

Living up to Life

**Leica**  
MICROSYSTEMS

# Schnittprobleme und mögliche Lösungen

Nachbearbeitung schwieriger Gewebeblöcke  
Geoffrey O Rolls

# Scientia

Die Fortbildungsserie von Leica Microsystems

## Autor

Geoffrey O Rolls BAppSc, FAIMS  
Histology Consultant  
Leica Microsystems  
Ehemals Dozent für Histopathologie  
am Fachbereich Labormedizin der  
RMIT University  
Melbourne

## Beiträge von

Fiona Tarbet

Kerrie Scott-Dowell

Alison Hopkins

Neville Farmer

Grant Taggart

Alle Histologiellabore sind hin und wieder mit dem Problem konfrontiert, dass sich Paraffinblöcke schwer oder gar nicht schneiden lassen. In manchen Fällen liegt das am Probentyp und den Gewebestrukturen, aus denen er besteht. Diese Gewebestrukturen können selbst bei ordnungsgemäßer Fixierung und Infiltration ein Problem darstellen. Faseriges Gewebe, Schilddrüsengewebe, stark keratinisierte Haut, Nägel oder Blutgerinnsel sind Beispiele für Präparate, die Probleme bereiten können. Manchmal sind Schnittprobleme auf unzureichende Fixierung, ungeeignete oder fehlerhafte Infiltration - einschließlich zu starker Infiltration (Überprozessierung) - oder einen Gerätefehler während der Infiltration zurückzuführen. Diese Bedingungen können dazu führen, dass bei einzelnen Blöcken oder schlimmstenfalls einer kompletten Charge Probleme auftreten.

Wenn Schnittprobleme auftreten, wird normalerweise eine Erstanalyse durchgeführt, um die Ursache zu ermitteln, und anschließend der Versuch unternommen, mit allen Mitteln brauchbare Schnitte zu erhalten. Der erste Teil des vorliegenden Textes enthält einige Fragen zur Unterstützung der Ursachenanalyse. Im zweiten Teil werden verschiedene Arten problematischer Paraffinblöcke mit möglichen Ursachen sowie einige Beispiele für schwierige Blöcke mit bekannten Ursachen vorgestellt. Dies soll Ihnen helfen, herauszufinden, woran es im konkreten Fall liegt. Teil 3 enthält einige Empfehlungen bezüglich des Erzielens von Schnitten ohne erneute Infiltration (Lösungen 1–6).

Wenn sich keine Schnitte erzielen lassen oder zahlreiche Blöcke betroffen sind, muss möglicherweise an eine erneute Infiltration gedacht werden. In Teil 3 werden Methoden der erneuten Infiltration beschrieben und bewertet (Lösungen 7–10). Eine erneute Infiltration sollte nur dann erwogen werden, wenn die Ursache des Problems genau analysiert wurde, da Reinfiltration in manchen Fällen (beispielsweise bei bereits überprozessiertem Gewebe) nicht angebracht ist. Außerdem ist sicherzustellen, dass das ursprüngliche Problem möglichst nicht erneut auftritt.

In Teil 4 werden die Wirkungen und Ursachen mangelhafter Infiltration ausführlicher erörtert und mögliche Kompromisse bei der Auswahl eines Infiltrationsprotokolls angesprochen. Da jedes Labor eine zuverlässige Reinfiltrationsmethode im Repertoire haben sollte, wird in Teil 5 eine einfache Methode zur Bewertung von Reinfiltrationsprotokollen beschrieben.

# Scientia

**Wissen. Wissenschaft. Fachwissen.**

Die Bildungsserie Scientia von Leica Microsystems ist Bestandteil unseres Zieles, Theorie und Praxis der Histologie durch Ausbildung, Schulung und den wissenschaftlichen Diskurs zu verbessern.





# Teil 1

## Die Erstanalyse

Weshalb lässt sich mein Paraffinblock schwer oder gar nicht schneiden?



## Die Erstanalyse – weshalb lässt sich mein Paraffinblock schwer oder gar nicht schneiden?

Wenn Sie mit dem Problem schwer oder gar nicht schneidbarer Paraffinblöcke konfrontiert sind, ist es wichtig, die Ursache zu ermitteln, bevor Sie über die weitere Vorgehensweise entscheiden. Als erstes sollten Sie sich folgende Fragen stellen:

1. Was ist an den infiltrierten Präparaten problematisch? Sind sie zu hart, zu weich, brüchig, breiig etc.? Die Beschreibungen in Teil 2 helfen Ihnen, diese Frage zu beantworten.
2. Worin unterschied sich der Zyklus, aus dem die problematischen Präparate resultierten, von vorherigen, erfolgreichen Zyklen?
3. Wurde der vorgesehene Ablauf eingehalten?
4. Tritt das Problem bei allen Präparaten in der Charge auf, oder betrifft es nur eine kleine Zahl? Sind alle betroffenen Präparate einem ähnlichen Typ zuzuordnen?
5. Befanden sich die Präparate im oberen Teil der Retorte und waren möglicherweise nicht vollständig mit allen Reagenzien bedeckt?
6. Wurden meine Präparate nach dem üblichen Protokoll infiltriert, das normalerweise für Proben dieser Größe und dieses Typs gute Ergebnisse liefert?
7. War das Protokoll für meine Problempräparate wahrscheinlich zu lang oder zu kurz? Wenn das Protokoll zu lang war, sind die Gewebepreparate möglicherweise zu stark infiltriert ("überprozessiert"), wenn es zu kurz war, nicht ausreichend infiltriert ("unterprozessiert"). Überprozessierte Gewebe sollten nicht erneut infiltriert werden.
8. Zeigte die Software während des Durchlaufs einen Fehler an, der auf eine Fehlfunktion des Geräts hinweisen könnte?
9. War eine visuelle Überprüfung der Reagenzienbehälter (Mengen, Verunreinigung, Sitz und Dichtung) aufschlussreich?
10. Besteht die Möglichkeit, dass beim Ersetzen von Lösungsmitteln im Gerät ein Fehler begangen wurde, oder war bei einigen Reagenzien der empfohlene Reinheitswert überschritten? Fehlerhafte Reagenzien oder eine falsche Reagenzienabfolge können zu "Unterprozessierung" führen. Wenn das entsprechende Gerät verfügbar ist, kann das spezifische Gewicht gemessen werden, um die ungefähre Konzentration von Dehydriermitteln zu bestimmen.
11. Wurden die Problempräparate auf die übliche Weise fixiert?
12. Kann ich mit Sicherheit sagen, wo der Fehler liegt?

Diese Fragen sollten Ihnen helfen, die Problemursache herauszufinden. Wenn immer noch Unsicherheit bezüglich der Problemursache besteht, müssen Sie sich so viele Informationen wie möglich beschaffen, indem Sie Ihre Präparate sorgfältig untersuchen. Durch eine gründliche Untersuchung lässt sich ein Verdacht bestätigen. Am Geruch können Sie möglicherweise erkennen, ob das Gewebe Lösungsmittelrückstände enthält.



## Teil 2

### Mehr Informationen:

Beispiele für typische Problemfälle und ihre Ursachen

## Mehr Informationen: Beispiele für typische Problemfälle und ihre Ursachen

Tabelle 1 gibt anhand häufig verwendeter Beschreibungen für Problemblocke und unbefriedigende Schnitte einen Überblick über Infiltrationsprobleme. In jedem Fall wird eine mögliche Ursache genannt. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Probleme anhand eines Beispiels ausführlich beschrieben. Die aufgeführten Lösungen werden in Teil 3 erläutert (Lösungen 1 – 10). Die im Anhang enthaltenen Entscheidungsbäume für Reinfiltration stellen eine weitere Hilfe dar.

**Tabelle 1. Beschreibung von Problemblocken mit möglichen Ursachen**

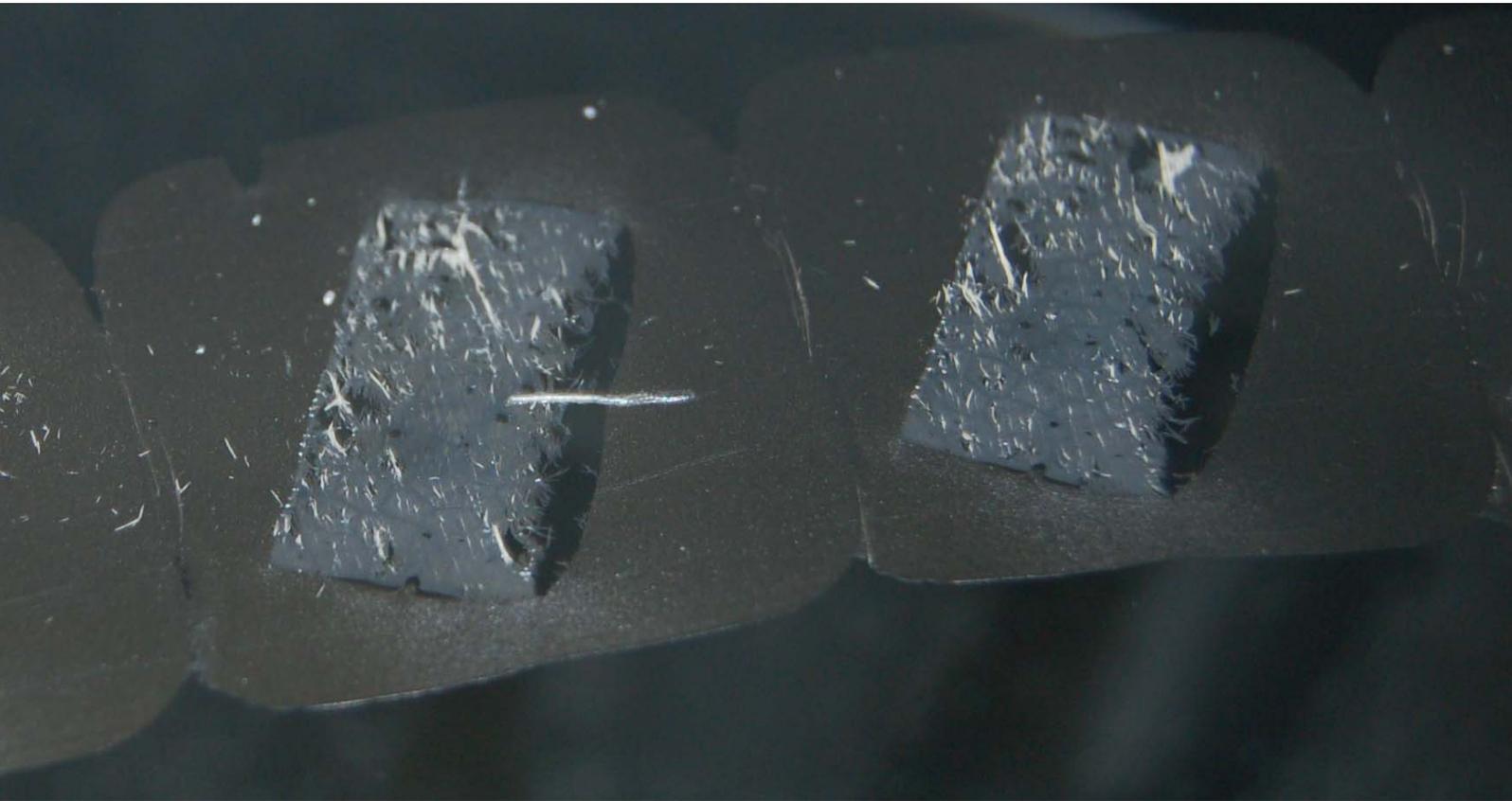
Nummer	Problem	Mögliche Ursache	Lösung (siehe Teil 3)
1	Sprödes oder brüchiges Gewebe	Zu starke Infiltration (Überprozessierung)	1, 3
2	Geschrumpftes Gewebe	Zu schwache Infiltration (Unterprozessierung)	8, 9
3	"Gekochtes" Gewebe	Überprozessiert	1, 2, 3
		Ausgetrocknetes Präparat	7,
4	Schmieriges, breiiges oder fettiges Gewebe	Zu schwache Infiltration (Unterprozessierung)	9, 10
5	Trockenes, pulveriges Gewebe	Zu starke Infiltration (Überprozessierung)	1, 2, 3
6	Gewebe riecht nach Intermedium	Zu schwache Infiltration (Unterprozessierung)	8, 9
7	Weiches, eindrückbares Gewebe	Zu schwache Infiltration (Unterprozessierung)	9, 10
8	Gewebe enthält harte Partikel	Kalk oder andere Materialien vorhanden	6, 3, 5
9	Äußerer Rand des Gewebes zufriedenstellend, aber mittlerer Bereich nicht schneidbar	Unterprozessierung	9, 10
		Unvollständige Wachsinfiltration	8
10	Gesamtes Gewebe hat eine mangelhafte Konsistenz.	Schlechte Fixierung, fehlerhafte Infiltration	9, 10
11	Äußerer Rand des Gewebes ist spröde und nicht schneidbar, während die Mitte zufriedenstellend ist.	Zu starke Infiltration (Überprozessierung)	1, 2, 3
12	Probe weist einzelne nicht schneidbare Bereiche auf, die bestimmten Gewebetypen, wie beispielsweise Muskelgewebe, dichtem Bindegewebe oder Fett, entsprechen.	Unterprozessierung	3, 4, 5 und anschließend 9
13	Ablösung der Präparatoberfläche vom umgebenden Wachs. Das Präparat kann beim Trimmen von der Blockoberfläche gezogen werden.	Falsche Einbettung	8
		Unterprozessierung	9,10
14	Schrumpfen des Präparats hat zu einer konkaven Blockoberfläche geführt	Unterprozessierung	9,10
15	Gewebe im Zentrum des Blocks hat wenig Halt, und die Schnitte zeigen eine "Blaufärbung" und "Kernschmelze".	Zu schwache oder fehlerhafte Infiltration	9
16	Schnitte "schwitzen" bei der Schnittstreckung	Zu schwache oder fehlerhafte Infiltration	9d
17	Schnitte zerfallen schnell bei der Schnittstreckung	Unterprozessierung (noch Lösungsmittel vorhanden)	9

## Problem 1. Sprödes oder brüchiges Gewebe

Das Gewebe wurde wahrscheinlich zu stark infiltriert. Erneute Infiltration wird kaum hilfreich sein. Einweichen der Blockoberfläche in Eiswasser oder Weichmacher und vorsichtiges erneutes Schneiden kann zu einem akzeptablen Ergebnis führen (Lösung 1 und 3 anwenden).

### Beispiel

Die in Abbildung 1 dargestellten gestreckten Leberschnitte waren anfangs sehr brüchig, sodass keine zusammenhängenden Schnitte erzielt werden konnten. Das Gewebe wurde einem 12-stündigen Ethanol/Xylol-Zyklus unterzogen, was für diesen Gewebetyp und die Probenabmessungen zu lang war. Nach kurzer Anwendung eines Weichmachers auf der Blockoberfläche (Wasser mit Reinigungsmittel), Kühlen und erneutem Schneiden wurden bessere Schnitte erzielt. (Lösung 2 und 3)



**Abbildung 1**

Schnitte aus einem spröden Leberblock

## Problem 2. Geschrumpftes Gewebe

Zu schwach infiltrierte Gewebe zieht sich aufgrund von evaporierenden Lösungsmittelrückständen in den Block zurück. Erneute Infiltration kann hilfreich sein. Gut infiltrierte Gewebe schrumpft nach dem Schneiden nicht, da das gesamte Lösungsmittel durch Wachs ersetzt wurde. (Lösung 8 und 9 anwenden)

### Beispiel

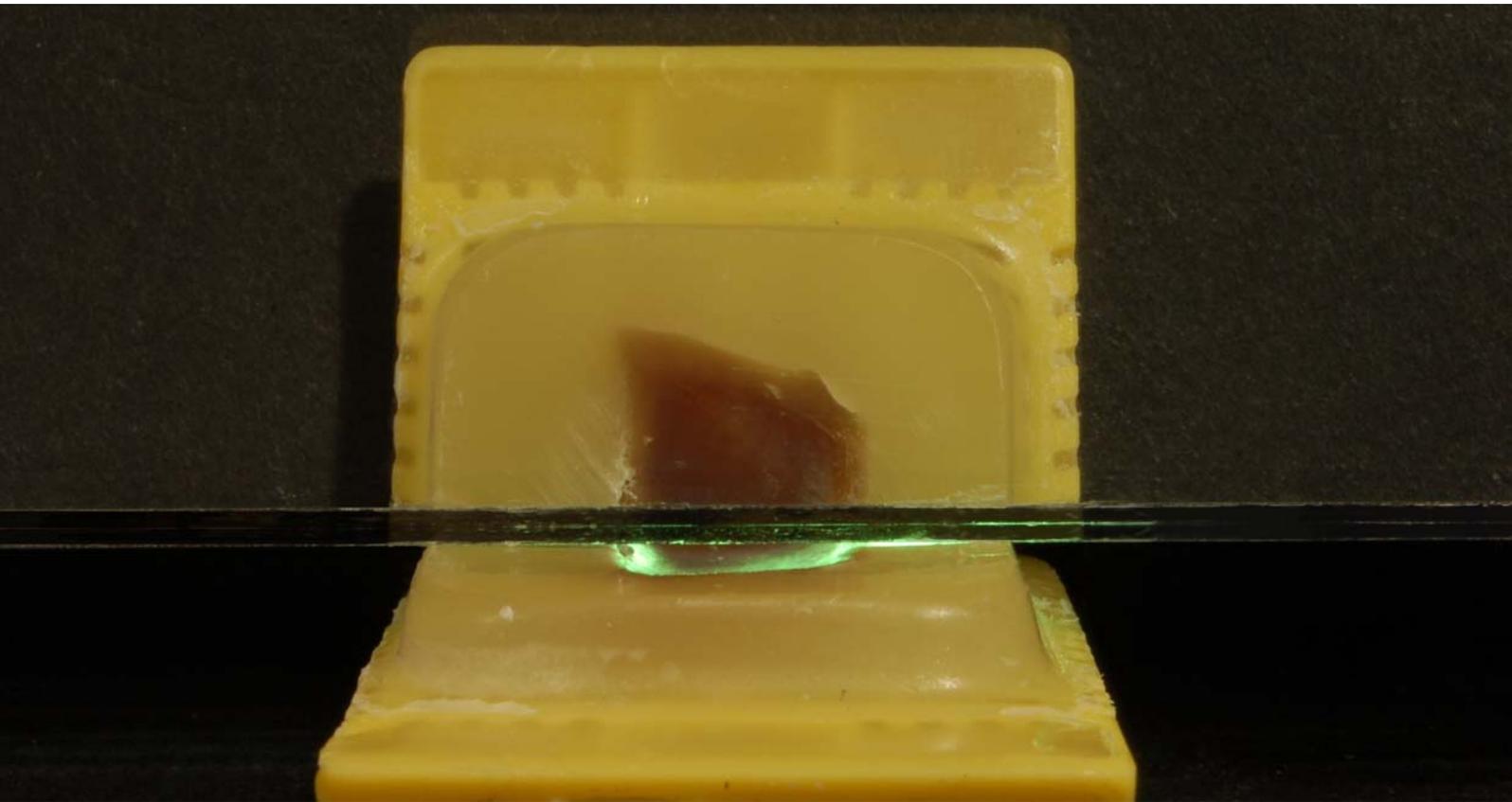
Bei dem in Abbildung 3 dargestellten Block handelt es sich um zu schwach infiltrierte, 24 Stunden zuvor geschnittene Herzmuskel. Die Oberfläche des Blocks hat sich zurückgezogen, da das Gewebe aufgrund von evaporierenden Lösungsmittelrückständen schrumpft. Das Foto wurde mit grünem Hintergrundlicht hinter einem Winkelspiegel aufgenommen, um den Schrumpfungsgrad zu zeigen (Abbildung 4). Der beste Schnitt, der sich unmittelbar nach der Einbettung aus dem Block erzielen ließ, ist in Abbildung 2 zu sehen.

Der Grad des Rückzugs einer Blockoberfläche nach dem Schneiden ist ein guter Indikator für die Infiltrationsqualität. Außerdem noch das freiliegende Gewebe dieses Blocks nach Intermedium. Das Präparat wurde nach einem für diesen Typ und diese Größe zu kurzen Protokoll infiltriert. Bei Anwendung von Lösung 9A kann möglicherweise ein vollständiger Schnitt erzielt werden.



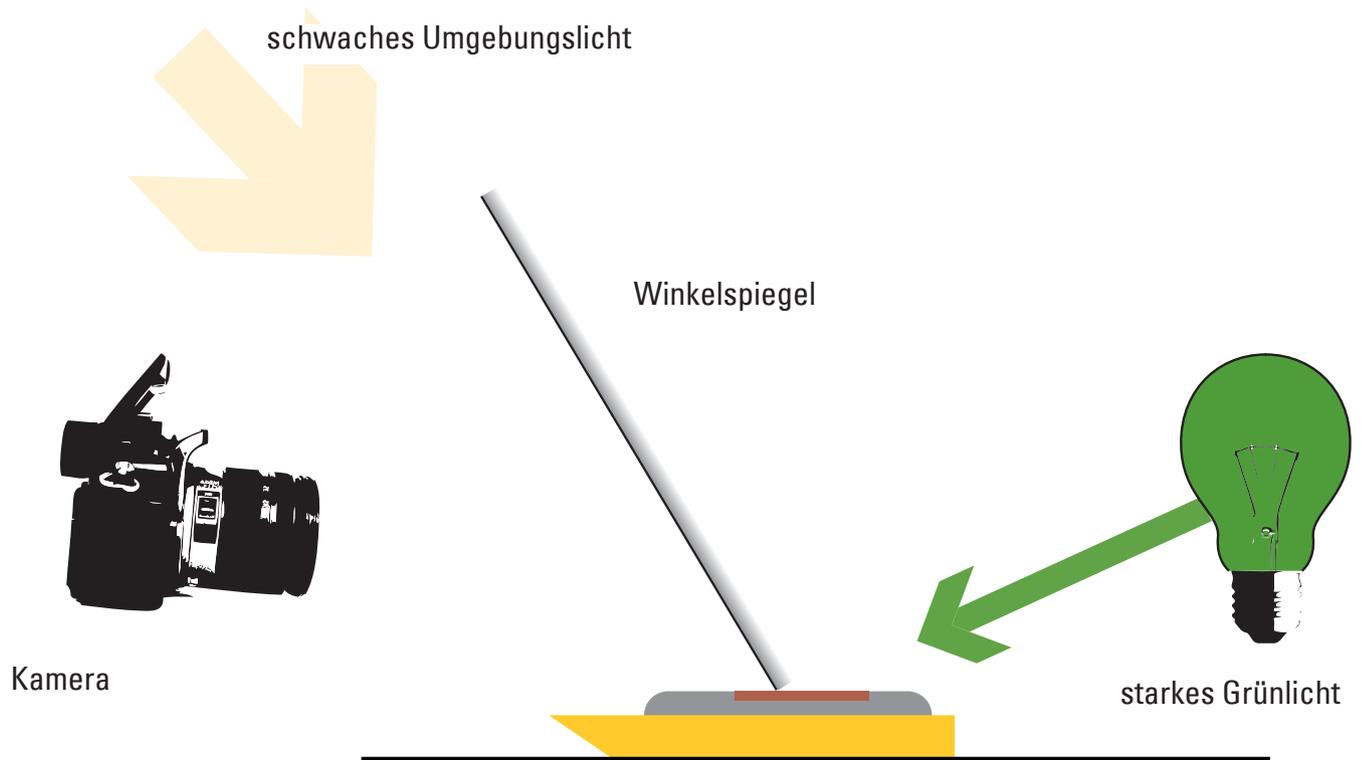
## Abbildung 2

Schlechter Schnitt von dem in Abbildung 2 dargestellten zu schwach infiltrierten Herzmuskelblock



**Abbildung 3**

Block mit extremer Schrumpfung



#### Abbildung 4

Kameraanordnung zur Darstellung der Probenschrumpfung

## Problem 3. "Gekochtes" Gewebe

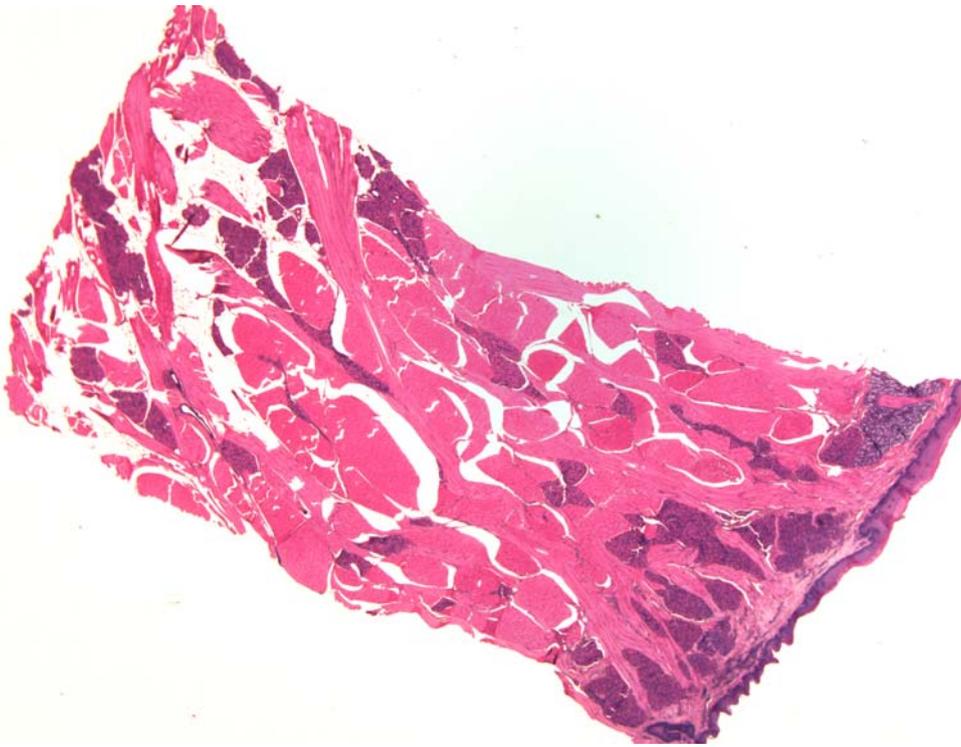
Gewebe, auf das diese Beschreibung zutrifft, wurde meist zu stark infiltriert (oder extremen Bedingungen, zum Beispiel zu großer Hitze, ausgesetzt). Die Schädigung ist möglicherweise irreversibel. Manchmal lassen sich durch Einweichen der Blockoberfläche in Eiswasser oder Weichmacher und vorsichtiges erneutes Schneiden zufriedenstellende Schnitte erzielen. (Lösung 1, 2 und 3 anwenden.) Siehe auch Beispiel zu Problem 1.

Dieser Effekt kann auch nach totalem Austrocknen der Probe vor oder während der Infiltration auftreten. Die Anwendung einer Wiederherstellungslösung und erneute Infiltration kann hilfreich sein. (Lösung 7 anwenden)

### Beispiel

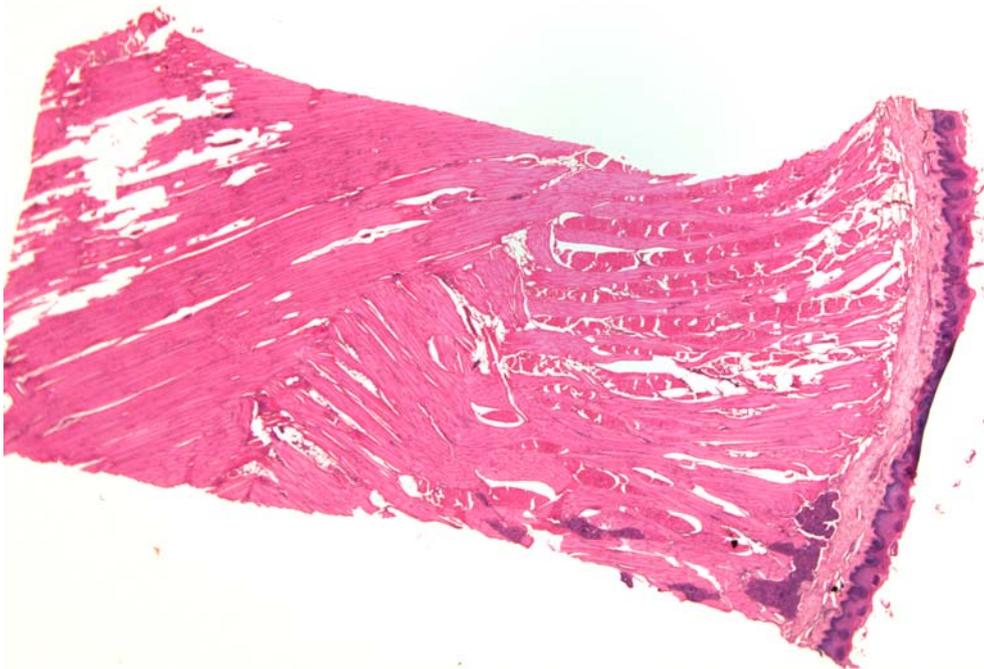
Ein Zungenpräparat war vor der Routineinfiltration eine Woche lang ausgetrocknet. Bei der Einbettung war es geschrumpft und sehr hart und wurde von dem für die Einbettung zuständigen Mitarbeiter als "gekocht" beschrieben. Abbildung 5 zeigt den besten erzielbaren Schnitt nach Anwenden von Lösung 1, 2 und 3.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis nach Anwendung von Lösung 7 (Sandisons Lösung) zur Wiederherstellung der Probe, gefolgt von erneuter Infiltration und erneutem Schneiden. Trotz nur mäßiger Morphologie wurde ein viel zusammenhängenderer Schnitt erzielt.



