



# HISTOKEMISKA ANALYSER

Vad händer med våra celler

2026-06-03 Maria Näslund och Helén Richard



# Att tänka på!

- IVDR
- Upphandling
- Plattformar
- Batch/LOT nummer
- Rutiner
- Kontroller

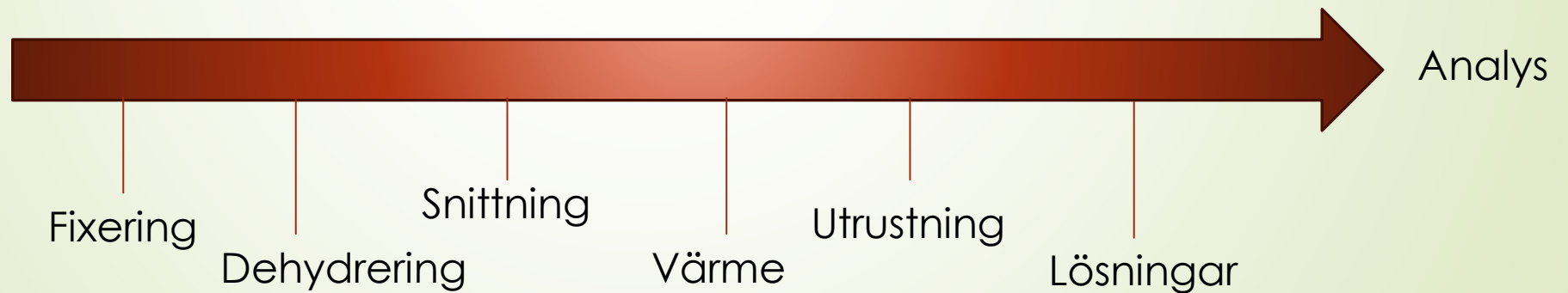


# Kort historia

- ▶ Första gången mikroskopisk färgning är omnämnt är 1714 och på 1860-talet började man använda HTX för att färga cellkärnor.
- ▶ De flesta färgningsmetoder tillkom genom praktiska erfarenheter och det är extremt svårt att förklara färgningsmekanismen då det försiggår flera komplexa fysikaliska och kemiska processer samtidigt.

# Viktiga faktorer

- Det ställs mycket speciella krav att få fram ett preparat för mikroskopisk/digital undersökning.
- Snittet skall bl.a. vara tunt och genom sin kontrastriktighet ge en detaljerad, naturtrogen bild av utgångsmaterialet.
- Digital bild/AI kräver en högre kvalitet av laboratorieprocessen.
- Felsökning?! Kontrollera omfattningen och undersök en sak i taget.





<b>Artefakt</b>	<b>Orsak</b>	<b>Hur det ser ut</b>
<b>Formalinpigment</b>	surt formalin	brunsvarta granula
<b>Paraffinrester</b>	dålig deparaffinering	ljusa "hål" i snittet
<b>Vakuoler i cytoplasman</b>	fixeringsfel	celler ser ut som de kokat
<b>Knife marks (mikrotomskador)</b>	trubbigt blad	"repor" i vävnaden
<b>Chatter / vibration</b>	för hårt block	bandliknande mönster
<b>Fällningar av färg</b>	gamla färgbud	blå eller rosa prickar



