

101 SCHRITTE ZU EINER BESSEREN HISTOLOGIE



Knowledge
Pathway

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives

Leica
BIO SYSTEMS

Auf ihrem Weg vom Patienten zum Pathologen erfordert die Vorbereitung einer Gewebeprobe für die histologische Untersuchung Sorgfalt, Geschick und verlässliche Verfahren. Dieser Leitfaden gibt praktische Ratschläge zu bewährten Methoden und erklärt, wie häufige Fehler vermieden werden können.

Dabei wird jeder Aspekt des histologischen Prozesses berücksichtigt: Probenahme und -vorbereitung, Infiltration, Einbettung, Schnittdarstellung und Färbung (Routine- und Spezialfärbungen, Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung).

Wir hoffen, dass die einzelnen Schritte helfen, die gute histologische Praxis in Erinnerung zu rufen, und dass sie die Fehlersuche vereinfachen, wenn die Ergebnisse mal nicht zufriedenstellend sein sollten.

A handwritten signature in black ink, reading "Geoffrey Rolls". The signature is written in a cursive, flowing style.

Geoffrey Rolls
Leica Biosystems

Inhalt

Probenahme und -transport

- Schritt 1 Mechanische Schäden vermeiden
- Schritt 2 Das Austrocknen der Probe verhindern
- Schritt 3 Hitzeschäden vorbeugen
- Schritt 4 Chemische Schäden vermeiden
- Schritt 5 Proben adäquat etikettieren
- Schritt 6 Sofortige Fixierung sicherstellen
- Schritt 7 Ausreichend Fixiermittel und einen geeigneten Behälter verwenden
- Schritt 8 pH-Wert des Fixiermittels prüfen
- Schritt 9 Fixierung großer Proben beschleunigen
- Schritt 10 Unnötige Verzögerungen vermeiden
- Schritt 11 Proben schonend handhaben

Probenvorbereitung

- Schritt 12 Ausreichende Fixierung gewährleisten
- Schritt 13 Mit dünnen Probenscheiben arbeiten
- Schritt 14 Probenschäden vermeiden
- Schritt 15 Kreuzkontamination verhindern
- Schritt 16 Biopsiepads richtig verwenden
- Schritt 17 Geeignete Kassetten wählen
- Schritt 18 Kassetten nicht überladen
- Schritt 19 Kassetten eindeutig beschriften

Infiltration

- Schritt 20 Protokolle von angemessener Dauer wählen
- Schritt 21 Zusätzliche Fixierung
- Schritt 22 Reagenzienqualität erhalten
- Schritt 23 Hochwertiges Wachs verwenden
- Schritt 24 Potenziell gefährliche Reagenzien vermeiden

Einbettung

- Schritt 25 Proben sorgfältig ausrichten
- Schritt 26 Geeignete Gussform wählen
- Schritt 27 Proben schonend handhaben
- Schritt 28 Proben nicht übermäßiger Hitze aussetzen
- Schritt 29 Temperaturen regelmäßig prüfen
- Schritt 30 Gussformen nicht überfüllen

Mikrotomie

- Schritt 31 Hochwertige Klingen nutzen
- Schritt 32 Einen optimalen Neigungswinkel einstellen
- Schritt 33 Blöcke vorsichtig trimmen
- Schritt 34 Gefrierschäden vermeiden
- Schritt 35 Ausreichend gekühlte Blöcke schneiden
- Schritt 36 Schnitte langsam schneiden

Aufschwimmen und Aufziehen

- Schritt 37 In sauberem Wasser arbeiten
- Schritt 38 Für saubere Objektträger sorgen
- Schritt 39 Kreuzkontamination verhindern
- Schritt 40 Kontamination durch Schuppen verhindern
- Schritt 41 Nicht von mehreren Blöcken aufziehen
- Schritt 42 Wassertemperatur prüfen
- Schritt 43 Faltenbildung reduzieren
- Schritt 44 Übermäßige Ausdehnung der Schnitte vermeiden
- Schritt 45 Aufschwimmende Schnitte nicht beschädigen
- Schritt 46 Schnitte sorgfältig auswählen
- Schritt 47 Blasenbildung und -einschluss vorbeugen
- Schritt 48 Abheben der Schnitte vom Objektträger verhindern

Schnitttrocknung

- Schritt 49 Vor dem Trocknen abtropfen lassen
- Schritt 50 Trocknungstemperatur überwachen
- Schritt 51 Angemessene Trocknungszeit wählen

Routinefärbung (H&E)

- Schritt 52 Zeitliche Vorgaben einhalten
- Schritt 53 Qualität der Färbung prüfen
- Schritt 54 Färbebedingungen standardisieren
- Schritt 55 Vollständige Entparaffinierung sicherstellen
- Schritt 56 Reagenzien regelmäßig erneuern
- Schritt 57 Schnitte gründlich
- Schritt 58 Hämatoxylin-Qualität der Hämatoxylin-Lösung kontrollieren
- Schritt 59 Vollständiges Bläuen der Zellkerne sichern
- Schritt 60 Ungleichmäßige Eosin-Färbung vermeiden
Gleichmäßige Eosinfärbung begünstigen
- Schritt 61 Eosin-pH-Wert der Eosin-Lösung kontrollieren

Eindecken

- Schritt 62 Vor Klärung und Eindecken gründlich entwässern
- Schritt 63 Austrocknen und Kristallbildung vermeiden

Spezialfärbungen

- Schritt 64 Die Färbung verstehen
- Schritt 65 Immer eine Positivkontrolle mitführen
- Schritt 66 Zeitliche Vorgaben einhalten
- Schritt 67 Stabilität der Reagenzien berücksichtigen
- Schritt 68 Reagenzien ordnungsgemäß lagern
- Schritt 69 Dem Protokoll folgen
- Schritt 70 Abweichungen notieren
- Schritt 71 Waschschritte standardisieren
- Schritt 72 Mikroskop für Qualitätskontrolle einstellen

Immunhistochemie

- Schritt 73 Hochwertige Schnitte verwenden
- Schritt 74 Optimale Fixierung sicherstellen
- Schritt 75 Unzureichender Schnitthaftung vorbeugen
- Schritt 76 Entparaffinierung, Rehydrierung und Reagenzienauftrag optimieren
- Schritt 77 Konzentrationsgefälle vermeiden
- Schritt 78 Antikörper sorgfältig auswählen
- Schritt 79 Datenblätter lesen
- Schritt 80 Geeignete Methoden zur Demaskierung wählen
- Schritt 81 Kreuzreaktivität der Antikörper berücksichtigen
- Schritt 82 Endogene Peroxidase blockieren
- Schritt 83 Hintergrundfärbung reduzieren
- Schritt 84 Geeignetes Detektionssystem verwenden
- Schritt 85 Waschschritte standardisieren
- Schritt 86 Gegenfärbung optimieren
- Schritt 87 Geeignete Kontrollen mitführen
- Schritt 88 Ergebnisse sorgfältig auswerten

In-situ-Hybridisierung

- Schritt 89 Hochwertige Schnitte verwenden
- Schritt 90 Optimale Fixierung sicherstellen
- Schritt 91 Unzureichender Schnitthaftung vorbeugen
- Schritt 92 Entparaffinierung, Rehydrierung und Reagenzienauftrag optimieren
- Schritt 93 Sonde mit Bedacht wählen
- Schritt 94 Datenblätter lesen
- Schritt 95 Richtig vorbehandeln
- Schritt 96 Gewebe vorsichtig handhaben
- Schritt 97 Geeignetes Detektionssystem verwenden
- Schritt 98 Reagenzienverdunstung vermeiden
- Schritt 99 Waschschritte standardisieren
- Schritt 100 Geeignete Kontrollen mitführen
- Schritt 101 Ergebnisse sorgfältig auswerten

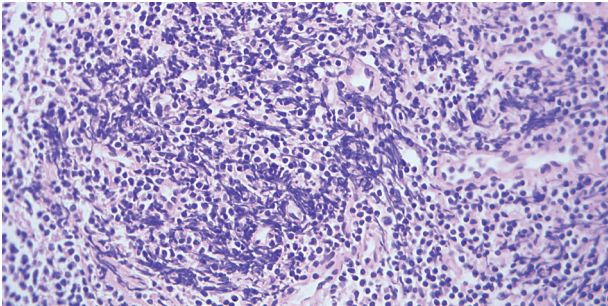


- Schritt 1 Mechanische Schäden vermeiden
- Schritt 2 Das Austrocknen der Probe verhindern
- Schritt 3 Hitzeschäden vorbeugen
- Schritt 4 Chemische Schäden vermeiden
- Schritt 5 Proben adäquat etikettieren
- Schritt 6 Sofortige Fixierung sicherstellen
- Schritt 7 Ausreichend Fixiermittel und einen geeigneten Behälter verwenden
- Schritt 8 pH-Wert des Fixiermittels prüfen
- Schritt 9 Fixierung großer Proben beschleunigen
- Schritt 10 Unnötige Verzögerungen vermeiden
- Schritt 11 Proben schonend handhaben

Schritt 1

Mechanische Schäden vermeiden

- ✓ Das Gewebe wird schonend entnommen, um Quetschschäden und Risse zu vermeiden. Dies gilt sowohl während des Eingriffs am Patienten als auch für eine eventuell erforderliche weitere Präparation des frischen Präparats.
- ✗ Die Probe wird vor der Fixierung beschädigt. Bei der Entnahme wird das Gewebe gequetscht oder reißt.



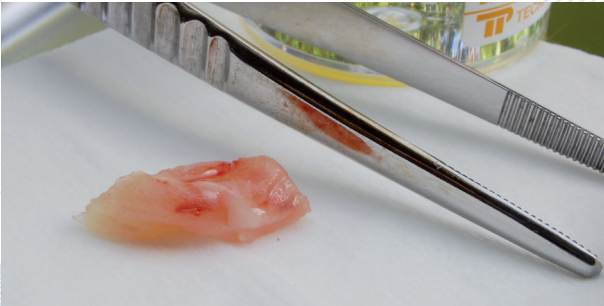
In diesem Schnitt aus lymphatischem Gewebe sind typische Quetschartefakte zu sehen. Es sind dunkle, deformierte Zellkerne zu erkennen, die zum Teil extrem in die Länge gezogen und stark basophil sind.

Probenahme und -transport

Schritt 2

Das Austrocknen der Probe verhindern

- ✓ Die Probe darf vor der Fixierung nicht austrocknen. Wenn eine sofortige Fixierung nicht praktikabel ist, wird mit Kochsalzlösung befeuchtete Gaze verwendet, um das Austrocknen zu verhindern.
- ✗ Die Probe wird vor der Fixierung auf einer saugfähigen Oberfläche zwischengelagert.



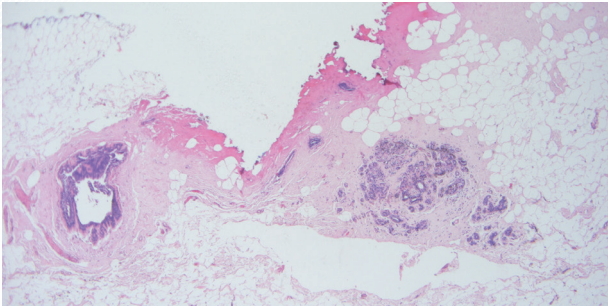
Diese frische Probe wurde soeben entnommen; der operative Eingriff dauert an. Das Gewebe liegt auf einer saugfähigen Oberfläche und im Operationssaal ist es recht warm, sodass es schnell austrocknen wird, wenn es nicht unverzüglich in Fixiermittel gelegt wird.

Probenahme und -transport

Schritt 3

Hitzeschäden vorbeugen

- ✓ Fokale Hitzeschäden werden so weit wie möglich vermieden, wobei eine lokale Hitzeschädigung der Proben (eine gewisse Schädigung durch Kauterisation nicht immer zu verhindern ist).
- ✗ Unnötige Hitze einwirkung führt zu vermeidbaren Schäden. Frisches Gewebe ist besonders empfindlich.



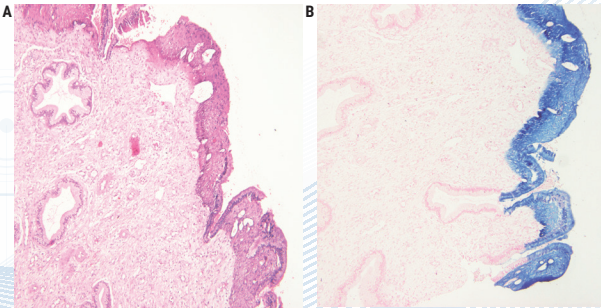
Ein begrenzter Bereich am Rand dieser Brustprobe zeigt sich stark azidophil. Nukleäre und zytoplasmatische Details sind kaum mehr zu erkennen. Diese Effekte sind das Ergebnis von Hitzeschäden, die durch die Verwendung eines Kauters bei der Entnahme der Probe verursacht wurden. Das angrenzende Drüsengewebe ist nicht betroffen.

Probenahme und -transport

Schritt 4

Chemische Schäden vermeiden

- ✓ Die Kontamination frischer Proben mit Desinfektionsmitteln und anderen Chemikalien wird vermieden.
- ✗ Die Oberfläche von unfixiertem Gewebe kann von derartigen Substanzen oder Reagenzien leicht durchdrungen und beschädigt werden.



Monsel-Lösung (Eisensulfat) ist ein topisches Hämostatikum, das zur Kontrolle von Blutungen nach der Schleimhautbiopsie verwendet wird. Es wirkt gerinnungsinduzierend und verursacht eine Nekrose der Schleimhautoberfläche. Wenn es vor der Entnahme einer Biopsie eingesetzt wird, resultiert das in einer lokalen Basophilie und Anzeichen einer frühen Nekrose, wodurch eventuell vorhandene pathologische Veränderungen maskiert werden. Das Artefakt der Monsel-Lösung steht oft im Zusammenhang mit einer wiederholten Biopsie oder einer neuerlichen, umfangreicheren Exzision. Das Ergebnis ist in Schnitt A zu sehen, der einer H&E-gefärbten Zervixbiopsie entstammt. In Schnitt B sind umfangreiche Eisenablagerungen auf der Oberfläche einer Probe zu erkennen, die einer Perl-Färbung unterzogen wurde.

Probenahme und -transport

Schritt 5

Proben adäquat etikettieren

- ✓ Jede Probe ist eindeutig identifizierbar. Sämtliche relevante Details werden so schnell wie möglich notiert.
- ✗ Die Erfassung dieser Details erfolgt nur verzögert und die verfügbaren Informationen sind unvollständig.



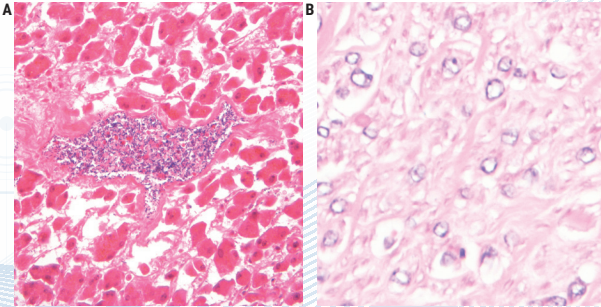
Proben mit unvollständigen Etiketten, wie hier zu sehen, sollten von keinem Labor angenommen werden. Es sollte ein Protokoll existieren, das den Umgang mit unvollständig gekennzeichneten Proben regelt. Dasselbe gilt für Lücken in den begleitenden Unterlagen.

Probenahme und -transport

Schritt 6

Sofortige Fixierung sicherstellen

- ✓ Die Fixierung wird stets zeitnah realisiert. Wenn es sich nicht vermeiden lässt, dass eine Probe für kurze Zeit unfixiert bleibt, wird sie bei 4 °C zu gekühlt.
- ✗ Die Fixierung erfolgt verzögert, was eine Degeneration der Probe ermöglicht. Letztere setzt ein, sobald das Gewebe nicht mehr durchblutet wird.



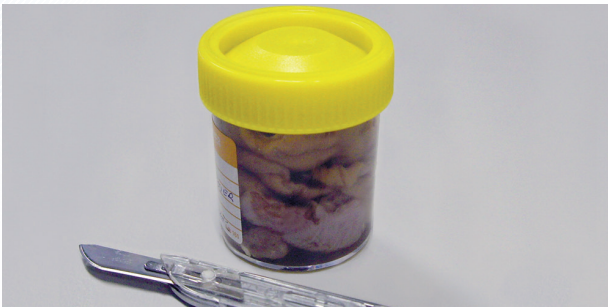
- A Diese während einer Autopsie entnommene, H&E-gefärbte Leberprobe wurde mit erheblicher Verzögerung fixiert. Beachten Sie die schlecht definierten Zellkerne und den Verlust zytoplasmatischer Details. Innerhalb des zentralen Blutgefäßes sind zahlreiche Bakterien auszumachen.
- B In diesem Schnitt aus fibro-muskulärem Gewebe ist das Kernchromatin aufgrund einer längeren Verzögerung vor der Fixierung nur schlecht erhalten.

Probenahme und -transport

Schritt 7

Ausreichend Fixiermittel und einen geeigneten Behälter verwenden

- ✓ Es wird ausreichend Fixiermittel verwendet und die Fixierung erfolgt in einem Gefäß mit geeigneter Größe. Das Verhältnis von Fixiermittel- zu Probenvolumen beträgt mindestens 20:1. So wird die Deformierung der frischen Probe vermieden und eine ausreichende Fixierung gewährleistet.
- ✗ Die Proben werden in ein kleines Gefäß gequetscht und das Fixiermittel reicht nicht aus, um die Probenoberfläche zu bedecken.



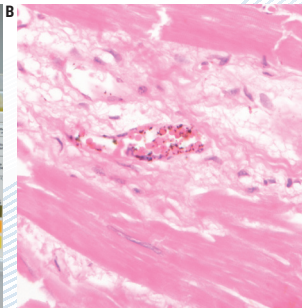
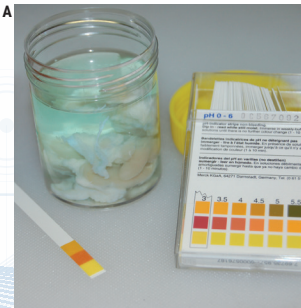
Dieser Behälter ist zu klein für das darin enthaltene Gewebenvolumen. Es wird nicht genügend Fixiermittel angeboten und die Probe wurde möglicherweise auch mechanisch beschädigt, als sie in den Behälter gestopft wurde.

Probenahme und -transport

Schritt 8

pH-Wert des Fixiermittels prüfen

- ✓ Das Fixiermittel ist von hoher Qualität und sein pH-Wert ist optimal.
- ✗ Das Fixiermittel ist von schlechter Qualität und sein pH-Wert ist unpassend oder nicht bekannt. Wenn Formalin bei saurem pH-Wert verwendet wird, bildet es durch Reaktion mit Hämoglobin schnell Formalinpigment (Formaldehyd-Hämatin). Nahezu neutrale Lösungen führen zwar ebenso zur Pigmentbildung, aber die Reaktion läuft viel langsamer ab. Um hochwertige histologische Präparate zu erreichen, sollte das Formalinpigment vor der Färbung entfernt werden.



