

MIKROTOMIE UND PARAFFINSCHNITTDARSTELLUNG



Knowledge
Pathway



Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives

Leica
BIO SYSTEMS

Einleitung

Die Präparation hochwertiger Schnitte für die Histopathologie erfordert Geschick und Erfahrung – aber wir haben ja alle einmal klein angefangen. Die vorliegende Broschüre soll Anfängern in der Mikrotomie und Präparation von Paraffinschnitten als Starthilfe dienen, während sie erfahreneren Histologen die Auffrischung des vorhandenen Wissens ermöglicht. Es werden die wichtigsten Aspekte angesprochen, die bei der Einrichtung und dem sicheren Betrieb eines Rotationsmikrotoms zur Darstellung von Paraffinschnitten zu beachten sind. Dabei werden auch einige der häufigsten Fehler besprochen, die zu suboptimalen Schnittergebnissen führen, und es werden Vorschläge gemacht, wie sich diese vermeiden lassen.

In dieser Broschüre finden Sie Abbildungen des manuellen Mikrotoms RM2235, jedoch gelten die hier gegebenen Empfehlungen und Anmerkungen gleichermaßen für die meisten modernen Rotationsmikrotome. Eine Beschreibung der technischen Daten und Sicherheitsfunktionen anderer Mikrotommodelle sowie die zugehörigen Gebrauchsanweisungen finden Sie in den Benutzerhandbüchern der jeweiligen Instrumente.



Knowledge Pathway

Autor

Geoffrey Rolls

Beiträge von

Claudia Dorenkamp

Neville Farmer

Jan Minshew

Kerrie Scott-Dowell

Fiona Tarbet

Inhalt

1.	Proben richtig fixieren	3
2.	Gewebe fachgerecht infiltrieren	4
3.	Proben sorgfältig einbetten	5
4.	Einen geeigneten Standort für das Mikrotom auswählen	6
5.	Sicherheitsfunktionen korrekt verwenden	7
6.	Klingenfreiwinkel optimal einstellen	9
7.	Klingenlebensdauer maximieren	10
8.	Proben präzise ausrichten	11
9.	Ausstattung des Mikrotoms und Anwendung von Zusatzfunktionen	13
10.	Vorsicht beim Trimmen, Fräsen und bei der Grobbearbeitung	14
11.	Faktoren, die die Schnittdicke beeinflussen	16
12.	Ausschließlich kalte Blöcke schneiden	17
13.	Technik zur Herstellung gleichförmiger, hochwertiger Dünnschnitte	18
14.	Richtige Auswahl von Objektträgern und Beschichtung	19
15.	Schnitte vorsichtig im Wasserbad aufschwimmen lassen	20
16.	Objektträger angemessen trocknen	22
17.	Mikrotom gründlich reinigen und instand halten.	23
18.	Häufige Fehler erkennen und korrigieren	24



1. Proben richtig fixieren

Der wichtigste Schritt bei der Präparation histologischer Proben ist die Fixierung. Sie können beim Infiltrieren und Schneiden des Gewebes noch so sorgfältig vorgehen, die wirklich wichtigen morphologischen Details werden nur erkennbar, wenn das Gewebe unverzüglich und fachgerecht fixiert wurde.

- » Unzureichend fixierte Proben lassen sich häufig wesentlich schlechter schneiden als gut fixierte.
- » Außerdem geht eine mangelnde Fixierung mit Defiziten in der Morphologie einher, selbst wenn nachfolgende Schritte wie Infiltration und Schnitterstellung optimal verlaufen.

2. Gewebe fachgerecht infiltrieren

Paraffinblöcke lassen sich nur dann mühelos schneiden, wenn eine gut fixierte Probe über eine angemessene Zeit korrekt infiltriert wurde.

- » Probleme resultieren sowohl aus der unzureichenden (Probe zu groß, Zeit zu kurz) als auch der übermäßigen (Zeit zu lang für Größe und Art der Probe) Infiltration. In beiden Fällen lassen sich die Blöcke nur schwer oder unter Umständen gar nicht schneiden.
- » Mit Hilfe verschiedener Techniken können auch aus schwierigen Blöcken noch Schnitte erstellt werden.
- » Wenn sich das Schneiden des Blocks problematisch gestaltet, weil das Gewebe hart oder brüchig ist, kann die freiliegende Fläche in kaltem Wasser oder einem Weichmacher getränkt werden, beispielsweise in einem milden Detergens, einem Gewebeweichmacher oder Mollifex.
- » Aus kalziumhaltigen Proben lassen sich unter Umständen mehrere Schnitte erstellen, wenn man einen Oberflächenentkalker verwendet und für 10 Minuten oder länger auf das freiliegende Gewebe einwirken lässt. Spülen Sie diese Blöcke gut ab, bevor Sie sie in den Probenhalter des Mikrotoms einsetzen und den Schneidevorgang fortsetzen, da Rückstände des Entkalkers die Andruckplatte des Klingenhalters beschädigen können.
- » Für schwierige Blöcke, die vielleicht unsachgemäß fixiert oder infiltriert wurden und daher mit den herkömmlichen Schneidverfahren nicht bearbeitet werden können, wird das Paraffin-Tape-Transfer-System empfohlen.
- » Falls Sie aus einem Block gar keine Schnitte erzeugen können, weil die Probe ungenügend infiltriert wurde, wird eventuell eine erneute Infiltration erforderlich.



