

CELLABVECKAN 2015

Cellabveckan är ett årligt evenemang som i år arrangeras för femte året i rad. De två sista dagarna av veckan ägnades åt histologi. Deltagare från hela Sverige bjöds på intressanta föreläsningar kring aktuella och relevanta ämnen. Tid fanns också till diskussion och utbyte av erfarenheter.

HISTOLOGI ONSDAG 16/9

Vad händer med vidareutbildningen? Hur gör Örebro Universitet?

Onsdagens första föreläsning hölls av Christina Karlsson från Örebro Universitet. Hon inledde med att berätta att vidareutbildning för Biomedicinska analytiker (BMA) tidigare inneburit att man läst ett extra år för att få en Magisterexamen i medicin eller laboratorievetenskap. Hösten 2013 startade dock ett Masterprogram för BMA. Christina berättade att 12 studenter påbörjade utbildningen och att fram tills nu är 5 personer utexaminerade. Utbildningen finns i två olika varianter: en 1-årig Magisterutbildning och en 2-årig Masterutbildning inom klinisk laboratoriemedicin, vilka båda läggs till en tidigare BMA-utbildning. Christina förklarade vilka kurser som ingår i programmen och hur examensarbetena ska se ut. "Kurserna går på halvfart" berättade hon och "man har möjlighet att sätta ihop en egen kursplan om man vill det". Om man redan inledningsvis vet vad man vill skriva sitt examensarbete om kan man välja att rikta kurserna mot det området, berättade Christina. Detta göra att det finns en möjlighet att få en utbildning som är skräddarsydd för en viss arbetsgivare eller arbetsfält. Exempelvis kan ett examensarbete vara en frågeställning som en klinisk verksamhet önskar få utredd.

Behörighet som krävs för utbildningarna är BMA-utbildning och 12 månaders heltidstjänstgöring som BMA. Christina berättade att flera av de examinerade fått specialisttjänster på sina arbetsplatser efter avslutade studier. Christina informerade även om att de leder en utbildning i "Bild och funktionsdiagnostik" som främst är riktad mot röntgensjuksköterskor. Sedan finns även alternativet att läsa någon av de tre internationella Masterprogrammen. Dock är de mer forskningsförberedande förklarade Christina.



Christina Karlsson

Optimering av dehydreringsstegen

Resten av dagens föredrag och diskussioner leddes av Ada Feldman från Anatech i Michigan USA. Ada gick igenom grundläggande och fördjupad kunskap, samt problemlösning kring dehydrering av vävnad. Ada har en gedigen praktisk och teoretisk kunskap om histoteknik och leder olika vidareutbildningar inom detta område och tillfrågas ofta som expert.



Ada Feldman

Ada inledde sitt föredrag med att slå fast faktumet "att vi arbetar mycket mindre manuellt idag och att det är viktigt att förstå vad instrumenten gör, om man ska kunna lösa problem när kvalitén inte är som man vill". Histoteknisk bearbetning av vävnad sker enligt ett fyrastegsprogram, alla dessa steg gicks igenom mycket noggrant.

Det första steget i processen är fixeringen. Då bevaras vävnaden från att brytas ner, bakterier får inte fästa och cellens olika komponenter blir olösliga. "Vi vill bevara vävnaden så som den såg ut när den levde" förklarade Ada. Vanligen används formalin som fixeringsmedel, men även formalinfri fixering förekommer. Fixeringen med formalin innebär att formaldehyd binder till cellerna och skapar metylbryggor, "crosslinks", vilka stabiliserar vävnaden. Någon annan förändring än dessa "bryggor" vill vi inte skapa i vävnaden säger Ada.

Nästa steg i processen är dehydreringen som syftar till att få bort vatten ur vävnaden. Ada förklarade: "det finns två typer av vatten i vävnaden: bundet och fritt vatten". Fritt vatten finns mellan molekylerna och bundet vatten är bundet till molekylerna. Det är det fria vattnet vi vill få bort. Detta görs genom att det obundna vattnet tas bort genom en stigande alkoholkoncentration och sedan ersätts vattnet av alkoholen som fyller alla utrymmen mellan molekylerna.