**Abbildung 5**

Zungenschnitt vor der  
Wiederherstellung und  
erneuten Infiltration



**Abbildung 6**

Zungenschnitt nach der  
Wiederherstellung und  
erneuten Infiltration

## Problem 4. Schmieriges, breiiges oder fettiges Gewebe

Die Ursache dieser Blockeigenschaften ist normalerweise Fett. Bei der Infiltration wurde das Fett aus einigen Probenbereichen nicht entfernt; diese Bereiche wurden deshalb nicht ausreichend mit Wachs infiltriert und bieten nicht genügend Halt für das Schneiden. Dies ist häufig bei großen Brustpräparaten der Fall, die nach einem zu kurzen Protokoll infiltriert wurden. Erneute Infiltration nach einem ausreichend langen Protokoll sollte schneidbare Blöcke liefern. (Lösung 9 oder 10 anwenden)

### Beispiel

Abbildung 7 zeigt ein zu schwach infiltriertes fettreiches Brustpräparat mit einem großen öligen Bereich in der Mitte.

Nur ein fragmentierter Randbereich lässt sich auf den Objektträger aufziehen (Abbildung 8). Das Gewebe wurde weder dehydriert noch geklärt (enthält nicht gelöstes Fett) und muss erneut infiltriert werden. Hier wird die Anwendung von Lösung 9a in einem 8-Stunden-Zyklus empfohlen.



### **Abbildung 7**

Zu schwach infiltriertes  
Brustpräparat



### **Abbildung 8**

Fragmentierter Geweberand  
aus einem zu schwach  
infiltrierten Brustblock

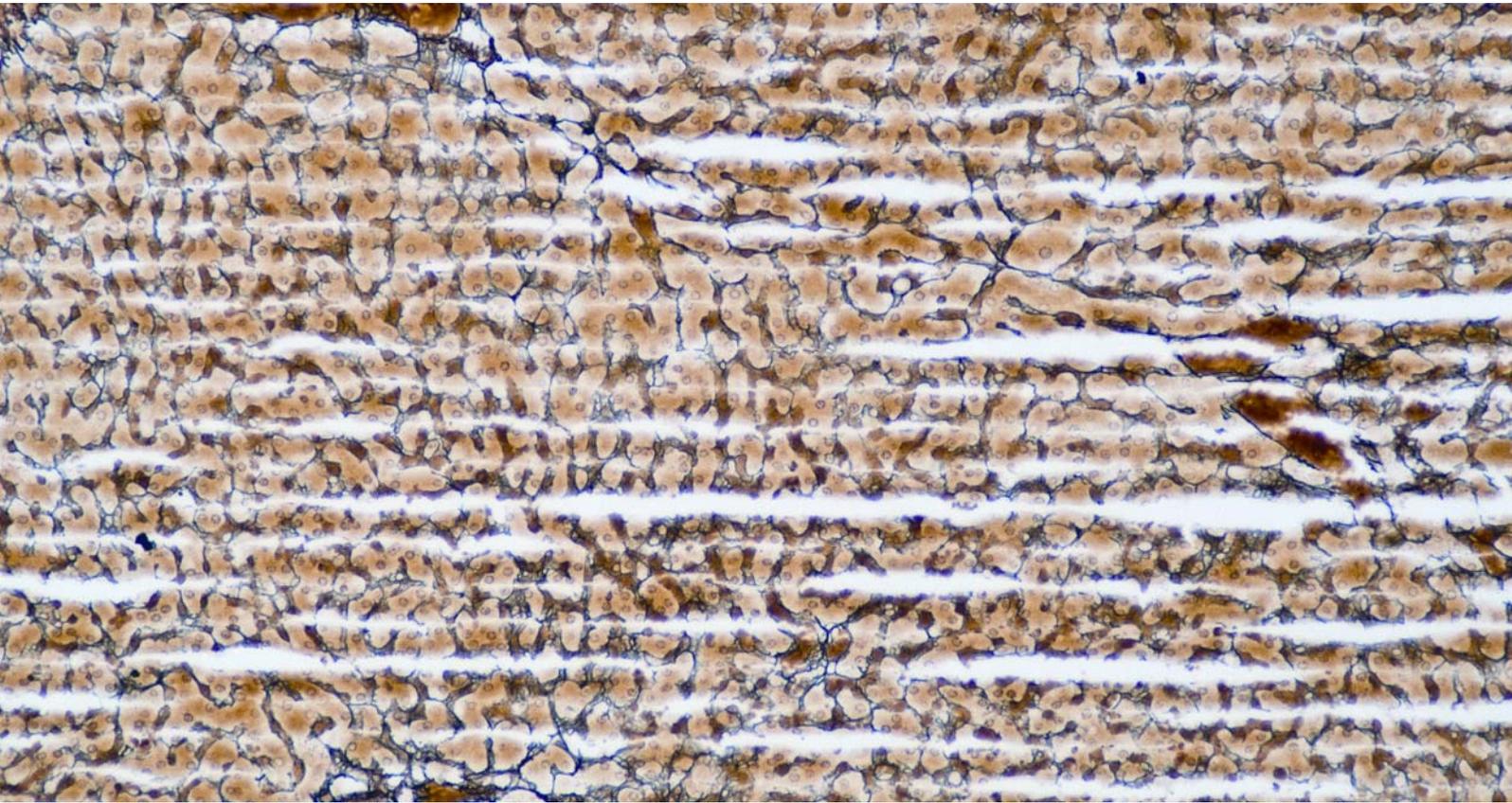
## Problem 5. Trockenes, pulveriges Gewebe

Trockenes und pulveriges Gewebe kann die Folge von zu starker Infiltration sein, insbesondere wenn das Gewebe viel Blut enthält. Es tritt auch häufig auf, wenn Nagergewebe nach besonders langen Protokollen infiltriert wird. Erneute Infiltration ist in diesem Fall nicht hilfreich.

Nützlich ist das Einweichen des Blocks in Eiswasser vor dem Schneiden. Langsames Schneiden des Blocks nach einer kurzen Aufwärmzeit kann brauchbare Ergebnisse liefern. Möglicherweise empfiehlt sich das Erstellen dünnerer Schnitte. (Lösung 2 oder 3 anwenden)

### Beispiel

Abbildung 9 zeigt einen Schnitt aus einem zu stark infiltrierten Nagerleberblock (Retikulin-Färbung). Das Gewebe wurde in einem 12-Stunden-Zyklus infiltriert, und der daraus resultierende Block war extrem brüchig, trocken und pulverig und wies zahlreiche Feinrisse auf. Einweichen der Blockoberfläche in Eiswasser vor dem erneuten Schneiden kann zu besseren Ergebnissen führen (Lösung 3).



### **Abbildung 9**

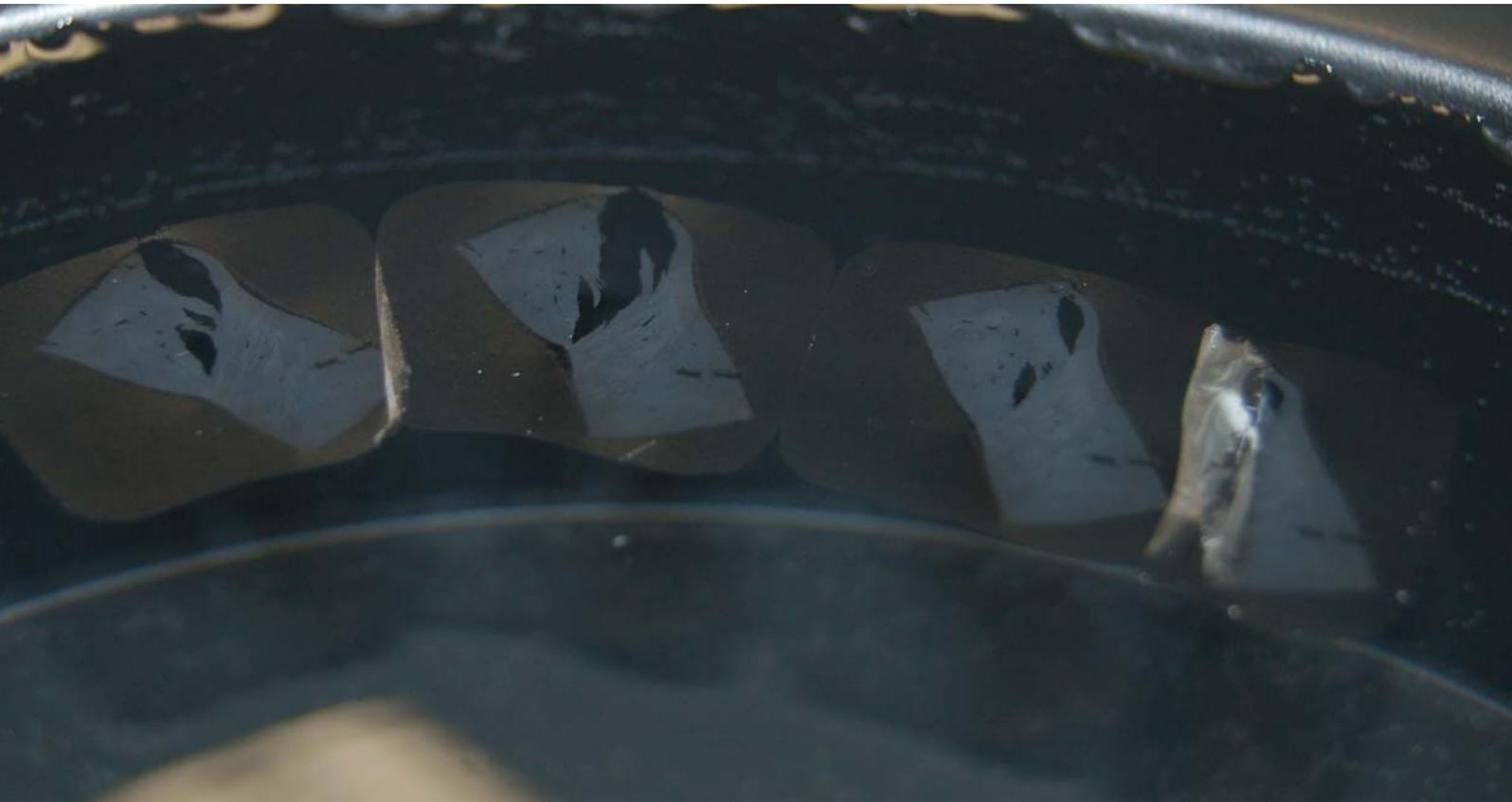
Zu stark infiltrierte Nagerleber  
(Retikulin-Färbung)

## Problem 6. Gewebe riecht nach Intermedium

Nach Intermedium riechende Blöcke wurden zu schwach infiltriert. Das Lösungsmittel wurde nicht durch Wachs ersetzt. Erneute Infiltration mit Wachs kann schneidbare Blöcke ergeben, da Proben dieser Art aber oft Spuren von Wasser enthalten, ist eine komplette Neuverarbeitung möglicherweise die beste Lösung. (Lösung 8 und 9 anwenden)

### Beispiel

Der in Abbildung 10 dargestellte Schnitt aus einem Fasergewebeblock zerfällt, sobald er auf die Wasseroberfläche gelegt wird. Mit dem Mikrotom ließ sich ein Schnitt erstellen, der jedoch stark eingerissen war. Die Blockoberfläche roch nach Xylol, das nicht durch Wachs ersetzt worden war. Mit Lösung 8 ließe sich der Block optimieren und es könnten zusammenhängende Schnitte erzielt werden.



### **Abbildung 10**

Schnitte auf der Wasseroberfläche zerfallen wegen Lösungsmittelrückständen

## Problem 7. Weiches, eindrückbares Gewebe

Wenn Gewebe in einem Block weich und eindrückbar ist, deutet dies darauf hin, dass eine unvollständige Wachsinfiltration stattgefunden hat. Oft ist dies auf nicht gelöste Fette zurückzuführen, die während der Verarbeitung nicht entfernt wurden, aber die Ursache könnte auch einfach eine unzureichende Wachsinfiltration sein. Oft ist dies auf nicht gelöste Fette zurückzuführen, aber die Ursache kann auch einfach eine unzureichende Wachsinfiltration sein. Erneute Infiltration ist die beste Lösung. (Lösung 9 und 10 verwenden)

### Beispiel

Der in Abbildung 11 dargestellte Pankreasblock weist einige der typischen Effekte einer kurzen Fixierung, gefolgt von deutlich zu schwacher Infiltration, auf. Die Mikraufnahmen (Abbildung 12 und 13) zeigen die drastischen Auswirkungen auf die Morphologie von Schnitten aus diesem Block. Es ist erstaunlich, dass ursprünglich überhaupt Schnitte erstellt werden konnten. Die Blockfläche hat sich aufgrund evaporierender Lösungsmittel, die während der Infiltration nicht entfernt wurden, im Laufe mehrerer Tage nach dem Schneiden von der Oberfläche zurückgezogen.

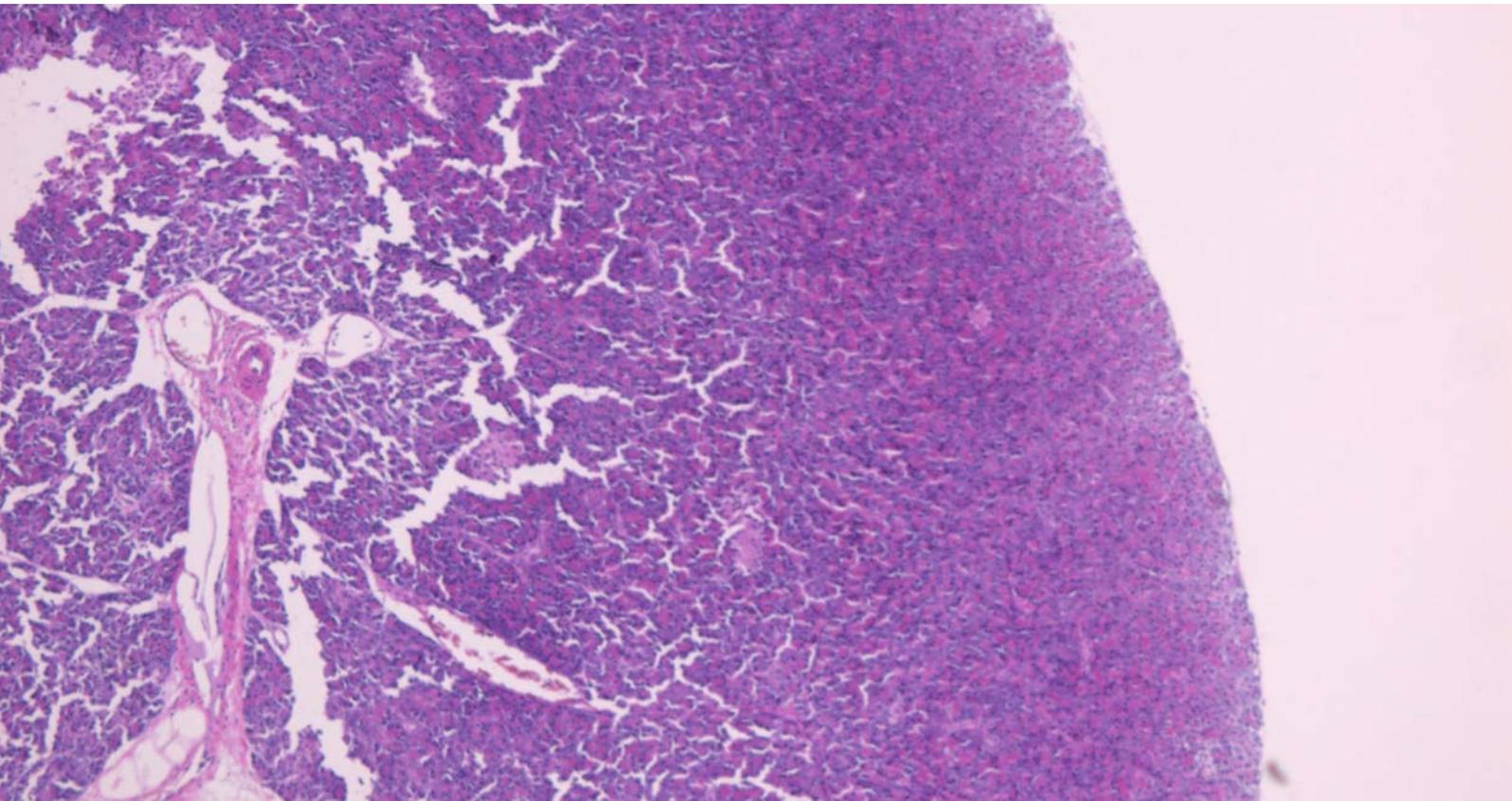
Abbildung 12 zeigt die typischen Grobrisse in der Mitte eines zu schwach infiltrierte Blocks. Der äußere Rand des Gewebes ist besser erhalten.

Abbildung 13 zeigt einen mittleren Bereich, der angeschwollene Zellen mit der typischen "Blaufärbung" enthält. Eine der Ursachen dieses Problems sind Lösungsmittelrückstände. Gewebe wurde nicht ausreichend entwässert und geklärt, und das Intermedium wurde nicht durch Wachs ersetzt.<sup>1</sup> Lösung 10 würde bessere Schnitte ermöglichen, aber die Morphologie wäre wahrscheinlich trotzdem noch etwas beeinträchtigt.



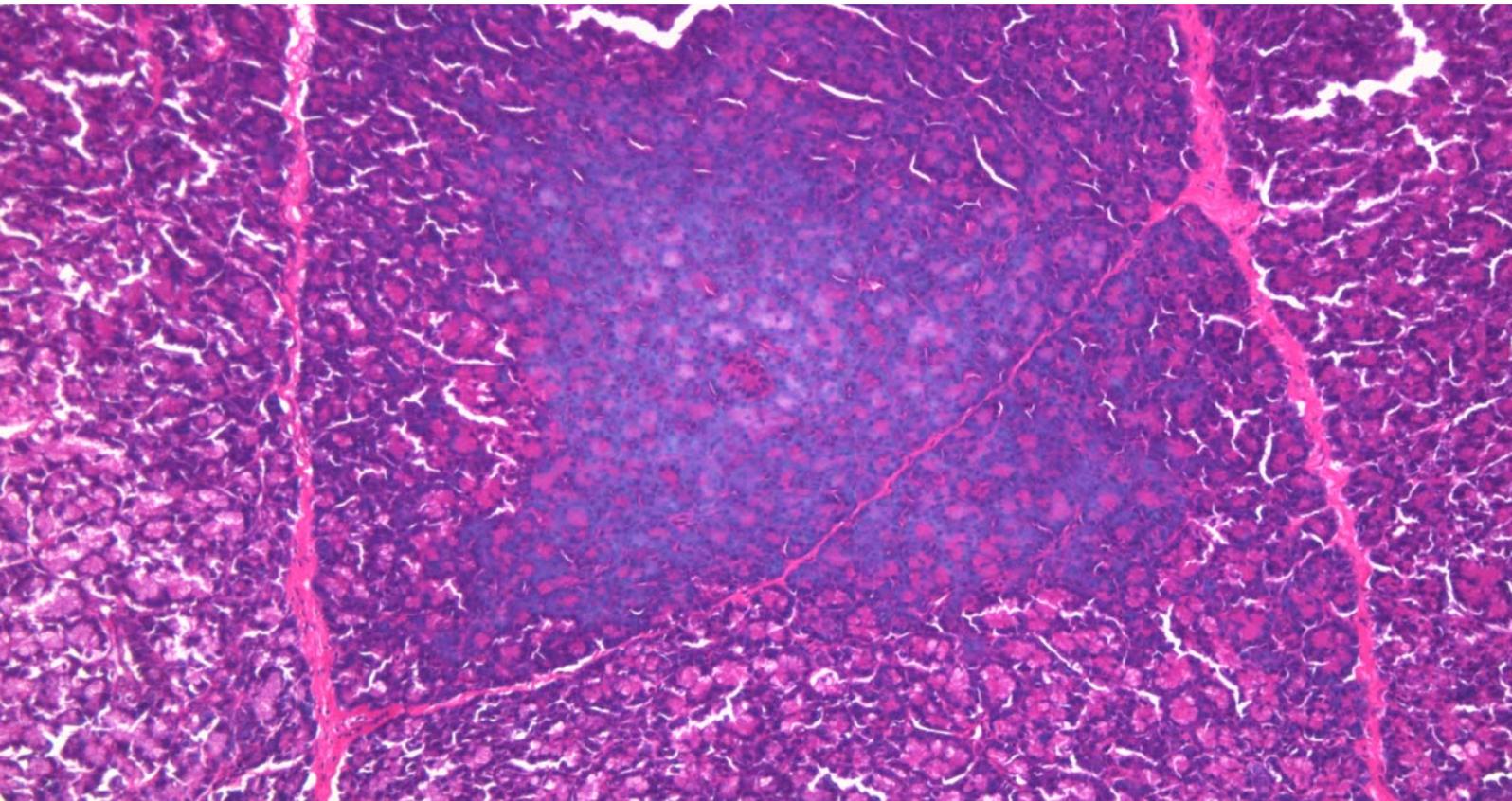
**Abbildung 11**

Schlecht fixierter und zu schwach infiltrierter Pankreasblock



**Abbildung 12**

Schwach vergrößerte Ansicht eines schlecht fixierten und zu schwach infiltrierten Pankreasblocks



**Abbildung 13**

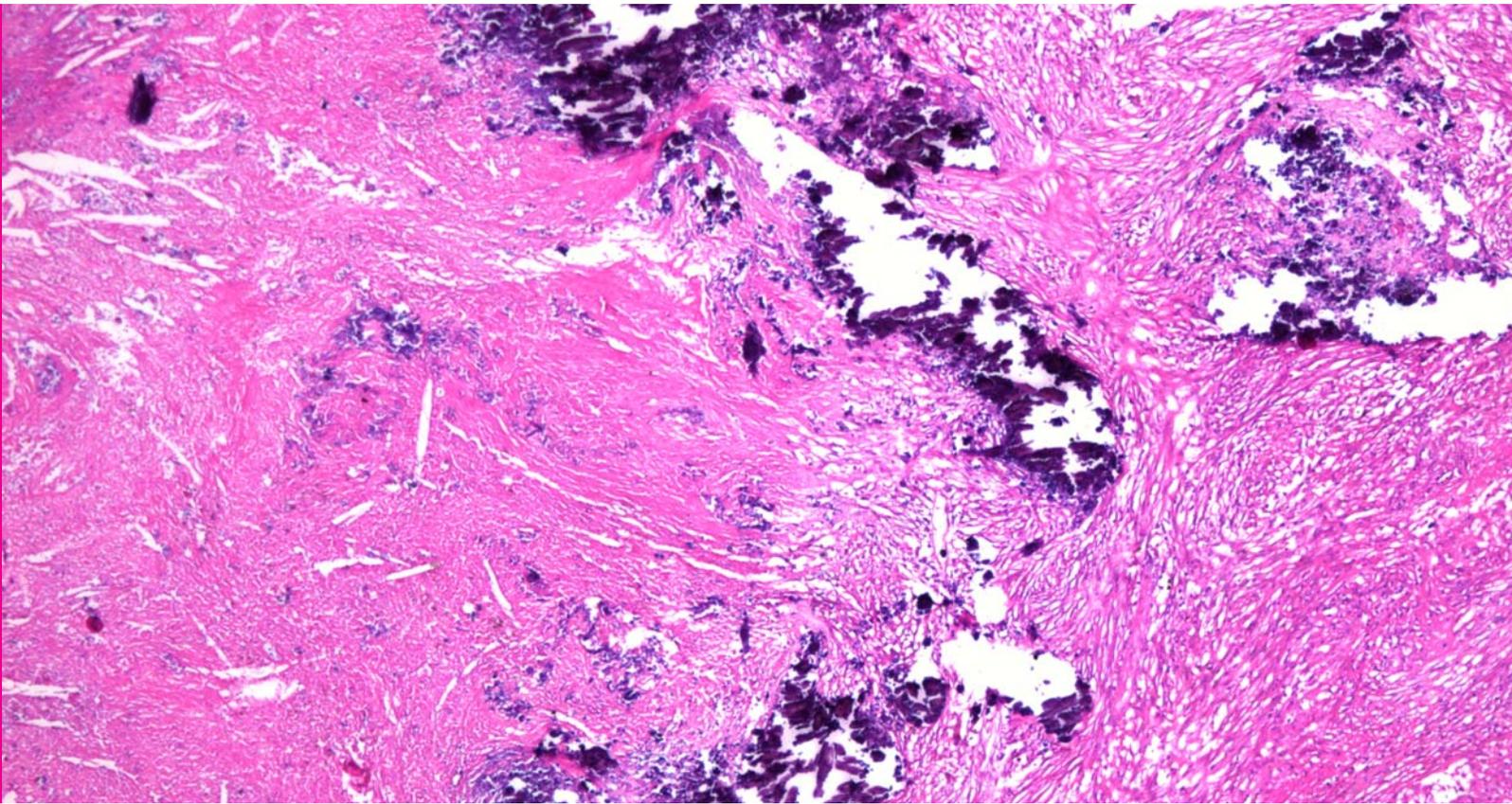
Mittlerer Bereich des schlecht fixierten und zu schwach infiltrierten Pankreasblocks mit "Blaufärbung".

## Problem 8. Gewebe enthält harte Partikel

Versuchen Sie zunächst festzustellen, woraus die Partikel bestehen. Wenn Kalk vorhanden ist, müssten sich nach Oberflächenentkalkung, gefolgt von gründlichem Spülen des Blocks, brauchbare Schnitte erzielen lassen. Es gibt noch viele andere Möglichkeiten, einschließlich atheromatöser Plaques. Letztere können manchmal durch Einweichen der Blockoberfläche vor dem erneuten Schneiden günstig beeinflusst werden. Andere mineralische Ablagerungen, generell in Lungengewebe, können problematisch sein. Lokales physisches Entfernen störender Partikel oder Fremdkörper kann ein letztes Mittel sein (beispielsweise bei chirurgischen Klammern, Glas, Teerpartikeln etc.). Lösung 6, 3 und 5 anwenden.

### Beispiel

Bei dem in Abbildung 14 sichtbaren basophilen Material im Granulom handelt es sich um Kalk. Ein großer Teil davon ist zersplittert und vom Schnitt abgefallen. Die Mikroaufnahme erfolgte von dem am besten erhaltenen Teil des Schnitts. Der Rest war stark zerrissen. Nach Oberflächenentkalkung (Lösung 6) ließen sich möglicherweise einige zusammenhängende Schnitte erzielen. Erneute Infiltration wäre von geringem Nutzen, es sei denn, sie beinhaltet einen Entkalkungsschritt.



**Abbildung 14**

Granulom mit basophilem Kalk (H & E)

## Problem 9. Äußerer Rand des Gewebes zufriedenstellend, aber mittlerer Bereich nicht schneidbar

Deutet auf Unterprozessierung hin. Das Gewebe wurde nicht vollständig entwässert und/oder geklärt und daher nicht vollständig infiltriert (das Wachs konnte wegen vorhandenem Wasser nicht eindringen). Erneute Infiltration müsste hilfreich sein. (Lösung 9 oder 10 anwenden)

Möglich ist auch, dass die Probe vollständig dehydriert und geklärt wurde, aber nicht ausreichend mit Wachs in Berührung kam, um eine vollständige Infiltration zu ermöglichen. Schmelzen Sie den Block und führen Sie eine weitere Infiltration durch. (Lösung 8 anwenden)

### Beispiel

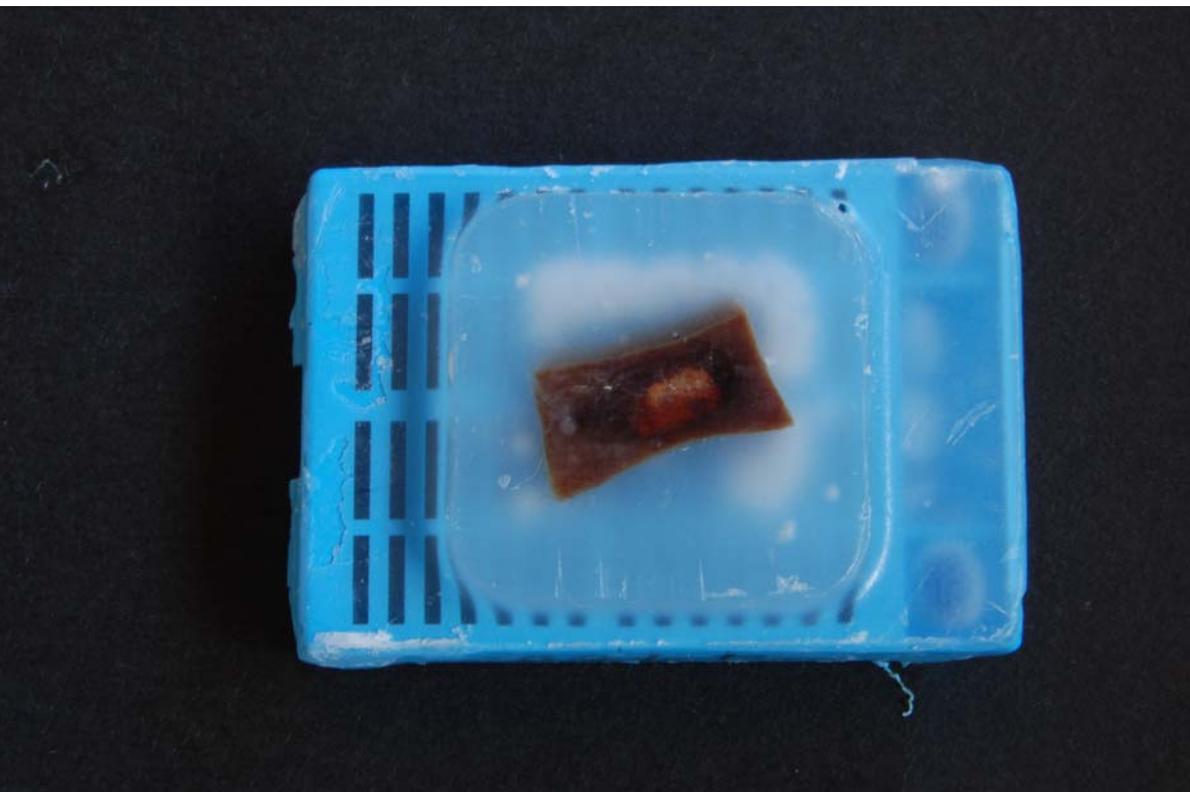
Der in Abbildung 15 dargestellte Block enthält in der Mitte einen nicht schneidbaren Bereich. Das Gewebe ist instabil und fällt beim Durchtritt der Klinge heraus.