- A Das hier verwendete Fixiermittel hatte einen ungeeigneten pH-Wert von 4,5. Gepufferte Formalin-Lösungen sollten einen pH-Wert von 6,8-7,0 haben.
- B Die bräunlich-schwarzen, körnigen Ablagerungen im Blutgefäß in der Mitte dieses Ausschnitts entsprechen Formalinpigment. Es bildet sich vor allem dann, wenn Gewebe in saurem Formalin fixiert wird, und befindet sich meist in der Nähe von Erythrozyten.

Probenahme und -transport

Schritt 9

Fixierung großer Proben beschleunigen

- ✓ Die Größe der Probe ermöglicht ein schnelles Eindringen des Fixiermittels. Große Proben werden zügig ins Labor transportiert und so zugeschnitten, dass eine ordnungsgemäße Fixierung möglich wird.
- ✗ Große Proben werden vor dem Zuschnitt für längere Zeit in Fixiermittel belassen. Das Zentrum der Probe bleibt möglicherweise unfixiert und das Gewebe verformt sich stark.



Dieses große Präparat aus Schweineherz wurde in Scheiben geschnitten, um sämtliches Gewebe dem Fixiermittel zugänglich zu machen. Die Scheiben sind ca. 4-5 mm dick.

Probenahme und -transport

Schritt 10

Unnötige Verzögerungen vermeiden

- ✓ Keine unnötigen Verzögerungen – alle Proben erreichen das Labor in kürzester Zeit.
- ✗ Es kommt zu Verzögerungen. Der Probentransport wird nicht priorisiert und ist nicht gut organisiert.



Bei der Zustellung von Proben an das Labor ist es wichtig, Prioritäten zu berücksichtigen. Das gilt insbesondere, wenn es sich um Gefrierschnitte handelt.

Probenahme und -transport

Schritt 11

Proben schonend handhaben

- ✓ Die Proben werden schonend behandelt, empfindliche Proben bleiben unversehrt.
- ✗ Die grobe Behandlung von Proben führt vor allem bei empfindlichem, brüchigem Gewebe zu vermeidbaren Schäden.



Einige der Gewebefragmente, die am Boden dieses Behälters zu sehen sind, sind auf dessen grobe Handhabung beim Transport zurückzuführen. Was ursprünglich eine kohäsive Probe war, besteht nur noch aus Bruchstücken.

Probenahme und -transport



- Schritt 12 Fixierungsstatus prüfen
- Schritt 13 Dünne Probenscheiben präparieren
- Schritt 14 Probenschäden vermeiden
- Schritt 15 Kreuzkontamination verhindern
- Schritt 16 Biopsie-Pads richtig verwenden
- Schritt 17 Geeignete Kassetten wählen
- Schritt 18 Kassetten nicht überladen
- Schritt 19 Kassetten eindeutig beschriften

Initiale

Probenverarbeitung

Schritt 12

Ausreichende Fixierung gewährleisten

- ✓ Die Proben werden zeitnah bearbeitet. Das gilt insbesondere für große Proben, bei denen sonst das Risiko einer mangelhaften Fixierung besteht.
- ✗ Potenziell problematische Proben werden wie alle anderen behandelt. Eine Anpassung und damit Optimierung der Fixierung erfolgt nicht.



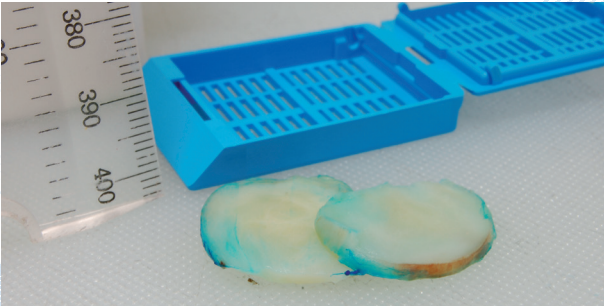
Proben, die in großen Behältern ankommen, sollten so schnell wie möglich überprüft werden, um sicherzustellen, dass eine adäquate Fixierung erfolgt.

Probenvorbereitung

Schritt 13

Mit dünnen Probenscheiben arbeiten

- ✓ Lassen Sie immer Sorgfalt walten, um aus großen Proben gleichmäßige, dünne Scheiben mit einer maximalen Dicke von 3-4 mm maximale Dicke) anzufertigen. Bei dichtem Gewebe hat dieser Schritt besonders große Bedeutung.
- ✗ Die Probenscheiben haben eine Dicke von 6 mm oder mehr oder sind ungleichmäßig stark.

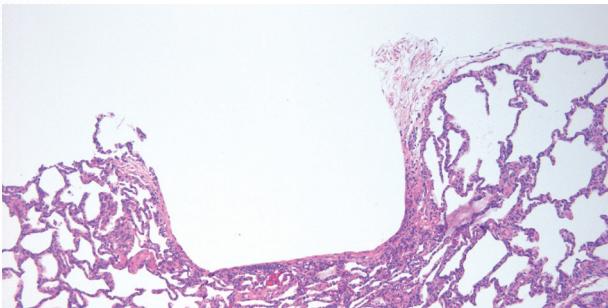


In der Abbildung sehen Sie gleichmäßige, 2-3 mm dünne Scheiben aus einer Tumorprobe, die sich optimal verarbeiten lassen. Damit können Infiltration und Schnittdarstellung problemlos durchgeführt werden.

Schritt 14

Probenschäden vermeiden

- ✓ Es wird darauf geachtet, dass empfindliche Proben nicht beschädigt werden, insbesondere solche, die nicht vollständig fixiert sind. Sie werden vorsichtig gehandhabt, nicht gedrückt und in der Präparation werden stets scharfe Klingen verwendet.
- ✗ Die Proben werden grob behandelt, ohne Rücksicht auf ihre Fixierung. Es kommen stumpfe Klingen zum Einsatz.

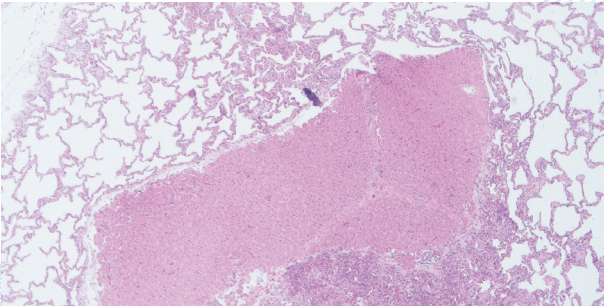


Dieser Schnitt durch eine H&E-gefärbte Lungenprobe zeigt einen deutlichen mechanischen Schaden, der durch kräftiges Greifen mit einer Pinzette gesetzt wurde. Frisches oder teilweise fixiertes Gewebe ist am anfälligsten für derartige Schäden, aber auch gut fixierte Proben können durch eine schroffe Handhabung beschädigt werden.

Schritt 15

Kreuzkontamination verhindern

- ✓ Proben werden konsequent auf sauberen Oberflächen gehandhabt, was das Risiko einer Kreuzkontamination durch andere Proben stark vermindert.
- ✗ Das Schneidebrett wird zwischen den Proben nicht ausreichend gereinigt. Das ist besonders bedenklich, wenn gleiche Probentypen nacheinander präpariert werden. Dann kann es beispielsweise zur Verschleppung maligner Zellen in eine benigne Probe kommen.

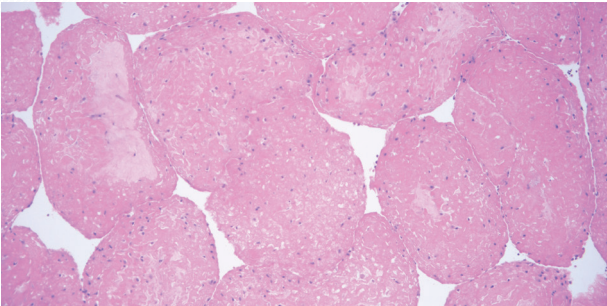


Dieser Schnitt durch eine H&E-gefärbte Lunge enthält ein Stück Fremdgewebe (Leber), das während der Präparation in die Oberfläche gedrückt wurde.

Schritt 16

Biopsiepads richtig verwenden

- ✓ Frische oder unvollständig fixierte Proben werden nicht zwischen Biopsiepads gelegt, vor allem keine Nadelkernproben, wodurch der Bildung von Artefakten vorgebeugt wird.
- ✗ Kleine, frische oder unvollständig fixierte Proben werden zwischen Biopsiepads gelegt, in eine Kassette gesetzt und dann fixiert. So entstehen typische Artefakte.



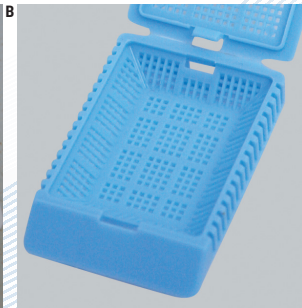
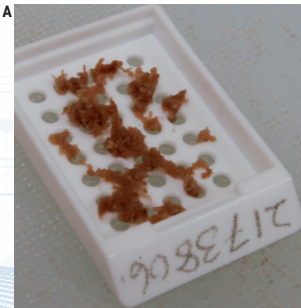
Die in diesem Schnitt sichtbaren dreieckigen Zwischenräume entsprechen lokalen Druckeffekten, die durch die zelluläre Struktur der Schaumstoffpads zu erklären sind und bei deren Nutzung mit frischem oder sehr kurz fixiertem Gewebe entstehen.

Probenvorbereitung

Schritt 17

Geeignete Kassetten wählen

- ✓ Die Auswahl der Kassetten erfolgt in Abhängigkeit vom zu verarbeitenden Probentyp. Gewebefragmente schrumpfen während der Infiltration und wenn die Löcher in der Kassette zu groß sind, kann Probenmaterial in die Reagenzien gelangen oder sogar auf andere Proben übergehen.
- ✗ Sämtliche Proben werden im selben Kassettentyp verarbeitet. Eine Anpassung an den jeweiligen Gewebetyp erfolgt nicht.

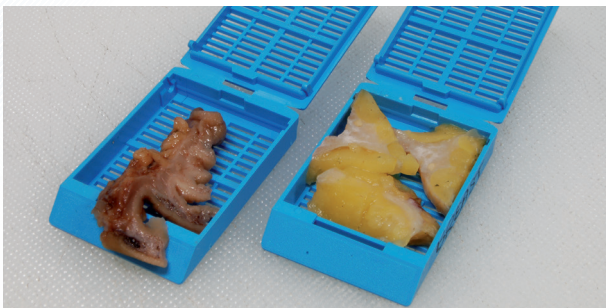


- A Einige der hier zu sehenden kleineren Gewebefragmente können durch die Löcher in der Kassette austreten. Das Risiko dafür steigt weiter, wenn das Gewebe während der Infiltration schrumpft.
- B Für kleine Gewebefragmente stehen Kassetten mit feinerer Perforation zur Verfügung.

Schritt 18

Kassetten nicht überladen

- ✓ Die Kassetten werden nicht überladen, sodass die Reagenzien guten Zugang zum Gewebe haben und eine Deformierung der Proben verhindert wird. Wenn größere Gewebevolumina infiltriert werden sollen, werden mehrere Kassetten verwendet.
- ✗ Die Kassetten werden mit Gewebe vollgestopft. Es kann nicht garantiert werden, dass die Reagenzien sämtliche Probenabschnitte erreichen. Weiterhin besteht ein erhebliches Risiko für eine Deformierung der Proben.

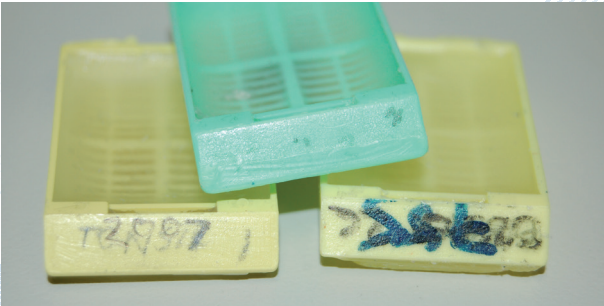


Diese Kassetten sind überladen. Wenn so gearbeitet wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Infiltration nur unvollständig erfolgt und es zur Deformierung von Gewebe kommt.

Schritt 19

Kassetten eindeutig beschriften

- ✓ Alle Kassetten sind eindeutig beschriftet. Die zweifelsfreie Identifizierung von Proben ist von größter Bedeutung und jederzeit möglich.
- ✗ Die Etiketten auf Kassetten sind schwer lesbar. Unter Umständen muss geraten werden, um eine Probe zu identifizieren.



Diese unleserlichen Kassettenetiketten sind vollkommen inakzeptabel.

Probenvorbereitung



- Schritt 20 Protokolle von angemessener Dauer wählen
- Schritt 21 Zusätzliche Fixierung einplanen
- Schritt 22 Reagenzienqualität gewähren
- Schritt 23 Hochwertiges Wachs verwenden
- Schritt 24 Potenziell gefährliche Reagenzien vermeiden

Infiltration

Schritt 20

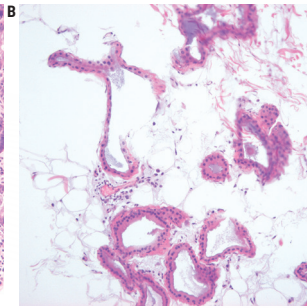
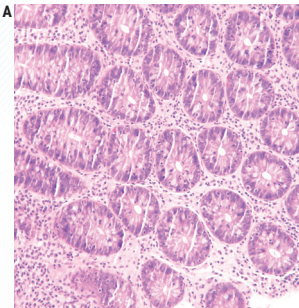
Protokolle von angemessener Dauer wählen



Das Protokoll wird in Abhängigkeit von Gewebetyp und Probengröße gewählt.



Das Protokoll passt nicht zur Probe. Unter Umständen wird ein zu langes Protokoll für eine kleine endoskopische Biopsie gewählt oder ein sehr kurzes für eine große Brustprobe mit hohem Fettanteil.



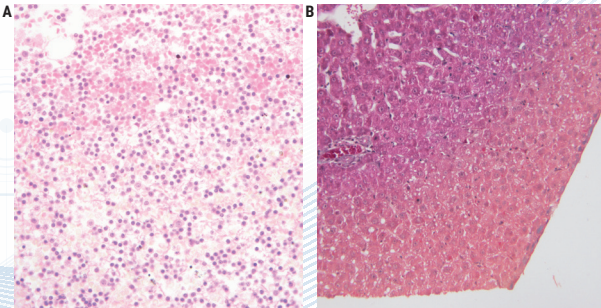
- A Diese endoskopische Biopsie wurde überinfiltriert und ist dadurch sehr spröde geworden. Infolgedessen sind im gesamten Präparat viele feine Risse erkennbar. H&E-Färbung. Fehler in der Schnittdarstellung verschlimmern das Problem noch.
- B Diese Aufnahme eines kleinen Bereichs von subkutanem Gewebe aus einer großen, fetthaltigen Probe zeigt die Auswirkungen einer unzureichenden Infiltration. Das fibro-adipöse Gewebe hat keinen Halt und ist fragmentiert, während im Drüsenepithel eine unzureichende Definition der Zellkerne und eine eigentümliche Färbung auffällt. Letztere ist durch Lösungsmittelrückstände zu erklären. H&E-Färbung.

Infiltration

Schritt 21

Zusätzliche Fixierung einplanen

- ✓ Um eine optimale Infiltration und gute Morphologie zu erreichen, wird das Gewebe stets ausreichend fixiert. Für unvollständig fixierte Proben ist eine zusätzliche Formalinfixierung vorgesehen.
- ✗ Unvollständig fixierte Proben werden direkt in Alkohol gelegt, was zu einer zonalen Fixierung führt: einer Formalinfixierung im Außenbereich der Probe, einer Fixierung durch Alkohol in der Tiefe.



- A In diesem Knochenmarkspirat ist eine zonale Fixierung zu erkennen. Im oberen linken Bildausschnitt sind intakte Erythrozyten zu sehen, während sie im unteren Teil des Bildes hämolysiert sind. H&E-Färbung.
- B Es ist eine Trichrom-gefärbte Leberprobe bei niedriger Vergrößerung zu sehen. Das Färberegebnis im äußeren Bereich der Probe unterscheidet sich von dem im inneren.

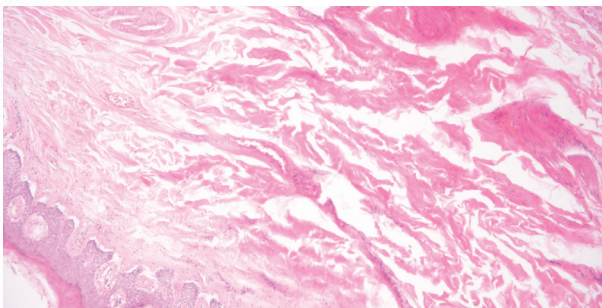
Infiltration

Schritt 22

Reagenzienqualität bewahren.

✓ Die Reagenzien werden streng nach Protokoll ausgetauscht, idealerweise unter Anwendung eines Reagenzien-Managementsystems in einem modernen Gewebeeinfiltrationsautomaten wie dem PELORIS von Leica Biosystems.

✗ Die Richtlinien für die Erneuerung von Reagenzien werden ignoriert oder gestreckt, d. h. es kommen verunreinigte, verdünnte oder gar unwirksame Reagenzien zum Einsatz. Warnungen zur Grenzwertüberschreitung, wie sie vom Reagenzien-Managementsystem PELORIS ausgegeben werden, werden ignoriert. Dies kann zu einer schlechten Infiltrationsqualität führen.



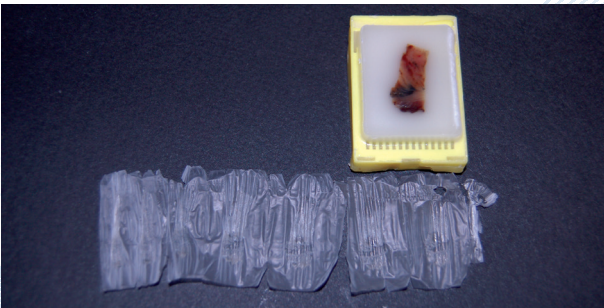
In diesem Schnitt aus einer großen Hautprobe ist das dichte Kollagen nur schlecht erhalten. Dieses Ergebnis ist auf eine unzureichende Infiltration zurückzuführen. In diesem Fall sind wir zu der Ansicht gelangt, dass stark kontaminierte Reagenzien mit wesentlicher Überschreitung des Grenzwerts zum Einsatz gekommen sind.

Infiltration

Schritt 23

Hochwertiges Wachs verwenden

- ✓ Für die Infiltration und vor allem für das Einbetten wird hochwertiges Wachs verwendet, um qualitativ hochwertige Blöcke zu erhalten, die sich leicht schneiden lassen.
- ✗ Zur Infiltration und Einbettung wird billiges, minderwertiges Wachs zweifelhafter Herkunft genutzt. Wachs von schlechter Qualität erzeugt Blöcke, die beim Schneiden Probleme machen.



