

Svensk förening för Patologi

Kvalitetsdokument för preanalytisk hantering, kvalitetssäkring och optimering av den histopatologiska labprocessen

Fastställt: 2022-06-16; version 1.1

Framtaget av KVASt kvalitetssamordnare:

Anders Askerlund, Halmstad

Linda Rännar, Umeå

Pia Gabrielsson, Borås

Ulrika Nordström, Stockholm

Adjungerad: Emilia Andersson, Svensk förening för patologi

Adjungerad: Jerker Green, IT och verksamhetsstrateg, Biobank Sverige, Uppsala

Innehållsförteckning

1. Förord
2. Tid till fixering
 - 2:1 Ischemi
3. Fixering
 - 3:1 Formaldehyd
4. Process
 - 4:1 Utskärning
 - 4:2 Urkalkning
 - 4:3 Dehydrering
 - 4:4 Inbäddning
 - 4:5 Snittning
 - 4.5.1 Specifika riktlinjer vid snittning till Immunhistokemi
5. Förvaring, klossar och glas
6. Dokumentation och kvalitetsindikatorer
7. Diskussion
8. Referenser
9. Bilaga 1. Förkortningar

1. Förord

I Sverige finns idag få rekommendationer för de preanalytiska stegen och labprocessen, till skillnad mot den mer reglerade diagnostiken. Dessa steg kan dock i hög grad påverka möjligheten till patientsäker diagnostik samt därmed utfallet för patienten. Enligt studier kan 60% av alla diagnostiska fel, såsom falskt positiva eller falskt negativa biomarkörsresultat härledas till pre-analytiska och processrelaterade faktorer (1). Diagnostiken kan ha en direkt påverkan på val av patienters behandling och prognos. Den histopatologiska diagnostiken består förutom av morfologisk bedömning, även av analys av proteiner, RNA och DNA. I takt med att allt fler molekylärbiologiska analyser krävs för diagnos och handläggning av patienter ökar kravet på standardisering.

The College of American Pathologists (CAP) bildade därför en projektgrupp “Preanalytics for Precision Medicine Project Team” i syfte att utveckla evidensbaserade rekommendationer för preanalytiskt omhändertagande och labprocessen av både vävnads- och blodprover. Gruppen som leddes av C. Compton, har i en metaanalys analyserat 328 publikationer och sammanställt resultat och rekommendationer som publicerats i en artikel 2019 (2). Detta dokument är första utgåvan av svenska rekommendationer baserade främst på ovan nämnda publikation men även europeiska consensus-rekommendationer från Clinical and laboratory standards institute (3). Konklusionen från projektgruppen är att trots att den preanalytiska hanteringen och labprocessen innehåller ett stort antal variabler, kan en majoritet av problemen härledas till ett fåtal kritiska faktorer. En standardiserad prediagnostisk hantering är en förutsättning för kvalitativ korrekt diagnostik samt för nationell forskning på biobanksmaterial, då materialets egenskaper ska vara oberoende av vilket laboratorium det processats på.

Fokus för dessa svenska nationella rekommendationer är den vetenskapliga förankringen samt även att hitta kvalitetsindikatorer som förbättrar hanteringen av patientprover genom att möjliggöra statistiska jämförelser och fortlöpande utvärdering. Vad gäller riktlinjer för hantering av specifika provtyper, såsom antal bitar, orientering, snittnivåer mm hänvisas till lokala riktlinjer, KVASt för respektive organ och RCC.

2. Tid till fixering

Provtagningsanvisningar ska ange om vävnad ska hanteras fixerad eller ofixerad, hur provet förvaras innan transport samt hur prover förvaras under transport.

2:1 Ischemitid

För att säkerställa analyskvaliteten på de vävnadspreparat som undersöks behöver tiden från det att preparatet opereras bort till det läggs i fixeringslösning vara så kort som möjligt, och får ej överstiga 60 minuter. (2) Prover som ska anlända till laboratoriet ofixerade måste därför omhändertas omedelbart.