Bei näherer Untersuchung ist der mittlere Bereich trocken und pulverig und nicht mit Wachs infiltriert (Abbildung 16). Das Gewebe wurde gründlich fixiert, aber in einem zweistündigen Zyklus nicht vollständig dehydriert oder geklärt. Für vollständige, zusammenhängende Schnitte ist eine erneute Infiltration erforderlich. Zur erneuten Infiltration in einem 6-Stunden-Zyklus sollte Lösung 9d angewendet werden.



**Abbildung 15**

Schlecht infiltrierte Leber, die keinen zusammenhängenden Schnitt ermöglicht



**Abbildung 16**

Leberblock mit instabilem mittlerem Bereich

## Problem 10. Gesamtes Gewebe hat eine mangelhafte Konsistenz

Es ist daran zu denken, dass schlechte Fixierung der Probe dieses Problem verursachen kann. Möglicherweise liegt auch ein Infiltrationsproblem vor, das aber nicht notwendigerweise in einer einfachen "Unterprozessierung" (zu kurzem Zyklus) besteht. Wahrscheinlicher sind minderwertige, verunreinigte (den Schwellenwert überschreitende) oder in der falschen Reihenfolge angewendete Reagenzien. Wurden kürzlich Lösungsmittel ersetzt? Das Problem lässt sich vielleicht durch erneute Infiltration beheben. (Lösung 9 oder 10 anwenden)

### Beispiel

Das in Abbildung 17 dargestellte Hirnrindenpräparat wurde in einem herkömmlichen 12-stündigen Ethanol-/Xylol-Zyklus infiltriert. Obwohl ein solches Protokoll für ein Präparat dieses Typs und dieser Größe geeignet sein sollte, hat der Block eine mangelhafte Konsistenz. Bei der näheren Untersuchung stellte sich heraus, dass das für die abschließende Dehydrierung verwendete Ethanol stark mit Wasser verunreinigt war. Deshalb ist das Präparat schlecht infiltriert. Durch erneute Infiltration (Lösung 9) lässt sich möglicherweise die Schnittqualität erhöhen.



### **Abbildung 17**

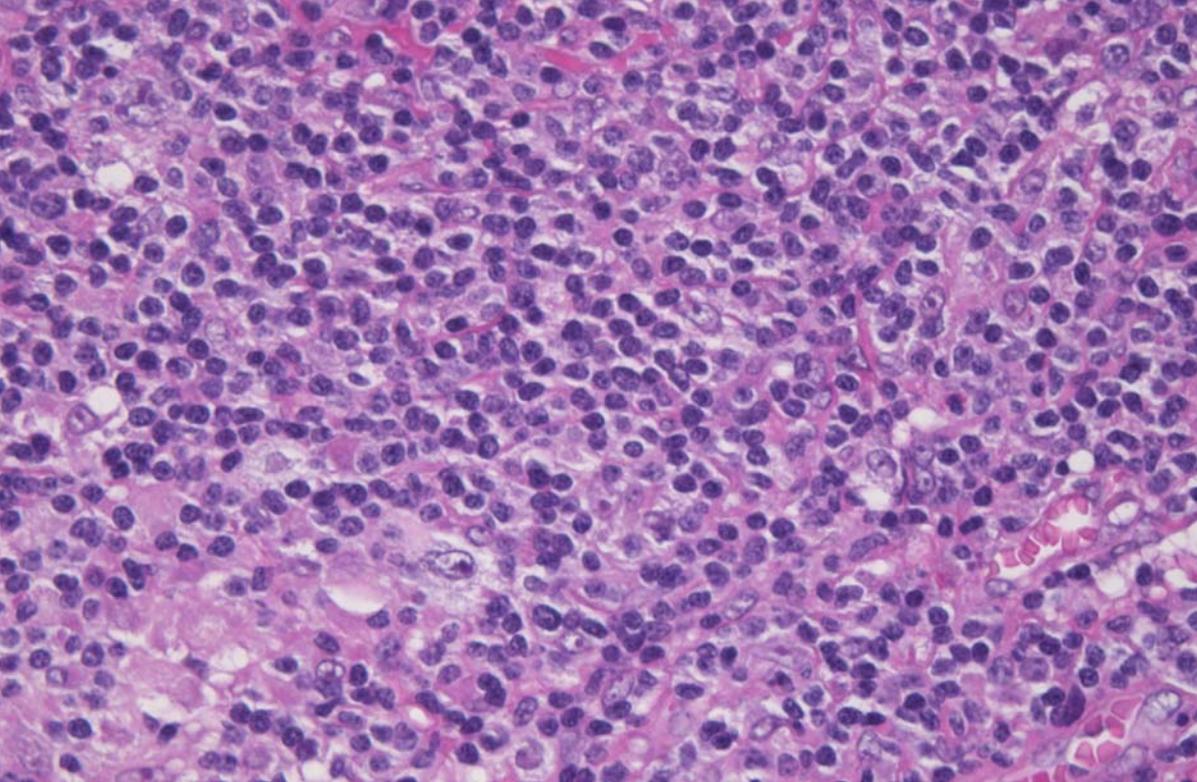
Ein Dehydrierungsfehler in einem  
Hirnblock

## Problem 11. Äußerer Rand des Gewebes ist spröde und nicht schneidbar, während die Mitte zufriedenstellend ist.

Dies kann auf zu starke Infiltration empfindlichen Gewebes, wie beispielsweise blutbildenden oder lymphatischen Gewebes, hindeuten, bei dem die äußere Schicht zuerst betroffen ist. Erneute Infiltration wird kaum hilfreich sein. Einweichen der Blockoberfläche in Eiswasser oder Weichmacher und vorsichtiges erneutes Schneiden kann zu einem akzeptablen Ergebnis führen. (Lösung 1, 2 und 3 anwenden)

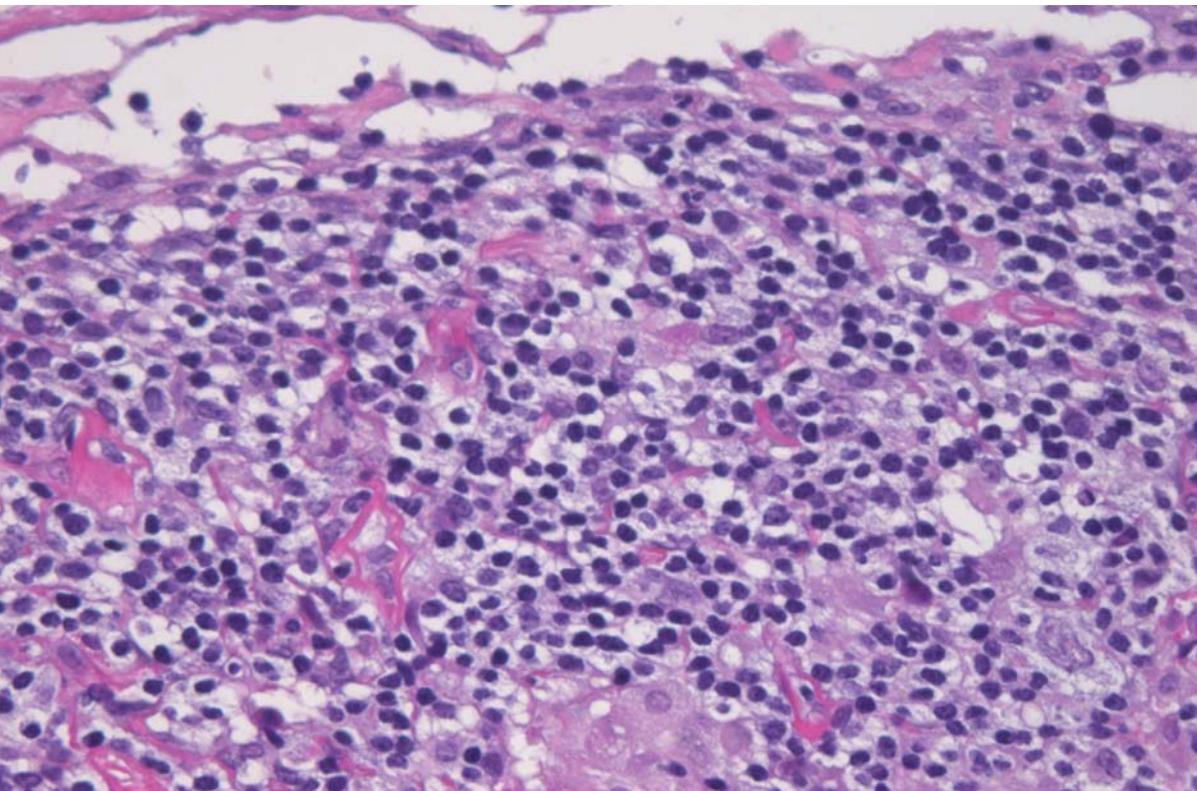
### Beispiel

Die Mikroaufnahmen in Abbildung 18 und 19 zeigen verschiedene Bereiche desselben Milzschnitts. Abbildung 18 zeigt den mittleren, gut schneidbaren Bereich, Abbildung 19 einen spröden Bereich vom Rand der Probe. Der zentrale Bereich ist recht gut erhalten (Zytoplasma und Kerne der Lymphozyten sind gut dargestellt und zeigen kaum Schrumpfung), aber der äußere Teil weist Risse, eine schlechte Darstellung des Zytoplasmas und der Kerne sowie eine deutliche Schrumpfung auf. Dieser Block wurde zu stark infiltriert. Die morphologischen Konsequenzen des zu langen Kontakts mit Infiltrationsreagenzien zeigen sich im äußeren Teil. Der mittlere Bereich hatte weniger Kontakt mit den Infiltrationsreagenzien und ist besser erhalten. Mit Lösung 1, 2 und 3 lässt sich wahrscheinlich die Schnittqualität erhöhen, aber erneute Infiltration ist nicht hilfreich.



**Abbildung 18**

Adäquate Infiltration im  
mittleren Bereich des  
Milzpräparats



**Abbildung 19**

Zu starke Infiltration am Rand  
des Milzpräparats

## **Problem 12. Probe weist einzelne nicht schneidbare Bereiche auf, die bestimmten Gewebetypen, wie beispielsweise Muskelgewebe, dichtem Bindegewebe oder Fett, entsprechen.**

Dies deutet auf zu schwache Infiltration von Geweben hin, die aufgrund besonderer Merkmale (wie beispielsweise extremer Dichte) dafür empfänglich sind. Es könnte lohnenswert sein, zunächst die bei den Lösungen 1 - 5 beschriebenen Aufweich- und Schneidmethoden anzuwenden. Wenn dies nicht zum Erfolg führt, lässt sich das Problem möglicherweise durch erneute Infiltration (Lösung 9) beheben.

### **Beispiel**

Abbildung 20 zeigt einen aus gut fixierter, aber zu schwach infiltrierter Schweineleber bestehenden Block, der aufgrund von Gewebeschrumpfung extrem konkav war. Bei genauer Betrachtung zeigt sich auch, dass das interlobuläre Bindegewebe in der Mitte des Blocks trocken und instabil ist.

Der aus diesem Block erzeugte Schnitt (Abbildung 21) zeigt große Gewebelücken und ist völlig unbefriedigend. Diese Probe wurde nach einem zu kurzen Protokoll infiltriert und ist weder ausreichend dehydriert noch geklärt. Bei Anwendung von Lösung 9A kann möglicherweise ein vollständiger Schnitt erzielt werden, aber die endgültige morphologische Qualität wird nur mittelmäßig sein.



**Abbildung 20**

Schweineleberblock mit instabilem interlobulärem Bindegewebe



**Abbildung 21**

Zu schwach infiltrierte Schweineleber mit unbrauchbarem mittlerem Bereich

## Problem 13. Ablösung der Präparatoberfläche vom umgebenden Wachs. Das Präparat kann beim Trimmen von der Blockoberfläche gezogen werden.

Dies könnte auf ein einfaches Einbettungsproblem hindeuten. Wachs auf der Probenoberfläche konnte aushärten, bevor die Probe in die Einbettform eingesetzt wurde. Dieses Problem lässt sich durch sorgfältiges erneutes Einbetten beheben.

Extreme Unterprozessierung kann ebenfalls diese Wirkung haben: Die Probe schrumpft, wenn Lösungsmittel von der Blockoberfläche evaporiert, sodass sich die Probenoberfläche vom Wachs löst (siehe Beispiel bei Problem 7). Dieses Problem kann durch gründliche Reinfiltration behoben werden.

### Beispiel

Das Präparat in Abbildung 22 hat sich vom umgebenden Wachs gelöst. Dies kann dazu führen, dass das Präparat bei der Mikrotomie (insbesondere beim Aufrauen) von der Blockoberfläche gezogen wird. Dies kann dadurch verursacht worden sein, dass Wachs an der Probenoberfläche aushärten konnte, bevor die Probe in die Einbettform eingesetzt wurde. Dieses Problem lässt sich durch sorgfältiges erneutes Einbetten beheben. In diesem Fall wurde das Problem nicht durch schlechte Infiltration verursacht.



**Abbildung 22**

Tumorpräparat mit Einbettungsfehler

## Problem 14. Schrumpfen des Präparats hat zu einer konkaven Blockoberfläche geführt

Zu schwache Infiltration (oder fehlerhafte Infiltration) hat diesen Effekt, da die Probe aufgrund von der Blockoberfläche evaporierenden Lösungsmittels schrumpft. Dieses Problem kann durch gründliche Reinfiltration behoben werden. Diese Wirkung tritt im Verlauf mehrerer Tage nach dem Einbetten ein und ist manchmal sogar bei geschnittenen und archivierten Blöcken zu beobachten. Siehe Beispiele 2, 7 und 12. (Lösung 9 oder 10 anwenden)

## Problem 15. Gewebe im Zentrum des Blocks ist instabil, und die Schnitte zeigen eine "Blaufärbung" und "Kernschmelze".

Wenn das Problem auf zu schwache Infiltration und demzufolge Lösungsmittelrückstände im Block zurückzuführen ist, kann erneute Infiltration hilfreich sein. Wenn schlechte Kerndarstellung andere Ursachen hat (beispielsweise Wachsverunreinigung mit Formalin), wird sich durch erneute Infiltration nicht die Morphologie verbessern, aber eine höhere Schnittqualität erzielen lassen. (Lösung 9 oder 10 anwenden)

Kernschmelze (Blasenbildung) ist eine der Bezeichnungen für eine Gruppe von Artefakten, die eine schlechte Darstellung der Zellkerne gemeinsam haben. Die Ursachen dieser Artefakte sind seit Jahren umstritten und noch nicht genau bekannt.<sup>2,3</sup> Da es mehrere Faktoren gibt, die zu ihrer Entstehung beitragen können, ist die genaue Ursache im Einzelfall möglicherweise nicht mit Sicherheit zu klären.

"Kernschmelzen" können folgende Merkmale aufweisen:

- Schwach differenzierte Kernmembranen
- Schwach differenziertes Chromatin (kann amorph, glassplitterähnlich oder verschwommen und sehr blass bis relativ dicht erscheinen)
- Blaufärbung oder ein blauer Schleier (von einem kräftigeren Blau als das Lila/Blau korrekt gefärbter Kerne im selben Schnitt)
- Eine fleckige Verteilung, die möglicherweise nur kleine Teile des Schnitts betrifft (beispielsweise kann sie bei einem Darm- oder Hautschnitt in einigen Epithelbereichen vorhanden sein, während darunter liegende Gewebe nicht betroffen sind)
- Auftreten in einer variablen Zahl von Proben einer Charge (1 oder 2 bis viele)
- Auftreten nur bei bestimmten Probentypen Häufig betroffene Gewebearten: Gastrointestinaltrakt (insbesondere Endoskopien), lymphatisches Gewebe und Knochenmark, Milz, Haut und Endometrium. Epitheliale und lymphatische Gewebe scheinen besonders anfällig zu sein.
- Regelmäßiges Auftreten – Labore haben eine Zeit lang damit zu kämpfen, bevor das Phänomen dann auf geheimnisvolle Weise wieder verschwindet, nur um Wochen oder Monate später wieder aufzutreten.

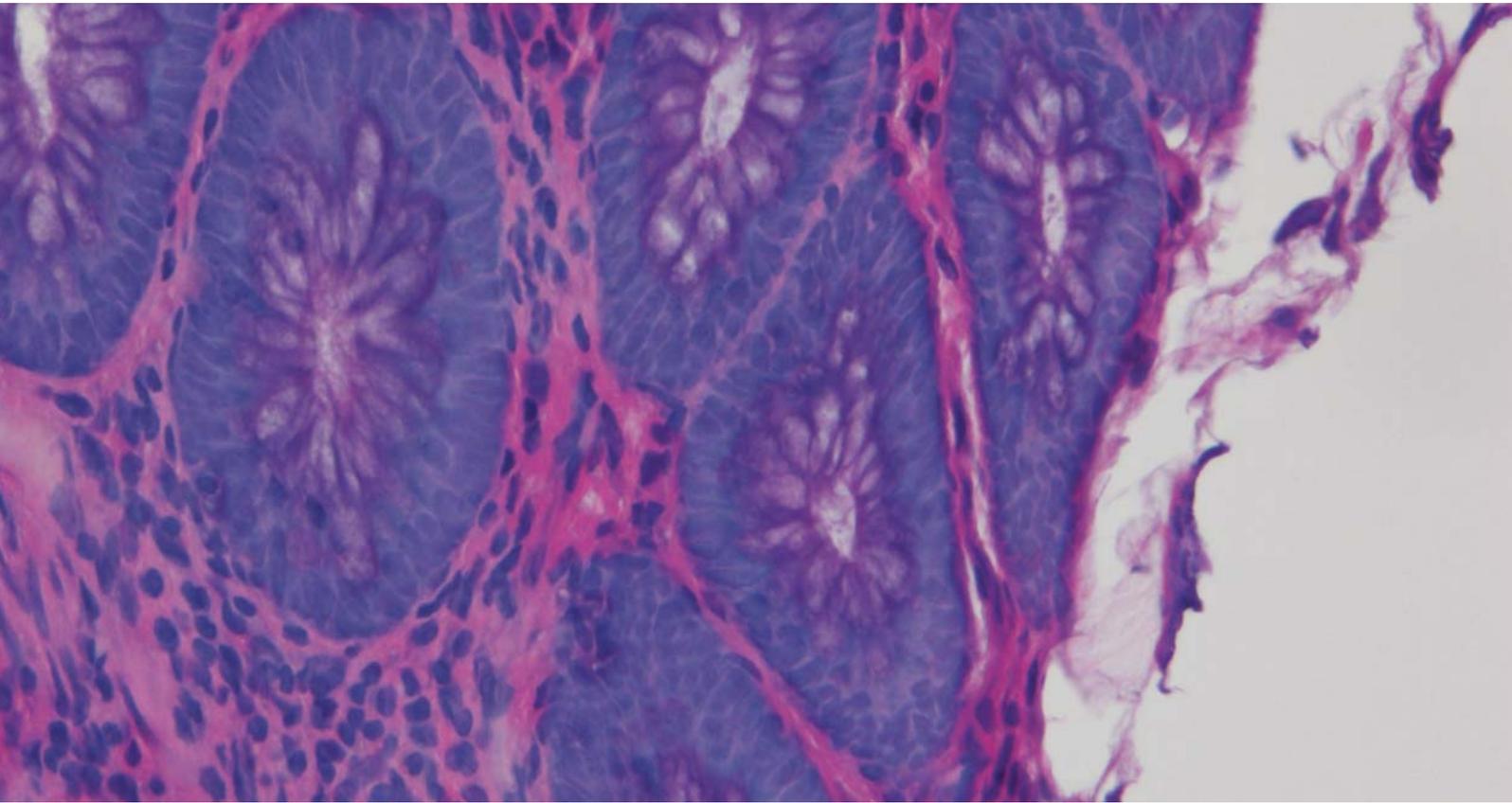
Folgende Ursachen werden dahinter vermutet:

- Austrocknen der Probe vor der Fixierung<sup>4</sup> (z. B., wenn frisches, nicht fixiertes Gewebe auf eine trockene, saugfähige Unterlage gelegt wird). Dies kann sicherlich bei sehr kleinen endoskopischen Präparaten der Fall sein.
- Verwendung von mit Wasser verunreinigtem Xylol beim Klärungsschritt während der Infiltration. Für diesen Fall wurde empfohlen, die Probe erneut zu infiltrieren<sup>5</sup>.

- Verwendung von mit Formalin oder Formalin und Ethanol kontaminiertem Wachs während der Infiltration<sup>5</sup>. Dieses Problem kann durch eine Fehlfunktion des Infiltrationsautomaten (insbesondere eines Automaten vom Flüssigkeitstransfer-Typ) verursacht sein und scheint zu einer dauerhaften Gewebeschädigung zu führen.
- Unvollständige Ersetzung des Lösungsmittels durch Wachs während der Infiltration (Lösungsmittelrückstände). Dies kann durch ein zu kurzes Protokoll, Verwendung abgelaufener oder verunreinigter Reagenzien oder eine Fehlfunktion des Gewebeeinfiltrationsautomaten verursacht sein. In diesem Fall kann das Problem durch erneute Infiltration der Probe behoben werden.
- Überhitzen des Schnitts beim Trocknen vor dem Färben (fehlerhafter Objektträgertrockner, der Hot Spots produziert).
- Unvollständige Kernfärbung wegen unzureichendem Entwachsen der Schnitte vor dem Färben. Die Kerne werden nicht ordnungsgemäß mit Hämatoxylin gefärbt und nehmen möglicherweise Eosin auf, was zur sogenannten "rosa Krankheit" führt<sup>6,7</sup>. Diese Problemursache kann durch verlängertes Entwachsen und frisches Lösungsmittel beseitigt werden.

## Beispiel

Abbildung 23 zeigt die typischen Merkmale der Kernschmelze, wobei das Chromatin sehr schwach differenziert ist und ein blauer Schleier erkennbar ist. Ein Teil der Mukosa ist davon betroffen, während einige angrenzende Bereiche normal erhalten sind. Die Probe bestand aus gut fixiertem Autopsiematerial, das nach einem vierstündigen Protokoll infiltriert wurde. In diesem Fall gehen wir davon aus, dass das Problem durch Lösungsmittelrückstände im Gewebe (deutliche Unterprozessierung) verursacht wurde. Mit Lösung 9E ließe sich ein zusammenhängenderer Schnitt und eine bessere Färbung erzielen.



**Abbildung 23**

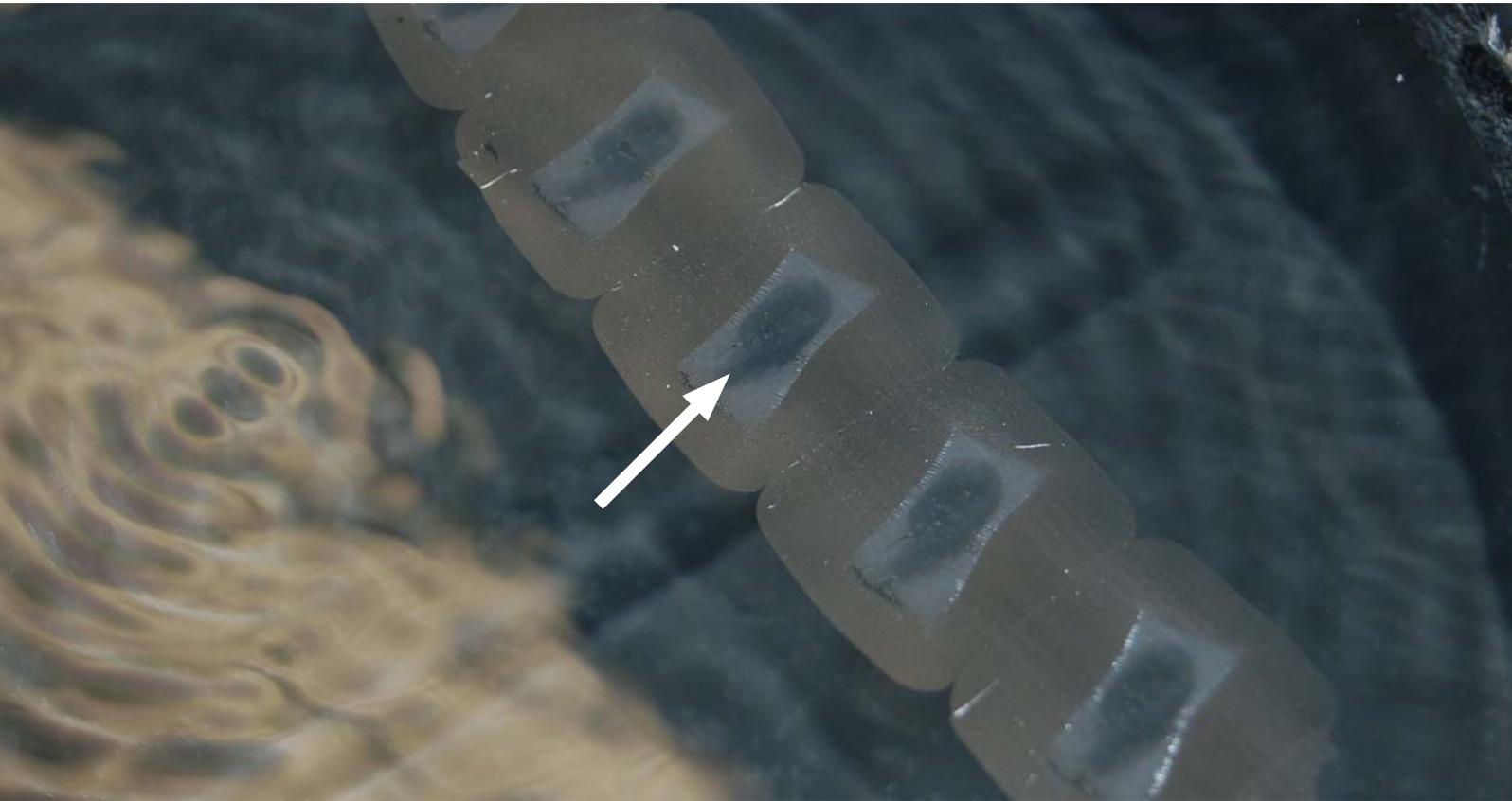
Mukosagewebe mit der typischen "Blaufärbung"

## Problem 16. Schnitte "schwitzen" bei der Schnittstreckung

Mit "Schwitzen" wird ein durchscheinendes Aussehen beschrieben, das manchmal während der Schnittstreckung bei Schnitten zu beobachten ist. Manchmal ist dies auf winzige ölige Intermediatropfen an der Schnittoberfläche zurückzuführen. Man findet es häufig bei unvollständig entwässerten und geklärten Hirn- und Rückenmarksblöcken. Schnitte mit diesem Aussehen neigen auch nach kurzer Schnittstreckung zum Zerfallen. Wenn keine Schnitte möglich sind, kann erneute Infiltration hilfreich sein. (Lösung 9d anwenden)

### Beispiel

Abbildung 24 zeigt Schnitte von einem Hirnblock, bei denen "Schwitzen" auftritt – ein Zeichen dafür, dass das Gewebe während des sechsständigen Zyklus nicht vollständig dehydriert und geklärt wurde. In diesem Bereich zeigte der Schnitt mikroskopisch feine Risse und Brüche. Hirngewebe ist empfindlich und schwer zu bearbeiten. Lösung 9d kann zu besseren Schnitten führen, aber in diesem Fall ist die Verbesserung möglicherweise unbedeutend.



**Abbildung 24**

"Schwitzende" Hirnschnitte

## Problem 17. Schnitte zerfallen schnell bei der Schnittstreckung

Dies ist ein häufiges, meist durch unzureichende Infiltration verursachtes Problem, bei dem Lösungsmittelrückstände die Oberflächenspannung zu verringern scheinen, die normalerweise das Gewebe zusammenhält. Als Folge davon kann der Schnitt bei der Schnittstreckung rasch zerfallen. Durch kurze Schnittstreckung in kaltem oder lauwarmem (statt heißem) Wasser können möglicherweise Schnitte gerettet werden. Wenn sich keine brauchbaren Schnitte erzielen lassen, kann erneute Infiltration hilfreich sein. (Lösung 9 anwenden.) Siehe auch Beispiel zu Problem 6.

# Teil 3

## Detaillierte Lösungen

Detaillierte Lösungen für Schnittprobleme



## Detaillierte Lösungen für Schnittprobleme:

### Wie gehe ich jetzt vor?

Vor einer endgültigen Entscheidung sollten folgende Schritte durchgeführt worden sein:

- Sorgfältige Inspektion des Gewebeeinfiltrationsautomaten (physisch und auf Anzeige von Fehlermeldungen).
- Rücksprache mit Mitarbeitern, die mit der Wartung oder Einrichtung und Bestückung des Geräts in diesem Fall befasst waren.
- Gründliche Untersuchung der Proben und Ermittlung der wahrscheinlichsten Ursache.
- Entscheidung darüber, ob das Erstellen einiger (wenn auch minderwertiger) Schnitte vor einer erneuten Infiltration sinnvoll sein könnte.

Erfahrene Histologen wenden eine Reihe von Techniken zum Erzielen von Schnitten aus suboptimalen Blöcken an. Die gebräuchlicheren Methoden werden nachfolgend bei den Lösungen 1–6 beschrieben.

Es gibt keine einzelne Methode, die sich zur Rettung aller Arten von schlecht infiltrierte Gewebe eignet. Die Fachliteratur enthält einige Empfehlungen, die durch einzelne Erfahrungsberichte bestätigt werden<sup>8-19</sup>. Wir haben die bei den Lösungen 7–10 beschriebenen Vorgehensweisen geprüft, können aber keine spezifischen Empfehlungen, sondern nur allgemeine Ratschläge geben, da Infiltrationsprobleme so vielfältige Ursachen haben können und eine erfolgreiche Fehlerbehebung normalerweise die korrekte Ermittlung dieser Ursachen voraussetzt. Die im Anhang enthaltenen Entscheidungsbäume für Reinfiltration stellen eine weitere Entscheidungshilfe dar.