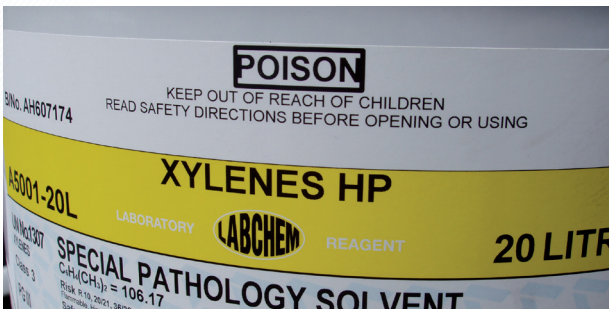
Dieses Schnittband wurde langsam aus einem kalten Block geschnitten. Trotz der niedrigen Temperatur ist eine deutliche Kompression des Gewebes zu erkennen. Hier hat das minderwertige Wachs dem Gewebe nicht den notwendigen Halt gegeben.

Infiltration

Schritt 24

Potenziell gefährliche Reagenzien vermeiden

- ✓ Wenn möglich, werden Xylol-freie Formulierungen verwendet, so etwa bei Einsatz des PELORIS von Leica Biosystems. So wird für mehr Sicherheit im Labor gesorgt, ohne die Infiltrationsqualität zu beeinträchtigen.
- ✗ Das gesundheitsschädigende Potenzial von Xylol findet keine Berücksichtigung. Alternativen werden nicht in Betracht gezogen.



Die Xylol-freie Infiltration kann die Sicherheit im Labor bei gleichbleibender Qualität erhöhen.

Infiltration



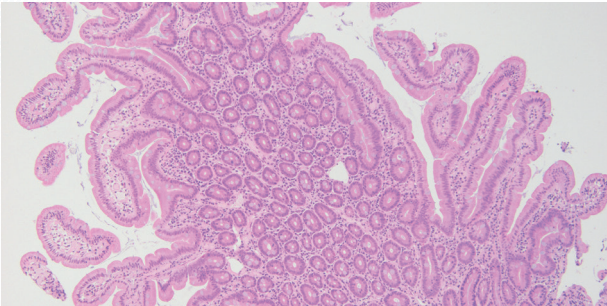
- Schritt 25 Proben sorgfältig ausrichten
- Schritt 26 Geeignete Gussform wählen
- Schritt 27 Proben schonend handhaben
- Schritt 28 Proben nicht übermäßiger Hitze aussetzen
- Schritt 29 Temperaturen regelmäßig prüfen
- Schritt 30 Gussformen nicht überfüllen

Einbettung

Schritt 25

Proben sorgfältig ausrichten

- ✓ Die Proben werden sorgfältig ausgerichtet. Der fachgerechte Zuschnitt sorgt bei den meisten Proben für eine flache Oberfläche. Das Personal, das die Einbettung vornimmt, hat jederzeit Zugang zur Probenbeschreibung und ist entsprechend geschult.
- ✗ Die Ausrichtung ist falsch. Unter Umständen wird eine neuerliche Einbettung erforderlich, was zum Verlust von Gewebe führt. Weiterhin machen schlecht ausgerichtete Präparate ein umfangreiches Trimmen notwendig, bevor ein vollflächiger Schnitt dargestellt werden kann.



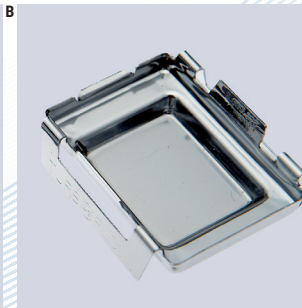
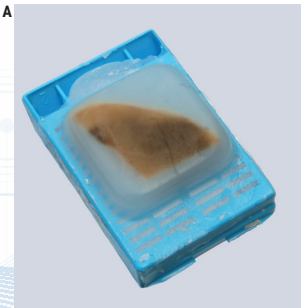
Diese endoskopische Biopsie ist falsch ausgerichtet und zeigt nur die oberflächlichen Schleimhautschichten.

Einbettung

Schritt 26

Geeignete Gussform wählen

- ✓ Für jede Probe wird eine Gussform in geeigneter Größe gewählt.
- ✗ Alle Proben werden in gleich großen Formen eingebettet. Dabei berührt das Gewebe möglicherweise den Rand der Form.

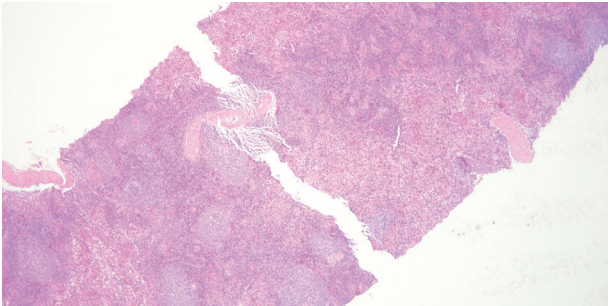


- A Die für diese Probe verwendete Form war zu klein. Die Probe liegt an den Blockrändern an, was Probleme beim Schneiden machen kann.
- B Um den unterschiedlichen Probengrößen gerecht zu werden, sind Gussformen in verschiedenen Größen erhältlich.

Schritt 27

Proben schonend handhaben

- ✓ Die Einbettung erfolgt vorsichtig, bei schonender Behandlung der Proben.
- ✗ Die Proben werden während des Einbettens grob behandelt und möglicherweise in die Gussform gedrückt, damit sie flach zu liegen kommen. Dabei werden unter Umständen Gewebebrüche provoziert.



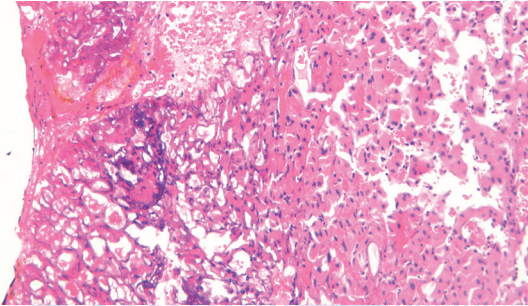
Hier sehen Sie einen Milzschnitt, der beim Einbetten gebrochen wurde, um ihn flach auf dem Boden der Gussform zu platzieren. H&E-Färbung.

Einbettung

Schritt 28

Proben nicht übermäßiger Hitze aussetzen

- ✓ Vor der von Gewebe werden die Pinzetten bis nahe an den Schmelzpunkt des Wachses erhitzt.
- ✗ Die Pinzetten werden weit über den Schmelzpunkt des Wachses erhitzt. Dies kann zu lokalen Hitzeschäden und einer Veränderung der Morphologie in anliegenden Bereichen führen.



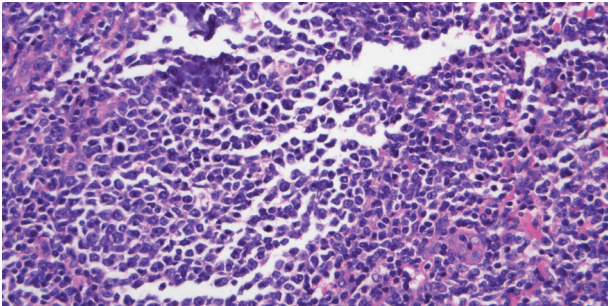
Diese Aufnahme zeigt die Oberfläche eines H&E-gefärbten Leberschnitts. Extreme Hitzeschäden, die beim Einbetten verursacht wurden, machen das Gewebe nahezu unkenntlich.

Einbettung

Schritt 29

Temperaturen regelmäßig prüfen

- ✓ Die Temperatur der Heizplatte der Einbettstation und des Wachsreservoirs wird regelmäßig überprüft.
- ✗ Die Temperatur der Heizplatte der Einbettstation findet keine Beachtung. Dabei wird übersehen, dass auch in diesem Stadium der Probenbearbeitung Hitzeschäden gesetzt werden können.



Dieser Lymphknoten wurde durch Überhitzung der Heizplatte der Einbettstation beschädigt. Beachten Sie die geschrumpften, pyknotischen Zellkerne und die ausgeprägte Rissbildung. Solche Risse können auch durch Aufschwimmen in einem zu warmen Wasserbad verursacht werden, oder durch Trocknung auf einer Heizplatte, ohne dass der Objektträger ausreichend abtropfen konnte.

Schritt 30

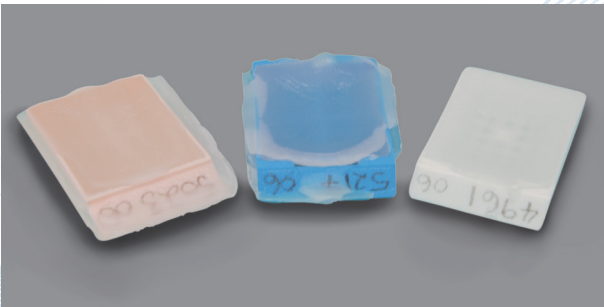
Gussformen nicht überfüllen



Die Gussformen sind optimal gefüllt und laufen nicht über.



Die Formen sind überfüllt, sodass die Rückseite und die Kanten der Kassetten vor der Mikrotomie abgeschabt werden müssen. Wird auch davon abgesehen und werden Kassetten aus überfüllten Formen ins Mikrotom eingesetzt, so geht dies häufig mit Instabilität einher. Das macht die entsprechenden Proben anfällig für eine Beschädigung während der Mikrotomie.



Diese Blöcke sind das Ergebnis überfüllter Gussformen beim Einbetten.



- Schritt 31 Hochwertige Klingen verwenden
- Schritt 32 Einen optimalen Neigungswinkel einstellen
- Schritt 33 Blöcke vorsichtig trimmen
- Schritt 34 Gefrierschäden vermeiden
- Schritt 35 Ausreichend gekühlte Blöcke schneiden
- Schritt 36 Schnitte langsam schneiden

Mikrotomie

Schritt 31

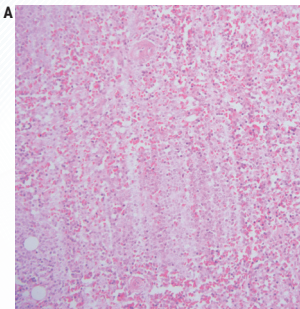
Hochwertige Klingen nutzen



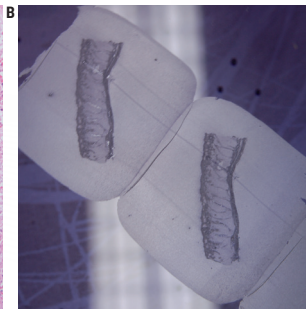
Zum Schneiden werden immer hochwertige, scharfe Klingen verwendet.



Die Klingen werden so lange wie möglich verwendet. Ein paar Zuglinien werden unumwunden akzeptiert und veranlassen nicht zum Klingenswechsel.



A Dieser Milzschnitt ist von zahlreichen feinen Linien durchzogen, die einer defekten Klinge geschuldet sind. H&E-Färbung.



B Diese Hautschnitte werden gerade aufgezogen. Auch ohne weitere Vergrößerung ist eine deutliche Messerlinie zu sehen, die quer durch das Gewebe verläuft. Solche Defekte sind beim Aufschwimmen leicht zu erkennen.

Schritt 32

Einen optimalen Neigungswinkel einstellen

- ✓ Der Neigungswinkel des Messers wird immer für jedes Mikrotom und Klingentyp angepasst.
- ✗ Der Neigungswinkel des Messers wird nie angepasst. Selbst wenn sich die Bedingungen ändern, ein neues Mikrotom zum Einsatz kommt, Klingentyp oder Wachs gewechselt werden, wird der Neigungswinkel nicht angepasst.

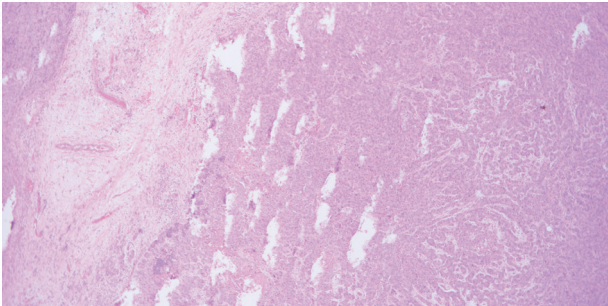


Dieses kurze Schnittband, das aus einem kalten Block geschnitten wurde, zeigt Anzeichen einer Kompression um 30-40 %. In diesem Fall konnte das Problem durch eine Neueinstellung des Neigungswinkels behoben werden.

Schritt 33

Blöcke vorsichtig trimmen

- ✓ Die Blöcke werden sorgfältig getrimmt, um einen optimalen Zugang zum Gewebe zu erhalten. Um die Oberfläche zu glätten, werden die letzten Trimmschnitte in der Schichtdicke realisiert, die auch für die finalen Schnitte vorgesehen ist.
- ✗ Die Blöcke werden eilig zugeschnitten, um Zeit zu sparen. Eine Glättung der Oberfläche erfolgt nicht. Man geht direkt zur Schnittdarstellung über. Dies führt oft zum Phänomen des Mottenfraßes, wobei die auszuwertenden Schnitte voller kleiner, ausgefranster Löcher sind.

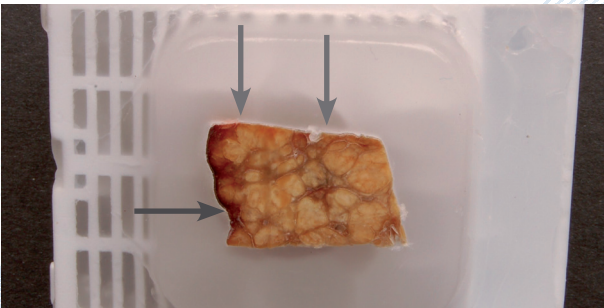


Hier wurden bei der Grobbearbeitung des Blocks Fragmente aus den tieferen Schichten herausgerissen. Im Schnitt sind deshalb zahlreiche Löcher auszumachen.

Schritt 34

Gefrierschäden vermeiden

- ✓ Die Blöcke werden auf einer kalten, feuchten Oberfläche gekühlt und ausschließlich kalt geschnitten. Schmelzendes Eis eignet sich hervorragend als Kühlfläche.
- ✗ Die Blöcke werden vor dem Schneiden eingefroren. Damit werden Risse im Gewebe in Kauf genommen.



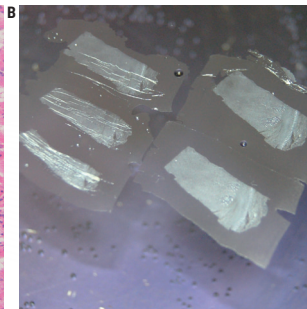
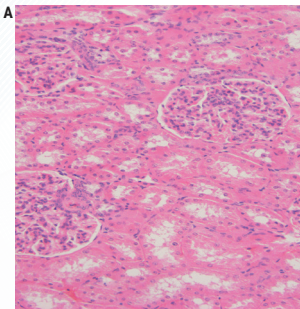
Dieser Block ist rissig, weil er vor dem Schneiden auf -15 °C gefroren wurde. Die Risse können das Schneiden und Aufziehen erschweren, da die Verbindung von Wachs und Gewebe an diesen Stellen aufgehoben ist.

Schritt 35

Ausreichend gekühlte Blöcke schneiden

✓ Die Blöcke sind beim Schneiden immer kalt.

✗ Manchmal dauert es länger als erwartet, bevor die endgültigen Schnitte dargestellt werden. In der Zwischenzeit mag sich der Block erwärmt haben, woraus sich ein Risiko für eine übermäßige Kompression ergibt.



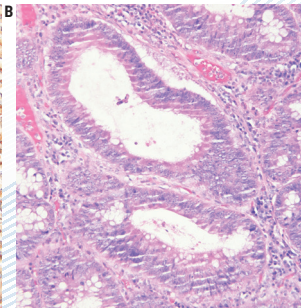
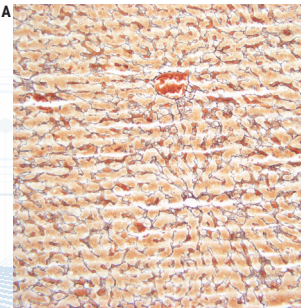
- A Die Verzerrung der Glomeruli in diesem Nierenschnitt ist auf eine übermäßige Kompression bei der Schnittdarstellung zurückzuführen. H&E-Färbung.
- B Hier ist zu sehen, wie Schnitte aus dem gleichen Block aufgezogen werden. Auf der linken Seite sind komprimierte Schnitte zu erkennen, die bei mangelhafter Kühlung erzeugt wurden, während die Schnitte auf der rechten Seite generiert wurden, als der Block ausreichend kalt war.

Schritt 36

Schnitte langsam schneiden

✓ Die Schnitte werden in einer gleichmäßigen, langsamen Bewegung erzeugt.

✗ Die Schnitte werden so schnell wie möglich geschnitten. Man geht davon aus, dass sich jegliche Kompression beim Aufschwimmen im Wasserbad von selbst behebt.



- A Dieses Leberpräparat nach Retikulin-Färbung zeigt eine feine Ratterung, die durch zu schnelles Schneiden eines kalten Blocks aus sprödem Gewebe zu erklären ist. In diesem Fall konnte das Problem gelöst werden, indem der Block minimal erwärmt und dann sehr langsam geschnitten wurde. Rattermuster können auch entstehen, wenn der Paraffinblock oder die Klinge unzureichend befestigt sind.
- B Dieser Schleimhautschnitt zeigt gleichermaßen feine Rattermuster, die dem schnellen Schneiden eines sehr kalten Blocks geschuldet sind. H&E-Färbung.



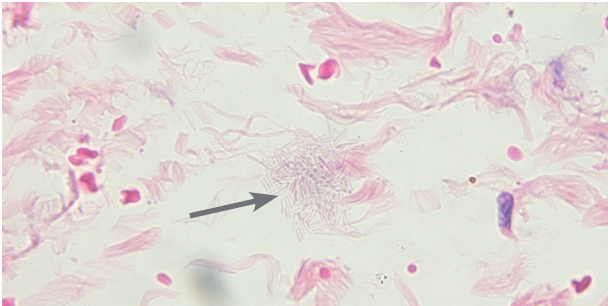
- Schritt 37 In sauberem Wasser arbeiten
- Schritt 38 Für saubere Objektträger sorgen
- Schritt 39 Kreuzkontamination verhindern
- Schritt 40 Kontamination durch Schuppen verhindern
- Schritt 41 Nicht von mehreren Blöcken aufziehen
- Schritt 42 Wassertemperatur prüfen
- Schritt 43 Faltenbildung reduzieren
- Schritt 44 Übermäßige Ausdehnung der Schnitte vermeiden
- Schritt 45 Aufschwimmende Schnitte nicht beschädigen
- Schritt 46 Schnitte sorgfältig auswählen
- Schritt 47 Blasenbildung und -einschluss vorbeugen
- Schritt 48 Abheben der Schnitte vom Objektträger verhindern

Schritt 37

In sauberem Wasser arbeiten

✓ Das Wasser im Wasserbad wird regelmäßig gewechselt.

✗ Das Wasser im Aufziehbad wird regelmäßig nachgefüllt und nur gelegentlich ausgetauscht. Verunreinigungen im Bad können auf die Objektträger und unter die Schnitte gelangen, z. B. Staub und Schimmel.