I det tredje steget, som kallas för Clearingsteget, (intermedium steget) tas alkoholen bort för att ersättas av xylen. Detta måste till för att förbereda nästa steg, eftersom alkohol inte är lösligt med vax. I det sista steget byter alkoholen och vax plats i vävnaden. Då har vi nått fram till en vävnad som kan snittas och undersökas mikroskopiskt med hjälp av olika infärgningar förklarade Ada.

Det kan låta som en enkel process, men det finns många saker som kan gå fel i processen menade Ada. Hon visade vävnadsbilder på några av de problem som kan uppstå: hål i vävnaden, sprickor, utsuddade detaljer och blå fläckar. Följande timmar ägnade vi sedan helt åt felsökning i processen.

Ada inledde med att berätta om problem som kan uppstå i det första steget, fixeringen. Vävnaden består av 65 % vatten och det frigörs och späder fixermedlet. För att vävnaden ska fixeras bra behövs förhållandet 20:1 av fixermedel till vävnad, många slarvar med mängden fixermedel. Fixeringsmedlet behöver även tillräckligt med tid att penetrera in i vävnaden och även tid för att sedan binda till vävnaden. Man brukar säga att fixeringstiden bör vara mellan 24-48 timmar med 4% buffrad formalinlösning. Det varierar för olika vävnader poängterade Ada. Ibland kan tiden behöva vara kortare. Om fixeringstiden kortas för mycket innebär det dock att vävnaden kommer vara längre tid i alkohol än i fixermedlet och då blir vävnaden alkoholfixerad istället. Ada visade vävnadsprover där detta kunde ses tydligt. "Vi lurar av att biopsierna de senaste åren blivit allt mindre" säger Ada. "De behöver fortfarande tid för fixering!". Använder man formalin löst i alkohol, i stället för vatten, då behövs dock kortare fixeringstid, eftersom alkoholen penetrerar in snabbare i vävnaden. Formalinfria fixermedel behöver kortare tid av denna anledning. Formalinfria fixermedel baserade på glyoxal har fördelen att de är luktfria. Sammanfattningsvis slog Ada fast tre viktiga saker för fixering: 1) ju större behållare för vävnaden desto bättre, 2) använd två behållare för fixeringen där vävnaden läggs en kortare tid i den första (spädning av vatten sker) och en längre tid i den andra och 3) ge fixeringen så lång tid som möjligt.

I dehydreringssteget kan alkoholen göra att det bundna vattnet tas bort och leder då till att vävnaden krymper. I kombination med dålig fixering skapas bindningar direkt i proteiner som ändrar form och ger en ny felaktig molekylär struktur. "Har du problem är det bästa att förlänga fixeringstiden och korta tiden i alkoholen" enligt Ada. Behöver man blöta upp vävnad när den ska snittas, kan det var ett tecken på att den är för torr och då kan du prova en justering av tiden. Kom ihåg att vi vill endast få bort det obundna vattnet, så vävnaden ska vara längre tid i de låga alkoholkoncentrationerna och kort tid i 95-100 %-ig alkohol slog Ada fast.

Xylen som används i nästa steg, Clearingsteget (intermedium steget), kan lösa sig i vatten till viss del, vilket gör att även detta steg torkar ut vävnaden. Xylen löser bundet vatten och dessutom fett. "Man måste skydda det bundna vattnet!" påminde Ada oss om. Alternativ till xylen är xylen substitut - exempelvis alifatiska kolväten. De är lite skonsammare för preparatet eftersom de tar inte bort bundet vatten, är mindre toxiska och har en mild odör.