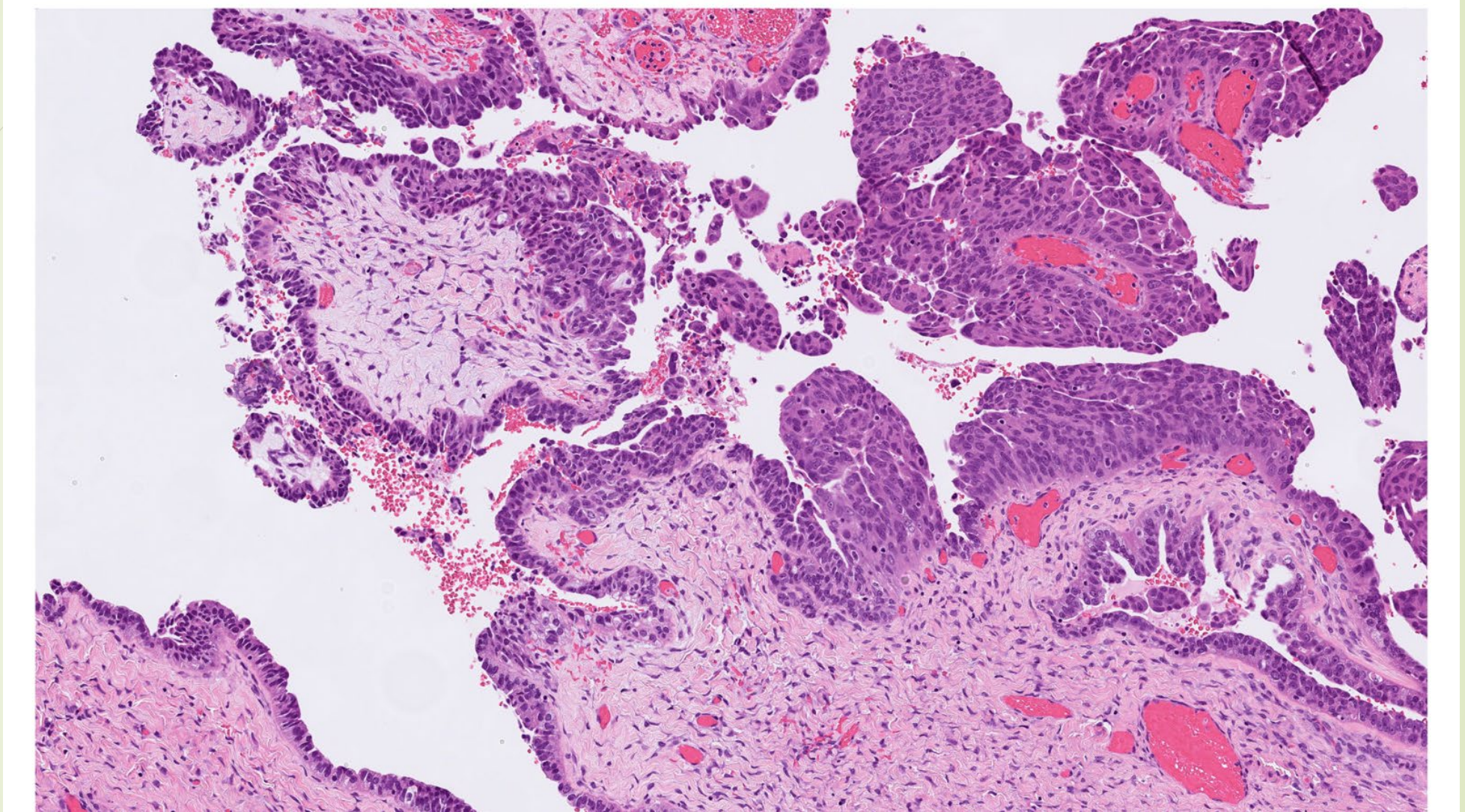
# Snabb förklaring

- ▶ Progressiv färgning. Färgningen avbryts när optimalt resultat är uppnått
- ▶ Regressiv färgning. Överfärgning görs och därefter löser man bort färgöverskottet till önskad styrka. Färgerna binds inte lika fast till alla vävnadsbeståndsdelar. Därför avfärgas viss vävnad fortare än andra vid differentiering.
- ▶ Oxidering: Ett ämne avger elektroner. Kan vara en reaktion med ett annat ämne. (motsatts, reduceras)
- ▶ Affinitet: Dragningskraft



# HEMATOXYLIN-EOSIN

- ▶ Är den vanligaste översiktsfärgningen.
- ▶ Är en kombination av ett surt färgämne, Eosin och ett basiskt färgämne, HTX
- ▶ Vid oxidering av HTX bildas hematein som är själva färgämnet.
- ▶ Hematein har låg affinitet "dragningskraft" till vävnaden och kräver ett betmedel ex alun som stärker den positiva laddningen av hematein och som då får lättare att binda till de negativa vävnadskomponenterna.  
Blåning i **kranvatten** då cellerna ändrar färg från röd till blå-lila
- ▶ Eosinfärgningen hjälper att skilja mellan olika cellers cytoplasma och olika typer av bindväv genom att färga dem i olika nyanser av rosa, orange och rött.