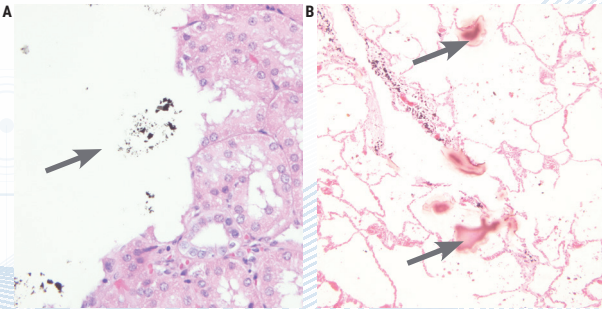
Dieser Schnitt durch die Serosa des Gastrointestinaltrakts wurde H&E-gefärbt. Innerhalb der Probe sind Cluster von schwach färbenden Mikroorganismen zu erkennen. Ähnliche Befunde ließen sich auch anderweitig auf dem Objektträger, außerhalb des eigentlichen Schnitts, erheben. Die Quelle dieser kontaminierenden Organismen war sehr wahrscheinlich das Wasserbad, in dem die Schnitte aufgezogen wurden.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 38

Für saubere Objektträger sorgen

- ✓ Die Objektträger werden stets auf Sauberkeit kontrolliert, bevor sie verwendet werden. Die Handhabung und Berührung der Objektträger wird auf ein Minimum beschränkt, um eine Kontamination mit Plattenepithelzellen vor dem Aufziehen zu vermeiden.
- ✗ Die Objektträger werden nicht auf Sauberkeit geprüft. Solange die Schnitte während der Färbung auf dem Objektträger haften bleiben, geht man davon aus, dass sie sauber genug waren. Staub, Mikroorganismen und andere Verunreinigungen können sonst hervorragende Präparate verderben.



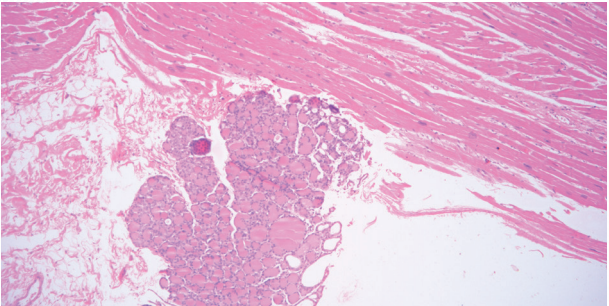
- A Dieser Nierenschnitt beinhaltet schwarze Verunreinigungen, die sich vor dem Aufziehen auf dem Objektträger befanden. Auch in anderen Bereichen des Präparats waren derartige Verschmutzungen zu erkennen.
- B In diesem Lungenschnitt sind gefärbte Klebstoffflecken zu finden, die sich bei der Schnitttrocknung gebildet hatten. Der Klebstoff, wahrscheinlich auf Gelatinebasis, stammt aus dem Wasserbad. Der Proteingehalt des Klebstoffs wurde durch die allmähliche Verdunstung des Wassers künstlich erhöht. Eine ordnungsgemäße Entleerung durch ordnungsgemäßes Abtropfen des Schnitts vor dem Trocknen hätte das Problem möglicherweise vermieden werden können.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 39

Kreuzkontamination verhindern

- ✓ Die Wasseroberfläche wird zwischen verschiedenen Blöcken stets abgeschöpft, um eine Kontamination mit Zellen aus der vorherigen Probe zu vermeiden.
- ✗ Die Wasseroberfläche wird nicht konsequent abgeschöpft, bevor ein neuer Block bearbeitet wird. Dies kann zu einer Kontamination von einer Probe zur anderen führen und damit zu Verwirrung, Unsicherheit bei der Diagnosestellung und sogar zu falschen Ergebnissen.



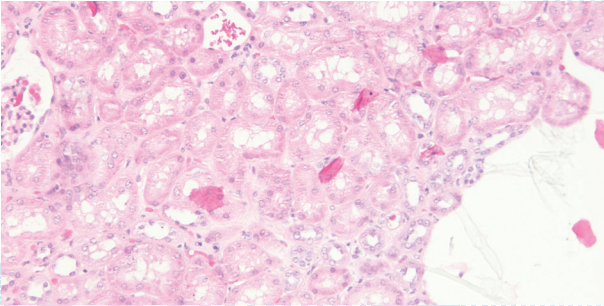
Dieser Herzmuskelschnitt wurde durch Fragmente von Schilddrüsengewebe aus einer anderen Probe kontaminiert. Diese Kontamination von einer Probe zur anderen ist im Wasserbad geschehen.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 40

Kontamination durch Schuppen verhindern

- ✓ Während der Arbeit mit den Proben darf sich der Histologe nicht durch die Haare fahren oder die Hände reiben, um einer Verunreinigung durch Hautschuppen vorzugreifen.
- ✗ Es wird immer wieder beobachtet, dass Objektträger viele Schuppen enthalten. Das deutet daraufhin, dass die eigene Haut als Kontaminationsquelle nicht universell Beachtung findet.



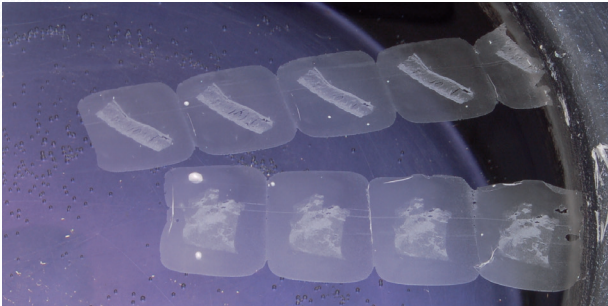
In diesem Nierenschnitt sind mehrere Schuppen zu erkennen, die sich auf der Oberfläche des Schnittes abgelagert haben, während er aufgezo-gen wurde. Sie haften fest und lassen sich durch Eosin anfärben.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 41

Nicht von mehreren Blöcken aufziehen

- ✓ Es werden niemals Schnitte aus mehreren Blöcken bzw. Fällern gleichzeitig im Wasserbad gehandhabt.
- ✗ Man lässt Schnitte aus zwei oder mehr Blöcken bzw. Fällern gleichzeitig aufschwimmen. Das ist eine gefährliche Gewohnheit, die zur Verwechslung von Proben führen kann. Ein besonderes Risiko besteht, wenn die Schnitte zufällig vom gleichen Probentyp stammen.



Hier werden Schnittbänder aus zwei verschiedenen Fällern gleichzeitig verarbeitet. Im Nachhinein kann es schwierig, mitunter gar unmöglich sein, einzelne Schnitte sicher zuzuordnen.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 42

Wassertemperatur prüfen

- ✓ Die Temperatur des Wasserbads wird engmaschig überwacht. Eine Temperatur von 4-5 °C unter dem Schmelzpunkt des Wachses ist optimal. Die Schnitte sollen sich leicht glätten lassen, aber das Wachs darf nicht schmelzen.
- ✗ In Schnitten, die länger als 15 Sekunden im Wasserbad liegen, beginnt das Wachs zu schmelzen. Das mag den Eindruck erwecken, den Prozess des Aufschwimmens und Aufziehens zu beschleunigen, kann aber schnell zur übermäßigen Ausdehnung sowie Gewebe- und Zellschäden führen.



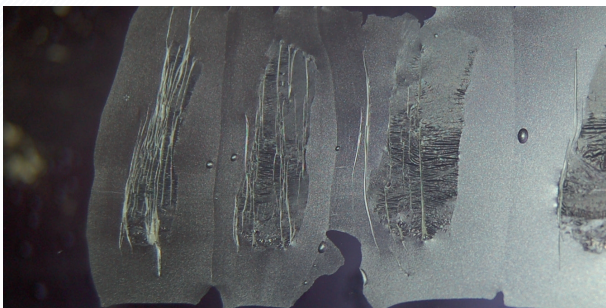
Diese Hautschnitte zeigen deutliche Risse und eine unerwartete Trennung in Schichten, die typisch für eine thermisch begünstigte, zu starke Schnittdehnung ist. Ungenügend infiltriertes Gewebe ist noch anfälliger für dieses Problem.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 43

Faltenbildung reduzieren

- ✓ Die Schnitte lassen sich im Wasserbad leicht glätten.
- ✗ Selbst nach dem Aufschwimmen im Wasserbad können die Schnitte nicht vollständig geglättet werden. Vielleicht ist das Wasser zu kalt; dann werfen die Schnitte beim Aufziehen Falten.



In diesem Fall hat das Aufschwimmen nicht zur Glättung der Falten geführt, die bei der Schnittdarstellung entstanden waren. Eine verbesserte Schneidetechnik und etwas wärmeres Wasser können helfen, dieses Problem zu beheben.

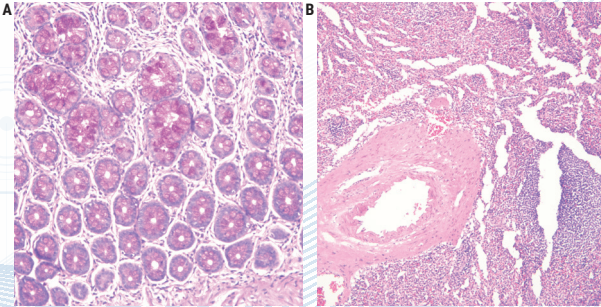
Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 44

Übermäßige Ausdehnung der Schnitte vermeiden

✓ Die Schnitte werden gerade lange genug im Wasserbad belassen, um sie zu glätten, und dann sofort auf einen Objektträger aufgenommen.

✗ Der Einfachheit halber werden Schnitte zuweilen für längere Zeit im Wasserbad belassen. Dies kann zu einer übermäßigen Ausdehnung und Gewebeschädigung führen, insbesondere bei empfindlichen Proben wie lymphatischem Gewebe.



- A Dieser Schnitt durch die Darmschleimhaut zeigt das Resultat einer zu starken Wärmeausdehnung: Betroffen ist die Lamina propria, wobei der große Abstand zu den Darmdrüsen zu beachten ist. Dieses Präparat wurde zu lange in einem zu heißen Wasserbad belassen. PAS-Färbung.
- B Dieser Schnitt aus lymphatischem Gewebe ist während der Überdehnung im Wasserbad gerissen. Lymphatisches und hämatopoetisches Gewebe ist besonders anfällig für derartige Schäden.

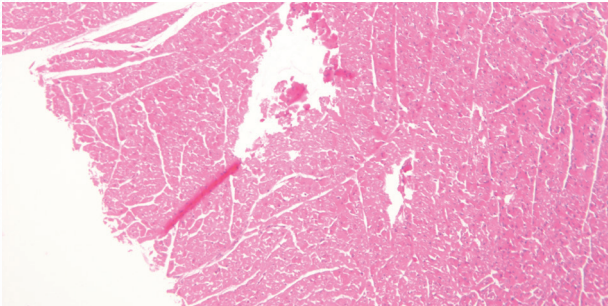
Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 45

Aufschwimmende Schnitte nicht beschädigen

✓ Wenn Falten mit einem Pinsel oder einer Pinzette entfernt werden sollen, geschieht dies mit äußerster Vorsicht, um Schäden an den schwimmenden Schnitten zu vermeiden.

✗ Schwimmende Schnitte werden schroff mit Pinzette oder Pinsel behandelt, um Falten zu glätten. Dabei werden den Präparaten makroskopische und mikroskopische Schäden zugefügt.



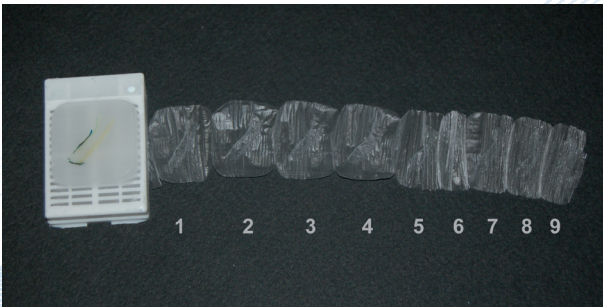
In diesem Herzmuskelschnitt sind deutliche mechanische Schäden zu sehen, die beim Versuch, eine Falte zu entfernen, gesetzt wurden. Dabei wurde ein Gewebeabschnitt regelrecht herausgehoben. H&E-Färbung.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 46

Schnitte sorgfältig auswählen

- ✓ Die ersten ein oder zwei Schnitte eines Schnittbandes werden nicht auf Objektträger aufgezogen.
- ✗ Die ersten ein oder zwei Schnitte eines Schnittbandes werden für die weitere Bearbeitung und Auswertung genutzt, weil sie besser aussehen als die Folgeschnitte. Tatsächlich mögen sie diesen Eindruck erwecken, weil sie notwendigerweise dicker sind als die nächsten Schnitte. Das hängt mit der Ausdehnung des am Anfang besonders kalten Blocks zusammen.



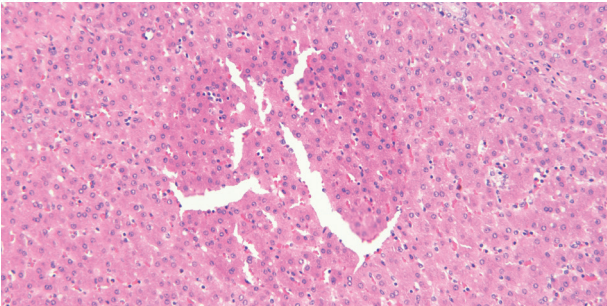
Die Schnitte in diesem Schnittband sind in der Reihenfolge nummeriert, in der sie erzeugt wurden. Beachten Sie, dass die ersten Schnitte breiter sind, also weniger komprimiert. Wenn sich der Block während der Mikrotomie erwärmt, werden die Schnitte anfälliger für übermäßige Kompression und damit schmaler. Ein weiterer Punkt, der zu beachten ist, ist die Schnittstärke. Obwohl das Mikrotom durchweg auf $3\ \mu\text{m}$ eingestellt war, sind die ersten Schnitte aufgrund der thermischen Ausdehnung schätzungsweise $4\text{--}5\ \mu\text{m}$ stark.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 47

Blasenbildung und -einschluss vorbeugen

- ✓ Es wird darauf geachtet, dass sich im Wasserbad keine Luftblasen bilden. Alle erkennbaren Blasen werden entfernt, bevor die Schnitte auf die Wasseroberfläche gelegt werden.
- ✗ Kleine Luftblasen im Wasserbad werden ignoriert. Man geht davon aus, dass sämtliche Blasen, die unter Schnitten eingeschlossen werden, bei der Trocknung verschwinden. Das mag in der Tat so aussehen. Nichtsdestotrotz stellen sich jene Gewebeschnitte, die über den Luftblasen liegen, oft verzerrt dar und heben sich beim Färben wahrscheinlich noch weiter ab.



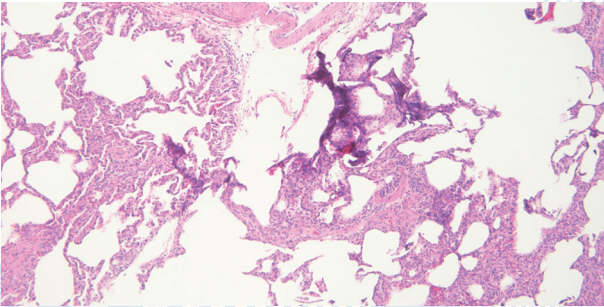
Der kreisförmige, rissige Bereich in diesem Leberschnitt hat sich vom Objektträger abgehoben. Die Ursache war eine Luftblase, die während des Aufziehens unter den Schnitt geraten ist und ein ordnungsgemäßes Abflachen und Anhaften verhinderte. H&E-Färbung.

Aufschwimmen und Aufziehen

Schritt 48

Abheben der Schnitte vom Objektträger verhindern

- ✓ Die Verwendung von adhäsiven, positiv geladenen Objektträgern oder Haftstoffen wie Aminoalkylsilan (AAS) wird in Betracht gezogen. Bei Bedarf kommen diese Produkte zum Einsatz.
- ✗ Manchmal schwimmen die Schnitte während der Färbung ab, insbesondere bei der Antigendemaskierung für die Immunhistochemie oder beim Einsatz von Methoden, die eine Wärmebehandlung erfordern. In diesen Fällen wären geladene Objektträger oder Haftstoffe die bessere Wahl.



Ein Teil dieses Lungenpräparats hat sich vom Objektträger abgehoben und auf anliegendes Gewebe gelegt, das damit kaum mehr zu beurteilen ist. H&E-Färbung.

Aufschwimmen und Aufziehen

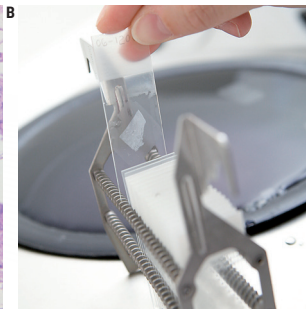
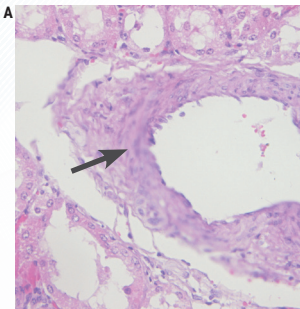


- Schritt 49 Vor dem Trocknen abtropfen lassen
- Schritt 50 Trocknungstemperatur überwachen
- Schritt 51 Angemessene Trocknungszeit wählen

Schritt 49

Vor dem Trocknen abtropfen lassen

- ✓ Die Schnitte werden kurz abgetropft, bevor sie in den Objektträgeretrockner oder auf die Heizplatte gelegt werden.
- ✗ Das Wasser kann kaum von den Schnitten ablaufen, bevor diese horizontal positioniert und getrocknet werden. Die Schnitte schwimmen regelrecht auf dem Objektträger und trocknen nicht immer flach ab.



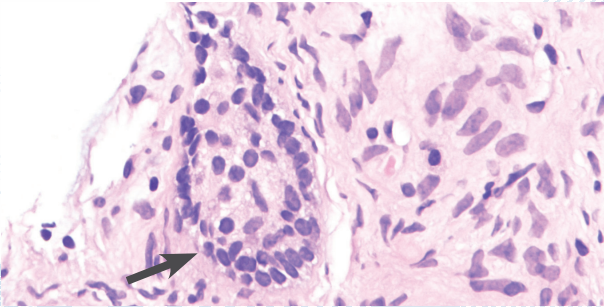
- A Dieser Schnitt wurde horizontal getrocknet, ohne dass er vorher ausreichend abgetropft ist. Der unscharfe Bereich in der Mitte des Bildes ist das Ergebnis dieses Vorgehens.
- B Dieser Schnitt wurde soeben auf den Objektträger aufgezogen und wird für kurze Zeit vertikal aufgestellt, bevor er in den Objektträgeretrockner gelegt wird. Dadurch lässt sich das in A gezeigte Problem vermeiden.

Schnitttrocknung

Schritt 50

Trocknungstemperatur überwachen

- ✓ Die Temperatur des Objektträgertrockners wird sorgfältig überwacht.
- ✗ Der Objektträgertrockner kann schon mal zu heiß werden. Übermäßige Hitze kann zu Brennpunkten im Schnitt und zu Unregelmäßigkeiten in der Färbung führen.