I det fjärde steget där xylen ska bytas ut mot vax, som är i flytande form. Kom ihåg att även värme kan ta bort det bundna vattnet. Xylen som kommer över till varmt vax kan ge en "friterande" effekt på vävnaden. "Ett tips är att inte låta vävnaden vara så länge i den första behållaren med vax och då undviks detta" enligt Ada. Därför är det även viktigt att rotera behållarna med vax var tredje dag så att inte xylen ansamlas i den första behållaren. Stora bitar kan behöva mellan 40-60 minuter i vaxet, små biopsier 10-20 minuter. "Var försiktig med värmen" varnade Ada.

Avslutningsvis gick Ada igenom olika typer av dehydreringsutrustningar som finns. Det finns olika typer av system med olika lösningar: Öppet systemet som doppar ner prover, slutet system där vätskorna pumpas in i en kammare, reagenskontrollerat system där instrumentet indikerar när vätskor ska bytas och xylenfria system - där mikrovågsteknik oftast används.

Onsdagen avslutades sedan med en kortare frågestund. Många frågor berörde specifika problem som deltagarna upplevt. Vi fick bland annat veta att det inte går att ta reda på om en vävnad fixerat färdigt förrän vi tittat på objektglaset. Att det är livsfarligt att hetta upp formalin, ångorna kan vara dödliga! Att om en vävnad faller ihop då den ska snittas så kan den ha varit i vaxet för kort tid. Ada berättade även att om man har problem vid snittningen kan detta bero på temperaturen, preparatet kan vara för kallt och då kan man prova olika snitthastigheter. Ada avslutar diskussionen med att tipsa oss om att alltid börja med små förändringar om man har problem med sina prover, "gör inte om hela processen!".



HISTOLOGI

TORSDAG 17/9

Hur skyddar du dig på lab, saker att tänka på vid val av skyddsutrustning. Ny klassificering av formalin.

Torsdagen inleddes med en föreläsning av Jenny Elfving från företaget Intersolia som bland annat arbetar med handledning inom kemikalieområdet, IT-system för kemikaliehantering och utbildningar. Jenny började med att berätta att användandet av kemikalier idag ökar exponentiellt och att det används miljontals ton varje år världen över. För 90 % av de kemikalier vi använder mest har vi mycket lite data om dess egenskaper. Kemikalier som faller inom områdena bekämpningsmedel, läkemedel, livsmedels- och fodermedeltillsatser samt kosmetika ska dock förhandsprövas innan de får sättas ut på marknaden.

När det kommer till exponering av kemikalier i arbetsmiljön behöver vi vara medvetna om att kemikalier är en av många olika faktorer som påverkar förklarade Jenny. När det gäller kemikalier är det främst genom inandning, exponering av hud eller om vi sväljer något som exponering sker. Hur farligt något är beror både på hur vi hanterar det, vilka kemiska egenskaper det har och vilka skador de kan ge upphov till förklarade Jenny.

Det finns en rad lagkrav som är kopplade till kemikalieanvändning på arbetsplatser berättade Jenny. Exempel på detta är att det ska finnas produktförteckningar och säkerhetsdatablad på alla kemikalier som används. Det ska i vissa fall även finnas tillstånd för användning av vissa kemikalier och för alla situationer där en kemikalie används ska en riskbedömning ha gjorts. Jenny poängterade även vikten av substitution av de farligaste kemikalierna, märkning av kemikalier, rätt avfallshantering och arbetstagarregister där olyckor och exponering ska rapporteras. Det är även viktigt att man på arbetsplatsen följer de regler som gäller för de hygieniska gränsvärdena, det vill säga hur mycket som får finnas av en viss kemikalie i inandningsluften.