Dieser Pankreasblock wurde unzureichend fixiert und nach einem viel zu kurzen Protokoll infiltriert. Er weist die typischen Zeichen einer mangelhaften Infiltration auf, die zu einer beträchtlichen Schrumpfung der Probe innerhalb des umgebenden Wachses führte. Das Gewebe erwies sich als weich und schwammig und ließ sich nicht schneiden. Daher war eine erneute Infiltration nötig.

3. Proben sorgfältig einbetten

Das Einbetten ist ein wichtiger Schritt, der umsichtig angegangen werden muss. Andernfalls können sich bei der Mikrotomie größere Schwierigkeiten ergeben.

- » Einerseits ist eine unzureichende Füllung der Einbettkassette zu vermeiden, da dies zur Instabilität bei der Einspannung im Mikrotom und somit zu variierenden Schnittdicken und anderen Problemen führen kann.
- » Andererseits darf die Kassette aber auch nicht überfüllt werden, weil dies die Ausrichtung der Schnittfläche des Blocks behindern könnte.
- » Vor dem Einspannen sollte überschüssiges Wachs von den Außenflächen der Kassette entfernt werden, um sicherzustellen, dass der Block beim Schneiden fest arretiert bleibt.
- » Darüber hinaus ist auf die richtige Probenausrichtung zu achten (siehe Punkt 8 auf Seite 11).



Beispiele für Kassettenfüllung: zu wenig Wachs (links), zu viel Wachs (rechts) und richtig befüllt (Mitte). Enthält die Kassette zu viel oder zu wenig Wachs, kann das zu Problemen bei der Schnittdarstellung führen.

4. Einen geeigneten Standort für das Mikrotom auswählen

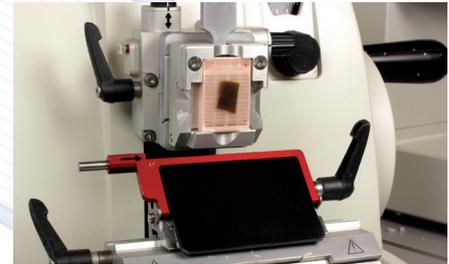
Die Bedeutung des Mikrotomstandorts im Labor ist nicht zu unterschätzen.

- » Stellen Sie das Mikrotom auf eine stabile Arbeitsfläche. Achten Sie auf ausreichenden Abstand zu Türen oder Durchgängen, die häufig von Mitarbeitern benutzt werden, und vermeiden Sie Zugluft. Jegliche Luftbewegung, wie sie auch unter Klimaanlage entsteht, kann die Handhabung der Schnitte massiv erschweren.
- » Vorzugsweise sind ein höhenverstellbarer Arbeitstisch und ein ergonomischer Stuhl anzubieten.
- » Die Anwender sollten bei der Arbeit am Mikrotom nicht abgelenkt werden, um Verletzungen durch die äußerst scharfen Klingen zu vermeiden. Aus Sicherheitsgründen ist bei der Aufstellung des Mikrotoms im Labor also auch die Möglichkeit der Ablenkung durch andere Mitarbeiter zu berücksichtigen.
- » In der direkten Umgebung des Mikrotoms ist es ratsam, einen rutschfesten Bodenbelag zu wählen, da bei der Arbeit am Mikrotom unweigerlich Schnittabfälle und Wachs auf den Boden fallen und die Rutschgefahr erhöhen. In vielen Labors entscheidet man sich für rutschfeste Matten, um die Arbeitssicherheit zu verbessern.

5. Sicherheitsfunktionen korrekt verwenden

Machen Sie sich mit den Sicherheitsfunktionen des von Ihnen bedienten Mikrotoms vertraut und beachten Sie beim Schneiden einige Grundregeln.