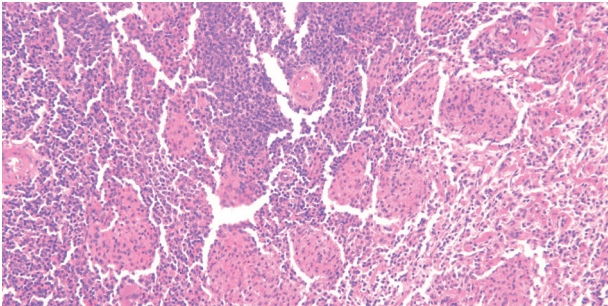
Dieses Prostatapräparat zeigt das Ergebnis einer „Zellkernschmelze“. Als wahrscheinlichste Ursache kommt zu große Hitze beim Trocknen der Objektträger infrage. Fehler bei der Gewebeeinfärbung können einen ähnlichen Effekt ergeben. Die Zellkernschmelze ist typischerweise am Rand der Proben zu erkennen und betrifft in den meisten Fällen Epithelgewebe. Die betroffenen Kerne sind ungleichmäßig gefärbt, manchmal rosa, manchmal blau, und morphologische Details gehen verloren.

Schnitttrocknung

Schritt 51

Angemessene Trocknungszeit wählen

- ✓ Die minimale und maximale Trocknungszeit der Objektträger wird eingehalten.
- ✗ Die Trocknungszeiten der Objektträger variieren erheblich. Längeres Trocknen bei höheren Temperaturen wirkt sich nachteilig auf die Schnittqualität aus.



Dieser Lymphknotenschnitt wurde zu lange und bei zu hoher Temperatur getrocknet und weist zahlreiche Risse auf. Solche Risse können auch durch andere Fehler in der Präparaterstellung verursacht werden, u. a. durch eine Überinfiltration. H&E-Färbung.

Schnitttrocknung



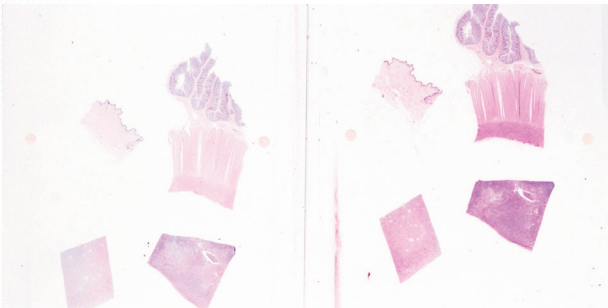
- Schritt 52 Zeitliche Vorgaben einhalten
- Schritt 53 Qualität der Färbung prüfen
- Schritt 54 Färbebedingungen standardisieren
- Schritt 55 Vollständige Entparaffinierung sicherstellen
- Schritt 56 Reagenzien regelmäßig erneuern
- Schritt 57 Schnitte gründlich rehydrieren
- Schritt 58 Qualität der Hämatoxylin-Lösung kontrollieren
- Schritt 59 Vollständige Blaufärbung der Zellkerne sicherstellen
- Schritt 60 Gleichmäßige Eosin-Färbung begünstigen
- Schritt 61 pH-Wert der Eosin-Lösung kontrollieren

Routinefärbung
(H&E)

Schritt 52

Zeitliche Vorgaben einhalten

- ✓ Jeder Schritt des Färbeprotokolls ist zeitlich genau festgelegt.
- ✗ Färbezeiten sind nur ungefähr festgelegt. Wenn die Bearbeitung eines Präparats eilt, werden Schritte übersprungen. Das kann zu inkonsistenten, wenig aussagekräftigen Ergebnissen führen.



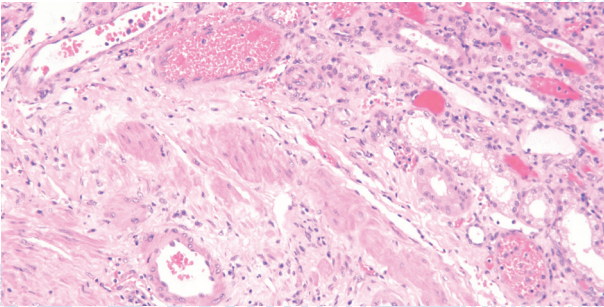
Diese Schnitte wurden aus dem gleichen Block in der gleichen Dicke geschnitten und von verschiedenen Mitarbeitern manuell nach der vermeintlich gleichen Methode H&E-gefärbt. Schon makroskopisch ist die Inkonsistenz der Färbung zu erkennen.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 53

Qualität der Färbung prüfen

- ✓ Um die Färbequalität zu kontrollieren, werden regelmäßig Kontrollpräparate mitgeführt und gefärbt.
- ✗ Insbesondere für H&E-Färbungen werden Qualitätskontrollen übergangen. Bei Problemen mit der Färbung ist es deshalb nur schwer möglich, zu unterscheiden, ob diese auf eine mangelhafte Qualität der Reagenzien, ein ungeeignetes Protokoll oder eine schlechte Fixierung zurückzuführen sind.



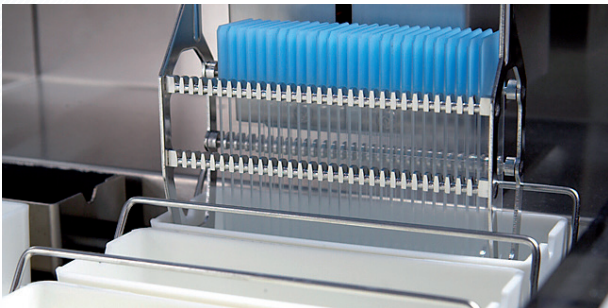
Dieser Nierenschnitt enthält eine Vielzahl von eosinophilen Gewebeelementen und gut erhaltenen Zellkernen, die eine zuverlässige Beurteilung der Qualität der H&E-Färbung ermöglichen. Auch Plazenta eignet sich als Probenotyp, um Färbequalitätskontrollen zu realisieren.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 54

Färbebedingungen standardisieren

- ✓ Rühr-, Wasch- und Abtropfzeiten sind für alle Schritte beim Färben optimiert und festgeschrieben.
- ✗ Rühr-, Wasch- und Abtropfzeiten variieren. Lösungsmittel und Reagenzien werden schnell verunreinigt. Damit werden die Färbeergebnisse inkonsistent und verlieren an Aussagekraft.



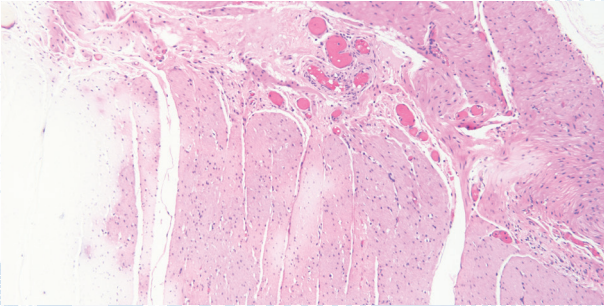
Einer der Vorteile von Färbeautomaten ist die Konstanz von Rühr-, Wasch- und Abtropfzeiten. Vorausgesetzt, dass auch die übrigen Variablen passen, gewährleistet das gute, reproduzierbare Ergebnisse.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 55

Vollständige Entparaffinierung sicherstellen

- ✓ Die Entparaffinierung der Präparate erfolgt unter optimalen Bedingungen und vollständig.
- ✗ Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgt nicht immer vollständig, sodass sich auf den Objektträgern Flecken mit Wachsresten finden. In diesen Bereichen kommt es zu Problemen bei der Färbung, die unzureichend oder unregelmäßig bleibt.



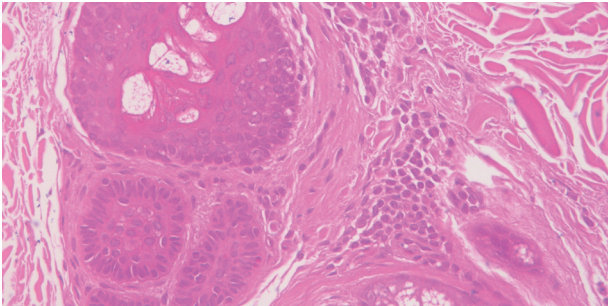
Dieser H&E-gefärbte Schnitt umfasst einen großen ungefärbten Bereich auf der linken Seite und mehrere kleinere Flecken im gesamten Bild, die entweder nur teilweise gefärbt oder gänzlich ungefärbt sind. Dieses Färbeargebnis ist auf eine unvollständige Entparaffinierung vor der Färbung zurückzuführen.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 56

Reagenzien regelmäßig erneuern

- ✓ Lösungsmittel und Färbereagenzien werden regelmäßig ausgetauscht. Die Entscheidung, wann ein Wechsel erforderlich ist, wird auf Grundlage der Anzahl der gefärbten Objektträger oder der bearbeiteten Racks gefällt.
- ✗ Die Erneuerung von Lösungsmitteln und Färbereagenzien erfolgt planlos. Sie werden erst ersetzt, wenn die Färbequalität sichtbar nachlässt.



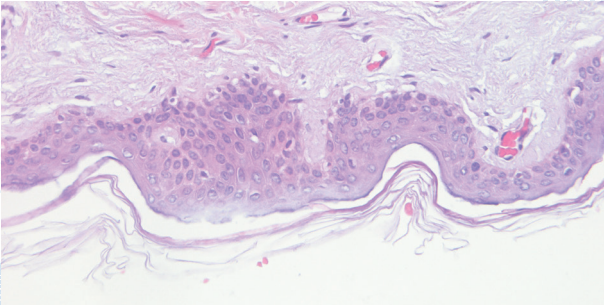
Hier sehen sie eine trübe, schlecht definierte und qualitativ minderwertige Hämatoxylin-Färbung. Das entsprechende Reagenz sollte sofort ersetzt werden.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 57

Schnitte gründlich rehydrieren

- ✓ Die Präparate werden vor der Hämatoxylin-Färbung gründlich rehydriert.
- ✗ Es kommt immer wieder zur Kontamination der Hämatoxylin-Lösung mit Alkohol oder Xylol. Daraus resultiert eine ungleichmäßige Färbung.



Die Ungleichmäßigkeit der Hämatoxylin-Färbung der Epidermis dieser Hautprobe wurde durch Xylol-Reste (und Spuren von Wachs) verursacht, die bei Anwendung der Färbelösung auf das Präparat übertragen wurden.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 58

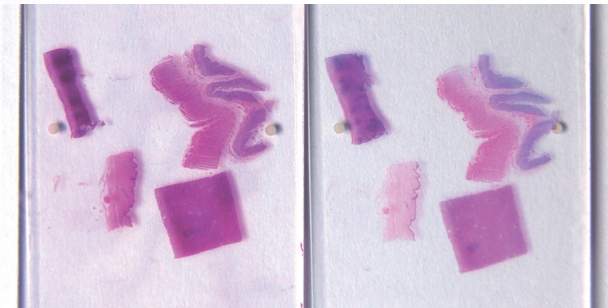
Qualität der Hämatoxylin-Lösung kontrollieren



Die Qualität der Hämatoxylin-Lösung wird sorgfältig überwacht: Während ihrer Nutzungsdauer wird sie zwangsläufig verdünnt, weil es zur Verschleppung anderer Reagenzien von Objektträgern und Racks kommt. Weitere Qualitätseinbußen ergeben sich aus unvermeidbaren Oxidationsprozessen. Deshalb müssen die Färberegebnisse kontinuierlich evaluiert werden.



Es werden variable, nicht reproduzierbare Färberegebnisse erzielt, für die keine Erklärung gesucht wird. So können z. B. die Oberflächen des Färbebads, die Belüftung während der Färbung und die Umgebungstemperatur die Oxidation der Lösung beeinflussen.



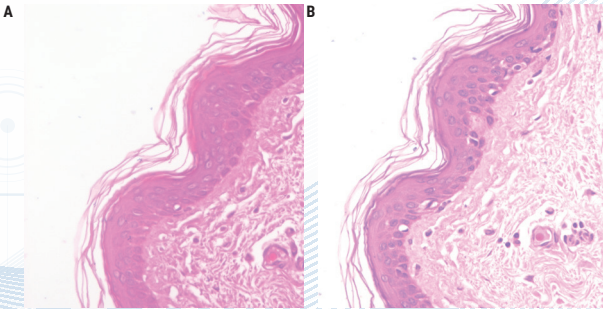
Es sind zwei Objektträger zu sehen, die aus demselben Kontrollblock geschnitten wurden. Sie wurden in einem Färbeautomaten mit identischen Formulierungen H&E-gefärbt, jedoch mit einem Abstand von sieben Tagen zwischen den beiden Durchläufen. Schon makroskopisch ist der Unterschied im Grad der Färbung offensichtlich.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 59

Vollständiges Bläuen der Zellkerne sichern

- ✓ Nach der Hämatoxylin-Färbung werden Scott'sche Lösung oder Ammoniakwasser eingesetzt, um ein gründliches Bläuen der Zellkerne zu gewährleisten. Die spezifischen Anforderungen hängen vom pH-Wert des Leitungswassers ab, das vor Ort verfügbar ist.
- ✗ Weil das Bläuen der Zellkerne nur unzureichend erfolgt, erscheinen diese auch in fertigen Präparaten rosa oder rötlich. Auch eine Unterfärbung mit Hämatoxylin (oder Überdifferenzierung) und anschließende Überfärbung mit Eosin resultiert in rosaroten Zellkernen.



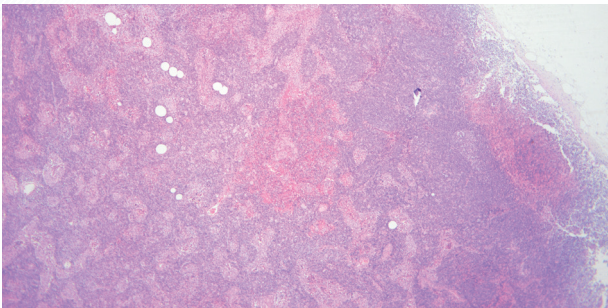
- A Die Zellkerne in der Epidermis dieses Hautschnitts sind schlecht definiert und rötlich gefärbt. wurde nach der Hämatoxylin-Färbung (Haut, H&E) in alkalischem Wasser nicht ausreichend gebläut; der pH-Wert blieb zu niedrig.
- B Hier sehen Sie einen anderen Hautschnitt, der nach der Kernfärbung mit Hämatoxylin korrekt gebläut wurde. Hier sind die Zellkerne viel besser definiert. Beide H&E-Färbung.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 60

Ungleichmäßige Eosin-Färbung vermeiden Gleichmäßige Eosin-Färbung begünstigen

- ✓ Nach dem Bläuen wird gründlich in Leitungswasser gewaschen, um Reste alkalischer Lösungen zu entfernen, die die Eosin-Färbung behindern und zur schwachen und ungleichmäßigen Färbung führen können.
- ✗ Ineffizientes Waschen nach dem Bläuen bedeutet, dass Alkalireste im Präparat verbleiben. Das stört die Eosin-Färbung.



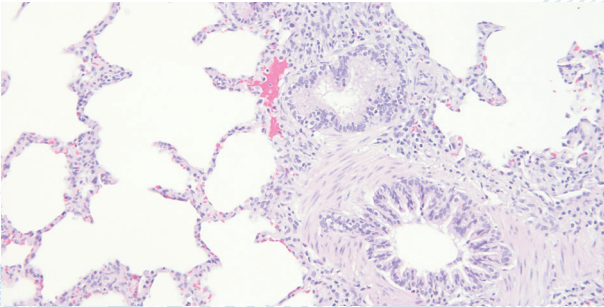
Hier sehen Sie die Effekte, die Alkalireste auf die Eosin-Färbung haben. Beachten Sie die fleckige Färbung des Milzschnitts. H&E-Färbung.

Routinefärbung (H&E)

Schritt 61

pH-Wert der Eosin-Lösung kontrollieren

- ✓ Der pH-Wert der Eosin-Lösung wird überwacht. Er wird um pH 5,0 gehalten, um optimale Färbegergebnisse zu ermöglichen. Die Zugabe von ein paar Tropfen Essigsäure genügt in der Regel, um die Lösung anzusäuern, wenn der pH-Wert zu hoch ist.
- ✗ Es werden keine Anstrengungen unternommen, den pH-Wert der Eosin-Lösung zu kontrollieren und gegebenenfalls zu korrigieren. Weil es durch die Verschleppung von alkalischer Lösung regelmäßig zum Anstieg des pH-Werts der Eosin-Lösung kommt, leidet die Färbequalität. Eingegriffen wird erst, wenn die Färbeintensität nachlässt.



Die Eosin-Färbung dieses Lungenschnitts ist durchgehend zu schwach und vollkommen inakzeptabel. Beachten Sie, dass die Erythrozyten als einzige Gewebekomponenten mit Eosin angefärbt sind. H&E-Färbung.

Routinefärbung (H&E)



- Schritt 62 Vor Klärung und Eindecken gründlich dehydrieren
- Schritt 63 Austrocknen und Kristallbildung vermeiden

Eindecken

Schritt 62

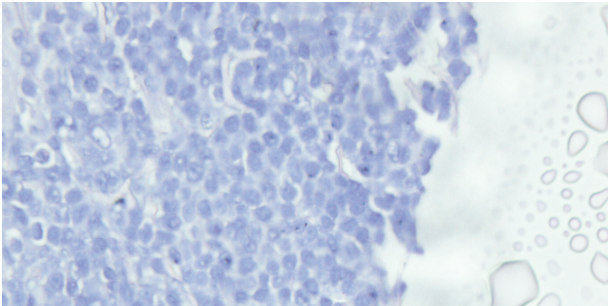
Vor Klärung und Eindecken gründlich entwässern



Die Schnitte werden gründlich entwässert, bevor sie zur Klärung in Xylol gelegt werden.



Um Zeit zu sparen, werden die Schnitte durch die Alkoholreihe gehetzt und in Xylol gegeben, bevor sie ausreichend entwässert sind. Bei Klärung in mit Wasser kontaminiertem Xylol können sich winzige Wassertröpfchen ins Gewebe einlagern, die mikroskopisch als undurchsichtige, detailarme Bereiche imponieren.



Diesem Schnitt mangelt es an Klarheit und Detail. Er erscheint dem bloßen Auge trüb, verschleiert. Bei genauerem Hinsehen sind überall winzige Wassertröpfchen zu erkennen.

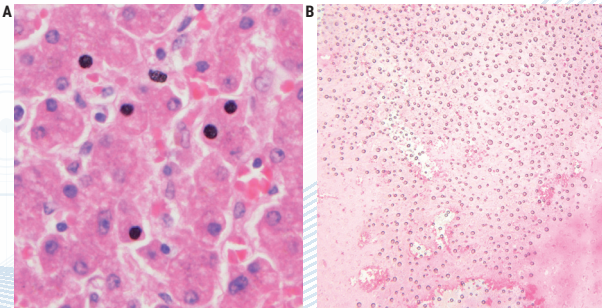
Eindecken

Schritt 63

Austrocknen und Kristallbildung vermeiden

✓ Das Deckglas wird stets aufgelegt, bevor der Schnitt trocknen kann, und es wird ein hochwertiges Eindeckmedium verwendet. Man weiß, wie sich das Einbettungsmedium bei längerer Lagerung verhält. Besonders in minderwertigen Medien können sich Kristalle bilden, manchmal erst nach Monaten oder Jahren.