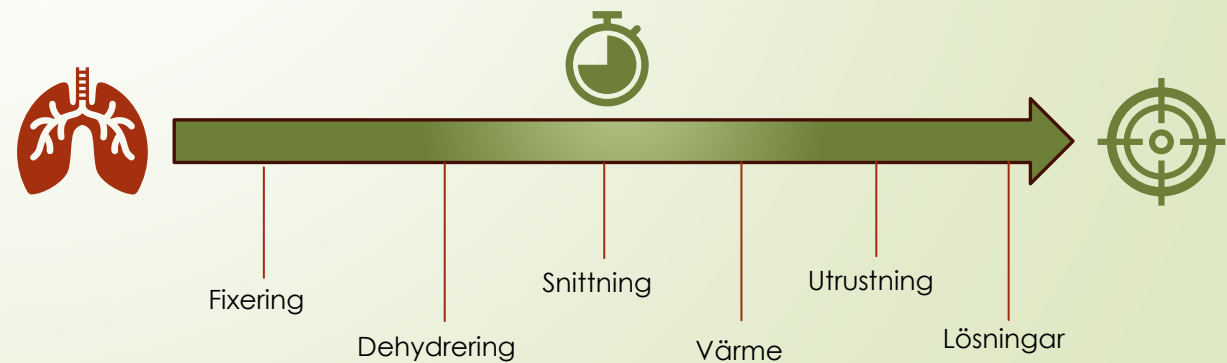
# Vad kan gå fel i HTX-Eosin

- pH värdet på vattnet



- Diffning, kort eller lång tid i alkohol

- Felaktiga lösningar ex pH värdet på eosin



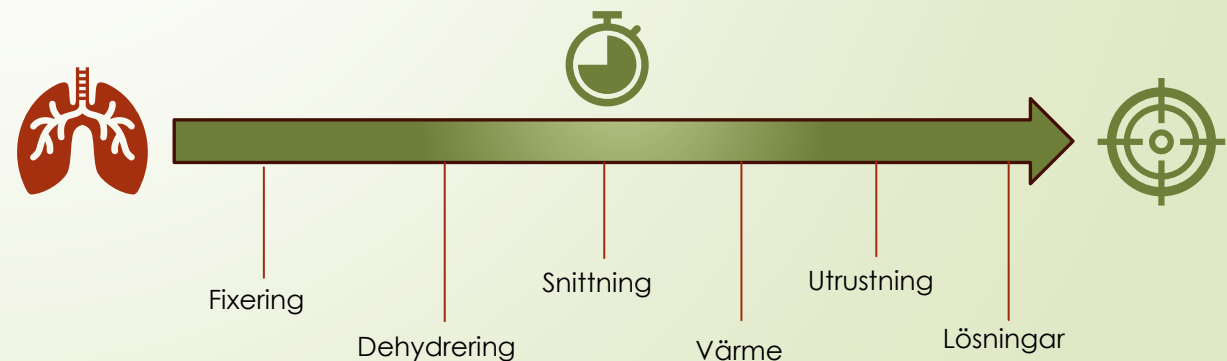


# AB-PAS

- ▶ Alcianblue PAS kombinerar två metoder för att särskilja sura mucopolysackarider (muciner) från neutrala.
- ▶ Alcianblue är ett basiskt färgämne där man använt ättiksyra för att få lösningen sur, pH 2,5, som binder till de sura grupperna av muciner och färgar dem blått.
- ▶ Periodsyra i PAS lösningen bryter ner kol-bindningarna i glykosringen så det bildas fria aldehydgrupper (-CHO). Dessa reagerar med Schiffs lösning och ger en rödfärgad förening som visar neutrala muciner och glykogenets position i cellen.

# Vad kan gå fel i AB-PAS

- Vid felaktigt pH värde i Alcianblue färgas inte de sura mucinerna tillräckligt.
- Vid för kort tid i perjodsyra bildas inte de fria aldehydgrupperna
- Fel tider i lösningarna
- För gamla lösningar
- Schiffs reagenslösning är för gammal när man inte erhåller tillräcklig infärgning efter 15 min eller när den börjar skifta i rosa.