- » Mikrotommesser und Einwegklingen sind besonders scharf und können bei unsachgemäßer Handhabung ernsthafte Verletzungen hervorrufen. Arbeitsunfälle drohen insbesondere, wenn der Anwender abgelenkt oder unkonzentriert ist.
- » Nutzen Sie eine Pinzette oder einen Pinsel, um Schnitte zu manipulieren oder Wachsreste von der Klinge oder der Schnittfläche des Blocks zu entfernen.
- » Um einen sicheren Betrieb zu gewährleisten, sind die Rotationsmikrotome von Leica mit einem Fingerschutz, einer Handradverriegelung und einer Handradbremse ausgestattet.
- » Der Fingerschutz kann so eingestellt werden, dass die Messerschneide auf ihrer gesamten Länge abgedeckt ist.
- » Die Handradverriegelung, mit der der Objektkopf am oberen Anschlag des Schneidehubs arretiert wird, ist beim Wechseln von Blöcken zu aktivieren.
- » Bevor ein Block in die Kassettenklammer eingespannt oder aus ihr entfernt wird oder wenn der Block bei eingespannter Klinge manipuliert werden soll, muss der Fingerschutz verwendet und das Handrad verriegelt werden. Der Fingerschutz ist außerdem anzubringen, wenn das Mikrotom unbeaufsichtigt ist.



Diese Abbildung zeigt den roten Fingerschutz des Leica-Mikrotoms RM2235, wie er nach oben geklappt und damit in Position gebracht wurde. Er deckt die Messerschneide vollständig ab.



Hier ist die Handradverriegelung dargestellt. Das Handrad befindet sich in der 12-Uhr-Position und ist in dieser Stellung verriegelt. Die Verriegelung kann nur in dieser Position, am oberen Anschlag des Schneidehubs, aktiviert werden.

- » Mit der Handradbremse kann das Mikrotom in jeder beliebigen Handradposition arretiert werden. Sie kommt bei der Neuausrichtung eines Blocks oder beim Verstellen des Grobtriebs zum Einsatz.
- » Messer oder Klinge sollten aus dem Mikrotom genommen werden, wenn das Gerät unbeaufsichtigt bleibt oder gereinigt wird. Dazu wird die Klingleklemme gelöst, dann die Klingenauswurfhilfe aktiviert, die sich links am Fingerschutz befindet, um die Klinge schließlich seitwärts aus der Klammer zu schieben. Dann kann sie mit einer Pinzette oder einem Magneten gefasst werden. Verwenden Sie dazu nicht Ihre bloßen Finger. Gebrauchte Klingle sind ordnungsgemäß in einem Behälter für spitze und scharfe Abfälle oder in dem entsprechenden Fach im Boden des Klingendispensers zu entsorgen.
- » Messer und Klingle dürfen nie mit nach oben gerichteter Schneide auf die Arbeitsfläche oder in eine beliebige Kiste gelegt werden. Falls Ihnen eine Klinge aus der Hand rutscht, lassen Sie sie zu Boden fallen. Versuchen Sie unter keinen Umständen, sie aufzufangen. Das Greifen nach dem fallenden Gegenstand ist ein natürlicher Reflex, den Sie unterdrücken müssen.

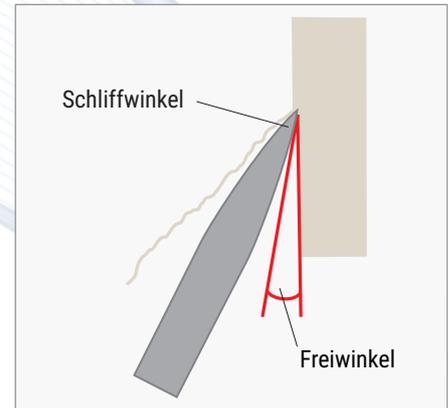


Diese Abbildung zeigt die arretierte Handradbremse des RM2235. Die Bremse kann in jeder beliebigen Handradposition aktiviert werden. Unerwünschte Mikrotombewegungen können über die Handradverriegelung oder Handradbremse verhindert werden.

6. Klingenfreiwinkel optimal einstellen

Der Klingenfreiwinkel ist verstellbar und muss eingestellt werden, um eine optimale Schnittqualität zu erreichen.

- » Der Freiwinkel verhindert, dass der Klingenschliff die Schnittfläche des Blocks berührt.
- » Der Schliffwinkel ist der Winkel zwischen den beiden Seiten, die die Messerschneide bilden. Für Routineschnitte eingesetzte Messer und Einwegklingen weisen einen Schliffwinkel von ca. 35° auf, wobei dieser Winkel je nach Klingentyp und Hersteller variieren kann.
- » Daher muss der Freiwinkel unter Berücksichtigung des Klingentyps eingestellt werden.
- » Richten Sie sich dabei nach den Empfehlungen des Mikrotomherstellers. Für Messer und Klingen von Leica wird ein Freiwinkel von 1-5° empfohlen¹.