✗ Man lässt die Schnitte teilweise trocknen, bevor das Deckglas aufgelegt wird, wodurch einige Zellkerne schwarz erscheinen. Allein aufgrund des Preises ausgewähltes Eindeckmedium kann bei langfristiger Lagerung Kristalle bilden und die Deckgläser können sich abheben.



- A Dieser Schnitt ist teilweise getrocknet, bevor man ihn eingedeckt hat. Das hat dazu geführt, dass über einigen Kernen winzige Luftbläschen eingeschlossen wurden, die sie schwarz erscheinen lassen. Dieses Erscheinungsbild wird manchmal auch als „Cornflake-Artefakt“ bezeichnet.
- B In diesem H&E-gefärbten Schnitt unter Deckglas ist eine Vielzahl von lichtbrechenden Sphärokristallen zu erkennen, die sich innerhalb von sechs Monaten nach dem Einbetten in minderwertigem Eindeckmedium gebildet haben.

Eindecken



- Schritt 64 Die Färbung verstehen
- Schritt 65 Immer eine Positivkontrolle mitführen
- Schritt 66 Zeitliche Vorgaben einhalten
- Schritt 67 Stabilität der Reagenzien berücksichtigen
- Schritt 68 Reagenzien ordnungsgemäß lagern
- Schritt 69 Dem Protokoll folgen
- Schritt 70 Abweichungen notieren
- Schritt 71 Waschschrte standardisieren
- Schritt 72 Mikroskop für Qualitätskontrolle einstellen

Spezialfärbungen

Schritt 64

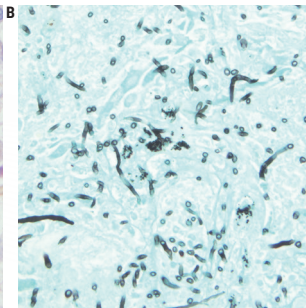
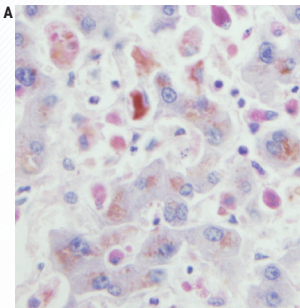
Die Färbung verstehen



Sie wissen, was Sie mit der Färbung, die Sie durchführen, zu zeigen versuchen.



Einem Protokoll zu folgen, ohne zu wissen, was im Schnitt zu sehen sein soll, führt selten zum Erfolg.



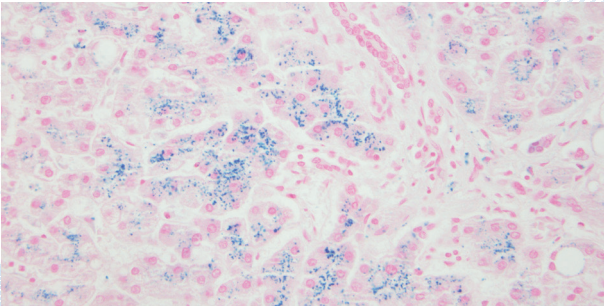
- A Hier handelt es sich um einen PAS-gefärbten Leberschnitt. Lipofuszin und Glykogen sind PAS-positiv, während Spuren von Galle und Hämosiderin PAS-negativ sind und in ihren natürlichen Farben gelb und braun erscheinen.
- B Dieser Schnitt zeigt eine opportunistische Pilzinfektion der Lunge durch *Aspergillus*. Die Pilzhyphen stellen sich schwarz dar, ebenso wie ungefärbter Teer, der in den Lungen von Rauchern und den meisten Stadtbewohnern zu finden ist. Grocott-Färbung.

Spezialfärbungen

Schritt 65

Immer eine Positivkontrolle mitführen

- ✓ In jedem Durchlauf wird eine Positivkontrolle mitgeführt, also ein Präparat, das sicher die Zielstrukturen enthält, die Sie zeigen bzw. anfärben möchten.
- ✗ Wenn die Zielstruktur nicht dargestellt werden kann, wird angenommen, dass sie im Präparat nicht enthalten ist.



Dieser Schnitt durch eine zirrotische Leber wurde einer Perl-Färbung unterzogen, um eisenhaltiges Hämosiderin zu zeigen, das sich blau darstellt. Der zugehörige Block eignet sich gut als Positivkontrolle für Eisenfärbungen.

Schritt 66

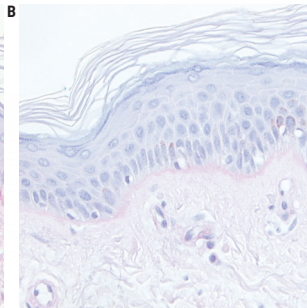
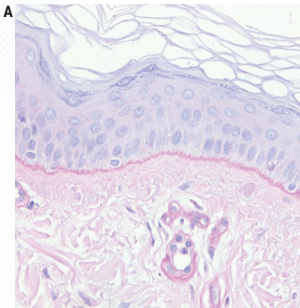
Zeitliche Vorgaben einhalten



Man hält sich an die zeitlichen Vorgaben im Protokoll.



Zeitliche Vorgaben werden nur ungefähr eingehalten. Ein solches Vorgehen führt zu ungefähren, d. h. inkonsistenten, nicht reproduzierbaren Ergebnissen.



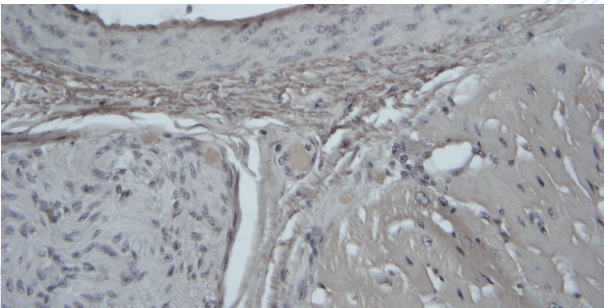
Diese beiden Hautschnitte stammen aus demselben Block und wurden mit der PAS-Reaktion gefärbt. Schnitt A wurde 5 Minuten lang mit dem Oxidationsmittel Perjodsäure behandelt, während Schnitt B diesem Agens nur 30 Sekunden lang ausgesetzt war, was eindeutig zu kurz ist. So lässt sich die äußerst schwache Färbung der Basalmembran in Schnitt B erklären.

Spezialfärbungen

Schritt 67

Stabilität der Reagenzien berücksichtigen

- ✓ Man achtet auf die Haltbarkeit der Reagenzien, die verwendet werden sollen. Einige Reagenzien oder Farbstofflösungen zersetzen sich langsam, während andere sehr instabil sind, frisch angesetzt und sofort verwendet werden müssen. Wieder andere können erst mit einer gewissen Verzögerung benutzt werden, weil beispielsweise Oxidationsprozesse ablaufen müssen, bevor die Lösung einsatzbereit ist.
- ✗ Man geht davon aus, dass sämtliche Reagenzien auf unbestimmte Zeit verwendet werden können.

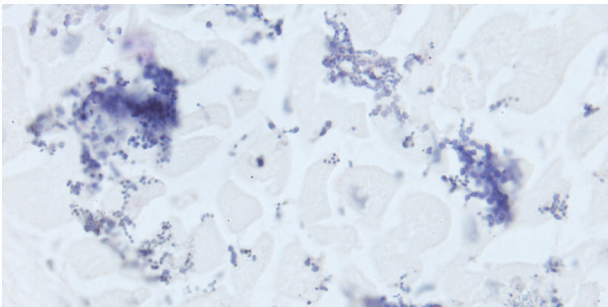


Diese trübe, schlecht definierte Hämatoxylin-Färbung nach Weigert ist auf eine Überoxidation zurückzuführen. Beachten Sie die Braunfärbung des Kollagens.

Schritt 68

Reagenzien ordnungsgemäß lagern

- ✓ Sämtliche Reagenzien werden gemäß den Herstellerempfehlungen gelagert. Einige bedürfen einer dauerhaften Kühlung, weil sie sonst allzu leicht schimmeln oder andere Mikroorganismen in ihnen wachsen. Andere sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln gelagert werden.
- ✗ Alle Reagenzien stehen griffbereit im Regal über der Färbekbank. Nicht selten verderben sie dort.



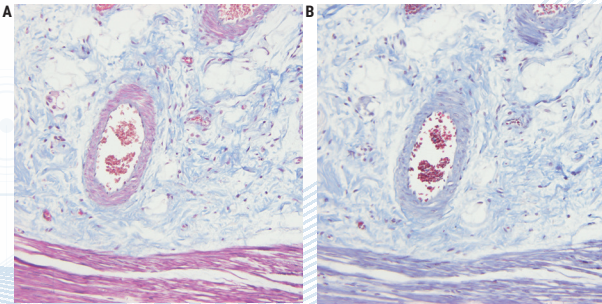
In diesem Schnitt sind zahlreiche Mikroorganismen zu erkennen, die in der Färbelösung gewachsen sind und mit dieser auf das Präparat übertragen wurden. In diesem Fall ging es um die Hämatoxylin-Lösung.

Spezialfärbungen

Schritt 69

Dem Protokoll folgen

- ✓ Man folgt dem Protokoll in allen seinen Schritten.
- ✗ Mitarbeiter erzielen unterschiedliche Ergebnisse, obwohl sie vermeintlich dem gleichen Protokoll folgen.



Diese Schnitte durch Formalin-fixierte intestinale Submukosa wurden einer Masson-Trichrom-Färbung unterzogen. In Schnitt A stellt sich die glatte Muskulatur rot dar. In diesem Fall wurde die Färbung korrekt nach Protokoll durchgeführt, einschließlich einer vorbereitenden Behandlung mit Chromsäure zur Sensibilisierung. Dieser Schritt des Beizens mit Chromsäure wurde beim Färben von Schnitt B übergangen. Daraus resultiert die fehlende Differenzialfärbung der Muskulatur in diesem Präparat.

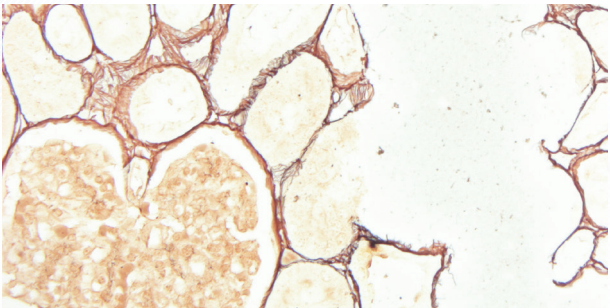
Spezialfärbungen

Schritt 70

Abweichungen notieren

✓ Jede Abweichung vom Protokoll wird unverzüglich festgehalten.

✗ Wenn die Ergebnisse nicht den Erwartungen entsprechen, ist es manchmal schwierig oder gar unmöglich, herauszufinden, woran es gelegen haben könnte, weil Änderungen am Protokoll nicht konsequent notiert wurden.



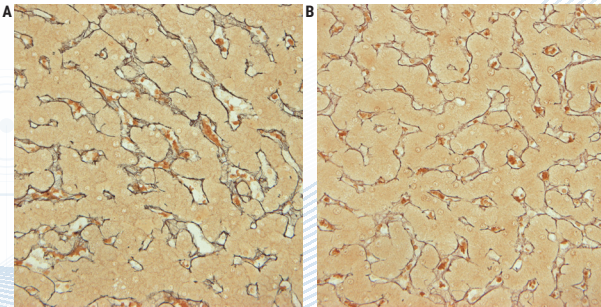
In dieser Silberfärbung nach Gordon und Sweets stellen sich die argyrophilen Retikulinfasern nur schlecht dar. Außerdem befindet sich ein Präzipitat auf dem Objektträger, das als schaumiger Hintergrund imponiert und die Beurteilung des Nierengewebes weiter erschwert. Es ist sehr schwierig, die Ursache für derartige Problem zu ermitteln, wenn die Methode nicht genau befolgt wurde.

Spezialfärbungen

Schritt 71

Waschschritte standardisieren

- ✓ Auch was die Waschschritte betrifft, hält man sich streng ans Protokoll. Bekanntermaßen sind sie eine häufige Ursache von unerwünschter Variabilität in den Ergebnissen, weshalb sie standardisiert werden müssen.
- ✗ Man wendet unterschiedliche Waschtechniken an: Manche Mitarbeiter schütteln kräftig, andere schwenken sanft. Und dazwischen bleibt viel Platz für Variationen.



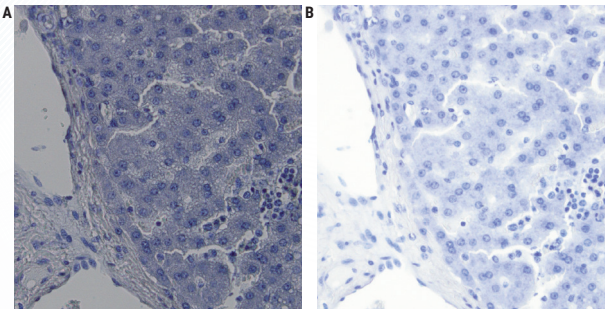
Diese Leberschnitte wurden nach der gleichen Methode gefärbt. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Präparationen war die Technik, mit der sie zwischen Imprägnierung und Reduktion gespült wurden. Die retikulären Fasern stellen sich schwarz dar und sind im Schnitt A bedeutend besser definiert. Silberfärbung nach Gordon and Sweets.

Schritt 72

Mikroskop für Qualitätskontrolle einstellen

✓ Entscheidende Zwischenschritte, z. B. solche, die einer Differenzierung bedürfen, werden mikroskopisch kontrolliert. Dabei weiß der Anwender, wie sich die routinemäßigen Einstellungen des Mikroskops auf das Erscheinungsbild von nassen, noch nicht eingedeckten Schnitten auswirken. Ihm ist bewusst, wie er das Gerät einstellen muss, um nicht dem falschen Eindruck einer Hintergrundfärbung zu erliegen.

✗ Der Grad der Färbung wird allein durch die Betrachtung des Objektträgers mit bloßem Auge beurteilt.



- A. Nassschnitt (ohne Deckgläschen), betrachtet unter einem Mikroskop mit geschlossener Kondensorblende. Der Hintergrund erweckt den Eindruck, er wäre mitgefärbt.
- B. Nassschnitt (ohne Deckgläschen), betrachtet unter einem Mikroskop mit offener Kondensorblende. Hier ist der Hintergrund klar.

Spezialfärbungen

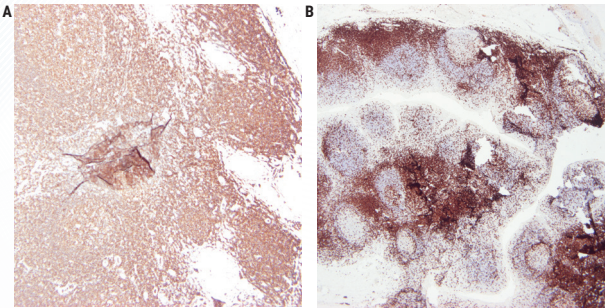


- Schritt 73 Hochwertige verwenden
- Schritt 74 Optimale Fixierung sicherstellen
- Stufe 75 Unzureichender Schnitthaftung vorbeugen
- Schritt 76 Entparaffinierung, Rehydrierung und Reagenzienauftrag optimieren
- Schritt 77 Konzentrationsgefälle vermeiden
- Schritt 78 Antikörper sorgfältig auswählen
- Schritt 79 Datenblätter lesen
- Schritt 80 Geeignete Methoden zur Demaskierung wählen
- Schritt 81 Kreuzreaktivität der Antikörper berücksichtigen
- Schritt 82 Endogene Peroxidase blockieren
- Schritt 83 Hintergrundfärbung reduzieren
- Schritt 84 Geeignetes Detektionssystem verwenden
- Schritt 85 Waschschritte standardisieren
- Schritt 86 Gegenfärbung optimieren
- Schritt 87 Geeignete Kontrollen mitführen
- Schritt 88 Ergebnisse sorgfältig auswerten

Schritt 73

Hochwertige Schnitte verwenden

- ✓ Es werden ausschließlich dünne, flache Schnitte verwendet, die gründlich getrocknet wurden. In der Immunhistochemie kommen vorzugsweise geladene oder mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtete Objektträger zum Einsatz.
- ✗ Unebene, schlecht haftende Schnitte färben ungleichmäßig mit variabler Hintergrundfärbung.

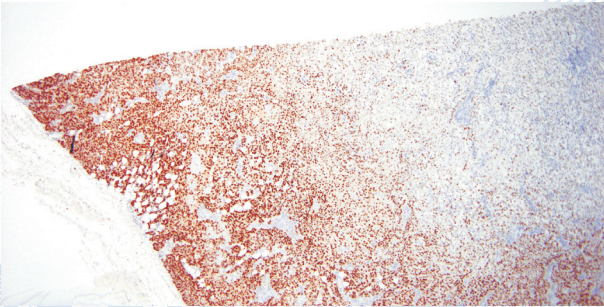


- A Beim Einbetten wurde eine Luftblase unter diesem Tonsillenschnitt eingeschlossen. Sie hat während der Färbung zu dessen Ablösung vom Objektträger geführt. CD45.
- B Dieser Tonsillenschnitt ist von schlechter Qualität. Er wurde vor der Färbung weder richtig geglättet noch gut getrocknet, hat sich angehoben, sodass das Präparat keine ausreichende Qualität erreicht. CD3.

Schritt 74

Optimale Fixierung sicherstellen

- ✓ Eine gute Fixierung unter bekannten und gleichbleibenden Bedingungen bezüglich Fixiermittel, pH-Wert, Temperatur und Zeit liefert die besten Ergebnisse. Die Proben werden vor der Infiltration überprüft, um festzustellen, ob eine zusätzliche Fixierung erforderlich ist.
- ✗ Variable Fixierbedingungen, die zur Unter- oder Überfixierung des Gewebes führen, sind keine gute Basis für reproduzierbare Ergebnisse. Außerdem erschweren sie die Fehlersuche.



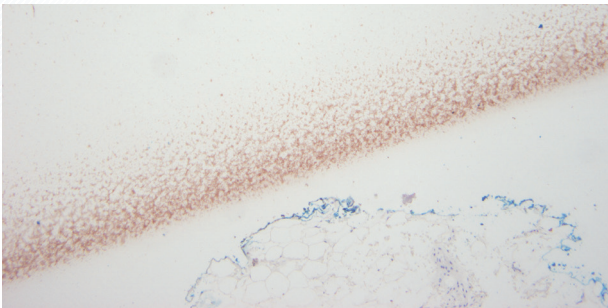
Die ungleichmäßige, zonale Fixierung dieses Schnitts aus einem Brusttumor erklärt dessen unregelmäßige Färbung. ER.

Schritt 75

Unzureichender Schnitthaftung vorbeugen

✓ Im Wasserbad wird die Verwendung von Kleber auf Proteinbasis, z. B. Stärke- oder Gelatinekleber, vermieden. Das gilt insbesondere, wenn die Schnitte auf geladene Objektträger aufgezogen werden.

✗ Kleber auf Proteinbasis können die Oberfläche des geladenen Objektträgers blockieren. So haften die Schnitte schlechter und heben sich stellenweise ab. An eben diesen Stellen sammeln sich die Reagenzien und provozieren Unregelmäßigkeiten im Färbeergebnis.