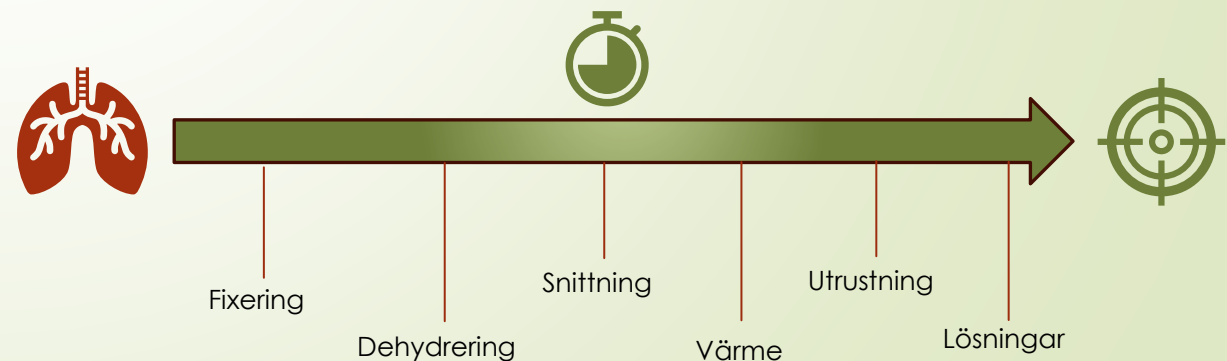
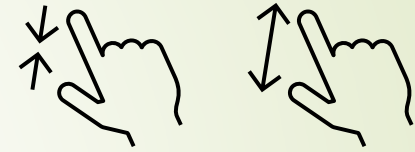


# GIEMSA

- Används för blodutstryk och att påvisa mikroorganismer och mastceller i vävnad, bl a Helicobakter pylori som är en gramnegativ bakterier
- Låg känslighet
- Är en differentialfärgning, en blandning av metylenblått (basisk), azur (basisk) och eosin (sur)
- Färgerna är inaktiva i alkohol (som i den färdiga lösningen) och måste därför blandas i en vattenlösning för att bli aktiv.
- Metylenblått och azur binder till sura komponenter såsom cellkärnor vilket ger dem en röd-lila färg och eosinet till basiska komponenter som blir blå-lila ex cytoplasma och bakterier

# Vad kan gå fel i Giemsa färgningen

- Tänk på tiderna vid diffning, fingertoppskänsla
- Viktigt att byta lösning om ni har många glas
- Gör mikroskopkontroll av snittet
- Utfällning, om Giemsa färgningen inte är färsk, filtrerad eller sköljningen är bristfällig. Då bildas fällningar



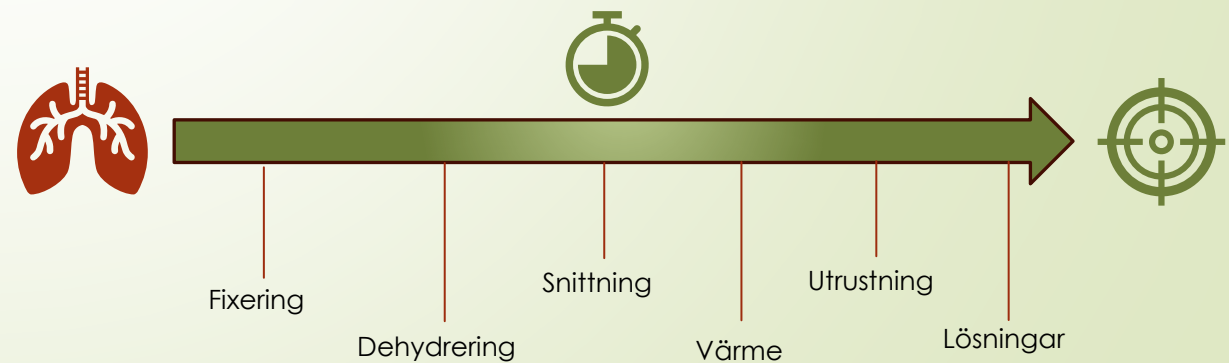


# ELASTIN van GIESON

- Används för att särskilja elastiska fibrer från annan bindväv ex kärlväggar
- Elastiska trådar hör till de tätast uppbyggda strukturerna i kroppen.
- Resorcin-fuchsin som har affinitet mot sura och negativt laddade elastiska trådar och som har förmågan att diffundera in i de kompakta vävnaderna
- Differentiering med kranvatten och alkohol
- Cellkärnorna färgas med Weigerts