## Lösungen ohne erneute Infiltration

### Lösung 1: Gute Grundtechnik

Achten Sie bei dem Versuch, Schnitte aus einem schwierigen Block zu erzeugen, auf eine gute Grundtechnik. Das bedeutet:

- Verwenden Sie eine scharfe, einwandfreie, für den betreffenden Probentyp geeignete Klinge.
- Stellen Sie einen optimalen Freiwinkel für die Klinge ein (manchmal verhindert eine kleine Justage das Abheben der Schnitte beim Aufwärtshub).
- Wählen Sie eine geeignete Schnittdicke (manchmal ist eine kleine Verringerung oder Erhöhung der Schnittdicke vorteilhaft). Das gilt besonders bei brüchigen Blöcken.
- Stellen Sie sicher, dass Ihr Mikrotom gut gewartet und frei von Verschleißspuren ist und dass alle Klammern einwandfrei funktionieren (das ist besonders dann wichtig, wenn große Blockflächen oder harte Gewebe zu schneiden sind).
- Achten Sie darauf, dass die Probe optimal eingebettet und korrekt zur Klingenkante ausgerichtet wurde. Beispielsweise sollte die Klinge bei Proben wie Gebärmutterhalsgewebe, das sehr dicht und faserig ist, beim Übergang von Wachs zu Gewebe eher an einer Spitze als an einer langen geraden Kante ansetzen. In einem solchen Block ist das Wachs deutlich weicher als das infiltrierte Gebärmutterhalsgewebe, was Dickenschwankungen innerhalb des Schnitts aufgrund von Klängen- oder Klammerbewegungen verursachen kann. Das lässt sich durch eine korrekte Ausrichtung vermeiden.
- Stellen Sie sicher, dass der Block kalt ist.

### Lösung 2: Kühlen von Blöcken

Bei Routine-Paraffinschnitten ist es übliche Praxis, den Block nach dem Freilegen der Gewebeoberfläche zu kühlen. Zweck des Kühlens ist die Aushärtung des Wachses, um einen der Härte des infiltrierte Gewebes entsprechenden Härtegrad zu erzielen. Es gibt verschiedene Methoden der Blockkühlung vor dem Schneiden, wobei insbesondere bei schwierigen Blöcken einige wirksamer als andere sind.

- Ein Gefrierschrank mit einer Temperatur von  $-15\text{ °C}$  kann verwendet werden, aber die dabei auftretende "trockene" Kälte verursacht manchmal Risse am Übergang zwischen Gewebe und Wachs. Dies kann das Erzielen zusammenhängender Schnitte insbesondere bei problematischen Blöcken erschweren.
- Eine Kühlplatte mit feuchter Oberfläche ist besonders wirksam ( $0 - 4\text{ °C}$ )
- Eine wirksame Kühlmethode für schwierige Blöcke besteht darin, die Blöcke mit einem abschmelzenden Eisblock in Kontakt zu bringen. Diese Methode hat den Vorteil, dass zumindest eine dünne Schicht des freiliegenden Gewebes teilweise rehydriert wird, sodass möglicherweise einige Schnitte aus einem Problemblock erzielt werden können (siehe unten).
- Es ist auch möglich, ein Kältespray direkt auf der Blockoberfläche anzuwenden. Gehen Sie dabei vorsichtig zu Werke, da lokales Gefrieren Risse verursachen kann. Außerdem sind nicht alle Produkte umweltfreundlich.

## Lösung 3: Ein- oder Aufweichen

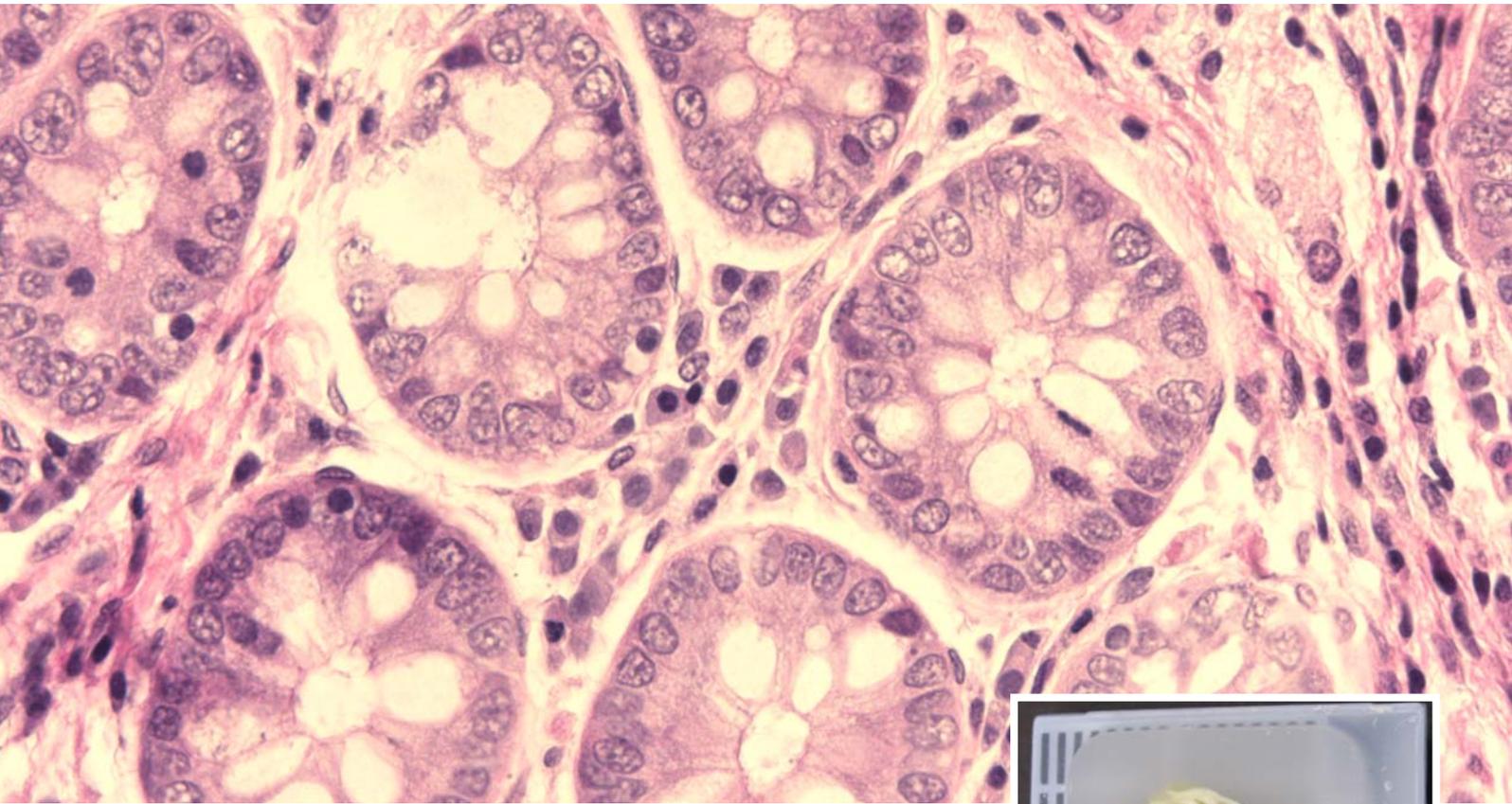
Wenn Gewebe an der Oberfläche eines Paraffinblocks durch Grobtrimmen freigelegt wird, hat es die Fähigkeit, Wasser und andere wässrigen und alkoholischen Reagenzien aufzunehmen. Sie dringen eine kurze Strecke in das Gewebe ein und lassen es weich werden und anschwellen. Bei schlecht (sowohl zu schwach als auch zu stark) infiltriertem Gewebe kann durch diese Methode das Erzeugen einiger Schnitte ermöglicht werden. Tabelle 5 im Anhang enthält detaillierte Angaben zu verschiedenen Reagenzien, die dafür eingesetzt werden können.

Bei schwierigen Blöcken ist zum Freilegen des Gewebes sehr vorsichtiges Trimmen erforderlich, bei dem eine zu starke Schädigung der Probenoberfläche vermieden wird. Anschließend legt man die Probe mit der freigelegten Fläche nach unten in ein Gefäß mit Weichmacher und lässt diesen während eines ausreichenden Zeitraums einwirken. Vor weiteren Schneidversuchen muss möglicherweise die Blockoberfläche abgespült und der Block erneut gekühlt werden. Da nur eine sehr dünne Gewebeschicht vom Reagenz durchdrungen wird, ist es sehr wichtig, dass die Ausrichtung der Blockfläche im Mikrotom erhalten bleibt, damit beim Erzeugen eines Ganzflächenschnitts kein Gewebe verschwendet wird. Generell werden nach Anwendung dieses Verfahrens die hochwertigsten Schnitte durch sehr langsames Schneiden erzielt. Folgende Optionen sind verfügbar:

- Einweichen der Blockoberfläche in Eiswasser
- Einweichen der Blockoberfläche in kaltem Wasser mit Reinigungsmittel<sup>6</sup> oder Weichspüler<sup>11,20</sup>
- Einweichen des Blocks in einem Weichmacher wie einer Alkohol-Glycerin-Mischung<sup>11</sup> oder Mollifex<sup>TM11,21</sup>
- Behandeln Sie bei stark keratinhaltigen Haut- oder Nagelproben die Blockoberfläche mit Nair<sup>TM</sup> oder Veet<sup>TM</sup> (Enthaarungsprodukten), Kaliumhydroxidlösung oder Phenollösung (diese toxischen Chemikalien müssen vorsichtig eingesetzt werden). Diese Reagenzien können auch zum Aufweichen gründlich fixierten Gewebes vor der Infiltration verwendet werden<sup>22</sup>.

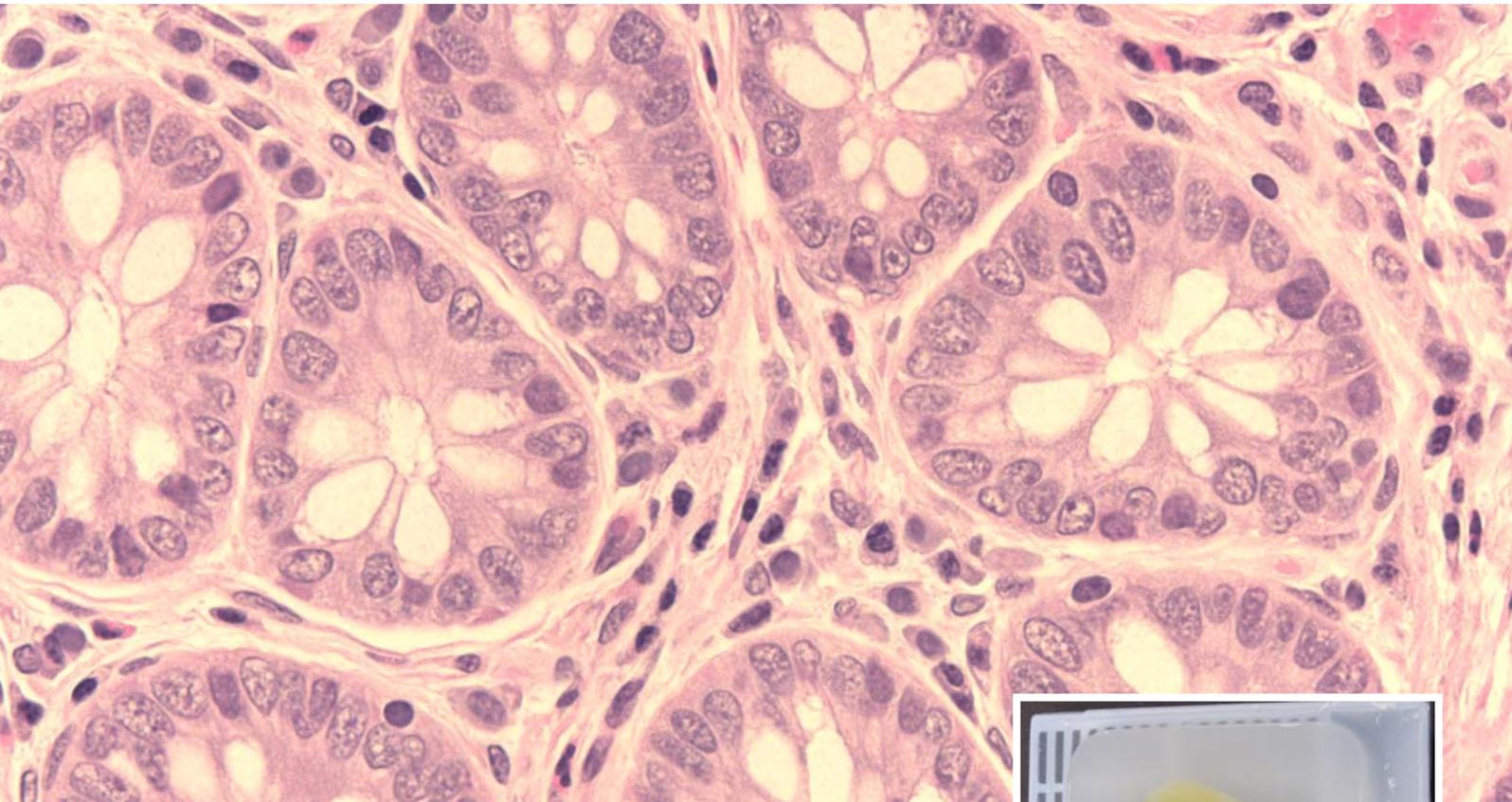
### Achtung:

Langes Einweichen von Blöcken kann die Morphologie und Färbereigenschaften von Geweben beeinträchtigen und sollte daher zurückhaltend eingesetzt werden. Abbildung 25A zeigt die Wirkung längeren Einweichens in Wasser. Das Gewebe im Block ist weiß und undurchsichtig geworden, und im Vergleich zu dem in Abbildung 25B dargestellten unbehandelten Block ist eine Kernschädigung und Zellschrumpfung zu erkennen.



**Abbildung 25A**

30 Minuten in Wasser eingelegte Blockoberfläche



**Abbildung 25B**

Kurz gekühlte und ohne Einweichen geschnittene Blockoberfläche

## **Lösung 4:** Nicht standardgemäße Schnittstreckung

Nicht standardgemäße Schnittstreckungstechniken können nützlich sein, wenn die besten aus einem Problemblock erzielbaren Schnitte stark zerknittert sind. Wenn die Schnitte zunächst auf kaltem oder lauwarmem Wasser oder 20 % Ethanol und anschließend auf einem Objektträger in das heiße Wasserbad übertragen werden, lassen sich möglicherweise glatte Schnitte erzielen. Durch 20 % Ethanol werden Falten geglättet, weil es eine geringere Oberflächenspannung als Wasser hat.

Zu schwach infiltrierte Blöcke, die Lösungsmittelrückstände enthalten, neigen bei normaler Schnittstreckungstemperatur zur "Explosion" (schnellem Zerfall) auf der Wasseroberfläche. Dieser Effekt lässt sich durch Verwendung von kaltem oder lauwarmem Wasser für die Schnittstreckung vermeiden.

## **Lösung 5:** Klebeband-Transfer

Das Leica Paraffin Tape-Transfer System™ wird für schwer zu schneidende Gewebe und Gewebe-Mikroarrays empfohlen und stellt eine Option für Problemblocke dar. Ein Klebebandfenster wird auf der Schnittfläche eines Blocks angebracht und flach gerollt. Ein vorsichtig erstellter Schnitt lässt sich am Klebeband vom Block ablösen. Der Schnitt wird auf einen Objektträger mit Haftbeschichtung aufgezogen, flach gerollt und zur Polymerisation des Klebstoffs mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wird der Objektträger zum Entfernen des Klebebands in Lösungsmittel eingelegt und normal gefärbt<sup>23</sup>.

## Lösung 6: Oberflächenentkalkung

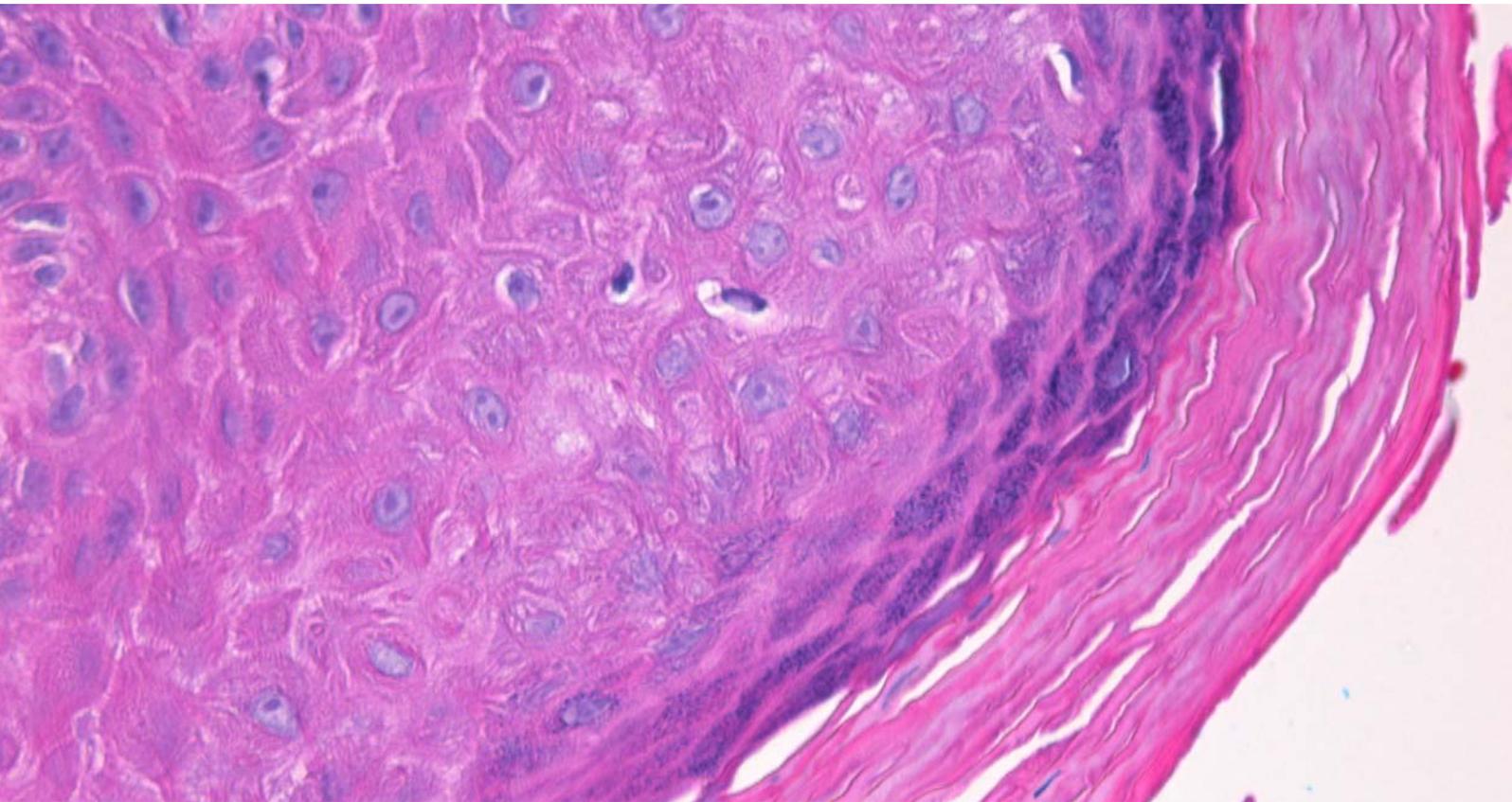
Manchmal enthalten Blöcke unerwartete Fragmente aus hartem Material. Wenn es sich dabei um Kalk handelt, kann er durch Oberflächenentkalkung von der Blockoberfläche entfernt werden. Fremdkörper wie Nahtmaterial, Klammern und synthetische Implantate werden durch diese Technik nicht entfernt und können manchmal nur manuell von der Blockoberfläche abgenommen werden.

**Grundprinzip:** Entkalkungsmittel dringen eine kurze Strecke in das freiliegende Gewebe im Paraffinblock ein und lösen den Kalk auf. Dadurch sollte es möglich werden, mehrere zusammenhängende Schnitte zu erzielen.

- Weichen Sie die freiliegende Blockoberfläche in einem Entkalkungsmittel ein. Nach anschließendem Spülen in Wasser und Kühlen können Sie erneut Schnitte erzeugen<sup>11</sup>. Gründliches Spülen ist erforderlich, um eine Beschädigung des Mikrotomklingenhalters durch den säurehaltigen Entkalker zu vermeiden.
- Die erforderliche Einwirkdauer ist vom verwendeten Entkalker abhängig. Starke Entkalker (die beispielsweise Salzsäure enthalten) sollten 5 bis 15 Minuten einwirken.
- Starke Entkalker können sich nachteilig auf die Kernfärbung auswirken und sollten daher zurückhaltend eingesetzt werden.

## **Achtung:**

Es ist nicht ratsam, säurehaltige Entkalker auf Blöcke anzuwenden, die keinen Kalk enthalten, da sich die Säure nachteilig auf den nachfolgenden Färbeschritt auswirken kann. Abbildung 26 zeigt die Epidermis bei einem zum Aufweichen des Keratins mit Entkalker behandelten Hautschnitt. Dabei sind die schlecht gefärbten Kerne in den oberflächlichen Schichten zu beachten.



**Abbildung 26**

Hautschnitt nach dem Einwirken von säurehaltigem Entkalker zum Aufweichen von Keratin

## Auf Wiederherstellung und erneuter Infiltration basierende Lösungen

### **Lösung 7:** Für fixiertes Gewebe, das vollständig ausgetrocknet, geschrumpft und hart ist:

Gelegentlich gehen Präparate beim Transport oder am Zuschneidetisch "verloren" und trocknen aus. Dies kann auch aufgrund einer Gerätefehlfunktion passieren, meistens bei Infiltrationsautomaten vom Gewebetransfer-Typ, bei denen das Gewebe nach dem Eintauchen in Dehydrier- oder Intermedium längere Zeit der Luft ausgesetzt sein kann.

Bei allen nachfolgend aufgeführten Methoden kommt ein "Wiederherstellungs"- oder Aufweichreagenz zum Einsatz. Einige dieser Reagenzien werden in der paläohistologischen und paläopathologischen Fachliteratur erwähnt, weil sie zum Aufweichen und Rehydrieren von mumifiziertem Gewebe verwendet werden<sup>24-26</sup>.

### **Lösung 7a:** Proben wurden nicht mit Wachs infiltriert

**Grundprinzip:** Wenn die Probe nach dem Fixieren, aber vor der Infiltration (beispielsweise weil sie im Deckel eines Gefäßes oder am Zuschneidetisch "verloren" gegangen ist) oder in den Anfangsphasen der Infiltration ausgetrocknet ist, kann eine "Wiederherstellungslösung" angewendet werden, um das Gewebe weich zu machen und zu rehydrieren.

- Legen Sie die Probe in eine größere Menge der gewählten Wiederherstellungslösung (siehe Tabelle 6 im Anhang) und lassen Sie die Lösung über einen ausreichenden Zeitraum einwirken. Gelegentliches vorsichtiges Umrühren kann hilfreich sein. Bei kleinen Proben können ein bis zwei Stunden ausreichen. Bei großen Proben, die längere Zeit ausgetrocknet waren, können 12 bis 48 Stunden erforderlich sein.
- Durch vorsichtiges Befühlen der Probe lässt sich feststellen, ob sie weich genug ist.
- Beginnen Sie die Infiltration der Probe (in Abhängigkeit vom verwendeten Wiederherstellungsreagenz) mit einer geeigneten Phase. Bei Verwendung eines auf Alkohol basierenden Reagenzes lassen Sie den Formalinschritt aus und starten mit der Dehydrierung. Wenden Sie ein Infiltrationsprotokoll an, das Sie ursprünglich für geeignet gehalten hätten.

Die in Abbildung 27A dargestellten Proben waren nach der Fixierung eine Woche lang in einem Abzugsschrank ausgetrocknet. Sie wurden anschließend durch 24-stündiges Einlegen in neutral gepuffertem Formalin wiederhergestellt (Abbildung 27B). Zu beachten ist hier die durch die Rehydrierung verursachte Schwellung.



**Abbildung 27A**

Proben nach dem Trocknen



**Abbildung 27B**

Proben nach der  
Wiederherstellung

## Lösung 7b: Proben wurden mit Wachs infiltriert

**Grundprinzip:** Wenn die Probe während der Verarbeitung ausgetrocknet ist, aber dennoch mit Wachs infiltriert wurde, muss das Wachs vor der Anwendung der Wiederherstellungslösung entfernt werden.

- Lösen Sie das Wachs mithilfe der Reinigungsreagenzien (vorzugsweise Xylol, nicht Waxsol™) und ohne Trockenschritt auf und behandeln Sie das Gewebe mit Alkohol und anschließend mit Wasser<sup>14</sup>. Behandeln Sie die Probe mit einer Wiederherstellungslösung, wie beispielsweise Natriumkarbonatlösung<sup>18</sup>, Formol-Glycerin<sup>15</sup> oder Alkohol-Glycerin<sup>10</sup> (siehe Tabelle 6 im Anhang), und wiederholen Sie dann die Infiltration ab einer geeigneten Phase und nach einem Protokoll, das Sie ursprünglich für geeignet gehalten hätten.

## Lösung 8: Für dehydrierte und geklärte Proben mit schlechter Wachsinfiltration

**Grundprinzip:** Es kommt vor, dass noch nicht vollständig infiltrierte Proben versehentlich aus dem Wachsbad im Infiltrationsautomaten entnommen werden oder ein Protokoll mit unzureichender Infiltrationsdauer angewendet wird. Sofern Entwässerung und Klärung abgeschlossen sind, kann die nachfolgend beschriebene Methode angewendet werden.

- Legen Sie die Kassetten zurück in das Wachsbad, lassen Sie sie vollständig schmelzen und führen Sie mindestens so lang wie ursprünglich vorgesehen mindestens zwei zusätzliche Wachsschritte im Vakuum durch. Betten Sie die Proben erneut ein und erstellen Sie Schnitte.

## **Lösung 9:** Für ausreichend fixierte, aber unvollständig infiltrierte Proben:

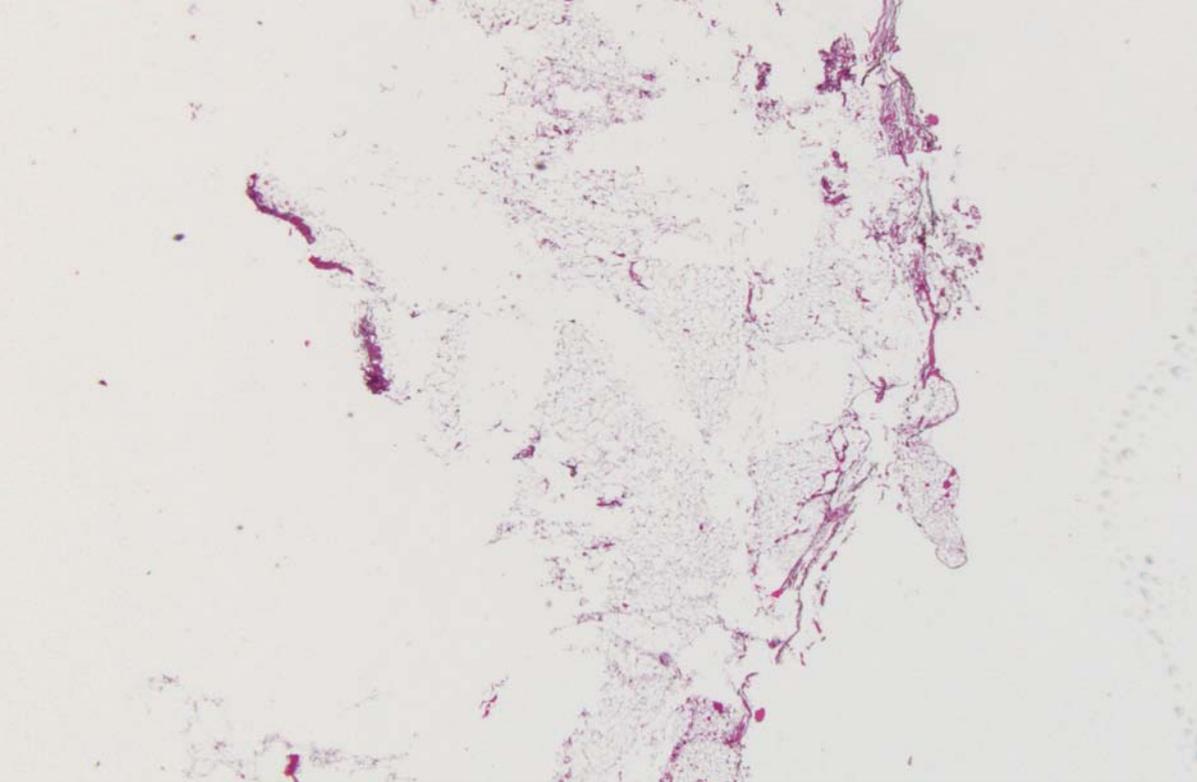
Bei jeder dieser Methoden kommt der Infiltrationsautomat zum Einsatz. Vor der erneuten Infiltration müssen Gerätefehler behoben und verunreinigte Reagenzien ausgetauscht werden. Nach einer ordnungsgemäß durchgeführten erneuten Infiltration sollten zusammenhängende Schnitte erzielbar sein, wo dies zuvor nicht möglich war. Das Ergebnis wird allerdings nie so gut sein, wie zu erwarten gewesen wäre, wenn von Anfang an eine optimale Infiltration stattgefunden hätte.

## Lösung 9a: Erneute Infiltration unter Verwendung von Salzlösung (nach Taggart<sup>19</sup>)

**Grundprinzip:** Bei dieser Methode wird überschüssiges Wachs vor der erneuten Infiltration mit heißer Salzlösung entfernt. Das durch die Salzlösung sanft rehydrierte Gewebe kann anschließend normal infiltriert werden. Salzlösung ist ein nicht-toxisches Reagenz, das ohne besondere Sicherheitsvorkehrungen im Labor verwendet werden kann.