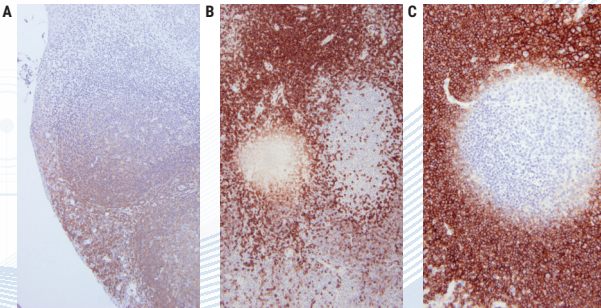


Neben dem eigentlichen Präparat aus Brustgewebe ist eine dicke, angefärbte Linie aus proteinbasiertem Kleber zu erkennen. PR.

Schritt 76

Entparaffinierung, Rehydrierung und Reagenzienauftrag optimieren

- ✓ Die Schnitte werden gründlich entparaffiniert und rehydriert, bevor sie mit weiteren Reagenzien behandelt werden. Der Reagenzienauftrag selbst erfolgt effizient und gleichmäßig über das gesamte Präparat. Dieses Vorgehen gewährleistet eine gleichmäßige Färbung und reproduzierbare Ergebnisse.
- ✗ Eine mangelhafte Entparaffinierung oder Rehydrierung kann ebenso wie eine ungleichmäßige Verteilung der Reagenzien über die Probenoberfläche zu ungenügender Färbequalität und z. T. gar zum Ausbleiben der Färbung führen.

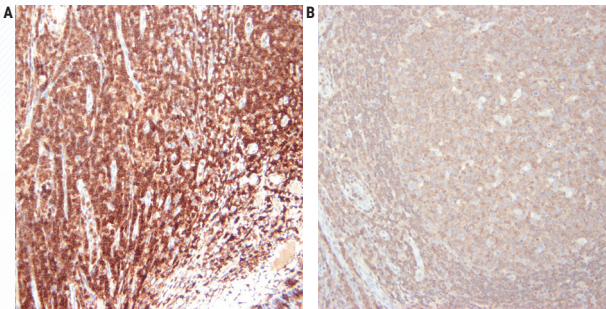


- A Ein schlechter Reagenzienfluss über diesen Tonsillenschnitt hat zu einer ungleichmäßigen Färbung geführt. CD45.
- B In diesem Tonsillenschnitt haben Wachsreste für ungefärbte Bereiche gesorgt. CD5.
- C Eine Blase im primären Antikörper hat eine gleichmäßige Färbung dieses Tonsillenschnitts verhindert. CD20.

Schritt 77

Konzentrationsgefälle vermeiden

- ✓ Konzentrationsgefälle werden durch sorgfältiges Auftragen der Reagenzien vermieden.
- ✗ Konzentrationsgefälle resultieren im Farbverlauf über den Objektträger, d. h. ein Ende ist stark gefärbt und zum anderen Ende hin nimmt die Färbintensität ab.



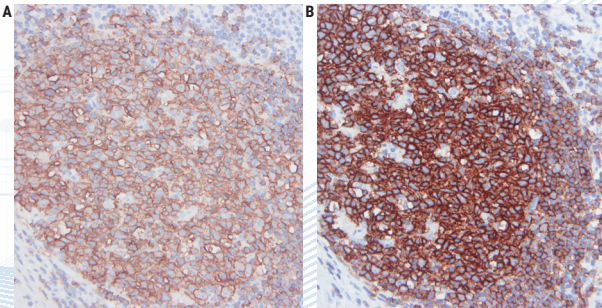
A und B sind Ausschnitte aus ein und demselben Tonsillenschnitt, die allerdings an gegenüberliegenden Enden des Objektträgers aufgenommen wurden. Eine Seite des Objektträgers zeigt eine intensive Färbung (A), während am anderen Ende nur eine schwache Färbung erreicht wurde (B). Dies ist ein extremes Beispiel für ein Konzentrationsgefälle, das bei der Färbung bestand. CD45.

Schritt 78

Antikörper sorgfältig auswählen

✓ Die primären Antikörper werden sorgfältig und unter Berücksichtigung ihrer Sensitivität und Spezifität ausgewählt. Antikörper, die von verschiedenen Anbietern verkauft werden, stammen oft aus der gleichen Quelle und werden für den Vertrieb lediglich neu etikettiert und verpackt. Wenn es um Informationen zu einem spezifischen Antikörper geht, ist deshalb der Name des Klons zu verwenden.

✗ „Wir kaufen Antikörper allein aufgrund des Preises.“

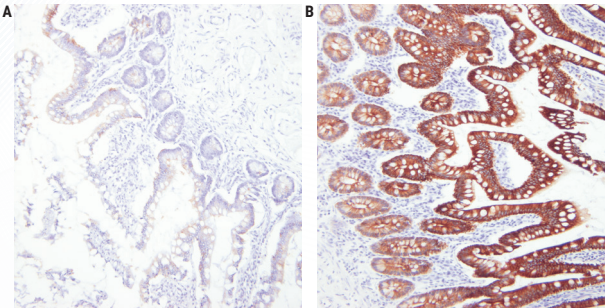


Diese Tonsillenschnitte stammen aus demselben Block einer menschlichen Gewebeprobe und wurden mit Antikörpern gegen den B-Zell-Marker CD20 gefärbt, wobei primäre monoklonale Antikörper von verschiedenen Lieferanten zum Einsatz kamen. In beiden Fällen wurden die Empfehlungen für Vorbehandlung und Verdünnung befolgt. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Färbequalität zu erkennen.

Schritt 79

Datenblätter lesen

- ✓ Sie kennen Ihre primären Antikörper. Aus dem zugehörigen Datenblatt geht hervor, ob der jeweilige Antikörper mit der gewählten Methode kompatibel ist. Es lohnt sich, die gesammelten Datenblätter zu aktualisieren, wenn eine neue Charge von Antikörpern gekauft wird.
- ✗ Die Mitarbeiter des Labors haben keinen Zugriff auf die Datenblätter zu den Antikörpern, die sie verwenden.

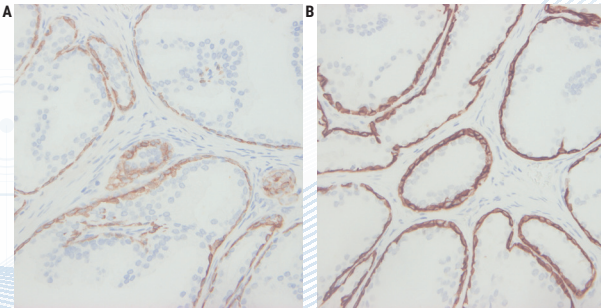


Diese Darmschnitte wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin AE1/AE3 gefärbt. Die gewählten Protokolle unterscheiden sich hinsichtlich der Methode zur Demaskierung, was in Schnitt A zu einem inakzeptabel schwachen Färbeergebnis und in Schnitt B zu einer intensiven Färbung geführt hat.

Schritt 80

Geeignete Methoden zur Demaskierung wählen

- ✓ Die Wahl der Methode zur Demaskierung erfolgt in Abhängigkeit vom Primärantikörper, dem zu färbenden Gewebe und der Fixierung (Reagenz, pH-Wert, Reaktionsbedingungen).
- ✗ Unter der Annahme, dass es ein erfolgreiches universelles Verfahren zur hitzeinduzierten Antigen-Demaskierung gäbe, wird für alle Primärantikörper die gleiche Demaskierungstechnik gewählt.

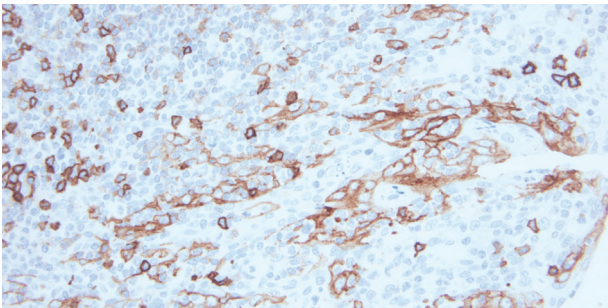


Diese Prostataschnitte wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin 34 β E12 gefärbt. Schnitt A zeigt eine schwache Färbung, während Schnitt B deutlich stärker gefärbt ist. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Präparationen war die Demaskierungsmethode.

Schritt 81

Kreuzreaktivität der Antikörper berücksichtigen

- ✓ Eine mögliche Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper findet Berücksichtigung. Bei Zweifeln wird das zugehörige Datenblatt konsultiert.
- ✗ Man versucht gar nicht erst, unerwartete positive Färbungen zu erklären.

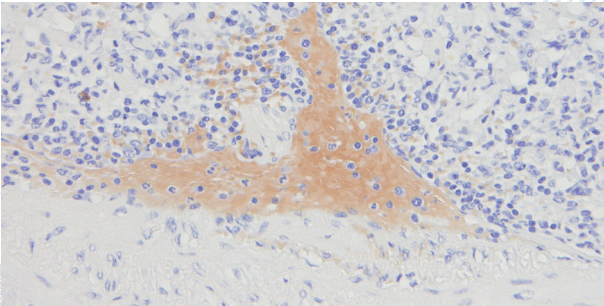


In den Tonsillenkrypten dieser Gaumenmandel ist eine positive CD5-Färbung zu erkennen. CD5 ist ein Lymphozytenmarker, der hauptsächlich T-Zellen färbt. Dieser spezielle Klon (4C7) kreuzreagiert mit Epithelzellen, die sich tief in den Tonsillenkrypten befinden.

Schritt 82

Endogene Peroxidase blockieren

- ✓ Um zuverlässige Ergebnisse aus Peroxidase-basierten Detektionssystemen zu erhalten, wird zunächst die endogene Peroxidase blockiert.
- ✗ Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Muskelgewebe färben sich zum Teil unspezifisch an, wenn die Aktivität der endogenen Peroxidase nicht vollständig blockiert wird.



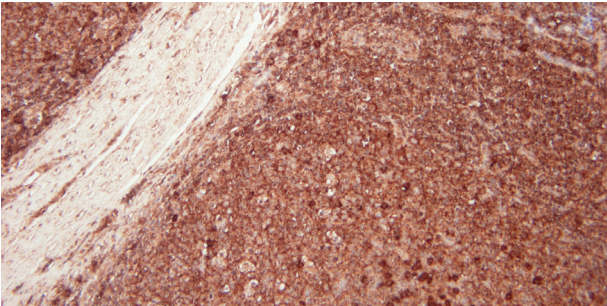
In diesem Milzschnitt ist die typische, unspezifische Färbung der Erythrozyten zu sehen, wie sie sich aus einer unvollständigen Blockierung der endogenen Peroxidase ergibt. Hier hat die in den roten Blutkörperchen vorhandene endogene Peroxidase mit dem DAB-Substrat reagiert.

Schritt 83

Hintergrundfärbung reduzieren

✓ Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung wird Wert auf eine effektive Proteinblockierung gelegt.

✗ In den Präparaten besteht eine generalisierte Hintergrundfärbung, die sich in einem ineffektiven Proteinblock begründet.

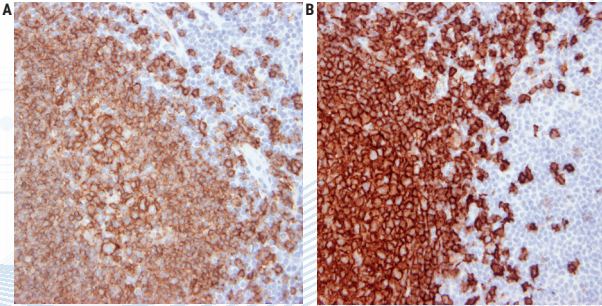


In diesem gesunden Tonsillengewebe, das mit Antikörpern gegen κ -Leichtketten gefärbt wurde, besteht eine starke Hintergrundfärbung durch unzureichende Proteinblockierung.

Schritt 84

Geeignetes Detektionssystem verwenden

- ✓ Es wird ein Detektionssystem gewählt, das ausreichend sensibel und spezifisch ist, um eine präzise Färbung zu erreichen.
- ✗ Es wird stets dasselbe Detektionssystem genutzt. Man ist darauf eingespielt und sieht keinen Bedarf, Änderungen vorzunehmen. Dabei wird in Kauf genommen, dass Färbungen manchmal schwach und unklar sind.

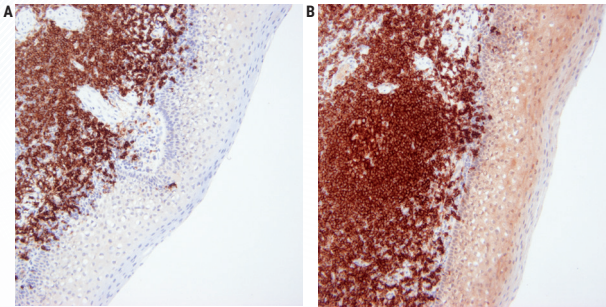


Die Tonsillenschnitte A und B stammen von der gleichen Probe. Es wurden verschiedene Detektionssysteme eingesetzt, woraus beachtliche Unterschiede in der Intensität und Präzision der Färbungen resultieren. CD20.

Schritt 85

Waschschritte standardisieren

- ✓ Sämtliche Waschschritte sind bezüglich Dauer, Volumen und Schütteln standardisiert. Damit wird ein wesentlicher Beitrag zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geleistet.
- ✗ Bei Verwendung desselben Antikörpers werden in verschiedenen Durchläufen unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Dafür können Variationen in der von einzelnen Mitarbeitern angewandten Waschtechnik verantwortlich sein.



Die Tonsillenschnitte A und B stammen aus derselben Probe und wurden manuell mit den gleichen Reagenzien gefärbt. Insbesondere im Bereich des mehrschichtigen Epithels besteht eine starke Hintergrundfärbung in Präparat B. Diese ist wahrscheinlich auf den Einsatz einer weniger effizienten Waschtechnik zurückzuführen. CD20.

Schritt 86

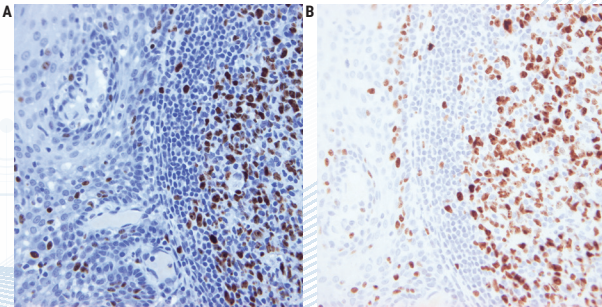
Gegenfärbung optimieren



Die Intensität der Gegenfärbung der Zellkerne wird sorgfältig reguliert und standardisiert, um positive Färbegergebnisse nicht zu überdecken. Die Gegenfärbung wird so eingesetzt, dass der Kontrast zwischen Chromogen und Hintergrundelementen maximiert wird. Deshalb erfolgt die Wahl der Gegenfärbung in Abhängigkeit vom Chromogen.



Die Gegenfärbung der Zellkerne ist zu stark. Damit besteht das Risiko, schwache spezifische Färbungen zu übersehen.

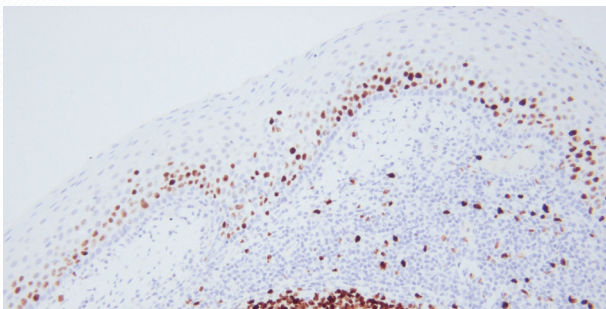


Diese Tonsillenschnitte wurden mit dem Proliferationsmarker Ki67 angefärbt, wobei eine Anfärbung der Zellkerne zu erwarten ist. Beide Schnitte stammen aus derselben Probe und unterscheiden sich in der Intensität der Hämatoxylin-Gegenfärbung. Schnitt A zeigt eine zu starke Färbung, die eine schwach positive Färbung durch Ki67 überdecken würde. Schnitt B ist hinsichtlich der Gegenfärbung deutlich besser gelungen.

Schritt 87

Geeignete Kontrollen mitführen

- ✓ Es werden immer geeignete Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt, die zur Validierung der Ergebnisse dienen. Interne Positiv- und Negativkontrollen sind ihrerseits von Bedeutung; sie stellen ein hervorragendes Mittel zur Qualitätssicherung in der Immunhistochemie dar.
- ✗ Kontrollen werden durchgeführt, wenn die Methode nicht zu funktionieren scheint. Darüber hinaus werden sie als überflüssig angesehen oder vielleicht sogar mitgeführt, aber nicht angeschaut.

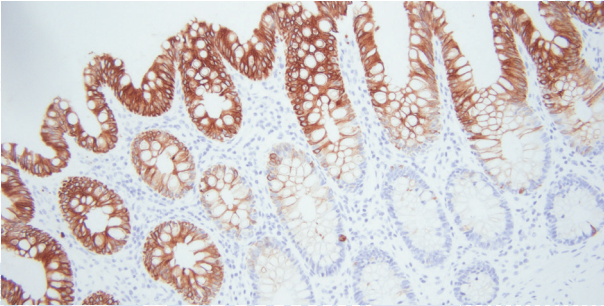


Dieser Tonsillenschnitt wurde mit Antikörpern gegen Ki67 angefärbt. Es handelt sich um die Negativkontrolle und die Zellkerne sollten nicht angefärbt sein. Auf diesen Objektträger wurde anstelle des negativen Kontrollreagens fälschlicherweise der Primärantikörper aufgetragen.

Schritt 88

Ergebnisse sorgfältig auswerten

- ✓ Sie wissen, wonach Sie suchen und wo Sie hinschauen müssen, um Ihre Schnitte der Fragestellung nach zu beurteilen.
- ✗ Man geht davon aus, dass eine Färbung funktioniert hat, wenn ein Objektträger Farbe zeigt.



Dieser Darmschnitt wurde mit Antikörpern gegen Cytokeratin AE1/AE3 gefärbt. Die Färbung des Kryptenepithels ist ungewöhnlich schwach ausgeprägt. Nachforschungen haben ergeben, dass fälschlicherweise CK20 als primärer Antikörper verwendet worden war.

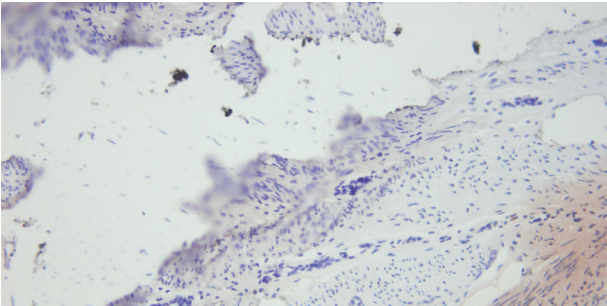


- Schritt 89 Hochwertige Schnitte verwenden
- Schritt 90 Optimale Fixierung sicherstellen
- Schritt 91 Unzureichender Schnitthaftung vorbeugen
- Schritt 92 Entparaffinierung, Rehydrierung und Reagenzienauftrag optimieren
- Schritt 93 Sonde mit Bedacht wählen
- Schritt 94 Datenblätter lesen
- Schritt 95 Richtig vorbehandeln
- Schritt 96 Gewebe vorsichtig handhaben
- Schritt 97 Geeignetes Detektionssystem verwenden
- Schritt 98 Reagenzienverdunstung vermeiden
- Schritt 99 Waschschrirte standardisieren
- Schritt 100 Geeignete Kontrollen mitführen
- Schritt 101 Ergebnisse sorgfältig auswerten

Schritt 89

Hochwertige Schnitte verwenden

- ✓ Es werden ausschließlich dünne, flache Schnitte verwendet, die gründlich getrocknet wurden. Für die In-situ-Hybridisierung werden geladene Objektträger genutzt.
- ✗ Unebene, schlecht haftende Schnitte färben ungleichmäßig mit variabler Hintergrundfärbung.