När det gäller varm ischemitid, dvs tiden från att ett organs blodtillförsel stryps till dess det är ute ur kroppen, bör det eftersträvas att denna tid hålls så kort som möjligt. Det är dock en variabel som främst påverkas av operationstekniska förhållanden. Det är önskvärt att denna tid dokumenteras och överförs till LIS för framtida förståelse av påverkan på biomarkörer.

3. Fixering

Syftet med fixering är att avbryta livsprocesserna momentant och bevara vävnaden så lik det levande tillståndet som möjligt både avseende fysiska och kemiska egenskaper.

Vävnadsprover i rutinhandling immersionsfixeras vanligtvis. Standardisering av fixeringsproceduren är av vikt då den påverkar resultat och kvaliteten på immunohistokemiska och molekylärbiologiska analyser. (2)

3.1 Formaldehyd

Fixering av vävnadsprover sker vanligtvis med 4% formaldehyd, vilket även benämns 10% Neutral Buffered Formalin (NBF) eller i vardagligt tal, formalin. Den färdiga fixeringslösningen framställs genom att en mättad (37-40 %) formaldehydlösning spädes 1:9 med H₂O. För att behålla ett stabilt neutralt pH buffras fixeringslösningen med fosfat. Benämningen "10% NBF" syftar således på spädningen medan benämningen "4% formaldehyd" syftar på den slutliga koncentrationen av formaldehyd.

Formaldehyd är ett kemiskt adderande, gelerande fixativ där proteinernas tertiärstruktur bevaras genom interna tvärbindingar. Vid bildandet av dessa metylenbryggor behålls exponeringen av den hydrofila delen av proteinet. Bindingarna är delvis reversibla.

Fixering med NBF utförs i rumstemperatur 18°C till 25°C, temperaturer utanför intervallet påverkar fixering/vävnadskvalitet negativt då lägre temperaturer gör den kemiska reaktionen långsammare och högre temperaturer påskyndar autolys. Volymen fixativ bör vara 15 - 20:1 med en absolut nedre gräns på 10:1. (2)

Penetrationshastighet och fixeringshastighet skiljer sig åt vid formaldehydfixering då de kemiska bindingarna tar längre tid än penetrationen in i vävnaden. Penetrationshastigheten för NBF är generellt 1mm/h och rekommenderad optimal fixeringstid för vävnad upp till 5mm i tjocklek är 24h med ett minimum på 6h och maxtid 36h. Större preparat behöver därför skäras upp för optimal fixering. Lipidrik vävnad kan fixeras upp till 48h. (2) Totaltid i fixeringslösning för vävnaden inkluderar även eventuell tid i formaldehyd i dehydreringsmaskinen.

Vävnad som är otillräckligt fixerad innan dehydrering riskerar att bli etanolfixerad under dehydreringsprocessen. Etanol är ett koagulerande fixeringsmedel som denaturerar och förändrar proteinstrukturen genom sin dehydrerande verkan, detta är en irreversibel process.

Formaldehyden som används bör kvalitetkontrolleras regelbundet avseende koncentration och pH. (2)

4. Process

4:1 Utskärning.

För att säkerställa ett fritt flöde i dehydreringsprocessen ska bitar som läggs i kassett ej nudda kassetts sidokanter eller lock. Vid utskärning av tumörmaterial är det rekommenderat att redan vid utskärning välja ut en bit för efterföljande immunhistokemi/molekylär analys. Vid val av bit bör andelen fettvävnad minimeras, och om möjligt bör biten/bitarna vara maximalt 2 - 3 mm tjock/a (3) Beakta ev. olika dehydreringsprogram för bitar med olika tjocklek för optimalt resultat.

Vid användande av palperingslösning (tex GEWF) för förbättrad detektion av lymfkörtlar (4 och 5) rekommenderas att bitar till immunologiska undersökningar tas innan preparatet läggs i lösning då otillräckligt publicerad forskning finns om hur detta kan påverka undersökningsresultat.