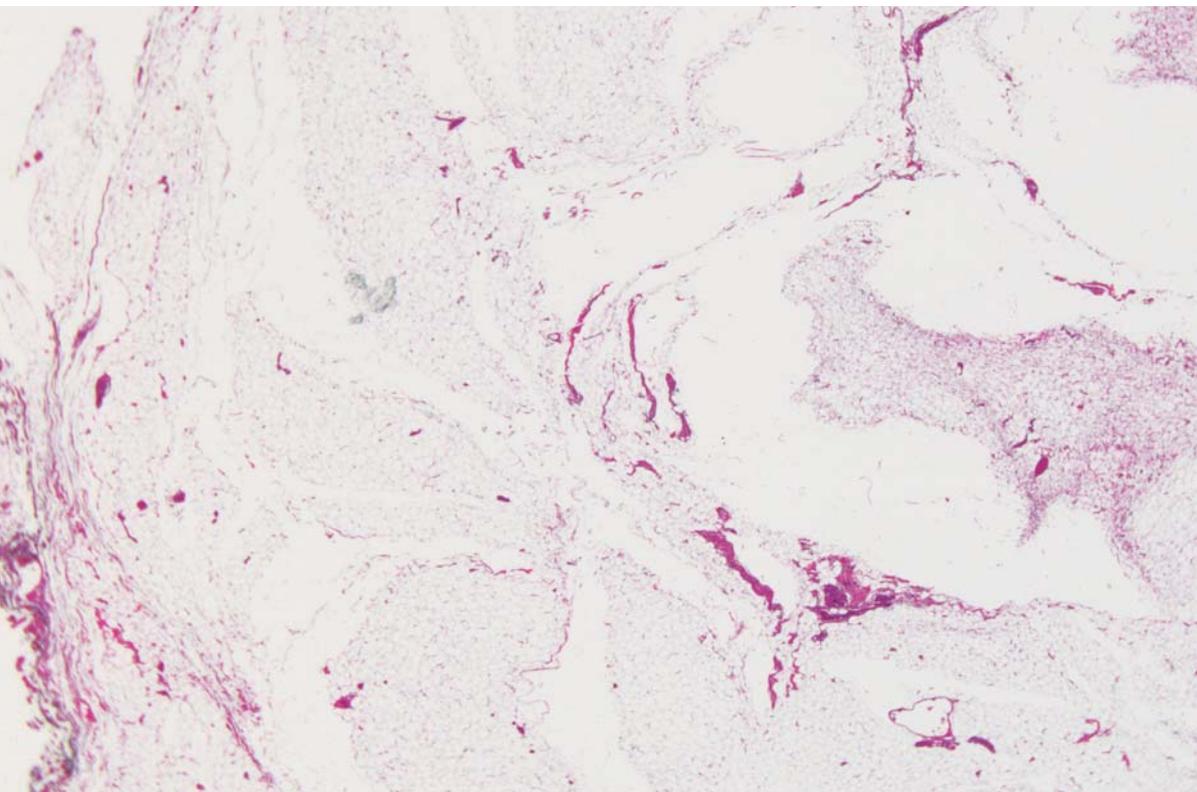
- Schmelzen Sie die Blöcke vor der erneuten Infiltration, tupfen Sie überschüssiges Wachs vorsichtig ab und legen Sie die Proben in eine neu beschriftete Kassette. Dadurch wird der Zugang der Infiltrationsreagenzien zu den Proben verbessert.
- Legen Sie die Kassetten in einem Gefäß mit isotonischer Kochsalzlösung (einer wässrigen Lösung aus 0,9-prozentigem Natriumchlorid) eine Stunde lang bei 65 °C in einen Inkubator (eine Stunde reicht für viele Probentypen und -abmessungen aus). Dadurch schmilzt das Wachs und steigt an die Oberfläche der Salzlösung auf.
- Entnehmen Sie die Kassetten aus der Salzlösung, lassen Sie sie kurz abtropfen, platzieren Sie sie im Infiltrationsautomat und wiederholen Sie die Infiltration ab der Formalinphase nach einem Protokoll, das ursprünglich geeignet gewesen wäre. Dies ist von Größe und Art der Proben abhängig.

Die Mikroaufnahmen in Abbildung 28 zeigen, was durch erneute Infiltration nach Lösung 9a (Taggarts Methode) erreicht werden kann. Eine optimale Infiltration dieser großen Unterhautfettprobe würde normalerweise einen 8-Stunden-Zyklus erfordern. Sie wurde mit einem 2-Stunden-Zyklus absichtlich deutlich unterprozessiert. Mikroaufnahme A zeigt den besten Schnitt, der nach Anwendung dieses unzureichenden Protokolls erzielbar war. Mikroaufnahme B wurde erstellt, nachdem wie oben beschrieben eine erneute Infiltration unter Verwendung von Kochsalzlösung zur Wachsentfernung und Rehydrierung, gefolgt von einem 8-stündigen Vorwärtsverarbeitungsprotokoll, durchgeführt wurde und anschließend erneut Schnitte erzeugt wurden. Der Schnitt ist zwar jetzt zusammenhängend und von akzeptabler Qualität, aber bei Anwendung eines korrekten Protokolls im ersten Durchlauf wäre ein besseres Ergebnis erzielbar gewesen.



**Abbildung 28A**

Fettpräparat vor der erneuten Infiltration



**Abbildung 28B**

Fettpräparat nach der erneuten Infiltration

## Lösung 9b: Erneute Infiltration unter Verwendung des Reinigungszyklus des Infiltrationsautomaten oder einer Variante davon.<sup>13, 14</sup>

**Grundprinzip:** Das ist eine praktische Methode, bei der die Reinigungsreagenzien zum Entfernen von Wachs und Rückführen des Gewebes in Alkohol verwendet werden. Es ist eine potenziell härtere Methode als 9a oder 9c.

- Schmelzen Sie die Blöcke vor der erneuten Infiltration, tupfen Sie überschüssiges Wachs vorsichtig ab und legen Sie die Proben in eine neu beschriftete Kassette. Dadurch wird der Zugang der Infiltrationsreagenzien zu den Proben verbessert.
- Stellen Sie die Kassetten in einem Präparatekorb in den Infiltrationsautomaten.
- Führen Sie den Reinigungs(Spül-)Zyklus des Infiltrationsautomaten oder eine Variante davon durch, bei dem die Reinigungsreagenzien verwendet werden (siehe Tabelle 2). Da Xylol etwas milder in der Wirkung als Waxsol™ ist, ist Xylol vorzuziehen. Damit werden die Proben durch Xylol und mehrere Alkoholanwendungen zurückgeführt. Es ist wichtig, **das Gewebe keine Trocknungsphase durchlaufen zu lassen**, die möglicherweise Teil des Reinigungszyklus ist (wie beispielsweise beim Standard-Peloris-Protokoll "Quick Clean"). Das Programm muss vor dem Erreichen dieser Phase abgebrochen werden. Daher empfiehlt es sich, ein neues Protokoll, wie beispielsweise das nachfolgend beschriebene, in den Automaten zu laden.

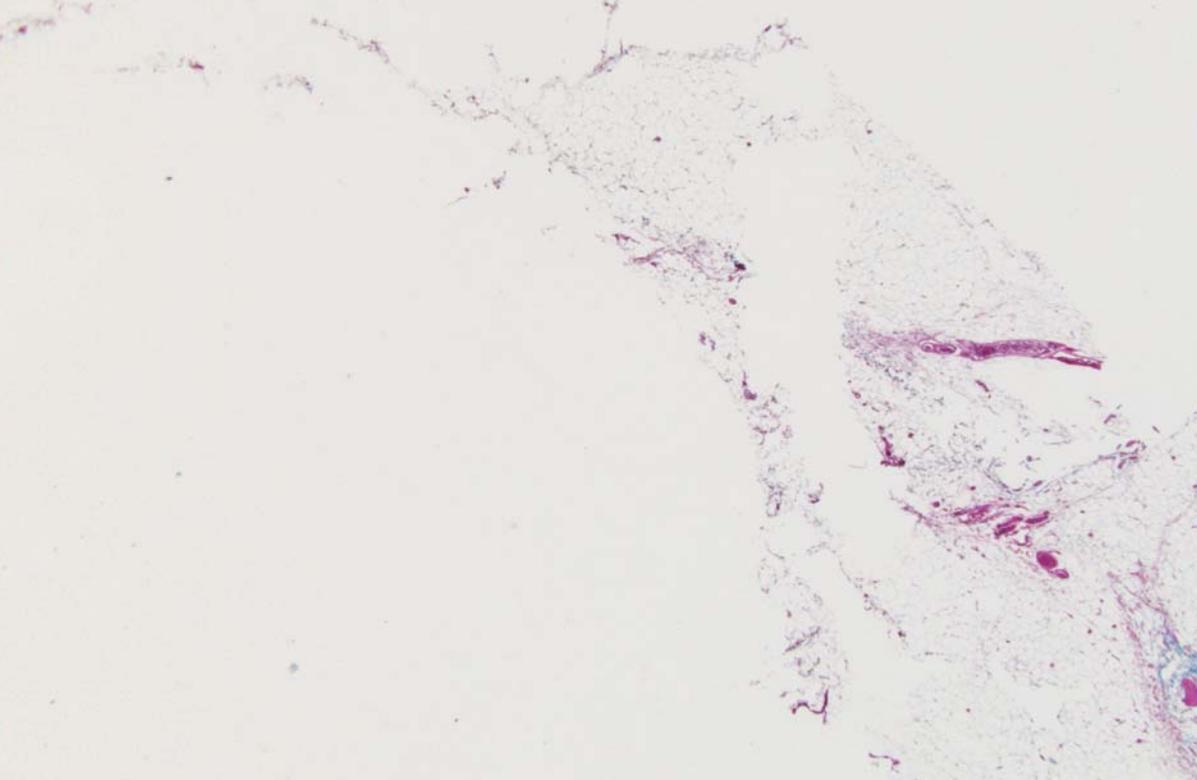
**Tabelle 2. Protokoll für schnelle Reinfiltration unter Verwendung von Reinigungsreagenzien für den Gewebeinfiltrationsautomaten Leica Peloris™**

Schritt-nummer	Reagenztyp	Zeit (Min.)	Temp (°C)	P/V	Rührer	Tropfdauer (Sek.)
1	Reinigungsreagenz	12	65	Umgeb.	Hoch	10
2	Reinigungsethanol	6	55	Umgeb.	Hoch	10
	<b>Schrittdauer</b>	18:00				
	<b>Verarbeitungsdauer</b>	22:00				

Die Proben sollten jetzt in Alkohol vorliegen und für die erneute Infiltration bereit sein.

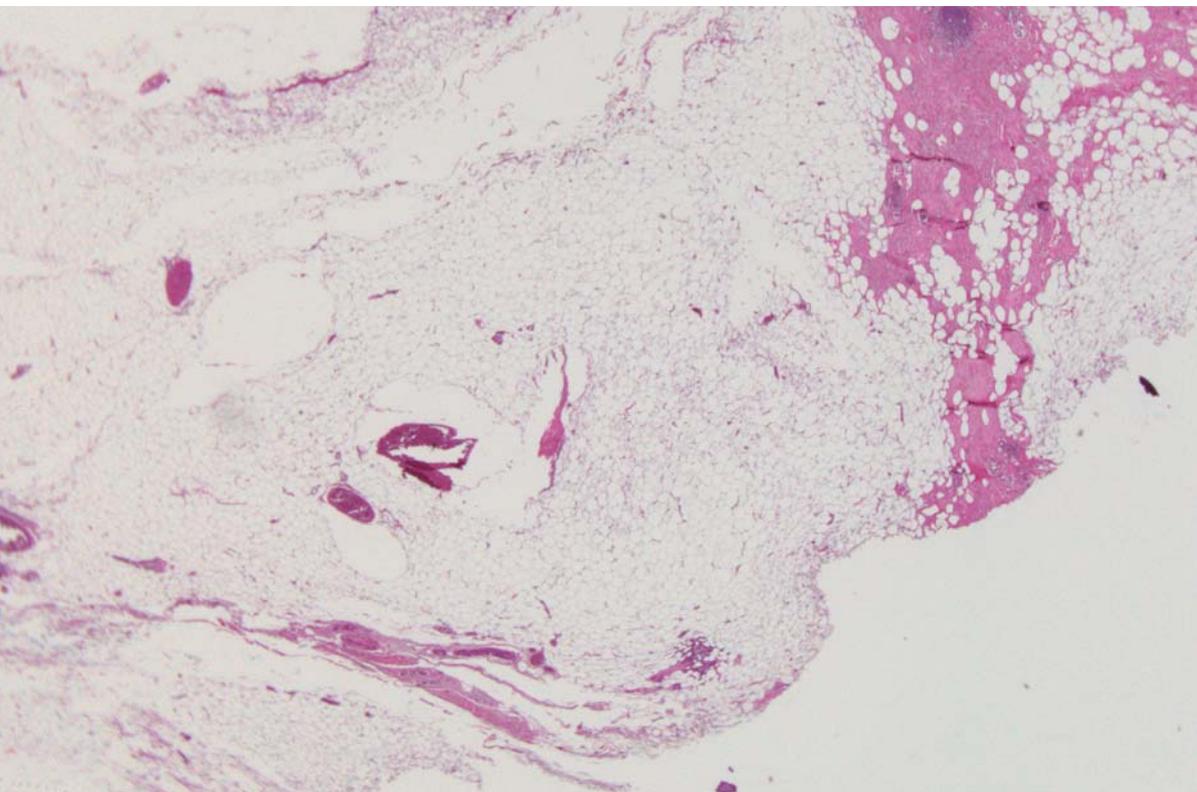
- Führen Sie, von Formalin oder Alkohol ausgehend, eine erneute Infiltration nach einem Protokoll durch, das ursprünglich geeignet gewesen wäre. Dies ist von Größe und Art der Proben abhängig. Es empfiehlt sich möglicherweise, die Proben in Formalin zu belassen und zusammen mit der nächsten vollen Probencharge zu infiltrieren.

Die Mikroaufnahmen in Abbildung 29 zeigen, was durch erneute Infiltration nach Lösung 9b (Reinigungsreagenzien) erreicht werden kann. Eine optimale Infiltration dieser großen Unterhautfettprobe würde normalerweise einen 8-Stunden-Zyklus erfordern. Sie wurde mit einem 2-Stunden-Zyklus absichtlich deutlich unterprozessiert. Abbildung 29A zeigt den besten Schnitt, der nach Anwendung dieses unzureichenden Protokolls erzielbar war. Abbildung 29B wurde nach erneuter Infiltration nach dem (oben beschriebenen) kurzen, geänderten Reinigungsprotokoll, gefolgt von einem 8-stündigen Vorwärtsverarbeitungsprotokoll und erneutem Schneiden des Blocks, erstellt. Der Schnitt ist zwar jetzt zusammenhängend und von akzeptabler Qualität, aber bei Anwendung eines korrekten Protokolls im ersten Durchlauf wäre ein besseres Ergebnis erzielbar gewesen.



**Abbildung 29A**

Fettpräparat vor der erneuten Infiltration



**Abbildung 29B**

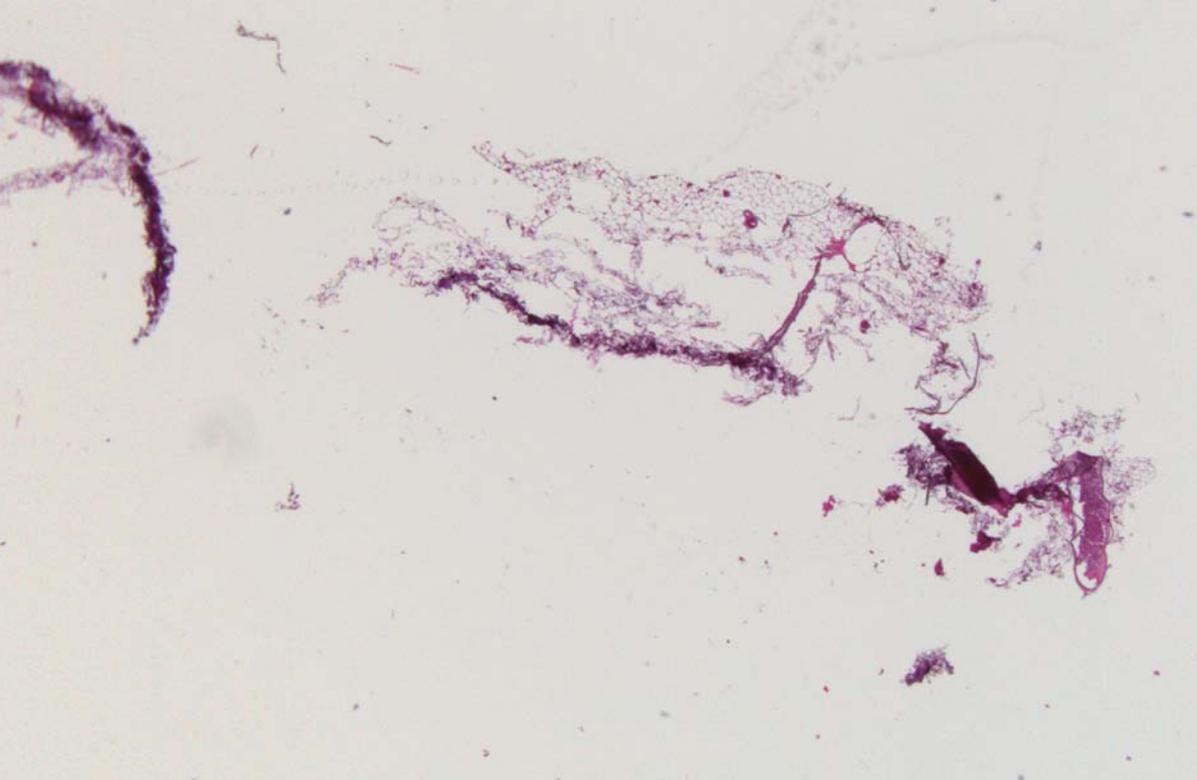
Fettpräparat nach der erneuten Infiltration

## Lösung 9c: Direkte erneute Infiltration<sup>13</sup>

**Grundprinzip:** Diese Methode erfordert keine Vorbehandlung vor der erneuten Infiltration. Die Probenbereiche, die ursprünglich ausreichend infiltriert wurden, werden nur geringfügig zusätzlich mit Alkohol dehydriert, aber zusätzlich geklärt und mit Wachs infiltriert. Schwach infiltrierte Bereiche erhalten eine zusätzliche Fixierung, Entwässerung, Klärung und Infiltration. Ein potenzieller Nachteil dieser Methode besteht darin, dass Infiltrationsautomat und Reagenzien leicht mit Wachs verunreinigt werden.

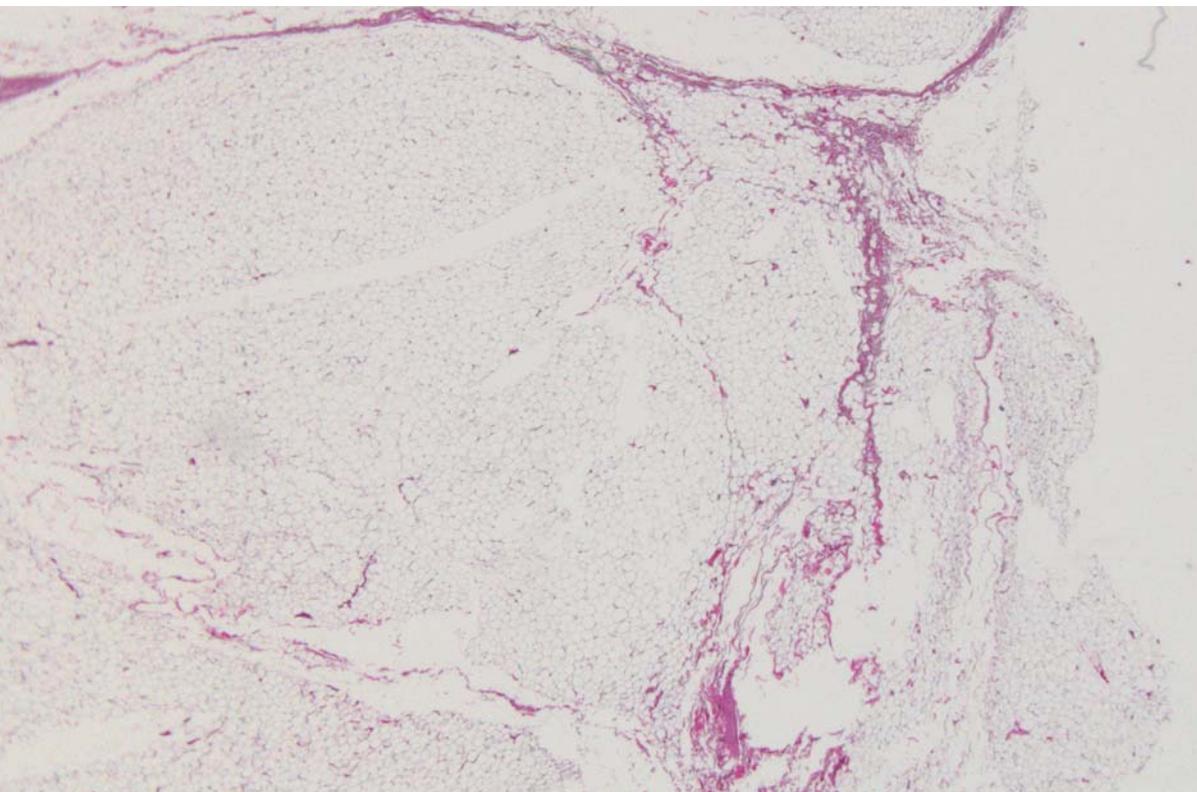
- Schmelzen Sie die Blöcke vor der erneuten Infiltration, tupfen Sie überschüssiges Wachs vorsichtig ab und legen Sie die Proben in eine neu beschriftete Kassette. Dadurch wird der Zugang der Infiltrationsreagenzien zu den Proben verbessert.
- Stellen Sie die Kassetten in einem Präparatekorb in den Infiltrationsautomaten.
- Führen Sie, von Formalin oder Alkohol ausgehend, eine erneute Infiltration nach einem Protokoll durch, das ursprünglich geeignet gewesen wäre. Dies ist von Größe und Art der Proben abhängig. Es empfiehlt sich möglicherweise, die Proben in Formalin zu belassen und zusammen mit der nächsten vollen Probencharge zu infiltrieren.

Die Mikroaufnahmen in Abbildung 30 zeigen, was durch erneute Infiltration nach Lösung 9c (direkte Reinfiltration) erreicht werden kann. Eine optimale Infiltration dieser großen Unterhautfettprobe würde normalerweise einen 8-Stunden-Zyklus erfordern. Sie wurde mit einem 2-Stunden-Zyklus absichtlich deutlich unterprozessiert. Abbildung 30A zeigt den besten Schnitt, der nach Anwendung dieses unzureichenden Protokolls erzielbar war. Abbildung 30B wurde nach der (oben beschriebenen) direkten Reinfiltration, gefolgt von einem 8-stündigen Vorwärtsverarbeitungsprotokoll und erneutem Schneiden, erstellt. Der Schnitt ist zwar jetzt zusammenhängend und von akzeptabler Qualität, aber bei Anwendung eines korrekten Protokolls im ersten Durchlauf wäre ein besseres Ergebnis erzielbar gewesen.



**Abbildung 30A**

Fettpräparat vor der erneuten Infiltration



**Abbildung 30B**

Fettpräparat nach der erneuten Infiltration

## Lösung 9d: Langsame Rückverarbeitung

**Grundprinzip:** Diese Methode ist zeitaufwändiger als andere, stellt aber wahrscheinlich die sanfteste und gründlichste aller hier aufgeführten Optionen dar. Sie besteht darin, die Probe langsam durch Klärung zur vollständigen Wachs Entfernung, gründliche Entfernung des Intermediums mit Alkohol und vollständige Rehydrierung zurückzuführen. Anschließend wird die Probe nach dem ursprünglich passenden Protokoll gründlich vorwärts verarbeitet.

- Schmelzen Sie die Blöcke vor der erneuten Infiltration, tupfen Sie überschüssiges Wachs vorsichtig ab und legen Sie die Proben in eine neu beschriftete Kassette. Dadurch wird der Zugang der Infiltrationsreagenzien zu den Proben verbessert.
- Stellen Sie die Kassetten in einem Präparatekorb in den Infiltrationsautomaten.
- Führen Sie einen modifizierten Rückverarbeitungszyklus durch (wie beispielsweise in Tabelle 3 dargestellt). Damit werden die Proben durch Xylol oder Waxsol™ und mehrere Alkoholanwendungen zurückgeführt. Das dargestellte Protokoll wäre für eine Probengröße und -art geeignet, die normalerweise innerhalb von sechs bis acht Stunden erfolgreich infiltriert würde. Für kleinere Proben ist das Protokoll entsprechend anzupassen (zu kürzen).

**Tabelle 3. Rückverarbeitungsprotokoll für Peloris Gewebeeinfiltrationsautomat**

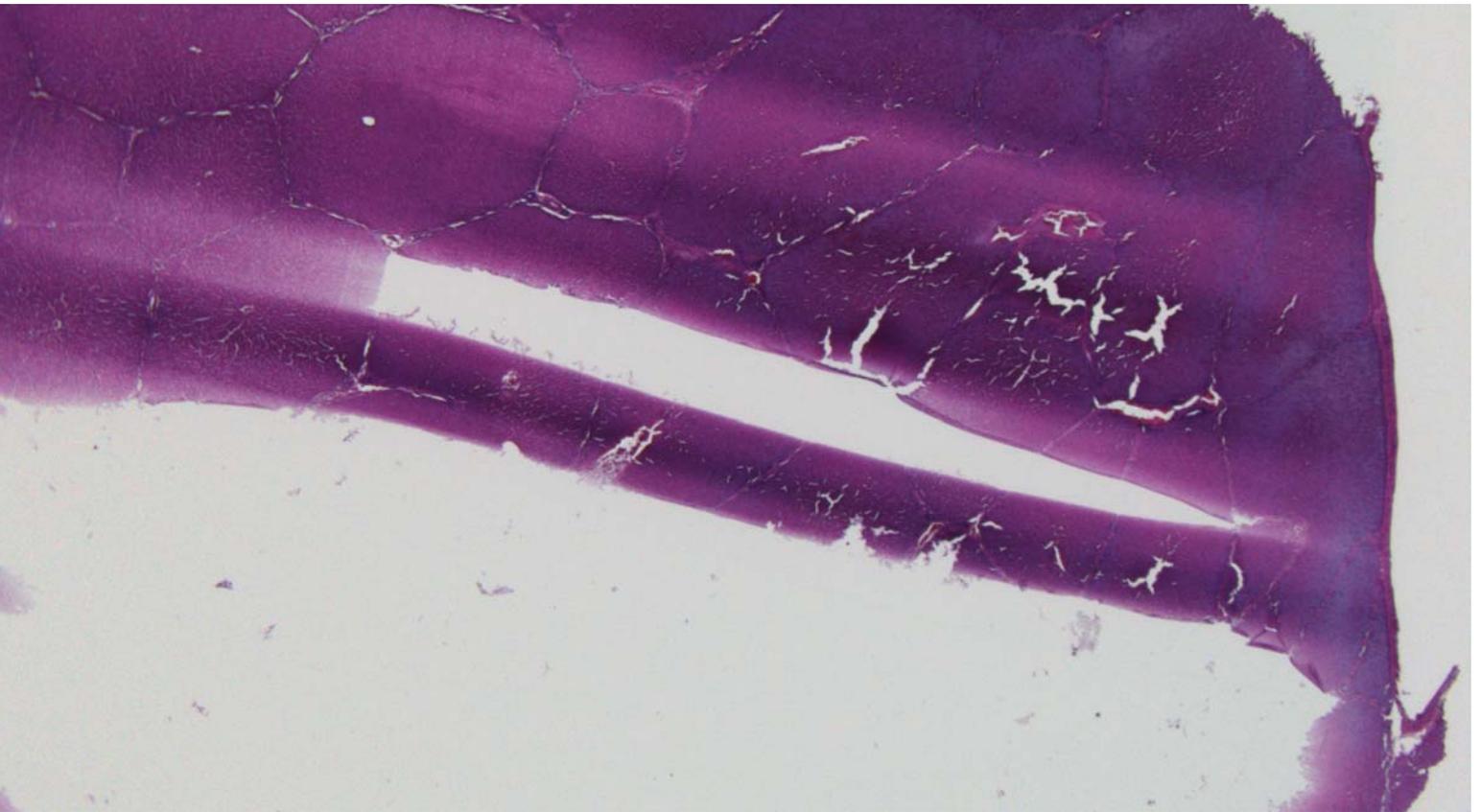
Nr.	Reagenztyp	Zeit (Min.)	Temp (°C)	P/V	Rührer	Tropfdauer (Sek.)
1	Reinigungsreagenz	60	Umgeb.	Umgeb.	Hoch	10
2	Reinigungsreagenz	60	Umgeb.	Umgeb.	Hoch	10
3	Reinigungsethanol	60	Umgeb.	Umgeb.	Hoch	10
4	Reinigungsethanol	60	Umgeb.	Umgeb.	Hoch	10
	<b>Schrittdauer</b>	240				
	<b>Verarbeitungsdauer</b>	248				

Die Proben werden vor der erneuten Infiltration 15 Minuten in 70% Ethanol gespült.

- Führen Sie, von Formalin oder Alkohol ausgehend, eine erneute Infiltration nach einem Protokoll durch, das ursprünglich geeignet gewesen wäre. Dies ist von Größe und Art der Proben abhängig. Es empfiehlt sich möglicherweise, die Proben in Formalin zu belassen und zusammen mit der nächsten vollen Probencharge zu infiltrieren.

