

FIKSERET PÅ KVALITET

**Fra rutine diagnostik til
forskning**

Lidt historik om mig og opstart af det veterinære histologi-laboratorie

13 års erfaring: Patologisk afdeling ved Regions hospitalet Randers

- superbruger på Sakuras Express og automatisk indstøbnings maskine
- Udskaeringskursus
- AMIR

Ansæt ved AU-viborg for snart 2 år siden (maj'24)I forbindelse med etableringen af de nye uddannelser på Foulum, specielt med henblik på veterinæruddannelsen.

- **Etablering af Histologi og patologi lab. Fra bunden af.**
- **Ledelse og etablering af undervisningslaboratorierne til all undervisning.**
- **Undervise på 1. semester i histologi – her under opbygning af tutor**
- **assistere og undervise phd studerende i histologi**
- **udføre histologiske og immunhistokemiske processer til forskning og Diagnosticering**

Formål med vævsfiksering

- Hvad er vævsfiksering?
- Standstning af biologisk tid.
- Forudsætningen for alt efterfølgende laboratoriearbejde.
- Den gyldne standard = 4% NBF (Neutral buffered formalin)
 - Fordele: Billigt, stabilt, fremragende morfologi til H&E-farvning.
 - Ulemper: Maskering af epitoper og tab af visse kulhydrater.

Forskning og Diagnosticering

- **4% neutralbuffet formalin**
 - Bruges til diagnosticering
 - Bruges til forskning (max opbevaring 24-72 timer)

- **Methacarn,**
 - Bruges til forskning (max opbevaring 18-24 timer)

- **Zinkfiksativ**
 - Bruges til forskning (max opbevaring 24-72 timer)

Kulhydraternes vogter - Methacarn

Fokus: Bevarelse af muciner (som sialo- og sulfomuciner).

Sammensætning: En non-additiv, koagulerende fiksativ (Methanol, Chloroform, Eddikesyre).

Hvorfor Methacarn? Modsat formalin "vasker" det ikke slimstofferne ud og krymper ikke mucin-granula i samme grad.

Visualisering: Ideelt til PAS- og Alcian Blue-farvninger i tarmsystemet. Samt HID/AB til visualisering af sulfomuciner.

Når IHC kræver mere – Zink-baseret fiksering

- Fokus:** Immunhistokemi (IHC) og bevarelse af antigenicitet.
- Hvorfor Zink?** Zink-ioner stabiliserer proteiner uden de hårde cross-links fra formalin.
- Fordele:** Ofte intet behov for antigen-retrieval (HIER/PIER). Signalet står skarpere.
- Anvendelse:** Særligt relevant i forskning, hvor specifikke overflademærkører skal findes.

Den store sammenligning

Parameter	NBF (Formalin)	Zink-fiksering	Methacarn
Morfologisk detaljegrad	Fremragende. Den gyldne standard for vævsstruktur og kerne-detaljer.	God til meget god. Lidt mere vævskrympning end ved formalin.	Moderat. Hurtig koagulering kan give mere udtalt skrumpning af cellerne.
Antigenbevarelse (IHC)	Begrænset. Kræver ofte hård antigen-retrieval (HIER) pga. cross-links.	Fremragende. Bevarer epitoper uden kemisk maskering. Ideel til forskning.	God. Især god til visse proteiner, men alkohol kan ændre nogle overfladeantigener.
Mucinbevarelse	Dårlig. Mucinerne "vaskes ud" eller svulmer pga. det høje vandindhold.	Moderat. Bedre end NBF, men stadig vandbaseret, hvilket påvirker slimlaget.	Fremragende. Udfælder muciner øjeblikkeligt. Giver det mest intakte slimlag.
Sikkerhed / Toksicitet	Høj risiko. Kræver udsugning. Kræftfremkaldende og allergifremkaldende.	Lav risiko. Langt sikrere for personalet. Ofte fri for formaldehyd.	Meget høj risiko. Indeholder chloroform. Giftigt, flygtigt og kræver specialhåndtering.
Anvendelse	Rutinediagnostik og langtidsopbevaring.	Avanceret IHC og følsomme vævsmarkører.	Specialforskning i barrierer, muciner og nukleinsyrer.

Praktiske overvejelser i laboratoriet

- Logistik:** Prøveudtagning (størrelse af væv), volumenforhold (1:20) og fikseringstid.

- Håndtering:** Oplysning af personale der skal håndtere og udtage vævet.

- Valg af fiksativ:** Hvornår skal forskeren/veterinæren vælge hvad?

Protokol på Excelsior

EXCELSIOR AS

FIX: 1: Formalin 30 min.
2: Formalin 30 min.

Dehydrering: (Graduerende alkoholer)

3: Ethanol 60 min.
4: Ethanol 60 min.
5: Ethanol 60 min.
6: Ethanol 60 min.
7: Ethanol 60 min.
8: Ethanol 60 min.

Vævsklaring:

9: HistoClear 60 min.
10: HistoClear 60 min.
11: HistoClear 60 min.