4:2 Urkalkning

Urkalkning syftar till att göra förkalkade vävnader mjukare och möjliga att snitta. Den främsta mineralkomponenten i förkalkade vävnader är hydroxyapatit. För att lösa ut hydroxyapatit används framför allt saltsyra, salpetersyra eller myrsyra. Även EDTA kan användas för urkalkning. Dessa metoder fungerar endast på preparat som är hårda på grund av förkalkning. (6)

Immunhistokemiska undersökningar på vävnadspreparat ger ofta sämre resultat efter behandling vid lågt pH. Svaga syror med högre pH är därför att föredra. Molekylärbiologiska analyser ska inte utföras på urkalkat material eftersom resultaten inte är pålitliga. (2) Det är därför rekommenderat att om möjligt skrapa eller skära loss vävnad som inte är förkalkad för dessa analyser innan resterande vävnad urkalkas. Urkalkning med EDTA sker i en något basisk miljö, vilket resulterar i att vävnaden inte bryts ner som vid användning av syror, men nackdelen är att urkalkning i EDTA är en långsammare process.

Vävnaden måste vara helt fixerad innan urkalkningen påbörjas. Fixeringsmedlet bör noggrant sköljas bort från vävnaden med vatten för att undvika oönskade kemiska reaktioner. Bufferten i NBF kan exempelvis minska effekten av urkalkningsmedlet.

Volymen urkalkningsmedel ska vara minst 15 - 20 gånger vävnadens storlek. Används syra byts den med 24 – 48h mellanrum. EDTA byts med 3 - 5 dagars mellanrum för optimalt resultat. För att minimera de negativa effekterna av urkalkning bör vävnaden testas dagligen. Testning med nål är den vanligaste metoden även om den medför risk för artefakter. Urkalkning i rumstemperatur är att föredra.

4:3 Dehydrering, clearing och paraffinfiltrering

Syftet med dehydrering, clearing och paraffinfiltration är att ersätta den extracellulära vätskan i vävnaden med ett stabiliserande (förhårdnande) medel för att möjliggöra snittning. Dehydrering av NBF fixerad vävnad utförs med alkohol i stigande koncentration efterföljt av ett intermedium/clearing med ett lösningsmedel som är xylen eller substitut, exempelvis

isoparaffin. Lösningsmedlet löser också ut kvarvarande lipider. Intermedium/clearing steget möjliggör infiltration av paraffin som fungerar som stabilisator av vävnaden. Vävnaden måste vara fixerad innan dehydrering påbörjas.

Längden på dehydreringsprogrammet avgörs av vävnadens tjocklek och lipidinnehåll. Totallängd samt tid, temperatur och tryck i respektive lösningsbad ska valideras utifrån olika vävnadstyper. Programmen ska även verifieras på respektive laboratorium. Förutom morfologi bör även RNA-kvalitet vara en del av verifieringen, då denna påverkas av dehydreringsprocessen. Rutinlaboratorier bör ha minst 3 olika dehydreringsprogram för att kunna hantera olika vävnadstyper och bibehålla acceptabel vävnadskvalité.

Rekommenderat är att första etanolbadet är 70% för att gradvis ökas till 100%, denna ersätts med ett intermedium/clearingmedel, vanligtvis xylen eller substitut därav. Lösningsmedlet löser också ut kvarvarande lipider. Intermedium/clearingsteget möjliggör infiltration av paraffin som slutligen fungerar som stabilisator av vävnaden. Tid i xylen och alkohol ska hållas så kort som möjligt för att undvika att vävnaden blir hård och för att undvika ökad bakgrundsfärgning i immunhistokemiska färgningar. (3)

Dehydreringsprocessen utförs utan tillsatt värme, men när vävnaden infiltreras i paraffinbadet värms paraffinet upp för att smältas. Undvik för hög värme och använd paraffin av god kvalitet med smältpunkt under 60°C. Tiden i varmt paraffin ska hållas så kort som möjligt. (2)

Alla reagens/lösningar ska bytas regelbundet och rutiner för detta ska vara etablerade för att säkerställa rätt koncentration och renhet.

Mellan byten av lösningar bör kontroller göras med hydrometer för att säkerställa att etanolkoncentrationen inte förändras samt att det inte bildas kondens i dehydreringsmaskinens processor.