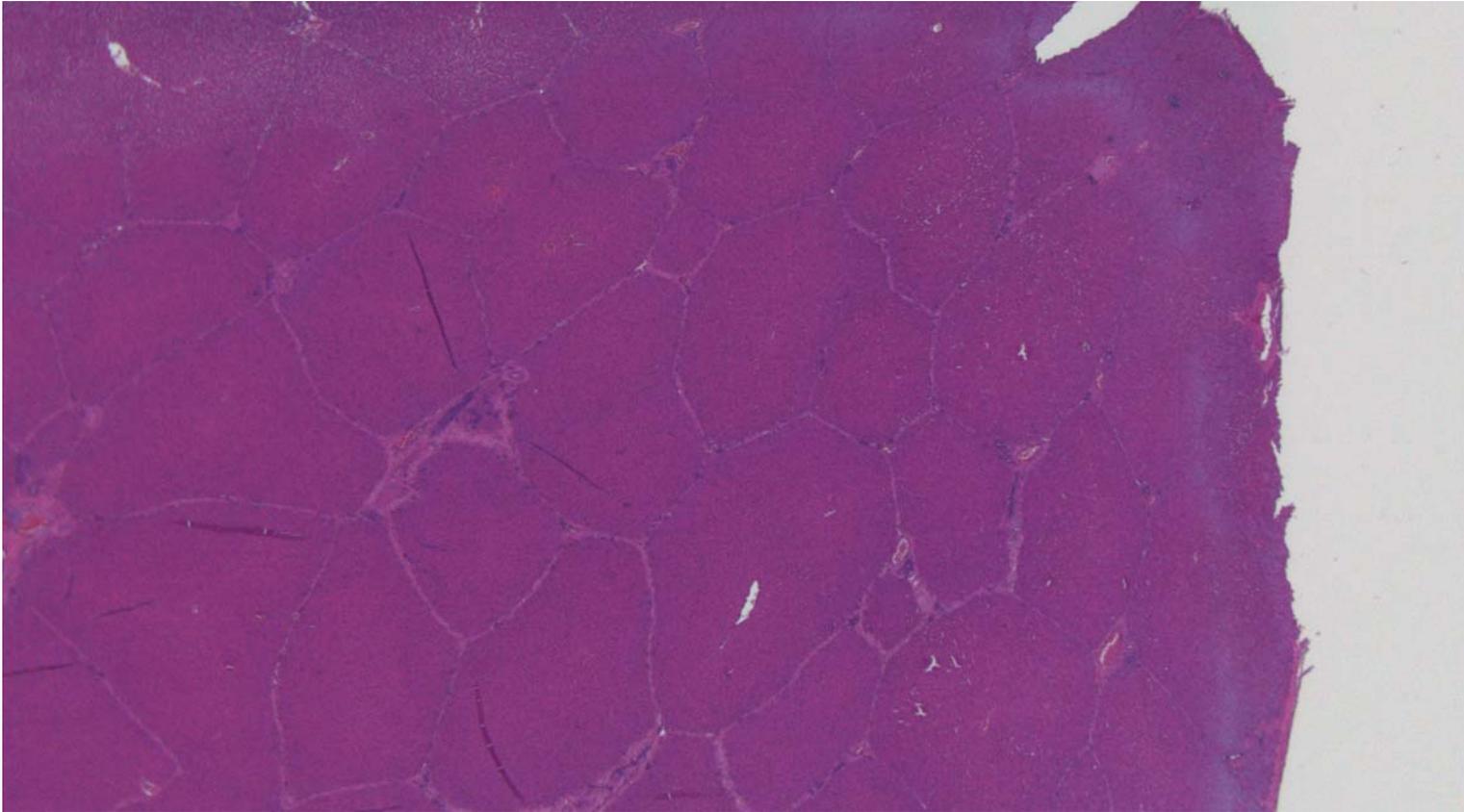
Die Mikroaufnahmen in Abbildung 31 zeigen, was durch erneute Infiltration nach Lösung 9d (langsame Rückverarbeitung) erreicht werden kann. Eine optimale Infiltration dieser großen Schweineleberprobe würde normalerweise einen 8-Stunden-Zyklus erfordern. Sie wurde mit einem 2-Stunden-Zyklus absichtlich deutlich unterprozessiert. Abbildung 31A zeigt den besten Schnitt, der nach Anwendung dieses unzureichenden Protokolls erzielbar war.

Abbildung 31B wurde nach dem in Tabelle 3 dargestellten Rückführungsprozess, gefolgt von einem 8-stündigen Vorwärtsverarbeitungsprotokoll und erneutem Schneiden des Blocks, erstellt. Der Schnitt ist zwar jetzt zusammenhängend und von akzeptabler Qualität, aber einige der durch zu schwache Infiltration verursachten Schäden sind geblieben.



**Abbildung 31A**

Leberpräparat vor der erneuten  
Infiltration



**Abbildung 31B**

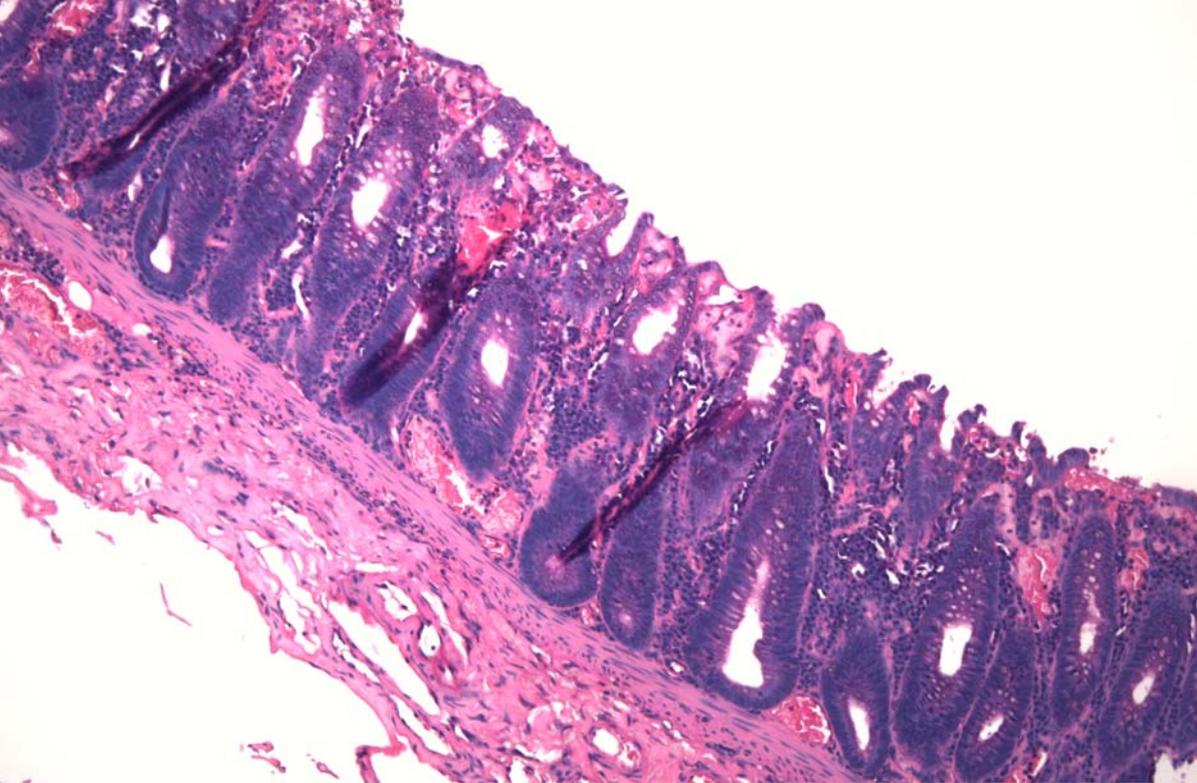
Leberpräparat nach der erneuten  
Infiltration

## Lösung 9e: Langsame Rückverarbeitung mit Wiederherstellungsschritt

**Grundprinzip:** Diese Methode ist am zeitaufwändigsten, aber in Extremfällen, in denen die Färbung durch Verunreinigung mit Reagenzien (beispielsweise Verunreinigung der Proben mit Formalin während der Wachsinfiltration) stark beeinträchtigt wurde, von Nutzen. Der durch die ursprüngliche Bearbeitung verursachte morphologische Schaden wird zwar nicht rückgängig gemacht, aber es lassen sich zusammenhängende Schnitte und eine bessere H&E-Färbung erzielen. Sie ist mit Methode 9d identisch, umfasst aber einen zusätzlichen Schritt. Nach der Rehydrierung und vor der erneuten Infiltration werden die Proben mindestens zwei Stunden (maximal über Nacht) mit einem Wiederherstellungsreagenz, wie beispielsweise Leica BOND ER2™ Lösung (Epitopdemaskierungslösung), Tris Puffer pH 10,2 oder sanfter mit isotonischer Kochsalzlösung oder 10 % neutral gepuffertem Formalin, behandelt. Dadurch wird die normale Eosinophilie des Gewebes größtenteils wiederhergestellt.

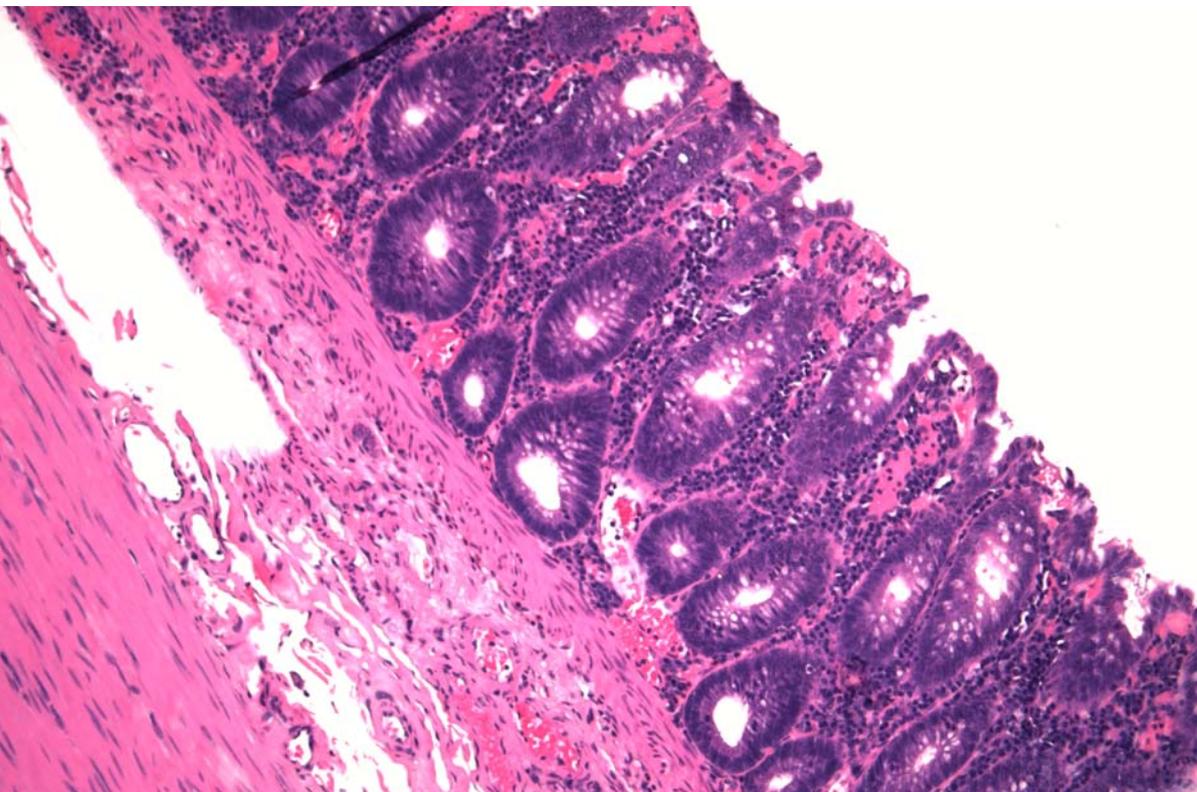
- Gehen Sie wie unter 9d beschrieben vor, bis sich die Probe in 70 % Ethanol befindet.
- Legen Sie die Probe je nach Art und Größe für mindestens zwei Stunden (bis maximal über Nacht) bei 65 °C in ein großes Volumen Wiederherstellungslösung. Bei kleinen Proben müssten zwei Stunden bei Umgebungstemperatur ausreichen.
- Führen Sie eine erneute Infiltration, ausgehend von Formalin oder Alkohol, nach einem ursprünglich geeigneten Protokoll durch.

Der in Abbildung 32A dargestellte Artefakt wurde durch absichtliche Verunreinigung der Probe mit Formalin unmittelbar vor der Wachsinfiltration im Rahmen eines an sich adäquaten Protokolls erzeugt. Die "Blaufärbung" und "Kernschmelze" sind in diesem Fall eine direkte Folge der Verunreinigung mit Formalin. Dieser Effekt tritt bei stark unterprozessiertem Gewebe oder, in seltenen Fällen, als Folge eines Gerätefehlers auf, der dazu führt, dass während der Wachsinfiltration Formalin in die Retorte gelangt. Abbildung 32B wurde nach langsamer Rückverarbeitung in Kombination mit einem Wiederherstellungsschritt (Lösung 9e mit BOND™ Epitope Retrieval Solution 2 pH 9,0) und anschließender Vorwärtsverarbeitung erstellt. Obwohl die morphologische Schädigung bleibt, konnten Schnittqualität und Färbung verbessert werden.



**Abbildung 32A**

Schleimhautschnitt mit durch Verunreinigung mit Formalin verursachtem Artefakt



**Abbildung 32B**

Schleimhautschnitt nach Wiederherstellung und erneuter Infiltration

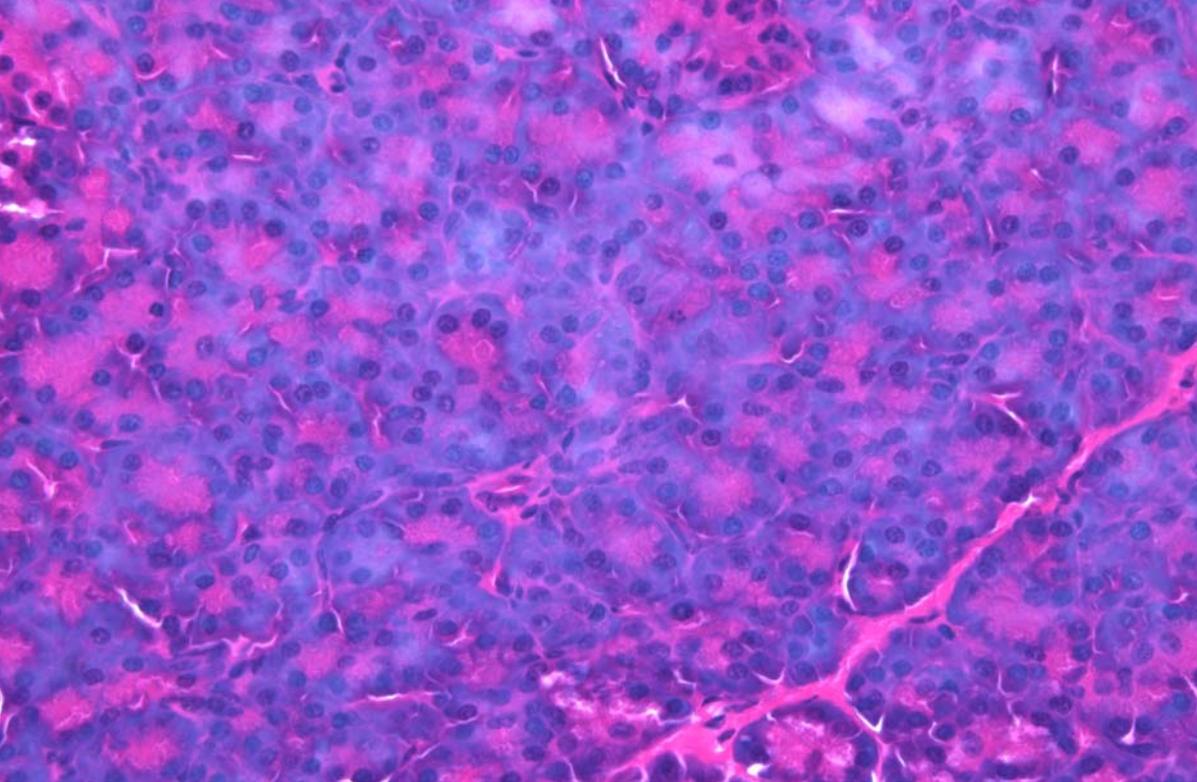
## Lösung 10: Für schlecht fixiertes und unvollständig infiltrierte Gewebe

**Grundprinzip:** Nichtfixiertes oder schlecht fixiertes Gewebe wird durch Infiltration geschädigt. Alkohol und hohe Temperaturen haben eine eigene Fixierwirkung, die von der des Formaldehyds abweicht. Nicht fixiertes Gewebe ist instabil und empfänglicher für Härtung und Schrumpfung als ordnungsgemäß fixiertes Material. Deshalb ist schlechte Fixierung in Kombination mit schwacher Infiltration ausgesprochen problematisch. Sanfte erneute Infiltration mit leichter zusätzlicher Fixierung stellt wahrscheinlich den besten Kompromiss dar. Die folgende Methode basiert auf Taggarts Methode<sup>19</sup> – eine der sanftesten unter den bisher beschriebenen Vorgehensweisen.

- Schmelzen Sie die Blöcke vor der erneuten Infiltration, tupfen Sie überschüssiges Wachs vorsichtig ab und legen Sie die Proben in eine neu beschriftete Kassette. Dadurch wird der Zugang der Infiltrationsreagenzien zu den Proben verbessert.
- Legen Sie die Kassetten in einem Gefäß mit isotonischer Kochsalzlösung (einer wässrigen Lösung aus 0,9-prozentigem Natriumchlorid) eine Stunde lang bei 65 °C in einen Inkubator<sup>19</sup>. Dadurch schmilzt das Wachs und steigt an die Oberfläche der Salzlösung auf.
- Nehmen Sie die Kassetten aus der Salzlösung und legen Sie sie für einige Zeit in 10 % neutral gepuffertes Formalin. Wie bereits erwähnt, können die Proben durch die vorherige Einwirkung von Formalin und Alkohol bereits teilweise fixiert sein, aber die zusätzliche Formalinfixierung kann vorteilhaft sein. Dieser Schritt sollte in unserem Infiltrationsautomaten ausgeführt werden.
- Führen Sie, von Formalin ausgehend, eine erneute Infiltration nach einem Protokoll durch, das ursprünglich geeignet gewesen wäre. Dies ist von Größe und Art der Proben abhängig.

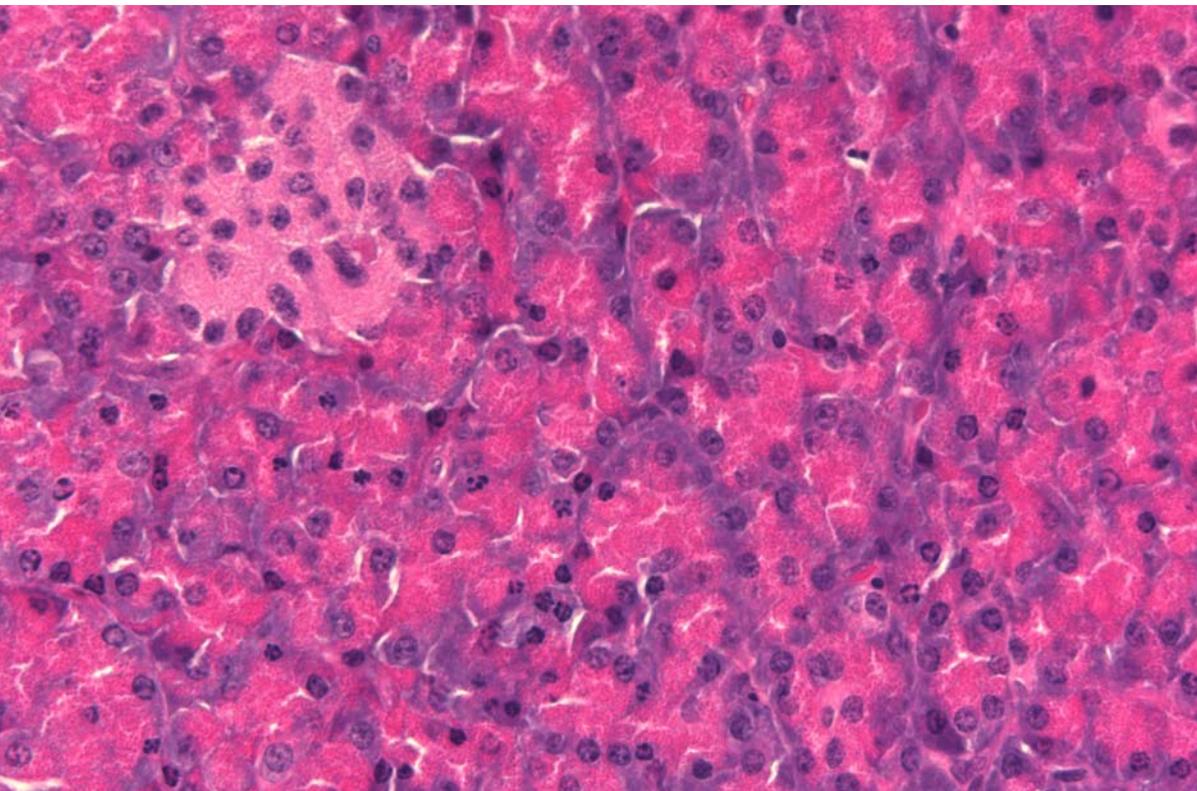
Der in Abbildung 33A dargestellte Artefakt wurde durch absichtliche Unterfixierung und starke Unterprozessierung eines Pankreaspräparats erzeugt. Der Block war sehr schwierig zu schneiden, da ein Bereich in der Mitte völlig fehlte. Intakte Gewebebereiche wiesen eine sehr schlechte Zellmorphologie mit wenig differenzierten Kernen ("Kernschmelze") auf und erschienen hellblau und verschwommen ("Blaufärbung"). Die zytoplasmatische Textur war schwach ausgeprägt und die Zellränder waren schlecht abgegrenzt. Die Zellen wirkten aufgedunsen.

Abbildung 33B wurde nach erneuter Infiltration der Probe nach der bei Lösung 10 (Taggarts Methode mit zusätzlicher Fixierung) beschriebenen Methode erstellt. Die Morphologie ist zwar gegenüber den ursprünglichen Schnitten verbessert und die "Blaufärbung" wurde teilweise behoben, aber es sind weiterhin Risse und eine Schrumpfung zu beobachten. Das Ergebnis ist nicht so gut wie das, was erzielbar gewesen wäre, wenn von Anfang an eine angemessene Fixierung und Infiltration nach dem richtigen Protokoll durchgeführt worden wäre.



**Abbildung 33A**

Pankreas mit durch Unterfixierung und -prozessierung verursachten Artefakten



**Abbildung 33B**

Pankreas nach erneuter Infiltration



# Teil 4

## Hauptursachen

Grundlegende Ursachen von Infiltrationsproblemen und ihre Vermeidung

## Grundlegende Ursachen von Infiltrationsproblemen und ihre Vermeidung

Wenn Labormitarbeiter mit einer Probe oder Probencharge konfrontiert sind, aus der sich keine akzeptablen Schnitte erzeugen lassen, stellt dies ein ernstes Problem dar. Dadurch verzögert sich die histopathologische Befundung, und schlimmstenfalls kann überhaupt keine Diagnose gestellt werden.

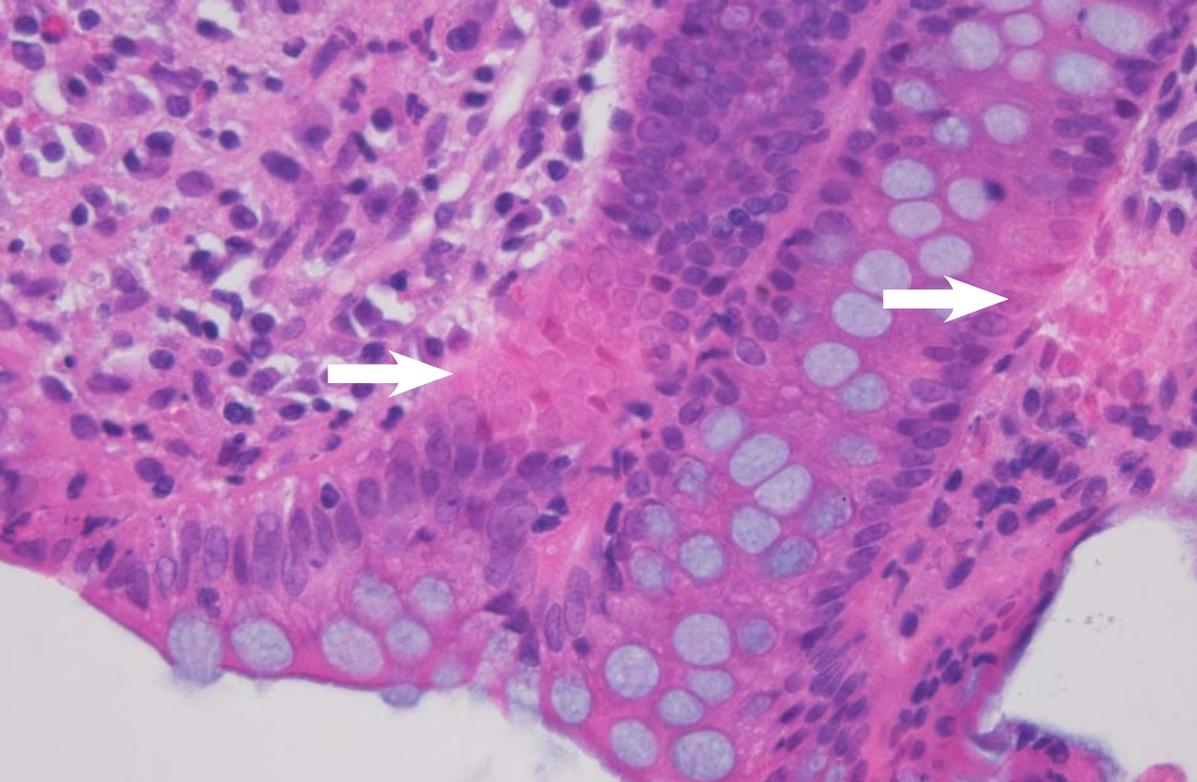
In dieser Situation besteht ein erheblicher Druck, schnellstmöglich Abhilfe zu schaffen. Eine kurzfristige Problemlösung kann darin bestehen, einige "Tricks" anzuwenden, um aus einem schlecht infiltrierte Block Schnitte zu erzeugen. Wenn dies nicht gelingt, muss die Probe unter Umständen erneut infiltriert werden.

Unter diesen Umständen ist eine sorgfältige Abwägung erforderlich, um die beste Vorgehensweise zu ermitteln.

Manchmal besteht die erste Reaktion des Laborpersonals darin, den Fehler beim Gerät zu suchen. Natürlich treten bei Infiltrationsautomaten gelegentlich Fehler auf, aber wir wissen aus Erfahrung, dass es auch andere Fälle gibt, in denen das Bedienpersonal Fehler gemacht hat. In jedem Fall ist eine gründliche Analyse erforderlich; es dürfen keine voreiligen Schlussfolgerungen bezüglich der Ursache gezogen werden.

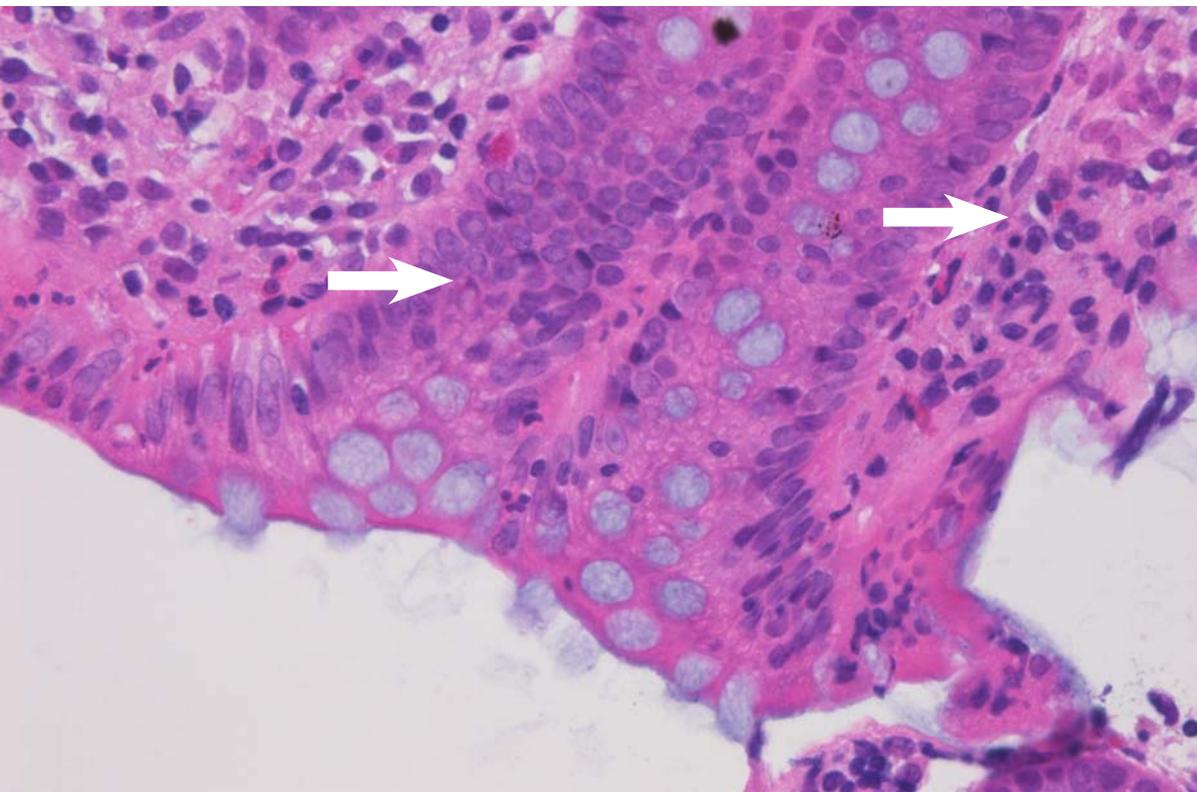
## Voreilige Schlüsse

Bei dem in Abbildung 34 dargestellten Beispiel baten Labormitarbeiter um Unterstützung, weil sie davon ausgingen, dass ein Problem beim Gewebeeinfiltrationsautomaten vorlag. Mehrere Schnitte aus einer Charge endoskopischer Biopsien zeigten abgegrenzte Bereiche mit schwacher Kerndarstellung und scheinbarer "Kernschmelze" (siehe Pfeile in Abbildung 34A). Eine sorgfältige Untersuchung benachbarter Abschnitte auf demselben Objektträger (Abbildung 34B) ergab, dass das Problem nicht bei der Infiltration lag, sondern durch unvollständige Wachsentsfernung vor der Färbung aufgrund von verunreinigtem Xylol in einem Färbeautomaten verursacht war. In diesem Fall hätte eine gründlichere Problemanalyse dem Personal erheblichen Stress erspart. Eine ausführliche Beschreibung dieses Problems findet sich unter "Kernschmelze" in Teil 2.