# Vad kan gå fel i Elastin färgningen

- För kort/lång tid i lösningarna
- Var noga med att ta bort överskottsfärgen (diffning).
- Hållbarhet för lösningen
- Elastinfibrerna blir otydliga om surhetsgraden inte är korrekt.



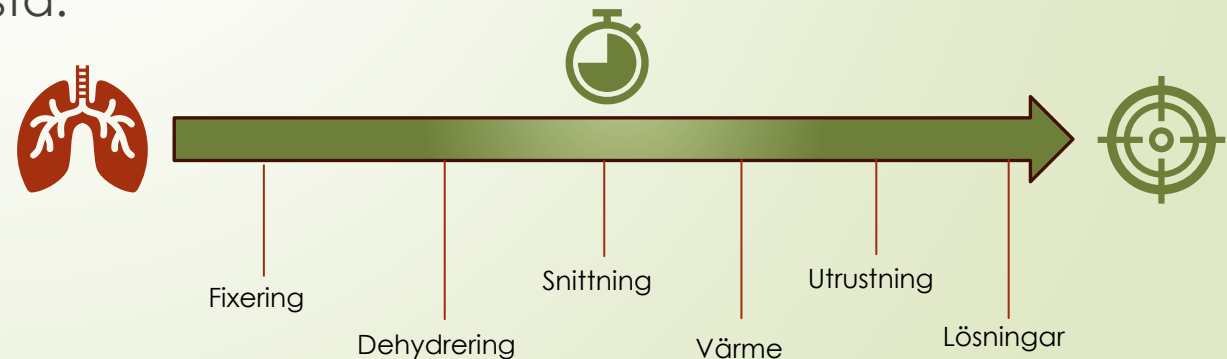


# TB-färgning

- Är en syrafast bakterie som har en komplex cellvägg. Membranet är rikt på lipider och innehåller mykolsyror som är en vaxliknande fettsubstans.
- Karbolfuchsin som appliceras på olika sätt beroende på metod för att tvinga in färgen i bakteriens cellvägg ex. med värme
- Karbolfuchsin är en basisk färg som binds till negativa bakteriekomponenter såsom mykolsyra.
- Provet sköljs med syraalkoholblandning där de syrafasta bakterierna, som har en hög halt av mykolsyror i sin vägg behåller den röda färgen.

# Vad kan gå fel i Tb färgningen

- Vid för svag uppvärmning färgas inte bakterierna in.
- Syran måste sköljas bort ur vävnaden innan kontrastfärgning, annars färgar inte metylenblått.
- Om snitten råkar torka innan karbol-fuchsin sköljs bort kan det bildas en förening som är resistent mot differentiering.
- Det vanligaste felet är överdifferentiering. Då färgen sköljs bort även från bakterien.
- Carnoys fixeringslösning får ej användas då denna gör syrafasta mikroorganismer icke syrafasta.