Jenny berättade sedan om de olika lagstiftningar som rör kemiska produkter och att det finns särskilda listor på vilka kemikalier som bör fasas ut för att de är för skadliga. För att få information om ett visst ämnes egenskaper och hur vi ska skydda oss tipsade Jenny om att man bör börja titta i säkerhetsdatabladen, där faropiktogramen

ger en första indikation. Titta sedan efter faroangivelser, ett exempel är koden H310 som betyder "dödlig vid hudkontakt". Det är först när vi vet detta som vi kan göra en bedömning hur vi ska skydda oss säger Jenny. I säkerhetsdatabladet ska det enligt Reach-förordningen finnas information om bland annat "åtgärder vid första hjälpen", "hantering och lagring" samt "personligt skydd". Vid val av skyddsutrustning bör man följa en 5 stegs procedur där man först tittar på om ett farligt ämne kan substitueras, det vill säga byts ut mot ett mindre farligt ämne. Om inte det går bör man se om processen där det används kan inneslutas. Man bör sedan se över tekniska lösningar så som exempelvis ventilation. Sedan bör man även titta på om farliga arbetsmoment kan läggas till andra tidpunkter så att personal inte utsätts i onödan. Därefter är det dags att titta på det personliga skyddet i form av exempelvis handskar och andningsmasker. Jenny berättade om en rad typer av handskar och andningsskydd samt sammanfattade med att "det allra bästa är att ringa leverantörerna, de är bra på vilka produkter som ska användas i olika situationer".



Jenny Elfving

Avslutningsvis ville Jenny föra fram lite information om formaldehyd. Den har fått en skärpt lagstiftning och blivit klassat som Cancerogen, Reproduktionsstörande och Mutagen (ett CRM- ämne). Ämnet finns just nu på ECHAs kandidatlista och man har föreslagit att det kanske i framtiden ska krävas tillstånd för att få användas. Man rekommenderar noggrann riskbedömning och att

mätningar görs i arbetsmiljön. Från publiken lyftes att det i USA finns substitut som kan ersätta formalin. Detta är något som Jenny ska undersöka vidare säger hon avslutningsvis.



Felsökning av H&E färgning

Följande föreläsningar under torsdagen hölls av Ada Feldman.

Ada inledde sitt föredrag med att påminna oss om den grundläggande kemin som säger att motsatser attraheras av varandra. Den negativa färgen eosin Y, som också är en syra, blandas med alkohol eller vatten och ättiksyra. Positivt laddade vävnadskomponenter, exempelvis protein med positivt laddade aminogrupeer vill binda till eosinfärgen. Optimalt har eosin pH 4,0 - 4,5. Är det över 4,5 färgas vävnaden för ljus och är den under 4,0 får vi utfällningar, vilka oftast ses redan i flaskan. Ada visar oss bilder på hur eosinfärgning ser ut när den är korrekt. "Det ska finnas tre olika toner av färgen" förklarade Ada.

Hematoxylin är en positivt laddad färglösning. Negativt laddade vävnadskomponenter som exempelvis cellkärnor vill binda till färgen. Rekommenderat pH för hematoxylin är mellan 2,2 - 2,8. Är pH över 3,0 får vi en bakgrundsfärgning av kollagen och muskelyvävnad. Är pH under 2,0 blir lösningen röd/gul. Ada visade hur en korrekt infärgning med hematoxylin ska se ut: "vi ska se olika former av kromatin, både öppet och stängt", "kärnmembranen ska vara väl avbildade" och "nucleoplasman ska vara ofärgad".

Ada gick sedan igenom hur färgningsprocessen går till samt vad som kan gå fel i de olika stegen. I det första steget i färgningsprocessen ska vaxet avlägsnas med hjälp av xylol och vatten ska föras tillbaka till vävnaden, det görs med en sjunkande alkoholkoncentration. Om det inte skett ordentligt blir vaxet som en barriär som färgen har svårt att ta sig igenom. Snittet ser prickigt ut eller suddigt med ljus infärgning områden. Låt glaset vara i xylol i tre steg, 3 minuter i varje steg. När glaset efter xylolsteget kommer till den 100 %-iga alkoholen

måste det vara i denna tillräckligt länge. Gå sedan i en sjunkande alkoholkoncentration ned till vatten. "Ni får prova er fram här" säger Ada.