Dieser Schnitt von schlechter Qualität hat sich vom Objektträger abgehoben und zeigt eine Hintergrundfärbung. HPV.

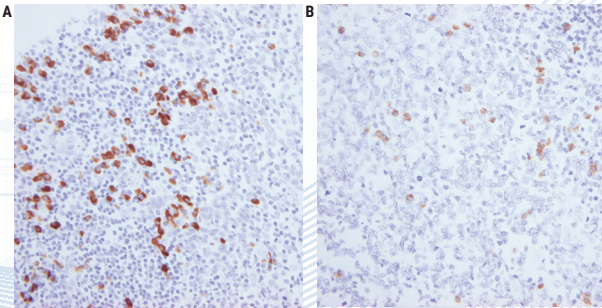
In-situ-Hybridisierung

Schritt 90

Optimale Fixierung sicherstellen

✓ Eine gute Fixierung unter bekannten und gleichbleibenden Bedingungen bezüglich Fixiermittel, pH-Wert, Temperatur und Zeit liefert die besten Ergebnisse.

✗ Variable Fixierbedingungen, die zur Unter- oder Überfixierung des Gewebes führen, sind keine gute Basis für reproduzierbare Ergebnisse. Außerdem erschweren sie die Fehlersuche.



A In dieser gut fixierten Tonsillenprobe ergab die In-situ-Hybridisierung gegen κ -Leichtketten mRNA eine scharfe, starke Reaktion.

B In diesem schlecht fixierten Präparat hingegen ist die Reaktion schwach ausgeprägt.

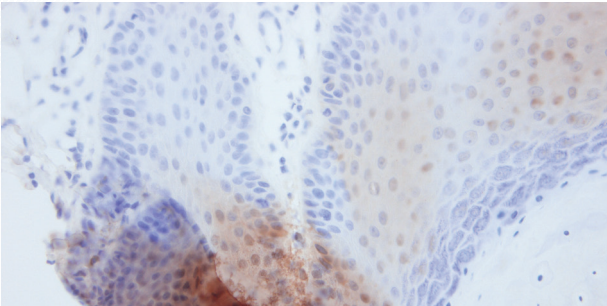
In-situ-Hybridisierung

Schritt 91

Unzureichender Schnitthaftung vorbeugen

✓ Im Wasserbad wird die Verwendung von Kleber auf Proteinbasis, z. B. Stärke- oder Gelatinekleber, vermieden. Das gilt insbesondere, wenn die Schnitte auf geladene Objektträger aufgezogen werden.

✗ Kleber auf Proteinbasis können die Oberfläche des geladenen Objektträgers blockieren. So haften die Schnitte schlechter und heben sich stellenweise ab. An eben diesen Stellen sammeln sich die Reagenzien und provozieren Unregelmäßigkeiten im Färbeergebnis.



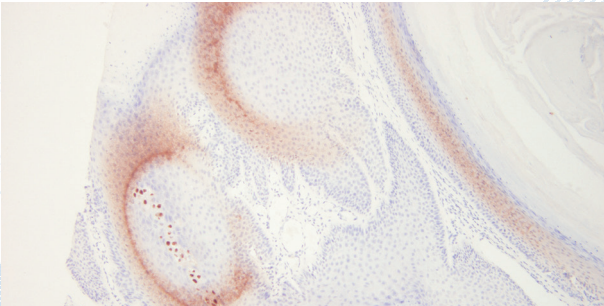
Hier haben unzureichende Haftung am Objektträger und Falten im Präparat zu einer ungleichmäßigen Färbung geführt. HPV.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 92

Entparaffinierung, Rehydrierung und Reagenzienauftrag optimieren

- ✓ Die Schnitte werden gründlich entparaffiniert und rehydriert, bevor sie mit weiteren Reagenzien behandelt werden. Der Reagenzienauftrag selbst erfolgt effizient und gleichmäßig über das gesamte Präparat. Dieses Vorgehen gewährleistet eine gleichmäßige Färbung und reproduzierbare Ergebnisse.
- ✗ Eine mangelhafte Entparaffinierung oder Rehydrierung kann ebenso wie eine ungleichmäßige Verteilung der Reagenzien über die Probenoberfläche zu ungenügender Färbequalität, z. T. gar zum Ausbleiben der Färbung führen. Blasen, die sich während der Vorbehandlung oder bei der Färbung an den Schnitt anhaften, können Probleme verursachen.



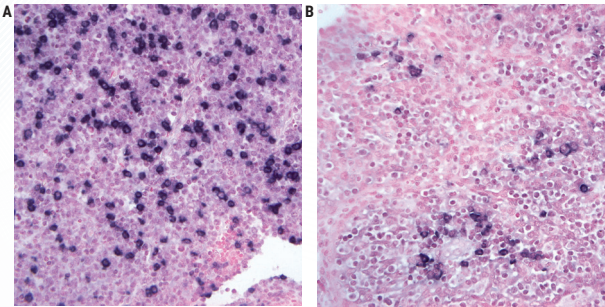
Blasen, die sich während der Vorbehandlung bei 95 °C gebildet haben, haben Unregelmäßigkeiten in der Färbung bewirkt. HPV.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 93

Sonde mit Bedacht wählen

- ✓ Sonden werden sorgfältig und im Hinblick auf ihre Sensitivität und Spezifität ausgewählt.
- ✗ Die Entscheidung für oder gegen eine Sonde wird allein am Preis festgemacht.



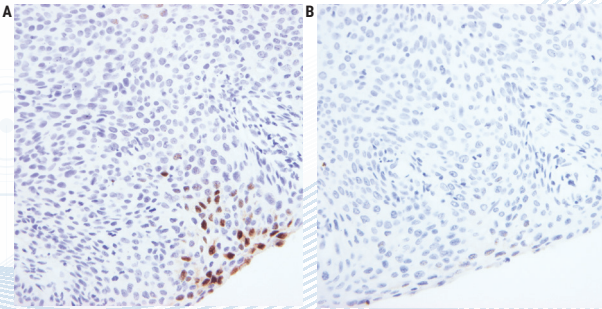
Diese beiden Tonsillenschnitte wurden mittels In-situ-Hybridisierung in BCIP/NBT-Lösung gegen κ -Leichtketten-mRNA angefärbt. Dabei kamen Oligonukleotidsonden von verschiedenen Anbietern zum Einsatz. Schnitt A zeigt eine intensive Färbung, während das Färbergebnis in Schnitt B deutlich schwächer ist und weniger Zellen angefärbt sind.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 94

Datenblätter lesen

- ✓ Sie kennen Ihre Sonden. Aus dem zugehörigen Datenblatt geht hervor, ob die jeweilige Sonde mit der gewählten Methode kompatibel ist. Temperatur und Zeit werden sorgfältig reguliert, um optimale Hybridisierungsbedingungen zu schaffen. Für eine maximale spezifische Bindung sind diese Parameter präzise einzustellen.
- ✗ Die Mitarbeiter des Labors haben keinen Zugriff auf die Datenblätter zu den Sonden, die sie verwenden.



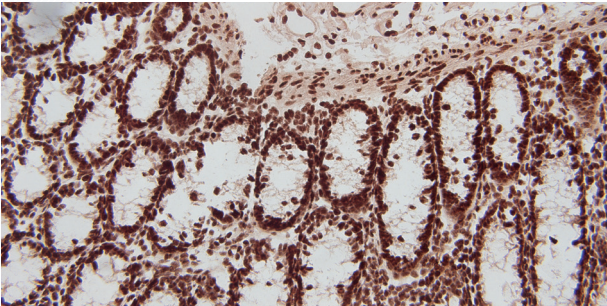
Diese Kondylomschnitte wurden mittels In-situ-Hybridisierung gegen HPV angefärbt, wobei die gleiche DNA-Sonde verwendet, aber unterschiedliche Hybridisierungsbedingungen gewählt wurden. In Schnitt A wurde eine starke Färbung erreicht, während das Ergebnis in Schnitt B unbefriedigend ist.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 95

Richtig vorbehandeln

- ✓ Es werden geeignete Bedingungen zur Vorbehandlung und Optimierung gewählt. Sie sind abhängig von der Fixierung und dem Gewebetyp.
- ✗ Wenn für verschiedene Sonden die gleiche Enzymvorbehandlung gewählt wird, kann das zu schlechten Ergebnissen führen.



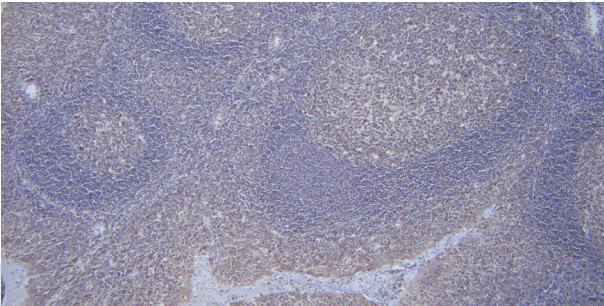
Dieser Schnitt durch Kolonschleimhaut wurde unter Verwendung einer Poly-dT-Kontrollsonde angefärbt. Er zeigt das Ergebnis einer Überverdauung mit Proteinase K. Man beachte den Verlust der zytoplasmatischen Struktur im Schleimhautepithel und die starke Hintergrundfärbung.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 96

Gewebe vorsichtig handhaben

- ✓ Gewebeproben werden vorsichtig gehandhabt und zeitnah fixiert. So wird die Aktivität endogener RNasen und damit der Verlust von RNA begrenzt.
- ✗ Die achtlose Handhabung von Gewebeproben und Verzögerungen in der Fixierung begünstigen den Verlust von RNA, weil endogene RNasen länger wirken können.



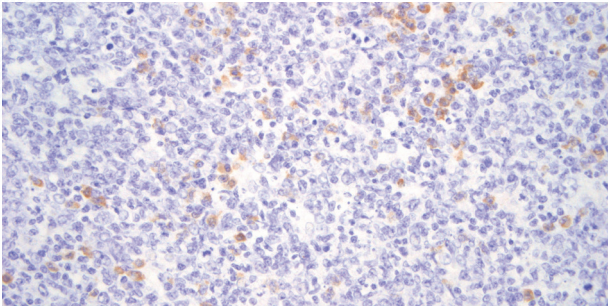
Nach dem Abbau nukleärer RNA durch endogene RNasen war in diesem Mandelschnitt, der mit einer Poly-dT-Sonde behandelt wurde, nur noch ein schwaches Färberegebnis zu erreichen.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 97

Geeignetes Detektionssystem verwenden

- ✓ Es werden sensitive Detektions- und Visualisierungssysteme gewählt und die Inkubationsbedingungen werden optimiert.
- ✗ Bei mangelnder Sensitivität des Detektions- und Visualisierungssystems kann es zu einer sehr schwachen oder sogar ausbleibenden Färbung kommen, obwohl die Sonde an ihre Zielstruktur gebunden ist.



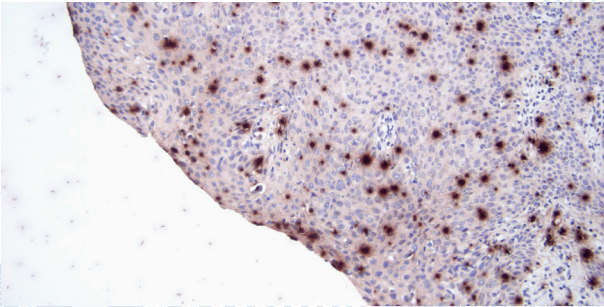
Die schwache Färbung dieses Tonsillenschnitts ist auf ein wenig sensibles Detektionssystem zurückzuführen. Bei dieser In-situ-Hybridisierung gegen λ -Leichtketten kam ein Nicht-Polymer-Detektionskit zum Einsatz.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 98

Reagenzienverdunstung vermeiden

- ✓ Während der Inkubation wird darauf geachtet, dass weder die Sondenlösung noch andere Reagenzien verdunsten. Aufgrund der notwendigen langen Inkubationszeiten ist das Eintrocknen von Reagenzien ein häufiges Problem. Dem lässt sich durch die Verwendung von hochwertigen Geräten entgegenwirken.
- ✗ Wenn die Sonde oder andere Reagenzien auf dem Schnitt eintrocknen, was meist an den Rändern geschieht, können daraus intensive unspezifische Färbungen entstehen.



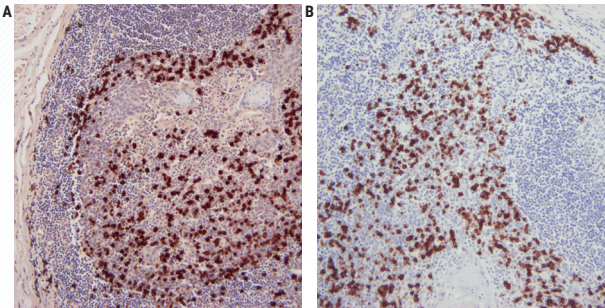
Dieser Tonsillenschnitt wurde einer In-situ-Hybridisierung gegen κ -Leichtketten unterzogen. Während der Behandlung mit Formamid ist das Präparat ausgetrocknet, was zu einer unstimmgigen, unspezifischen Färbung geführt hat.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 99

Waschschritte standardisieren

- ✓ Sämtliche Waschschritte sind bezüglich Dauer, Volumen und Schütteln standardisiert. Damit wird ein wesentlicher Beitrag zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geleistet.
- ✗ Bei Verwendung derselben Sonde werden in verschiedenen Durchläufen unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Dafür können Variationen in der von einzelnen Mitarbeitern angewandten Waschtechnik verantwortlich sein.



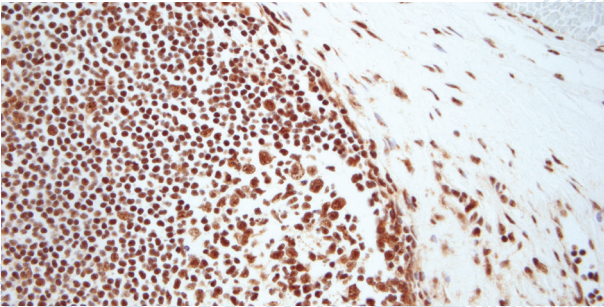
Diese Tonsillenschnitte verdeutlichen, wie sehr das Waschen zu einem guten oder weniger guten Ergebnis der In-situ-Hybridisierung beiträgt. Schnitt A zeigt eine übermäßige Hintergrundfärbung, die auf einer schlechten Waschtechnik beruht, während die κ -Leichtketten-Färbung in Schnitt B bei adäquatem Waschen gut gelungen ist.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 100

Geeignete Kontrollen mitführen

- ✓ Es werden immer geeignete Kontrollen mitgeführt. Für die Positivkontrolle ist Gewebe zu verwenden, das sich bekanntermaßen gut anfärben lässt, während die Negativkontrolle mit einer unspezifischen Sonde inkubiert wird.
- ✗ Kontrollen werden durchgeführt, wenn die Methode nicht zu funktionieren scheint. Darüber hinaus werden sie als überflüssig angesehen oder vielleicht sogar mitgeführt, aber nicht angeschaut.



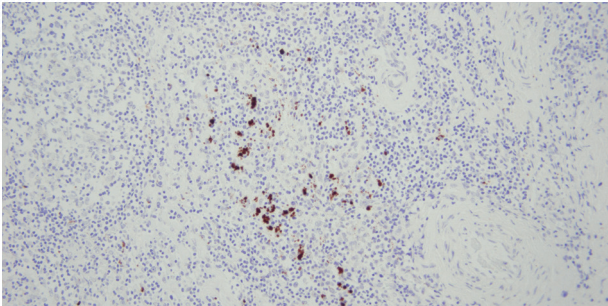
Dieser Mandelschnitt, der mit einer Poly-dT-Sonde behandelt wurde, diente als Positivkontrolle. Die klare, deutliche Färbung belegt, dass das Gewebe gut fixiert und die RNA gut erhalten war.

In-situ-Hybridisierung

Schritt 101

Ergebnisse sorgfältig auswerten

- ✓ Sie wissen, wonach Sie suchen und wo Sie hinschauen müssen, um Ihre Schnitte der Fragestellung nach zu beurteilen. Jeder Mitarbeiter, der In-situ-Hybridisierungen durchführt, verfügt über fundiertes Wissen zu den zugrundeliegenden Prozessen und weiß, was eine positive Färbung ist und was nicht.
- ✗ Man geht davon aus, dass eine Färbung funktioniert hat, wenn ein Objektträger Farbe zeigt.



Dieser Tonsillenschnitt wurde als Negativkontrolle mitgeführt und hat alle Schritte der In-situ-Hybridisierung durchlaufen, ohne mit einer Sonde inkubiert worden zu sein. Natürlich braun gefärbtes Hämosiderin, das zusätzlich DAB bindet, stellt sich deutlich dar. Das ist allerdings kein positives Färbeergebnis.

In-situ-Hybridisierung



Knowledge Pathway

Autoren

Geoffrey Rolls (Hauptautor)

Simon Davies (Immunhistochemie)

Aodin Gallagher (In-situ-Hybridisierung)

Mit Beiträgen von

Kerrie Scott-Dowell

Annette Mullane

Neville Farmer

Fiona Tarbet



Knowledge Pathway

Der Knowledge Pathway ist eine wissenschaftliche und pädagogische Ressource für Fachpersonal in der Pathoanatomie. Dieses dynamische Portal wird von einer stetig wachsenden Gemeinschaft von Autoren und Experten erhalten und bietet kontinuierlich relevante Informationen auf dem neuesten Stand, von den Grundlagen bis hin zu spezifischen Anwendungen.

knowledgepathway.com

LEICA BIOSYSTEMS

Leica Biosystems ist weltweit führend im Bereich der Workflow-Systeme und Automatisierung, wobei sämtliche Prozessschritte Berücksichtigung finden und integriert werden. Als einziges Unternehmen, das sich mit der Gesamtheit der Arbeitsabläufe von der Biopsie bis zur Diagnose beschäftigt, sind wir bestens positioniert, um Hürden zwischen den einzelnen Schritten zu überwinden. Unsere Mission „Bessere Krebsdiagnostik für höhere Lebensqualität“ steht im Mittelpunkt unserer Unternehmenskultur. Unsere anwenderfreundlichen und stets zuverlässigen Angebote tragen dazu bei, die Effizienz der Arbeitsabläufe und die Diagnosesicherheit zu verbessern. Das Unternehmen ist in über 100 Ländern vertreten und hat seinen Hauptsitz in Nussloch, Deutschland.