**Abbildung 34A**

Gut erkennbarer  
Infiltrationsartefakt in einer  
endoskopischen Biopsie



**Abbildung 34B**

Derselbe Bereich in einem  
benachbarten Schnitt

## Nicht nur zur Behebung des unmittelbar anstehenden Problems, sondern auch zur Vermeidung eines erneuten Auftretens ist es wichtig, die Ursache herauszufinden.

Dazu sollte eine zeitnahe Untersuchung durchgeführt werden. Wenn Sie den Infiltrationsautomaten nicht selbst eingerichtet oder aufgefüllt haben, sollten Sie mit den dafür zuständigen Mitarbeitern sprechen, solange die Erinnerung noch frisch ist. Wenn einiges dafür spricht, dass es sich um einen Fehler bei der Hard- oder Software des Geräts handelt, sollte so schnell wie möglich der Kundendienst des Gerätelieferanten hinzugezogen werden. Geräteprotokolle können wertvolle Hinweise auf den Fehler liefern.

Die Auswirkungen und einige Ursachen zu schwacher Infiltration werden nachfolgend erläutert.

## Auswirkungen zu schwacher Infiltration

Schwache Infiltration hat sowohl Makro- als auch Mikroeffekte auf den Probenblock.

### Makroeffekte:

#### Schwierige Schnitterzeugung

- Block hat ungünstige Beschaffenheit (zu hart, spröde oder weich)
- Block ist uneinheitlich (innen andere Beschaffenheit als außen)
- Block ist nicht zusammenhängend (Komponenten zerfallen)
- Schnitte lassen sich zusammendrücken (Gewebe ist instabil)
- Schlechte Schnittbandbildung (Schnitte lösen sich leicht voneinander)

#### Schwierige Schnittstreckung und Eindecken

- Schnitte schwitzen im Wasserbad (durchscheinende oder "nasse" Bereiche)
- Komponenten zerfallen im Wasserbad (können sogar "explodieren")
- Schnitte lassen sich nicht glätten (auch nicht bei kaltem Block)

#### Blockqualität verschlechtert sich bei der Lagerung

- Proben schrumpfen im Block (aufgrund von Evaporation des Lösungsmittels)
- Blöcke enthalten (aufgrund von vorhandenem Wasser) trübe Stellen

## Mikroeffekte:

### Schlechte physikalische Schnittqualität

- Schnitte weisen Lücken auf (große Risse, fehlende Bereiche)
- Schnitte haften schlecht an Objektträgern
- Schnitte sind rissig (grobe und feine Risse, wie "ausgedörrte Erde")
- Schnitte weisen eine ungleichmäßige Dicke (innerhalb eines Schnitts) auf

### Schlechte Morphologie (Gewebekonservierung)

- Schwache Kerndifferenzierung (Beschreibung der "Kernschmelze" siehe Teil 2<sup>1</sup>)
- Wenige zytoplasmatische Details
- Beschädigung spezieller Komponenten (z. B. Basalmembranen)
- Faserige Elemente sind schlecht erhalten (Kollagen, Retikulin, Elastin)
- Keine einheitliche Konservierung der Probe (äußere im Vergleich zu inneren Strukturen)
- Schlechte Färbung
- Keine einheitliche Färbung (innerhalb des Schnitts)
- Schlechte Kernfärbung<sup>1</sup> ("Kernschmelze" und/oder "Blaufärbung vorhanden" – weitere Informationen siehe Teil 2)
- Schlechte zytoplasmatische Färbung
- Extrazelluläre Komponenten schlecht differenziert

# Ursachen zu schwacher Infiltration

Häufigste Ursachen geringer Blockqualität:

1. Das Gewebe wurde vor der Infiltration nicht ausreichend fixiert (zu kurze Infiltrationsdauer, zu große Probe, Probe nicht geöffnet etc.). Leider haben Labormitarbeiter nur begrenzten Einfluss auf die ersten Phasen der Fixierung chirurgischer Proben. Erst nach dem Eintreffen der Proben im Labor können Maßnahmen zur Optimierung der Fixierung ergriffen werden. Dies ist besonders bei großen Proben wichtig, die geschnitten oder geöffnet werden müssen, um den Zugang des Fixiermittels zum Gewebe zu ermöglichen. Nach dem Zuschneiden kann als erster Bearbeitungsschritt eine zusätzliche Fixierung durchgeführt werden. Dies kann sehr hilfreich sein. Es sei daran erinnert, dass Gewebe, das ursprünglich unzureichend mit Formalin fixiert wurde, während der Bearbeitung durch Alkohol fixiert wird. Daraus kann eine auf bestimmte Zonen beschränkte Fixierung und unbefriedigende Morphologie resultieren.
2. Die Proben sind für das ausgewählte Protokoll zu dick. Dies kann problematisch sein, wenn Proben – insbesondere dichte Gewebe wie Uteruspräparate – von unerfahrenen Mitarbeitern zugeschnitten werden. Während der für die Bearbeitungsphasen festgelegten Zeitspannen können die Lösungsmittel nicht bis ins Zentrum der Proben vordringen, sodass keine vollständige Wachsinfiltration stattfindet und der Block sich nicht schneiden lässt. Optimale Ergebnisse werden mit 3 bis 4 mm dicken Gewebescheiben erzielt.
3. Das Gewebe ist für das ausgewählte Protokoll zu dicht. In manche sehr dichten Gewebe dringen Fixiermittel und Infiltrationsreagenzien nur sehr langsam ein. Faseriges Muskelgewebe, entkalkter Knochen und Knorpel, Keratin und Nägel oder Chitin sind Beispiele für dichte Gewebe, die auch bei dünnem Schnitt langsamer durchdrungen werden als die meisten anderen Gewebe.
4. Das Gewebe ist für das ausgewählte Protokoll zu fettreich. Große Brustpräparate oder Hautexzisionen, die große Mengen Unterhautfett enthalten, erfordern längere Protokolle, weil Fett die Entwässerung beeinträchtigt und in der Probe verbleibendes Wasser zu unvollständiger Klärung und Wachsinfiltration und somit zu geringer Gewebestabilität führt. Ethanol ist ein schlechtes Fettlösungsmittel – Isopropanol ist vorzuziehen. Bei Protokollen, die für fettreiche Proben vorgesehen sind, ist zusätzliche Zeit für die Entwässerung und Klärung vorzusehen.
5. Das Gewebe enthält Kalkablagerungen, die nicht durch vorherige Entkalkung entfernt wurden, oder Fremdkörper, Nahtmaterial, Klammern, synthetische Implantate etc. Das Problem hierbei ist, dass Kalkablagerungen und die meisten Fremdkörper unabhängig von der Einwirkdauer nicht von Reagenzien durchdrungen werden, sodass sie nicht durch Wachs gehalten werden und sich nicht schneiden lassen. Kleine Kalkmengen können durch Oberflächenentkalkung entfernt werden (siehe Lösung 6), aber bei größeren Mengen ist möglicherweise eine Rückführung zu Wasser, gefolgt von normaler Entkalkung, erforderlich. Das könnte beispielsweise der Fall sein, wenn nicht entkalkter Knochen versehentlich in einen normalen Filtrationslauf einbezogen wurde. Bei anderen Fremdkörpern kann es erforderlich werden, sie (nach Rücksprache mit dem Pathologen) vor der Infiltration von der Probe oder anschließend von der Blockoberfläche zu entfernen, um Schnitte zu ermöglichen.

6. Das Protokoll war zu kurz, was zu folgenden Probeneigenschaften führte:

- Nicht ausreichend fixiert
- Oder nicht ausreichend entwässert
- Oder nicht ausreichend geklärt
- Oder nicht vollständig mit Wachs infiltriert
- Oder eine Kombination der oben genannten Eigenschaften

Dieses Problem tritt meistens auf, wenn kleine und große Proben in derselben Charge infiltriert werden. Auch wenn das Protokoll für die Mehrzahl der Proben geeignet sein mag, werden die größten oder dichtesten Proben möglicherweise nicht vollständig infiltriert. Das passiert oft, wenn zur Erhöhung des Durchsatzes kürzere Protokolle angewendet werden, ohne die Probenarten oder -größen für die kürzeren Protokolle einzuschränken. Weitere Erläuterungen hierzu finden Sie unter "Kompromisse bei der Infiltration".

7. Das Protokoll war zu lang, was sich auf empfindliche oder sehr kleine Proben folgendermaßen auswirkte:

- Zu langes Einwirken der Dehydriermittel
- Oder zu frühes Einwirken hoher Dehydriermittelkonzentrationen (besonders bei schlecht fixiertem Gewebe)
- Oder zu langes Einwirken der Reinigungsmittel
- Oder zu langes Einwirken heißen Wachses
- Oder zu langes Einwirken hoher Temperaturen
- Oder eine Kombination der oben genannten Einflüsse

Zu starke Infiltration ist ein häufiges Problem bei kleinen Proben, die spezielle Gewebearten enthalten, wie beispielsweise Drüsenepithelgewebe (wie in endoskopischen Biopsien) sowie hämopoetisches und lymphatisches Gewebe. Wie oben bei 6 tritt dieses Problem meistens auf, wenn kleine und große Proben in derselben Charge infiltriert werden. Die überprozessierten Proben werden brüchig und können sehr schwierig zu schneiden sein. Weitere Erläuterungen hierzu finden Sie unter "Kompromisse bei der Infiltration".

8. Das Protokoll wurde nicht auf die zu bearbeitenden Probenarten zugeschnitten (beispielsweise erfordern Nagergewebe normalerweise eine andere Schrittdauer als Humangewebe). Auch wenn die Gesamtdauer angemessen erscheint, kann die Dauer einzelner Phasen ungeeignet sein. Einige Beispiele:

- Unzureichende Entwässerung vor dem Klären. Das bedeutet, dass die Probe noch Wasser enthält und unabhängig von der Einwirkdauer des Intermediums oder Wachses nicht vollständig geklärt oder infiltrierte werden kann.
- Zu starke Entwässerung vor dem Klären kann dazu führen, dass gebundenes (molekulares) Wasser aus der Probe entfernt wird. Bei empfindlichen Geweben, wie beispielsweise Schleimhautgewebe aus dem Darm, kann dies zu sehr spröden Blöcken führen<sup>27</sup>.
- Unzureichende Klärung vor der Wachsinfiltration kann bedeuten, dass das Gewebe aufgrund von Alkoholrückständen nicht ausreichend infiltrierte und deshalb im Block nicht ausreichend gehalten wird.
- Zu starkes Klären vor der Wachsinfiltration kann zu sprödem Gewebe führen. Auch hier sind wieder in erster Linie empfindliche Epithelgewebe betroffen.
- Zu kurze Infiltration bedeutet, dass Klärungsreagenzien in der Probe nicht vollständig durch Wachs ersetzt werden. Mit Klärungsreagenz gemischtes Wachs härtet nicht ausreichend, um das Gewebe zu halten, sodass es schwierig oder unmöglich wird, Schnitte zu erzeugen. Nach dem Schneiden und während der Lagerung kontrahiert sich die Oberfläche von Blöcken, die noch Klärungsreagenz enthalten, aufgrund der Evaporation des Lösungsmittels.
- Zu lange Infiltration kann bei empfindlichen Proben zu großer Härte, Sprödigkeit und Schrumpfung führen.

Bei den für den Gewebeinfiltrationsautomaten Peloris™ empfohlenen (1- bis 12-stündigen) Standardprotokollen sind die Schrittdauern für Entwässerung, Klärung und Wachsinfiltration wie in Tabelle 4 angegeben aufgeteilt. Diese Protokolle wurden ausgiebig getestet, und die empfohlenen Protokolle für andere Infiltrationsautomaten sind ähnlich aufgebaut. Die Schrittdauer für die Fixierung ist nicht in der Berechnung enthalten, da sie entsprechend den individuellen Laboranforderungen variiert.

**Tabelle 4. Anteil wichtiger Verarbeitungsschritte an der Gesamtschrittdauer (ohne Fixierung)**

Phase	Reagenz	Anteil (+/- 5%)
<b>Ethanol/Xylol-Protokolle</b>		
Entwässerung	Beinhaltet Ethanolreihe und absolute Alkohole	40 %
Klärung	Xylol	30 %
Infiltration	Wachs	30 %
<b>Xylolfreie Protokolle</b>		
Entwässerung	Beinhaltet Ethanolreihe und Ethanol-/Isopropanol-Gemische	35 %
Klärung	Isopropanol	30 %
Infiltration	Wachs	35 %

9. Ein Problem beim Programmieren oder Befüllen des Automaten:

- Falsches Protokoll aus den verfügbaren Optionen ausgewählt. Dies ist ein häufiger Grund für erneute Infiltration und ist auf Bedienfehler zurückzuführen. Große Proben, die nach einem kurzen 2-Stunden-Protokoll statt nach einem 8-Stunden-Protokoll infiltriert werden, werden deutlich unterprozessiert. Hier wird eine erneute Infiltration erforderlich. Sehr kleine Proben, die normalerweise nach einem 2-stündigen Protokoll infiltriert werden, schrumpfen und werden spröde, wenn sie acht bis zwölf Stunden infiltriert werden. In diesem Fall gelingt es nur noch mithilfe einiger "Tricks", Schnitte zu erzeugen.
- Körbe sind mit Kassette überladen. Dieses Problem tritt meistens auf, wenn Kassetten ohne Objektträgerhalter in Körbe gelegt werden und während der Infiltration nicht vollständig mit Reagenzien bedeckt sind. Gewöhnlich sind nur einige Kassetten ganz oben im Korb betroffen. Falsche Füllstände in der Prozessorretorte können sich ähnlich auswirken. Die Auswirkung auf die Gewebe ist davon abhängig, welche Reagenzien nicht mit den Proben in Kontakt gekommen sind.
- Kassetten sind mit Gewebe überladen. Dieses Problem tritt häufig in Laboren auf, in denen unerfahrene Mitarbeiter für den Probenzuschnitt zuständig sind. In überladenen Kassetten ist die Flüssigkeitszirkulation eingeschränkt, was zu einer schlechten Infiltration führt. Außerdem kann lokale Druckeinwirkung durch hervorstehende Teile des Kassettendeckels stellenweise die Morphologie des Gewebes beeinträchtigen.
- Verwendung ungeeigneter Kassetten. Die Kassettenform ist wichtig und beeinflusst die Infiltrationsqualität. Die Kassette muss das gesamte Gewebe, einschließlich kleiner Fragmente, sicher umschließen und freien Zugang der Infiltrationsreagenzien ermöglichen. Da viele verschiedene Kassettentypen im Handel sind, sollte die Auswahl nach diesem Kriterium getroffen werden. Für kleine Proben werden im Allgemeinen Feingitterkassetten, Biopsietücher oder Biopsieschwämmchen verwendet. Jedes dieser Trägermaterialien schränkt die Flüssigkeitszirkulation ein und erhöht geringfügig die Reagenzienverschleppung. Dem ist durch Auswahl eines geeigneten Infiltrationsprotokolls und Kompensation der verstärkten Reagenzienverschleppung beim Nachfüllen von Reagenzien Rechnung zu tragen.

#### 10. Ein Problem bei der Gerätewartung:

- Unzureichende Schulung der Mitarbeiter. Alle Mitarbeiter, die Infiltrationsautomaten bedienen und mit Routinewartungsaufgaben befasst sind, müssen umfassend geschult sein und die Gründe für bestimmte Abläufe sowie die Folgen ihrer Unterlassung kennen.
- Verwendung eines falschen Reagenzes beim Nachfüllen von Lösungsmitteln. Wird zum Beispiel fälschlicherweise 70 % Ethanol zum Nachfüllen eines Behälters verwendet, der 100 % Ethanol enthalten sollte, führt Ihr Infiltrationsautomat mit diesem Reagenz möglicherweise den letzten Entwässerungsschritt durch. Das würde bedeuten, dass keine vollständige Entwässerung stattgefunden hat und somit auch die nachfolgende Infiltration unvollständig abläuft. Dieses Problem kann schwer zu erkennen sein.
- Auffüllen von Lösungsmittelbehältern in der falschen Reihenfolge. Dies kann zu ähnlichen Ergebnissen führen wie oben beschrieben. Es ist zu beachten, dass ein mit dem richtigen Reagenz befüllter und korrekt beschrifteter Behälter vom Infiltrationsautomaten nicht korrekt erkannt wird, wenn er sich an der falschen Position befindet, was zu fehlerhafter Infiltration führt.
- Verwendung stark verunreinigter Reagenzien, die hätten ausgetauscht werden müssen (entsprechende Warnungen wurden ignoriert). Bei jedem Infiltrationslauf werden die verwendeten Reagenzien durch aus den Proben austretende Gewebeflüssigkeit, Fette und Fixiermittel verunreinigt. Außerdem werden durch Proben, Kassetten, Kassettenkörbe, Biopsieschwämmchen und -tücher sowie Komponenten der Retorte bei jedem Leeren und Neubefüllen der Retorte Reagenzien verschleppt. Es ist wichtig, feste Abläufe für den Austausch verunreinigter Infiltrationsreagenzien einzuhalten. Verunreinigte Reagenzien können zu unvollständiger Entwässerung, Klärung oder Infiltration und damit zu fehlerhafter Verarbeitung führen. Gerätehersteller geben Empfehlungen in Bezug auf den Zeitpunkt des Reagenzienaustauschs, die sich an der Zahl der bearbeiteten Körbe und Kassetten, dem Anteil der Kassetten, die Biopsieschwämmchen enthalten, etc., orientieren. Auf der Grundlage dieser Empfehlungen und der Erfahrung des Bedienpersonals sollten Regeln festgelegt werden, die strikt einzuhalten sind.
- Verwendung wiederaufbereiteter Reagenzien von unzureichender Qualität. Die Qualität von Infiltrationsreagenzien ist von großer Bedeutung. Manche Reagenzien sind nur begrenzt wiederaufbereitbar, und es ist daher notwendig, regelmäßig frische Reagenzien zu verwenden. Die Anweisungen von Lieferanten handelsüblicher Wiederaufbereitungsprodukte sind strikt einzuhalten.
- Starten des Reinigungszyklus vor der Entnahme der Proben. Wenn ein Kassettenkorb versehentlich in der Retorte verblieben ist, während das Wachs abgelassen und ein Reinigungszyklus gestartet wird, werden die Proben einem heißen Entwachungsmittel ausgesetzt und durchlaufen möglicherweise einen Alkohol- und einen Trocknungsschritt—je nachdem, wann der Fehler erkannt wird. In diesem Fall ist eine erneute Infiltration erforderlich, und es ist sorgfältig abzuwägen, an welchem Punkt der Vorgang am besten gestartet werden sollte und wie bei der erneuten Verarbeitung vorzugehen ist.

11. Ein Gerätefehler, der sich wie folgt auswirkte:

- Fehlendes Auffüllen, sodass Proben längere Zeit der Luft ausgesetzt sind und austrocknen. Fehlendes Auffüllen könnte in Kombination mit Retortenerwärmung ein Problem verursachen, aber bei den meisten Infiltrationsautomaten vom Flüssigkeitstransfer-Typ dauert es relativ lange, bevor Proben in einer abgedichteten Kammer austrocknen. Das Austrocknen von Proben ist ein Problem, das eher bei älteren Infiltrationsautomaten vom Gewebetransfer-Typ auftritt.
- Zu langes Verweilen von Proben in einem bestimmten Reagenz (wie beispielsweise absolutem Alkohol, Xylol oder Wachs). Dies kann, insbesondere bei kleinen, empfindlichen Proben, ernste Folgen haben und zu überprozessierten, extrem spröden Blöcken führen. Besonders gravierend ist das Einwirken heißer Reagenzien.
- Proben sind zu hohen Temperaturen ausgesetzt. Da moderne Infiltrationsautomaten mit Sicherheitsthermostaten ausgestattet sind, die Schutz vor Überhitzung gewährleisten sollten, ist diese Gefahr eher gering. Proben, die sehr hohen Temperaturen ausgesetzt werden, können irreparabel geschädigt werden.
- Proben werden verunreinigten Reagenzien ausgesetzt (beispielsweise mit Formalin verunreinigtem Wachs). Es liegen Berichte über defekte Ventile vor, die zur Verunreinigung von Wachs und Klärreagenzien geführt haben.<sup>21</sup> Die Folgen einer Verunreinigung mit Formalin sind bei Lösung 9e in Teil 3 beschrieben. Die Verunreinigung von Klärreagenzien (Xylol und Isopropanol) und Wachs hat die gravierendsten Folgen. Durch eine erneute Infiltration lassen sich aus Proben, die durch verunreinigte Reagenzien geschädigt wurden, schneidbare Blöcke erzielen, aber eine gewisse morphologische Schädigung wird bleiben.

## Kompromisse bei der Infiltration

Sind optimale Ergebnisse zu erwarten, wenn kleine und große Proben im selben Durchlauf infiltriert werden? Welche Auswirkung hat die Gesamtdauer eines Infiltrationsprotokolls auf die Infiltrationsqualität?

Das Diagramm in Abbildung 35 zeigt den Kompromiss, der erzielt wird, wenn bei einem Infiltrationslauf sehr kleine und sehr große Proben zusammen bearbeitet werden. Dies entspricht der hypothetischen Infiltration dreier sehr unterschiedlicher Proben. Die dargestellten Ergebnisse basieren auf der Erfahrung des Autors und einigen Labortests. Es geht hier um das zugrunde liegende Prinzip, nicht um die konkreten Ergebnisse.

Die "beliebige Qualitätsskala" steht für die Gesamtinfiltrationsqualität, die erzielbar ist, wenn eine bestimmte Probe nach einem Protokoll einer bestimmten Gesamtdauer verarbeitet wird ("Verarbeitungsdauer in Stunden"). Diesem Modell liegt die Annahme zugrunde, dass das Gewebe korrekt fixiert wurde und die Infiltrationsprotokolle korrekt eingeteilt wurden. Es wurden verschiedene Infiltrationsprotokolle mit einer Dauer von einer Stunde bis zu zwölf Stunden einbezogen. Die "Infiltrationsqualität" wird durch einen Wert zwischen eins und einhundert dargestellt, der durch Berücksichtigung der auf Seite 70 und 71 beschriebenen Makro- und Mikroeffekte schlechter Infiltration<sup>28</sup> berechnet wird. Die gelbe Linie beim Wert 50 markiert den Punkt, ab dem das Infiltrationsergebnis akzeptabel ist. Ein Wert von 80 – 90 entspricht hoher Infiltrationsqualität.

Zur Veranschaulichung des Problems wurden sehr unterschiedliche Probenarten ausgewählt. Eine empfindliche, 2 mm dicke endoskopische Biopsie lässt sich am besten nach einem 1- bis 3-stündigen Protokoll infiltrieren, während sich bei einem 3 mm dicken Myokardpräparat mit einer Protokolldauer von vier bis sieben Stunden optimale Ergebnisse erzielen lassen. Ein 5 mm dickes, keilförmiges Muttermundpräparat, das aus sehr dichtem Muskelfasergewebe besteht, kann eine Bearbeitungsdauer von acht bis zwölf Stunden erfordern, um gute Ergebnisse zu erzielen.

Das Diagramm zeigt, dass ein 3,5-stündiges Protokoll akzeptable Ergebnisse liefern würde, wenn die endoskopische Biopsie und das Myokardpräparat zusammen verarbeitet würden, während sich mit einem 7,5-stündigen Protokoll akzeptable Ergebnisse erzielen ließen, wenn Myokard- und Muttermundpräparat gemeinsam verarbeitet würden. Aus diesem Modell geht auch hervor, dass es nicht möglich wäre, ein "Kompromissprotokoll" zu finden, das zu akzeptablen Ergebnissen führen würde, wenn die endoskopische Biopsie und das Muttermundpräparat zusammen verarbeitet würden.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich hier um ein hypothetisches Modell handelt. Bei Verwendung anderer Infiltrationsautomaten und anderer Reagenzien ergäben sich im Detail abweichende Kurven, aber die Tatsache, dass es bei der Gewebeeinfiltration keine einheitliche, für alle Probentypen geeignete Vorgehensweise gibt, wird bei diesem Modell deutlich. Es ist unmöglich, sehr kleine, empfindliche Proben und große, robuste Proben nach demselben Infiltrationsprotokoll zu verarbeiten und für beide Probentypen optimale Ergebnisse zu erzielen.

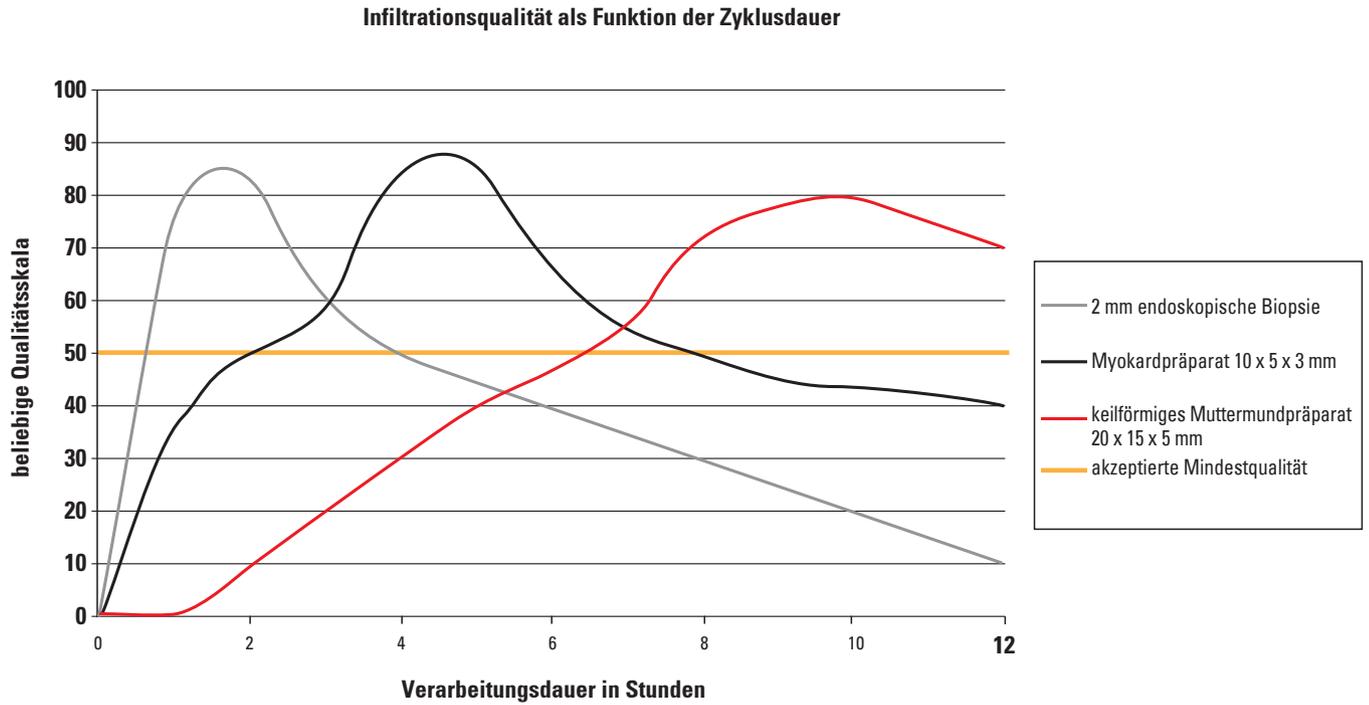


Abbildung 35



# Teil 5

## Bewertung

### Bewertung von Reinfiltrationsmethoden



## Bewertung von Reinfiltrationsmethoden

Die im vorliegenden Text enthaltenen Empfehlungen sind allgemeiner Natur und basieren auf Erfahrung und eingeschränkten Testreihen. Labore sollten Reinfiltrationsmethoden unter den für sie relevanten Bedingungen und mit den verfügbaren Geräten bewerten. Es ist sehr hilfreich, auf eine bewährte Methode zurückgreifen zu können, wenn erneute Infiltration erforderlich wird.

Empfohlene Vorgehensweise für die Bewertung:

Bei der Bewertung der im vorliegenden Text beschriebenen Reinfiltrationsmethoden wurde die nachfolgend erläuterte Methode angewandt. Sie ist leicht anzuwenden und für jedes Labor praktikabel, das eine Methode für den eigenen Gebrauch bewerten möchte.

