	--	--
2	D*	Drying Station	0:10:00	**	OFF
3	29	Tissue Clear	0:04:00	**	ON
4	21	Tissue Clear	0:04:00	**	ON
5	22	Tissue Clear	0:04:00	**	ON
6	23	Alcohol 100%	0:02:00	**	ON
7	15	Alcohol 95%	0:02:00	**	ON
8	14	Distilled Water	0:01:00	**	ON
9	13	Hematoxylin	0:05:00	50%	ON
10	W*	Wash Station	0:05:00	**	ON
11	12	Eosin	0:00:30	=	ON
12	W*	Wash Station	0:00:30	**	ON
13	3	Alcohol 70%	0:00:30	**	ON
14	11	Alcohol 95%	0:00:30	**	ON
15	2	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
16	1	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
17	9	Xylene	0:02:00	**	ON
18	17	Xylene	0:02:00	**	ON
19	E*	End Station	--:--:--	--	--

VEDLEGG 3: PROTOKOLL FOR DAKO FARGEREAGENSER.

Step	Station	Solution Name	Time	Delay	Mix
1	S*	Start Station	-:--:--	--	--
2	29	Tissue Clear	0:03:00	**	ON
3	21	Tissue Clear	0:03:00	**	ON
4	22	Tissue Clear	0:03:00	**	ON
5	23	Alcohol 96%	0:01:00	**	ON
6	15	Alcohol 96%	0:01:00	**	ON
7	14	Alcohol 70%	0:02:00	**	ON
8	W*	Wash Station	0:01:00	**	ON
9	13	Distilled Water	0:01:00	**	ON
10	12	Hematoxylin	0:03:00	50%	ON
11	20	Distilled Water	0:01:00	**	ON
12	3	Bluing Agent	0:01:00	**	ON
13	W*	Wash Station	0:01:00	**	ON
14	11	Alcohol 70%	0:01:00	**	ON

15	10	Eosin	0:01:00	==	ON
16	2	Alcohol 96%	0:01:00	**	ON
17	1	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
18	9	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
19	17	Alcohol 100%	0:01:00	**	ON
20	18	Xylene	0:01:00	**	ON
21	19	Xylene	0:01:00	**	ON
22	E*	End Station	-:--:--	--	--

**VEDLEGG 4: LABORATORIETS NÅVÆRENDE PROTOKOLL MED
«IN- HOUSE REAGENSER»**

Solution name	Time	Delay	Mix
Start Station	-:--:--		--
Drying Station	0:10:00		OFF
Tissue Clear	0:04:00		ON
Tissue Clear	0:04:00		ON
Tissue Clear	0:04:00		ON

Alcohol 100%	0:01:00		ON
Alcohol 100%	0:01:00		ON
Alcohol 96%	0:01:00		ON
Alcohol 80%	0:01:00		ON
Wash station	0:01:00		OFF
Hematoxylin	0:05:00	50%	ON
Wash station	0:05:00		OFF
Alcohol 80%	0:01:00		ON
Eosin	0:01:00	==	ON
Alcohol 96%	0:00:30		ON
Alcohol 96%	0:00:30		ON
Alcohol 100%	0:00:45		ON
Alcohol 100%	0:00:45		ON
Alcohol 100%	0:00:45		ON
Alcohol 100%	0:00:45		ON
Xylene	0:01:00		ON
Xylene	0:01:00		ON

VEDLEGG 5: PROTOKOLL OPPGITT AV SAKURA FOR SAKURA FARGEREAGENSER

Step	Reagent	Time (hh:mm:ss)
1	Drying	00:10:00
2	Xylene	00:03:00
3	Xylene	00:03:00
4	Alc. 100%	00:02:00
5	Alc. 100%	00:02:00
6	Alc. 95%	00:02:00
7	Alc. 70%	00:02:00
8	Wash in running tap water	00:01:00
9	Distilled water	00:01:00
10	HT 3G	00:05:00
11	Wash in running tap water	00:03:00
12	Alc. 70%	00:00:30
13	Eosin	00:03:00
14	Alc. 70%	00:00:30
15	Alc. 95%	00:01:00
16	Alc. 100%	00:01:00
17	Alc. 100%	00:02:00
18	Xylene	00:02:00
19	Xylene	00:03:00