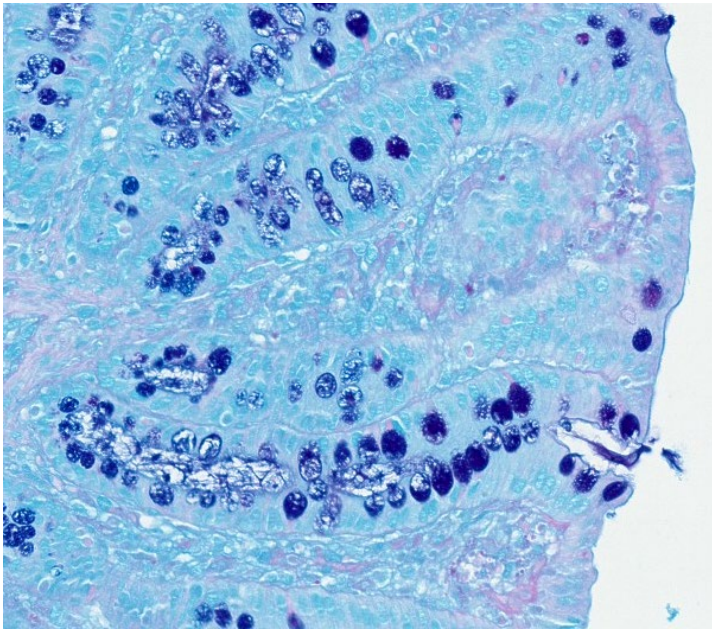
Infiltrering:

12: Paraffin 120 min.
13: Paraffin 120 min.
14: Paraffin 120 min.

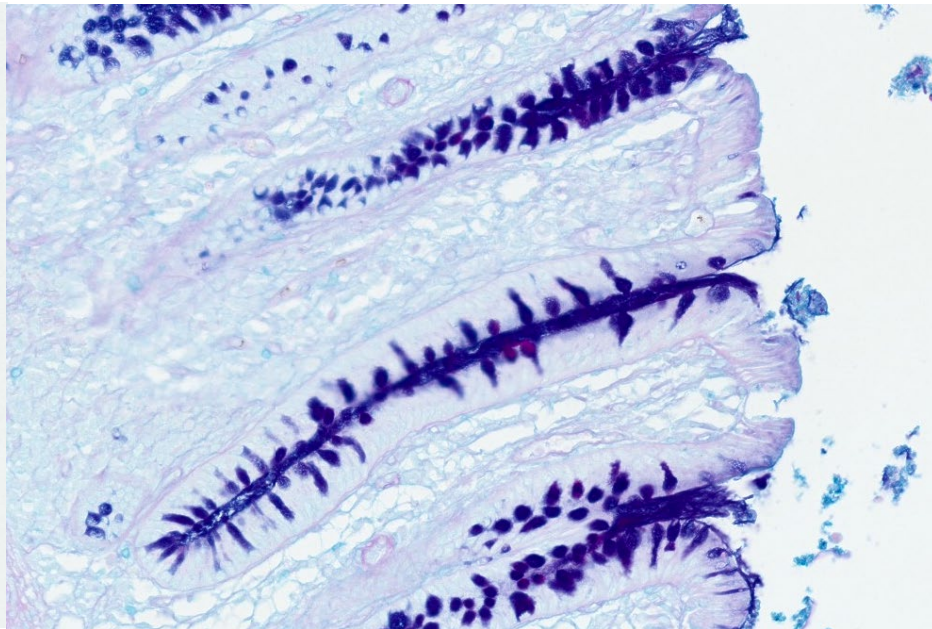
Methacarn: Startes programmet fra Dehydreringen.

Zink: Prøverne bliver skyllet i dem. vand 3X10 min. og startes så fra Dehydreringen.