1. Wählen Sie mehrere Probenotypen zum Testen aus. Dabei sollte es sich um schwierige Gewebearten handeln, die nach Ihrer Erfahrung am häufigsten von Infiltrationsproblemen betroffen sind. Gute Beispiele dafür sind große, fettreiche Brustgewebepreparate oder keilförmige Muttermundpreparate. Verwenden Sie überschüssiges Gewebe, das nicht mehr für diagnostische Zwecke benötigt wird. Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, sollten die Tests mit gut fixiertem Gewebe durchgeführt werden.
2. Wählen Sie ein Infiltrationsprotokoll aus, das Sie normalerweise für die ausgewählten Probenotypen verwenden würden, und bereiten Sie Gewebelöcke mit präzisen Abmessungen vor, die Ihrer Einschätzung nach mit diesem Protokoll ausreichend infiltriert werden müssten. Beispielsweise könnten Sie Blöcke aus Muttermundgewebe mit den Abmessungen 15 x 10 x 4 mm zuschneiden, für die normalerweise ein 8-stündiger Zyklus angemessen wäre.
3. Wenden Sie ein Protokoll an, von dem Sie wissen, dass es zu kurz ist, und betten Sie die Präparate normal ein. Beispielsweise könnten Sie die oben erwähnten Muttermundpreparate nach einem 2-stündigen Protokoll infiltrieren.
4. Vergewissern Sie sich, dass Ihre Proben nicht akzeptabel sind, indem Sie das Gewebe im Block freilegen und versuchen, zusammenhängende Schnitte zu erzeugen.
5. Wenden Sie die Reinfiltrationsmethode an, die Sie bewerten wollen. Wenden Sie als Ausgangspunkt für die Vorwärtsverarbeitungsphase (die letzte Phase) der Reinfiltrationsmethode ein Protokoll derselben Dauer an, die normalerweise für Proben der betreffenden Art und Größe angemessen wäre. Beispielsweise würden Sie die oben erwähnten Muttermundpreparate mit der ausgewählten Entwachs- und Rehydriermethode rückverarbeiten und sie anschließend nach einem 8-stündigen Protokoll vorwärtsverarbeiten.
6. Erzeugen Sie erneut Schnitte aus Ihren Blöcken, um sich zu vergewissern, dass die erneute Infiltration erfolgreich war.
7. Färben Sie die Schnitte nach verschiedenen Methoden, um zu ermitteln, ob sich deutliche Unterprozessierung, gefolgt von erneuter Infiltration, nachteilig auf die Färbung auswirkt. Bei Durchführung von Wiederherstellungsschritten sollte insbesondere die Anwendung von IHC und ISH erwogen werden.
8. Falls sich die Methode als geeignet erwiesen hat, legen Sie sie als Standardmethode fest.



Teil 6

Anhang

## Entscheidungsbäume für Reinfiltration

Da schlechte Blockqualität so viele mögliche Ursachen haben kann, muss bei der Entscheidung über die beste Vorgehensweise eine logische Abfolge eingehalten werden. Hier werden drei Entscheidungsbäume vorgestellt.

Entscheidungsbaum 1 bezieht sich auf Proben, die vor der Infiltration falsch behandelt wurden. Er deckt schlecht fixierte Proben sowie Proben mit nicht entfernten Verkalkungen ab. Für den unwahrscheinlichen Fall, dass Proben vor oder während der Infiltration vollständig austrocknen, ist Entscheidungsbaum 3 vorgesehen.

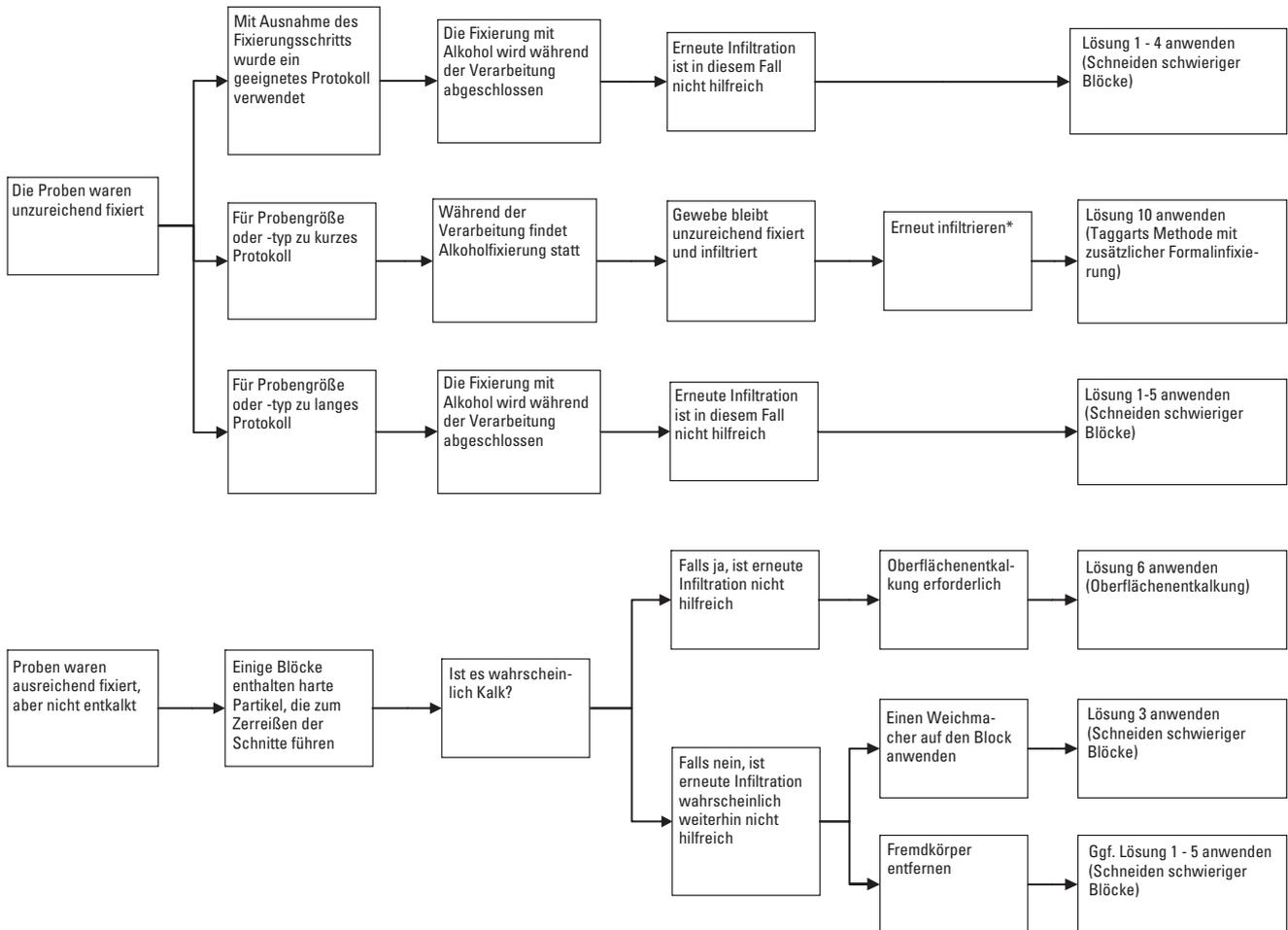
Entscheidungsbaum 2 bezieht sich auf den Fall, dass kein Geräte- oder Reagenzienfehler vorliegt, sondern ein ungeeignetes Protokoll angewendet wurde.

Entscheidungsbaum 3 gilt für Gerätefehler und Reagenzienprobleme.

### **WARNUNG:**

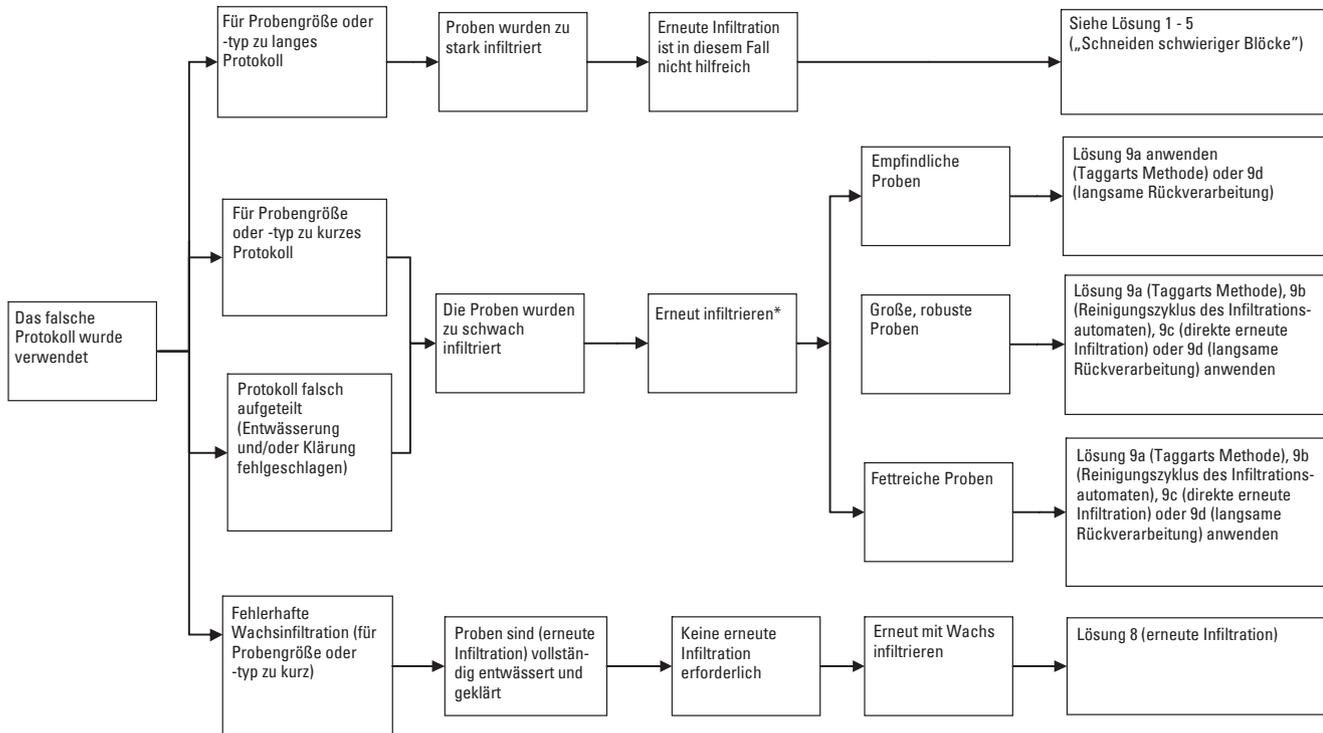
Die Entscheidung zur erneuten Infiltration sollte erst nach sorgfältiger Abwägung getroffen werden, da die Situation in manchen Fällen durch erneute Infiltration eher noch verschlimmert statt verbessert wird.

# Entscheidungsbaum 1: Unzureichende Fixierung oder Entkalkung



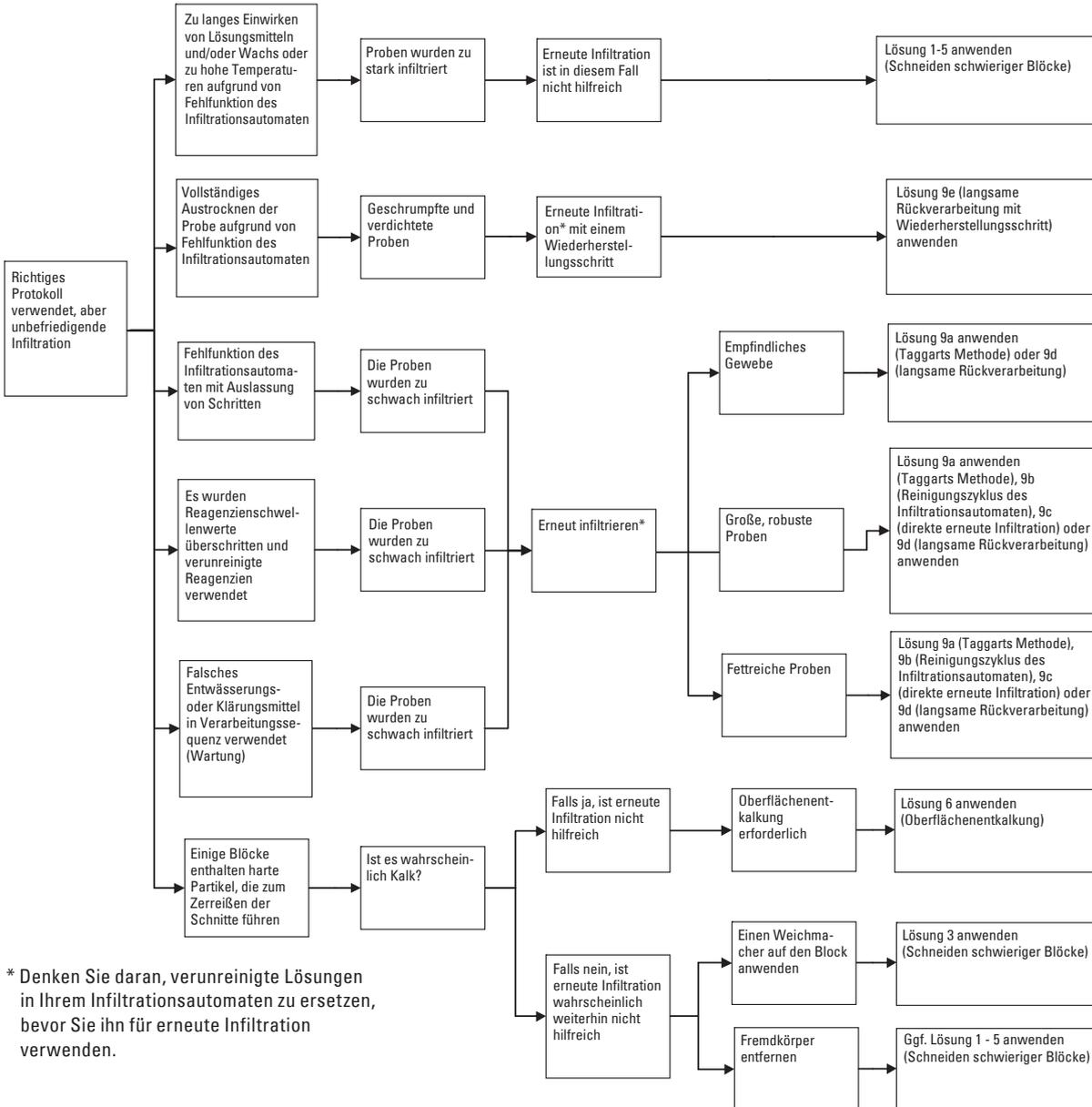
\* Denken Sie daran, verunreinigte Lösungen in Ihrem Infiltrationsautomaten zu ersetzen, bevor Sie ihn für erneute Infiltration verwenden.

## Entscheidungsbaum 2: Falsches Protokoll angewendet



\* Denken Sie daran, verunreinigte Lösungen in Ihrem Infiltrationsautomaten zu ersetzen, bevor Sie ihn für erneute Infiltration verwenden.

# Entscheidungsbaum 3: Gerätefehler oder Reagenzienprobleme



**Tabelle 5. Aufweichreagenzien zur Anwendung auf der Blockoberfläche**

Methoden	Zusammensetzung	Anwendung	Referenzliteratur
Eiswasser	Aqua dest.	Getrimmte Blockoberfläche einige Minuten auf schmelzendes Eis oder in eine Wanne mit Eiswasser (4 °C) legen und Block erneut schneiden.	Anderson <sup>10</sup> Carson <sup>27</sup> Culling <sup>21</sup> Drury & Wallington <sup>6</sup>
Baker	90 ml 60 % Ethanol 10 ml Glycerin	Getrimmte Blockoberfläche einige Minuten in die Lösung legen, mit Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Gray <sup>11</sup>
Carleton	0,2 % Teepol™ (oder anderes Detergenz) in Wasser	Getrimmte Blockoberfläche einige Minuten in die Lösung legen, mit kaltem Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Drury und Wallington <sup>6</sup>
Goodwin	5 Teile Ethanol 5 Teile Glycerin 1 Teil Teepol™	Für entkalkten Knochen oder dichtes Fasergewebe empfohlen. Gibt an, dass Einweichen über Nacht oder länger die Blöcke nicht beschädigt hat	Goodwin <sup>29</sup>
Weichspüler	5 ml Downy™ Weichspüler 100 ml destilliertes Wasser Gut vermischen, in beschriftetem Probenbehälter aufbewahren. 2 Monate stabil.	Block mit der Schnittfläche nach unten in die Lösung legen. 5-10 Minuten einwirken lassen. Kann auch zum Abwischen der Blockoberfläche vor dem Schneiden verwendet werden.	WebPath <sup>20</sup>
Mollifex™	Wasser, Ethanol, Methanol, Aceton, Glycerin, 4-Hexylresorcinol	Getrimmte Blockoberfläche einige Minuten in Mollifex™ legen, mit Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Culling <sup>21</sup> Gray <sup>11</sup> MSDS <sup>30</sup>
Kaliumhydroxid	10 % wässriges Kaliumhydroxid	Kann zum Aufweichen von Nagelpräparaten und dichtem Keratin nach Fixierung mit Formalin vor der Infiltration sowie auf Paraffinblöcke angewendet werden. Block mit der Schnittfläche nach unten in die Lösung legen. Einige Minuten einwirken lassen, gründlich mit Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Winsor <sup>22</sup>
Phenol	4 % wässriges Phenol	Block mit der Schnittfläche nach unten in die Lösung legen. Einige Minuten einwirken lassen, gründlich mit Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Winsor <sup>22</sup>

Methode	Zusammensetzung	Anwendung	Referenzliteratur
Ammoniak/ Tween™ Weichmacher	Zu gleichen Teilen 5 % wässriges Ammoniak mit 5 % wässrigem Tween80™ mischen	Block mit der Schnittfläche nach unten in die Lösung legen. Einige Minuten einwirken lassen, gründlich mit Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Dorevitch Pathology (Melbourne)
Nair™ oder Veet™	Thioglycolat- Rezepturen, die die Disulfidbindungen in Keratin aufbrechen	Blockoberfläche mit Lotion bedecken. Einige Minuten einwirken lassen, mit Wasser spülen, kühlen und erneut schneiden.	Winsor <sup>22</sup>

**Tabelle 6. Wiederherstellungsreagenzien oder Weichmacher zur Anwendung bei Proben**

Methode	Zusammensetzung	Anwendung	Referenzliteratur
Mekota (wird zur Wiederherstellung mumifizierten Gewebes eingesetzt)	0,2 % Comfort™ Weichspüler in 80 ml 5 % Natriumkarbonat 20 ml 4 % Formaldehyd (10 % Formalin)	Über Nacht in Lösung legen, anschließend 24 Stunden mit Formalin fixieren und normal weiterverarbeiten.	Mekota <sup>24</sup>
Baker (während der Infiltration verwenden oder auf die Schnittfläche eines Paraffinblocks geben)	90 ml 60 % Ethanol 10 ml Glycerin	Block einweichen, bis das Gewebe weich wird (1 bis 24 Stunden), anschließend normal weiterverarbeiten.	Gray <sup>11</sup>
Anderson und Gordon (zur Wiederherstellung von während der Infiltration ausgetrocknetem Gewebe)	70 ml 70 % Ethanol 30 ml Glycerin 1 g Dithionit	Gewebe mehrere Stunden (normalerweise über Nacht) einweichen, dann ab der Entwässerungsphase wie gewohnt verarbeiten.	Bancroft und Stevens <sup>10</sup>

Methode	Zusammensetzung	Anwendung	Referenzliteratur
Sandison (Aufweichen dehydrierter, ausgetrockneter, spröder oder ungewöhnlich harter, fixierter oder mumifizierter großer Gewebepreparate)	30 ml 96 % Ethanol 50 ml 1 % wäss. Formalin 20 ml 5 % wäss. Natriumkarbonat	Gewebe 12 bis 18 Stunden einweichen, dann ab der Entwässerungsphase wie gewohnt verarbeiten.	Thompson <sup>18</sup>
Luna (Aufweichen von vor oder nach der Fixierung ausgetrocknetem Gewebe – einschließlich getrocknetem Kadavergewebe, sowie zur Behandlung von schlecht infiltriertem Gewebe)	<b>Formol-Natriumacetat-Stammlösung:</b> 10 ml Formalin (38 % Formaldehyd) 2 g Natriumacetat 90 ml Wasser <b>Formol-Glycerin-Arbeitslösung:</b> 90 ml Formol-Natriumacetat-Stammlösung 10 ml Glycerin	Einweichen, bis das Gewebe weich wird (meist nach 5 – 8 Stunden) Keine Gewebeschädigung durch längeres Einwirken. Wie gewohnt weiterverarbeiten.	Luna <sup>15</sup>
Epitopdemaskierungslösung (BOND™ Epitope Retrieval Solution 2) oder Tris-Puffer	ER-Lösung pH 9 wie empfohlen verdünnt oder Tris – HCl Puffer pH 9	Gewebe je nach Größe, Typ und Zustand 1 – 12 Stunden einweichen. Durch Inkubation bei 65 °C kann die Wirkung dieser Reagenzien beschleunigt werden.	Wright <sup>31,32</sup>
Isotonische Kochsalzlösung	0,85 % wässriges Natriumchlorid	Gewebe je nach Größe, Typ und Zustand 1 – 12 Stunden einweichen. Durch Inkubation bei 65 °C kann die Wirkung dieses Reagenzes beschleunigt werden.	
Neutral gepuffertes Formalin	10 % Formalin in Phosphatpuffer mit pH 7,4	Gewebe je nach Größe, Typ und Zustand 1 – 12 Stunden einweichen.	



## Literaturverweise

1. Rolls GO, Farmer NJ, Hall JB. Artifacts in Histological and Cytological Preparations. 1. Auflage Melbourne: Leica Microsystems, 2008.
2. Luna LG. Questions in search of an answer (Question 4). *HistoLogic* 1988;XVIII;16.
3. Dayman ME. Response to questions in search of an answer. *HistoLogic* 1989;XIX;56 - 57.
4. Grizzle WE. The effect of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. *The Journal of Histotechnology* 2001;24;213-219.
5. Wynnchuk M. An Artifact of H&E Staining: The Problem and Its Solution. *The Journal of Histotechnology* 1990;13;193-198.
6. Drury RAB, Wallington EA. Carleton's Histological Technique. 5. Auflage Oxford: Oxford University Press, 1980.
7. Faolain EO, Hunter MB, Byrne JM et al. Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005;53;121-129.
8. Disbrey BD, Rack JH. Dehydration and clearing. *Histological Laboratory Methods*. Edinburgh: E. & S. Livingstone, 1970;43.
9. Clapp TR, Mellen PF. Rapid "Reprocessing" of Poorly Prepared Fatty Tissues. *The Journal of Histotechnology* 1998;21;65.
10. Anderson G, Gordon KC. Tissue processing, microtomy and paraffin sections. In Bancroft JD und Stevens A Hrsg. *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York: Churchill Livingstone, 1996;57.
11. Gray SJ. Practice of microtomy. *Essentials of Microtomy*. London: Butterworths, 1972;72.
12. Humason G. Paraffin sectioning and mounting. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W H Freeman and Company, 1972;61.
13. Johnson ml. A technique for correcting poorly processed paraffin blocks. *Histologic* 2003;XXXVI;21-22.
14. Lefebvre G. Reprocessing tissue blocks. *Histologic* 2001;XXXIV;42.
15. Luna LG. Method for reprocessing dried tissue specimens. *Histologic* 1978;VIII;111.
16. Mondragon G. Facts about alcohol dehydration of tissue samples. *Histologic* 2006;XXXIX;23.
17. Staples TC. Rehydration of biopsy specimens to facilitate sectioning. *Histologic* 1996;XXVI.
18. Thompson SW. Preparation of microscopic tissue sections. *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. Springfield: Charles C Thomas, 1966;137-138.
19. Taggart G. Taggart's reprocessing technique. Sydney: E-Mail an G Rolls, 6. August 2008.
20. WebPath: Internet Pathology Laboratory. Downy: Block softening solution. The University of Utah Eccles Health Sciences Library 2008; <http://library.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>; 19. Januar 2009
21. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique. 4. Auflage London: Butterworths, 1985.

22. Winsor L. Tissue Processing. In Woods AE und Ellis RC, Hrsg. Laboratory Histopathology. New York: Churchill Livingstone, 1994;4.2-37.
23. Leica. Paraffin Tape Transfer System. MyNeuroLab.com, 2009; <http://www.myneurolab.com/myneurolab/Products/ProductList.aspx/Histology+Products/Paraffin+Tape+Transfer+System/4/232>;
24. Mekota AM, Grupe G, Zimmerman MR, Vermehren M. First identification of an ancient Egyptian mummified human placenta. International Journal of Osteoarchaeology 2005;15;51-60.
25. Ciranni R, Castagna M, Fornaciari G. Goiter in an eighteenth-century Sicilian mummy. American Journal of Physical Anthropology 1999;108;427-432.
26. Verbov JL. Mummified skin - an exercise in preservation. International Journal of Dermatology 1983;22;46-60.
27. Carson FL. Histotechnology: A self-instructional text. 2. Auflage Chicago: ASCP Press, 1997.
28. Rolls GO, Farmer NJ, Tarbet F. Assessing the Quality of Tissue Processing and the Performance of Peloris™ using the Leica Microsystems Scoring System. Scientia Educational Materials and White Papers, 2005.
29. Goodwin JR. Strict serial sectioning with particular reference to bone and dense fibrous tissue. Histologic 1981;XI 1-2.
30. EMD Chemicals Inc. Mollifex™ Material Safety Data Sheet. 2008; [http://www.emdchemicals.com/analytics/doc/msds/MSDSU\\_65039.htm](http://www.emdchemicals.com/analytics/doc/msds/MSDSU_65039.htm); January 19, 2009
31. Wright KR. Research Antigen Retrieval Solution (Leserbrief). The Journal of Histotechnology 1994;17;81.
32. BioGenix. Datenblatt: H&E Retrieval Solution Cat No HK168-5K. San Ramon, Ca: BioGenix, 2004.





# „Mit dem Anwender, für den Anwender“ – Leica Microsystems

Leica Microsystems ist global in vier Divisionen tätig, die in ihrem jeweiligen Segment zu den Marktführern zählen.

## • Life Science Division

Die Life Science Division von Leica Microsystems erfüllt die Bildgebungsanforderungen der Wissenschaft mit höchster Innovationsfähigkeit und technischem Know-how für die Visualisierung, Messung und Analyse von Mikrostrukturen. Durch ihre Vertrautheit mit Forschungsapplikationen bringt die Division ihren Kunden den entscheidenden Vorsprung in der Wissenschaft.

## • Industry Division

Mit hochwertigen und innovativen Bildgebungssystemen für die Betrachtung, Vermessung und Analyse von Mikrostrukturen unterstützt die Industry Division von Leica Microsystems das Streben ihrer Kunden nach höchster Qualität und Ergebnissen. Ihre Lösungen werden bei industriellen Routine- und Forschungsanwendungen, in der Materialwissenschaft und Qualitätssicherung, in der Forensik und bei Schulungsanwendungen eingesetzt.

## • Biosystems Division

Die Biosystems Division von Leica Microsystems bietet Labors und Forschern in der Histopathologie eine umfassende Produktpalette in höchster Qualität. Diese Palette umfasst für jeden Arbeitsschritt in der Histologie das ideale Produkt – sei es für den Patienten, sei es für den Pathologen. Für die gesamte Laborumgebung stehen hochproduktive Workflow-Lösungen zur Verfügung. Mit kompletten Histologiesystemen, gestützt auf innovativer Automatisierung und Novocastra™-Reagenzien, fördert die Biosystems Division eine bessere Patientenversorgung durch schnelle Durchsätze, verlässliche Diagnosen und eine enge Zusammenarbeit mit dem Kunden.

## • Medical Division

Die Medical Division von Leica Microsystems unterstützt Mikrochirurgen in der Patientenversorgung und stellt ihnen als innovativer Partner qualitativ hochwertige Operationsmikroskope für aktuelle und zukünftige Belange zur Verfügung.

[www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)

Die fruchtbare Zusammenarbeit „mit dem Anwender, für den Anwender“ ist seit jeher Grundlage für die Innovationskraft von Leica Microsystems. Auf dieser Basis haben wir unsere fünf Unternehmenswerte entwickelt: Pioneering, High-end Quality, Team Spirit, Dedication to Science und Continuous Improvement. Diese Werte mit Leben zu erfüllen, heißt für uns: **Living up to Life.**

## Weltweit aktiv

Australien:	North Ryde	Tel. +61 2 8870 3500	Fax +61 2 9878 1055
Belgien:	Diegem	Tel. +32 2 790 98 50	Fax +32 2 790 98 68
Dänemark:	Ballerup	Tel. +45 4454 0101	Fax +45 4454 0111
Deutschland:	Wetzlar	Tel. +49 64 41 29 40 00	Fax +49 64 41 29 41 55
England:	Milton Keynes	Tel. +44 800 298 2344	Fax +44 1908 246312
Frankreich:	Nanterre Cedex	Tel. +33 811 000 664	Fax +33 1 56 05 23 23
Italien:	Mailand	Tel. +39 02 574 861	Fax +39 02 574 03392
Japan:	Tokio	Tel. +81 3 5421 2800	Fax +81 3 5421 2896
Kanada:	Concord/Ontario	Tel. +1 800 248 0123	Fax +1 847 236 3009
Korea:	Seoul	Tel. +82 2 514 65 43	Fax +82 2 514 65 48
Niederlande:	Rijswijk	Tel. +31 70 4132 100	Fax +31 70 4132 109
Österreich:	Wien	Tel. +43 1 486 80 50 0	Fax +43 1 486 80 50 30
Portugal:	Lissabon	Tel. +351 21 388 9112	Fax +351 21 385 4668
Schweden:	Kista	Tel. +46 8 625 45 45	Fax +46 8 625 45 10
Schweiz:	Heerbrugg	Tel. +41 71 726 34 34	Fax +41 71 726 34 44
Singapur		Tel. +65 6779 7823	Fax +65 6773 0628
Spanien:	Barcelona	Tel. +34 93 494 95 30	Fax +34 93 494 95 32
USA:	Buffalo Grove/Illinois	Tel. +1 800 248 0123	Fax +1 847 236 3009
Volksrepublik China:	Hongkong	Tel. +852 2564 6699	Fax +852 2564 4163
	Shanghai	Tel. +86 21 6387 6606	Fax +86 21 6387 6698

und Vertretungen in mehr als 100 Ländern

**Leica**  
MICROSYSTEMS