Mikrovågsdehydrering

Genom att använda mikrovågor i olika steg i dehydreringen påskyndas processen. Mikrovågsdehydrering utförs främst med absolut etanol och isopropanol som också kan användas som intermedium/clearing. För dehydrering av preparat / vävnader med högt lipidinnehåll kan ett steg med lösningsmedel läggas till.

Det är ont om oberoende forskning i ämnet, det behövs ytterligare forskning för att utröna hur mikrovågsdehydrering påverkar materialets integritet.

4:4 Inbäddning

Syftet med inbäddningen är att producera klossar som möjliggör optimala snitt vid snittning. För att kunna producera ett snitt med rätt förutsättningar för diagnostisering och molekylär- eller immunhistokemiska analyser krävs ett paraffin med låg smältpunkt och bra textur. Paraffin med hög smältpunkt samt paraffin med tillsatser bör undvikas, då tillsatser kan orsaka föroreningar i provet samt försvåra utvinnandet av biomolekyler. (7) Ett paraffin med hög smältpunkt kan försvåra avparaffinering, utvinnandet av biomolekyler samt kan påverka

utfallet av immunhistokemi i kvantitet och intensitet. (2) Studier rekommenderar paraffin med en smältpunkt under 60 °C. (2,7)

Tid i smält paraffin eller ”torr” värme (utan paraffin) i samband med inbäddning bör hållas så kort som möjligt, då värme påverkar det slutliga resultatet avseende uttryck av antigener och gör att vävnaden krymper och blir hårdare. (3) Då publicerade studier för maxtider av varm (~60°C) förvaring av icke inbäddade vävnadsprover saknas, hänvisas till maxtid för värmeexponering av snittad vävnad vilket skall understiga 60 minuter.

4:5 Snittning

Snitt tas med hjälp av mikrotom från olika nivåer av vävnaden i klossen. Mikrotomen är ett precisionsinstrument, som ska uppfylla kraven på tunna och jämna snitt. Frammatning i instrumentet och tjocklek på de producerade snitten bör kontrolleras för att säkerställa reproducerbarhet och kvalitet.

Det är viktigt att knivbladet har rätt slipning för vävnadstypen, att det hålls vasst och utan skador samt att knivvinkeln optimeras enligt tillverkarens instruktioner. En för stor vinkel kan orsaka skrapartefakter i snitten, och för liten vinkel resulterar i snitt som varierar i tjocklek.

För att underlätta snittningen, kan paraffinklossarna kylas på is eller kylplatta, men överdriven tid i isbad bör undvikas då rehydrering kan orsaka förvrängning av cellulära detaljer.

Sträckning av paraffinsnitten kan ske med hjälp av en värmeplatta eller varmt vatten. Temperaturen bör hållas ca 5 - 10 °C lägre än paraffinets smältpunkt, hög värme kan orsaka artefakter. Säkerställ genom torkning att snitten fäster på glaset samt att inget vatten finns mellan snitt och glas innan färgning då det kan orsaka artefakter. Torktemperaturen för glaset ska ej överstiga 60 °C. (3)

Val av snittjocklek är en kompromiss mellan upplösning och kontrast samt totalt informationsinnehåll i snittet. Målet är att få ett snitt med ett cellager och tillräckligt stark infärgning för att det totala informationsinnehållet i snittet ska bli så bra som möjligt för korrekt diagnostik.

Att använda destillerat vatten reducerar risken för kontamination som kan påverka färgningens kvalitet, till exempel kan järn och kalcium interferera med en del specialfärgningar, särskilt silverfärgningar, och klor som finns i kranvatten kan ha en blekande effekt (8).

4.5.1 Specifika riktlinjer vid snittning till immunohistokemi

Snitt på glas till immunologiska färgningar torkas optimalt i 24h rumstemperatur, men av praktiska skäl rekommenderas 60 minuter i värmeskåp som ej överstiger 60 °C. (3) Använd glas med laddning. Dessa glas ska ej torkas på värmeplatta utan stående i värmeskåp. Det är viktigt att kontrollera hållbarhet på snittade glas så kallad ”slide aging”, för aktuell antikropp.