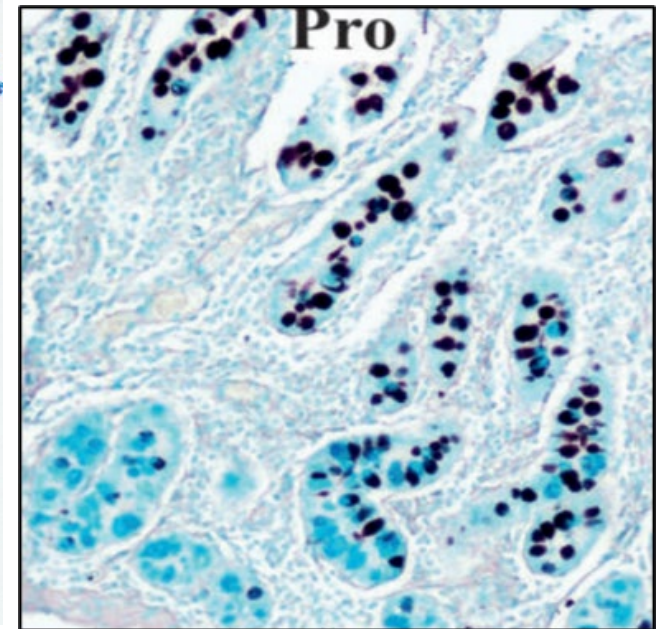
Case-studie: Grisetarmen i fokus



Formalin fikseret AB/PAS X20



Methacarn fikseret AB/PAS X20

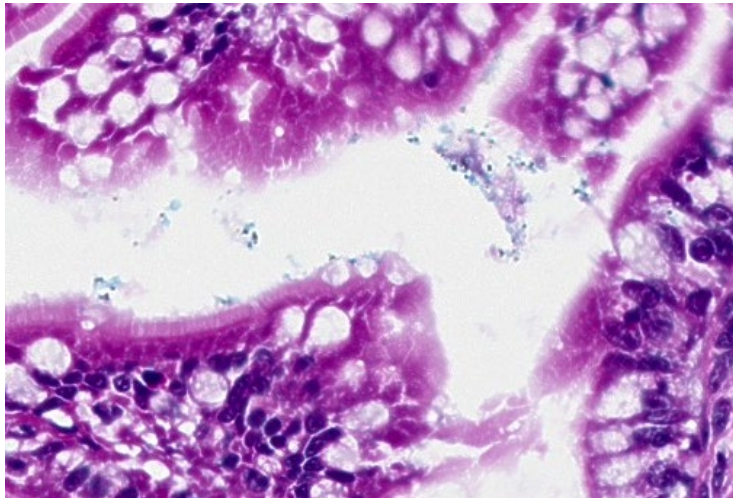


Methacarn fikseret HID/AB X20

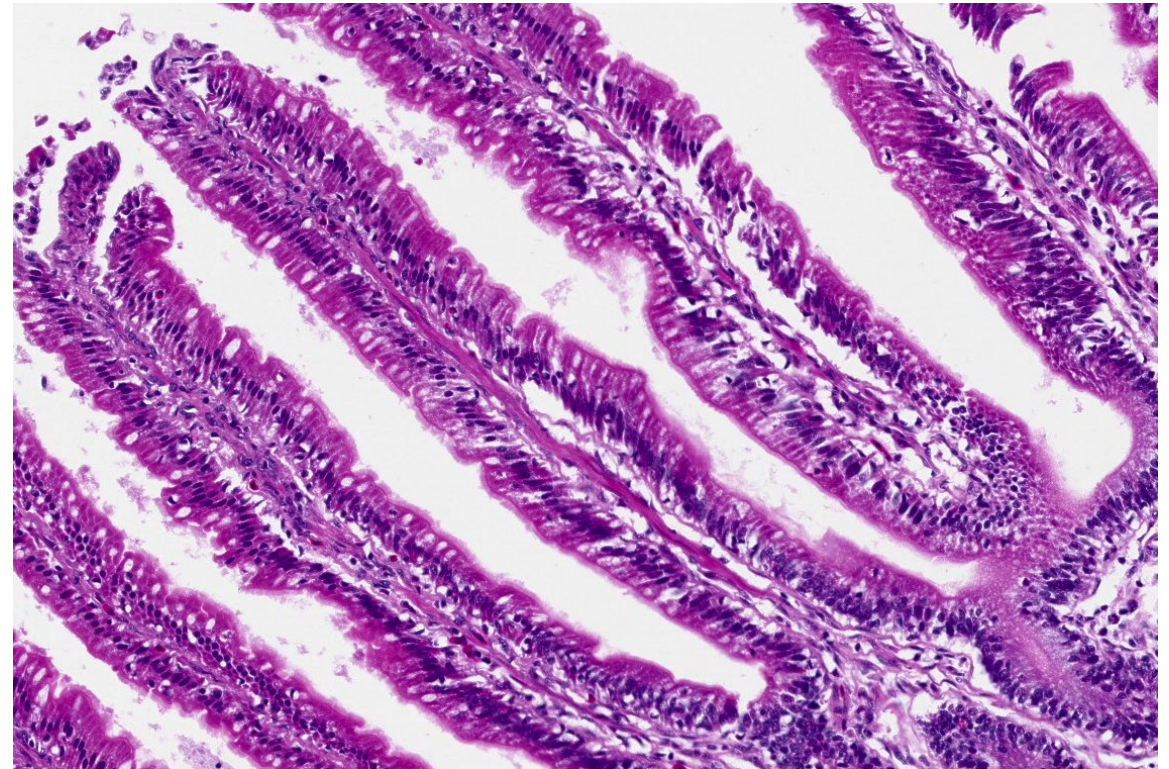
Case studie: Immunhistokemi på høns

Problemstillinger:

- Forlang fikseringstid
- Manglende vaskestep
- For hård håndtering af vævsbiopsier



Zinkfikseret tarmsnit med Zinkkrystaler HE X40



72 timers Zinkfikseret tarmsnit fra høne HE X20

Spørgsmål?