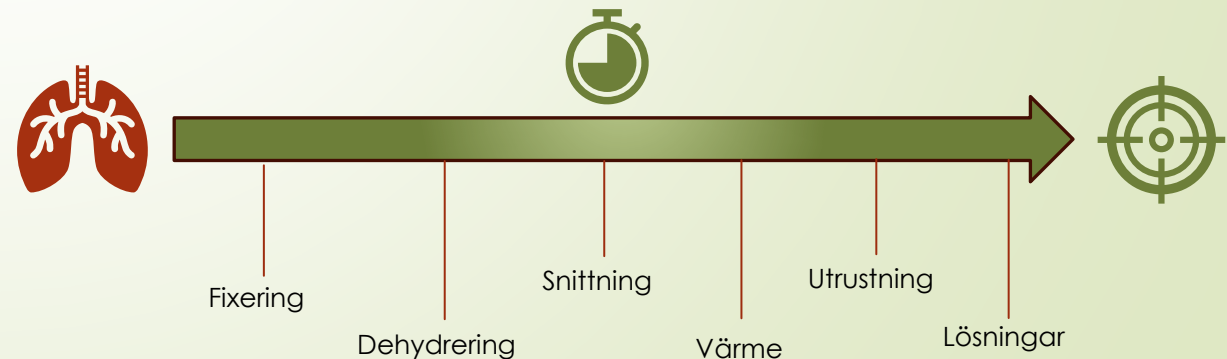


# FE

- Järn är olösligt i alkaliska lösningar men lösligt i sura lösningar.
- Här frigörs  $\text{Fe}^{3+}$  med hjälp av saltsyra och järn (III)klorid formas.
- Vid färgning reagerar järnet med kaliumferrocyanid och bildar olöslig ljusblå järn ferrocyanid

# Vad kan gå fel i FE färgningen

- Gamla eller kontaminerade reagenser, ger svaga eller ojämna färgningsresultat
- För kort/lång inkubationstid
- Felaktigt pH
- Den vanligaste orsaken till falskt negativa resultat att järnet i vävnaden inte har blivit frilagt på rätt sätt.
- Järnkontaminering, Använd inte material i metall ex pincett
- Långvarig fixering i surt buffrad formalin kan leda till att järn lakas ut ur vävnaden



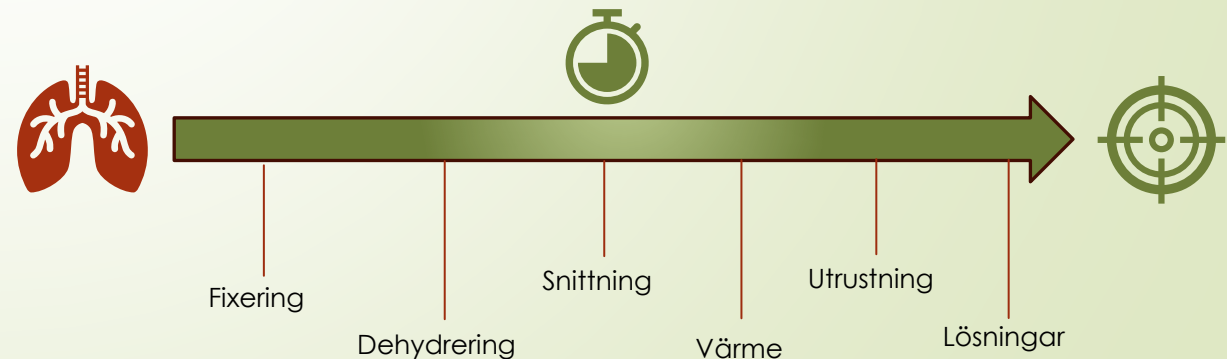


# RETIKEL

- Retikelfärgning är en silverfärgning
- Kaliumpermanganat oxiderar vävnaden för att öka färgningen av retikulin och sen avlägsnas överskott av kaliumpermanganat med oxalsyra.
- Järnalun fungerar som betmedel och ersätts efteråt av silvret från diaminosilverlösningen.
- Formalin tillsätts för att utveckla silver till synligt silver.
- Guldklorid tillsätts för bättre kontrast och klarhet. Tiosulfat avbryter reaktionen och avlägsnar silver som inte reagerat

# Vad kan gå fel i Retikel färgningen

- Viktigt att skölja bort kaliumpermanganat och oxalsyra
- Vid för svag färgning kan oxideringen (kaliumpermanganat) vara otillräcklig eller så har man använt en gammal silverlösning.
- Överfärgning kan bero på att reduceringssteget (formalin) har varit för långt.
- Viktigt att använda noga rengjorda kyvetter
- Använd plastpincetter vid silverlösningar





# Frågestund!

*Tack för oss och Lycka till med ert arbete*

## Referenser

Histologiska färgningar av Maisa Äyhynmäki, Yrkehögskolan NOVIA

Histotechnology - Freida Lcarsson & Christa Cappellano

Bancroft´s - S. Kim Suvarna, Christopher Layton & John D. Bancroft



Histopatologisk teknik - Gertraude Moewis