För immunhistokemiska analyser rekommenderas att följa protokollets rekommendation för snittjocklek. (9)

Använd vävnadskontroll på varje glas, så kallad ”on slide” kontroll, enligt NordiQC rekommendationer (10) För att undvika kontaminationer och korsreaktioner används destillerat vatten i vattenbad vid snittning till immunohistokemi (11).

5. Förvaring, klossar och glas

Vävnader som är optimalt fixerade och dehydrerade kan lagras under lång tid. Uttrycket av vissa antikroppar försvagas dock med tiden. Detta gäller även bevarandet av RNA:s och DNA:s integritet. Dessa nedbrytningsprocesser verkar vara beroende av kvarvarande vatten i vävnaden eller vatten som tillförs från omgivande miljö, ex luftfuktighet. Det är därför viktigt att vävnaden är ordentligt dehydrerad och att klossarna förvaras torrt och i rumstemperatur 18–25 °C. (3,12-13)

Enligt 4§ biobankslagen måste klossarna förvaras på ett sådant sätt att vävnadsproverna inte riskerar att förstöras och obehöriga inte får tillgång till dem. Detta innebär att de måste förvaras så att de är skyddade från brand, skadedjur och annan förstörelse. (14)

6. Dokumentation och kvalitetsindikatorer

Laboratoriet ska ha dokumenterade rutiner för att prover ej skadas, förloras eller att dess kvalitet ej försämras vid preanalytisk hantering, såsom provtagning, fixering, transport och ankomst till laboratorium. (15)

Ett första steg mot att säkerställa och förbättra provkvaliteten är att dokumentera och mäta för att identifiera vad som behöver åtgärdas. Nedan är listat de variabler som vi identifierat har stor påverkan på provmaterialet och som därför bör dokumentera i LIS för att kunna följas upp regelbundet. Vi har även listat ett antal kvalitetsindikatorer. Statistik bör tas fram regelbundet, analyseras och vid eventuella funna brister bör det finnas en handlingsplan för åtgärder. Somliga av dessa kvalitetsindikatorer kommer att ingå i ett nationellt kvalitetsutskick medan andra är förslag på vad laboratoriet själv kan följa.

I nedanstående tabell finns de variabler som vi identifierat som kritiska för provets kvalitet och som behöver registreras för att kunna ta fram dessa kvalitetsindikatorer.

Variabler som bör registreras i LIS	Kvalitetsindikator
Information från remittent, utöver medicinsk information.	
Provdatum	-
Provtagningsstid	-
Varm ischemitid (önskvärt)	-
Kall ischemitid (i minuter)	Andel resektat med kall ischemitid >60 minuter (%)

Information från laboratorium	
Är provmaterialet i acceptabel mängd formalin/rätt medium? Ja/Nej	Andel prover i acceptabel mängd formalin/rätt medium. (%)
Tidpunkt för start av fixering	-
Fixeringslösning	-
Är bitar/skivor maximalt 5 mm tjocka när de fixeras? Ja/Nej.	Andel prover som fixerats i icke optimal tjocklek. (%)
-	Finns rutiner för att regelbundet testa pH och koncentration på formaldehyd? Ja/Nej
Urkalkningstid samt medium.	Dokumenteras urkalkningstid i LIS. Ja/nej. Finns rutiner för att säkerställa immunhistokemisk undersökning och/eller molekylär analys på icke urkalkat material? Ja/nej
Ev. användande av palperingslösning	Finns rutin för att säkerställa immunhistokemi/molekylär analys på material som inte exponerats för palperingslösning? Ja/Nej
Total fixeringstid, inklusive eventuell fixeringstid i dehydreringsutrustning.	Andel prover fixerade mindre än 6h (%), mellan 6–36 h (%), över 36h (%)
Dehydreringslängd och metod	Finns möjlighet att spåra varje enskilt preparat till specifik utrustning samt dehydreringsprogram? Ja/nej.
-	Används Xylen? Ja/Nej Används substitut för Xylen? Ja/Nej
-	Finns rutiner för frekvens och kvalitetskontroll för byte av lösningar i dehydreringsutrustning? Ja/Nej
Exponeringstid för värme/smält paraffin inför bäddning över 60 minuter. Ja/Nej.	Finns riktlinjer för maxtider i varmt paraffin efter dehydreringsprocess? Ja/nej
-	Används högkvalitativt paraffin med låg smältpunkt? Ja/nej.
-	Finns rutiner att kontrollera frammatning på mikrotom och tjocklek på producerade snitt? Ja/Nej
Exponeringstid för värme vid torkning av glas över 60 minuter. Ja/Nej.	Finns riktlinjer för maxtider i värme vid torkning av glas? Ja/nej
Antal dagar från snitt av glas till immunhistokemisk färgning (slide ageing)	Finns rutin etablerat för att säkerställa att immunhistokemiska färgning inte utförs på för gamla snitt? Ja/Nej