För hematoxylin är två vanliga problem att infärgningen blir för mörk eller ospecifik. Det vill säga att exempelvis muskelceller eller kollagen färgas, att alla kärnor färgas lika eller att själva glaset färgas. Ada förklarade att det kan bero på att tiden för infärgningen varit för lång, max 4-6 minuter rekommenderas. Det kan även bero på att pH ändrats i lösningen eller att vävnadssnittet är för tjockt. Även exponering för värme, exempelvis från torkning av glaset, kan ge mörk infärgning eftersom värme ger förändringar i vävnaden. Att glaset färgas kan bero på att det är belagt med positiv laddning av något slag för att vävnaden ska fastna bättre. Lösningen är då att prova andra typer av glas

Om hematoxylinfärgningen är för ljus kan detta bero på att vävnadsprovet är för tunt, att vax finns kvar, att infärgningstiden är för kort, att hematoxylinfärgen är gammal eller utspädd förklarade Ada.

Andra problem vid färgningen med hematoxylin kan vara att glaset inte sköljts tillräckligt väl med vatten efter hematoxylinsteget, vilket kan ge ojämn färgning. "Skölj 2 gånger, 1 minut per gång" tipsade Ada. Glöm inte heller bort att diska dina behållare eller instrumentets behållare. Ada berättade att man bör tänka över vilket vatten man använder. Kranvatten kan innehålla exempelvis metaller eller klor som påverkar infärgningen. Avjoniserat vatten är bättre. Ada tipsade om vikten av att vattnet måste täcka hela glaset när det sköljs, annars kan färg finnas kvar på glaset som sedan rinner ned på snittet. Hematoxylinfärgen differentieras sedan med saltsyra alkohollösning. Om infärgningen är för ljus eller mörk kan det även bero på detta steg, se över tiderna och koncentrationerna av lösningen. Viktigt är även att sköljsteget med vatten efter differentieringen bör ske två gånger, 1 minut per gång. Bluing reagent används sedan för att göra så att hematoxylinet får den färg den ska ha.

Problem med eosinfärgningen innebär också ofta att den är för ljus eller för mörk. Om det blir för mörkt kan det bero på vilken lösning färgen är löst i, vilket ger färgen olika styrkor. Val av färgpigment kan också avgöra vilken ton färgen får, samt vilken koncentration som används. Även för eosin har snittets tjocklek betydelse. Ser man inte tre olika färgtoner beror det oftast på dålig fixering, överfärgning eller att eosin lösningen är felaktig. Vid Eosinfärgning sker sköljningen med alkohol, som beroende på %-halten tar bort eosin olika mycket. Dock behöver glaset vara tillräckligt länge i alkoholen - annars kommer det finnas vatten kvar i snittet. Ada föreslår: 3 sköljningar i 100 %-ig alkohol, 1 minut för varje och att det är viktigt att öka volymerna i varje behållare så att mer och mer av glaset täcks. Den sista behållaren ska absolut inte bli

färgad, då finns eosin kvar. Sista steget i eosinfärgningen har till syfte att ta bort alkoholen. Detta görs med xylol. "Gör detta i tre byten, med 1 minut per behållare" tipsade Ada. Om xylolsubstitut används kan de vara känsliga för fukt, det kan märkas genom att snitten blir suddiga eller "blödande". Har man inte fått ut all alkohol kan eosinet blekna bort berättade Ada.



Ada Feldman

Slutligen täcks glaset med glas eller tejp. Problem i detta steg berättade Ada kan vara att det skapas luftbubblor eller samlas skräp under glaset eller tejp, eller att monteringsmediet inte är kompatibelt med xylolsubstitut om det används. De resultat man får på sina snitt kan även leda ända tillbaka till processen då vävnadsprovet preparerades. "Var därför noga med att följa råden jag gav under gårdagen" påminde Ada slutligen.