För immunfärgning samt övrig specialfärgning: "On slide" kontroll använd. Ja/Nej.	Andel enskilt färgade glas där "on slide" kontroll används vid specialfärgnings (%) samt immunhistokemisk färgning%)
-	Finns rutiner att kontrollera temperatur och luftfuktighet för klossförvaring? Ja/Nej

7. Diskussion

Att undersöka vävnad för att ställa diagnos och vägleda behandlingsbeslut är en av förutsättningarna för precisionsmedicin. Den laborativa processen är komplex och många av stegen är baserade på vetenskap och även till stora delar beprövad, icke dokumenterad, erfarenhet. För en patientsäker diagnostik ställs höga krav för att undvika falskt negativa eller falskt positiva analysresultat. Detta gäller i hög grad vävnadens stabilitet för immunhistokemiska och molekylärbiologiska analyser som ofta har en direkt påverkan på behandlingsbeslut. Det finns många andra kvalitetsaspekter där diagnostikerns tolkning av resultatet kan kompensera för variationer, tex snittjocklek eller hematoxylin-eosinfärgning. Med ökad användning av digital patologi och AI/maskininlärningsalgoritmer kan vi dock förvänta oss större behov av att optimera även dessa aspekter i framtiden.

I denna första utgåva av riktlinjer för labprocessen har främst fokuserats på att standardisera hanteringen fram till färgning och IHC samt förvaring av FFPE klossar. Standardisering är av vikt för patientens diagnos men också för att kvalitetssäkra vår nationella biobank. Biobanksmaterial ligger till grund för den forskning som bedrivs och därmed grundas framtida behandlingar på resultat som baseras på detta material. Att med säkerhet veta hur materialet man analyserar vid studier har hanterats i labprocessen underlättar för att kunna dra slutsatser och bedöma resultat. Därav är dokumentation av kvalitetsindikatorer vi listat samt ett standardiserat handhavande av största vikt.

Rekommendationerna i detta dokument bygger på vetenskapliga studier. Det finns många etablerade rutiner och metoder som används på laboratorierna idag som inte testats vetenskaplig eller beskrivits i vetenskaplig litteratur och då har vi avstått från att ge entydiga rekommendationer.

Naturligtvis ser vi ett behov att ta fram ytterligare riktlinjer gällande den fortsatta labprocessen, det vill säga visualisering, IHC samt scanning. För dessa parametrar hänvisas för närvarande till leverantörens publicerade protokoll och befintliga lokala rutiner för validering och verifiering.

Vissa variabler och kvalitetsindikatorer som listats i detta dokument kan i dagsläget, med den utrustning och LIS som upphandlats, vara svåra att uppnå. Vår förhoppning är att listan kan vara ett stöd till framtida kravspecifikationer vid upphandling av utrustning och LIS.

En utökad dialog med operationsavdelningar och övriga aktörer som tar prover och skickar till histologisk undersökning behövs för att kunna dokumentera tex ischemitider i LIS. I de fall optimala processtider, tex fixeringstider, inte kan uppnås behöver lokala rutiner utformas för att uppfylla kvalitetskraven.

Ett urval av de identifierade rekommendationerna kommer att ingå i ett nytt nationellt kvalitetsutskick/rapport av kvalitetsindikatorer. Vi har även identifierat

behov av externa kontrollprogram, tex utskick med referensvävnad för kvalitetskontroll av dehydrering.

Vi vill skicka ett särskilt tack till dem som tagit sig tid att läsa remissutgåvan och har inkluderat de konkreta förslag och rättningar som inkommit. Då det här är ett levande dokument så uppmanar vi även till att komma in med tips och förslag på ämnen som ni ser behov av att inkluderas i nästa utgåva.

Referenser

1. **Tosuner Z, Gücin Z, Kiran T, Büyükpınarbaşı N, Turna S, Taşkıran O, Arici DS.** A Six Sigma Trial For Reduction of Error Rates in Pathology Laboratory. *Turk Patoloji Derg.* 2016, Vol. 32(3):171-7. doi: 10.5146/tjpath.2015.01356.
2. **Compton CC, Robb JA, Anderson MW, Berry AB, Birdsong GG, Bloom KJ, Branton PA, Crothers JW, Cushman-Vokoun AM, Hicks DG, Nowak JA, Olson D, Pfeifer JD, Schade A, Vance GH, Walk EE, Yohe SL.** Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. 2019, Vol. 143(11):1346-1363, ss. 1353–1356.
3. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Quqlity assurance for designe control and Implematation of immunohistochemistry assays,Approved Guideline- Second addition.* 2011.
4. **Ken J. Newell, MD, PhD, o.a.** GEWF Solution An Inexpensive, Simple, and Effective Aid for the Retrieval of Lymph Nodes From Colorectal Cancer Resections. *Arch Pathol Lab Med.* 2001, Vol. 125: 642-645.
5. **Horne J, Bateman AC, Carr NJ, et al.J.** Lymph node revealing solutions in colorectal cancer: should they be used routinely? *Clinical Pathology.* 2014, Vol. 67:383–388.
6. **Singh V M, Salunga R C, Huang V J, Trans Y, Erlander M, Plumlee P, Peterson M R.** Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies. *Annals of Diagnostic Pathology.* 2013, Vol. 17:322-326.
7. **Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams M, Palma JF, Warrington JA.** Tissue Handling and Specimen Preparation in Surgical Pathology: Issues Concerning the Recovery of Nucleic Acids From Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2008, Vol. 132(12):1929-35.
8. **MERCK.** *Water for Histology.* [Online] www.merckmillipore.com/SE.
9. **Libard, S., Cerjan, D. & Alafuzoff, I.** Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol.* 2019, Vol. 151; 91–96.
10. **Nordic immunohistochemical Quality Control .** [Online] www.nordiqc.org.
11. **MERCK.** *Water for Immunohistochemistry.* [Online] www.merckmillipore.com/SE.
12. **R Xie, J-Y Chung, K Ylaya, R L Williams, N Guerrero, N Nakatsuka, C Badie and S M Hewitt.** Factors Influencing the Degradation of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections . *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2011. Vol. 59 (4) 356-365 .
13. **Grillo F, Bruzzone M, Pigozzi S, Prosapio S, Migliora P, Fiocca R, Mas tracci L.** Immunohistochemistry on old archival parafn blocks: is there an expiry date? *J Clin Pathol .* 2017, Vol. 70:988–993.
14. **Sveriges Riksdag.** *Lag (2002:297) om biobanker i hälso- och sjukvården m.m.* [Online] www.riksdagen.se.
15. **Swedish standards institute.** *SVENSK STANDARD · SS-EN ISO 15189:2012.* [Online] www.sis.se.

8. Bilaga 1. Förkortningar

AI	Artificiell intelligens
CAP	The College of American Pathologists
DNA	Deoxiribonuklensyra
EDTA	EthylenDiameneteTraacetic Acid
FFPE	Formalinfixeradeparaffininbäddade klossar
GEWF	Glacial acetic acid, Ethanol, Water Formalin
IHC□	Immunhistokemi
KVAST	Kvalitets- och standardiseringskommittén
LIS	Laboratorieinformationssystem
NBF	Neutral buffrad formaldehyd
RCC	Regionalt CancerCentrum
RNA	Ribonukleinsyra