7. Klingenlebensdauer maximieren

Ein paar einfache Tipps helfen, die Lebensdauer der Klingen zu verlängern.

- » Wenn Sie die Klinge reinigen, sollten Sie nichts an der Schneidkante entlangziehen. Selbst Zellstofffasern können diese beschädigen.
- » Berühren Sie die Schneidkante unter keinen Umständen mit harten Objekten wie einer Pinzette oder einem Pinsel.
- » Nutzen Sie die Klinge systematisch, von einem Ende zum anderen. So können Sie jeden Abschnitt der Klinge bestmöglich nutzen.
- » Verwenden Sie einen Klingenabschnitt zum Trimmen und einen anderen zur Schnittdarstellung oder wechseln Sie für diese beiden Vorgänge die Klinge.
- » Bei Mikrotomen mit Probenrückzug verlängert sich die Lebensdauer der Klingen dadurch, dass die Probe beim Aufwärtshub von der Klinge abgerückt wird und sich somit an der Klingenrückseite keine Rückstände ansammeln können.

8. Proben präzise ausrichten

Wie leicht sich beim Schneiden ein Schnittband erzielen lässt, ist unter anderem von der Ausrichtung der Probe zur Klinge abhängig. Damit nimmt die Probenausrichtung während des Schneidehubs auch direkten Einfluss auf die Schnittqualität.

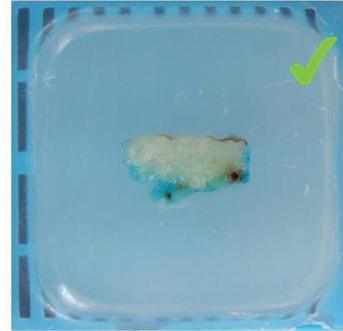
- » In den meisten Labors werden alle Kassetten mit derselben Ausrichtung in die Objektklammer eingesetzt, z. B. Beschriftungsfeld nach links bei waagrechter Ausrichtung oder Beschriftungsfeld nach oben bei senkrechter Ausrichtung. Dies erleichtert die Grobbearbeitung mehrerer Blöcke vor der Darstellung der endgültigen, hochwertigen Schnitte. Auch lassen sich auf diese Weise tiefere Schnitte oder Wiederholungsschnitte ohne übermäßige Gewebeerluste vornehmen. Die Ausrichtung der Proben zur Klinge muss daher bereits beim Einbetten berücksichtigt werden. Das wird oftmals übersehen.
- » Die Abbildung auf Seite 12 zeigt die bevorzugte Ausrichtung einiger typischer Proben. Sicherlich gibt es bei manchen Probentypen unterschiedliche Meinungen zur optimalen Ausrichtung – aber bezüglich der grundsätzlichen Bedeutung der Probenausrichtung ist man sich einig.
- » Beispiel A. Darm: Die Schleimhaut wird zuletzt passiert.
- » Beispiel B. Zervix: Es wird empfohlen, die Klinge an dichtem Gewebe anzusetzen, nicht an einer geraden Kante.
- » Beispiel C. Haut: Die Epidermis wird zuletzt geschnitten.
- » Mikrotome wie das RM2235 verfügen über eine Feinorientierung mit kalibrierten Bedienelementen, mit deren Hilfe sich ohne größere Mühe eine Nullposition oder eine definierte Position auf der x/y-Achse einstellen lässt. Diese Vorrichtung ist besonders beim erneuten Schneiden von Blöcken hilfreich, die in anderen Labors präpariert oder auf anderen Mikrotomen bearbeitet wurden. Eine präzise Ausrichtung hilft in diesen Fällen, unnötigen Gewebeerlust zu vermeiden. Beim routinemäßigen Schneiden mehrerer Blöcke ist darauf zu achten, dass der Probenhalter vor Beginn des Schneidevorgangs auf beiden Achsen in die Nullposition gebracht wird. Dies ist mit Hilfe der roten Indikatoren, der klickenden Einrastpunkte und der Markierungen mühelos möglich.



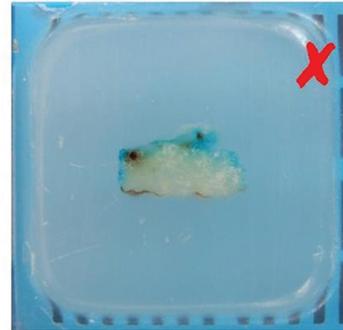
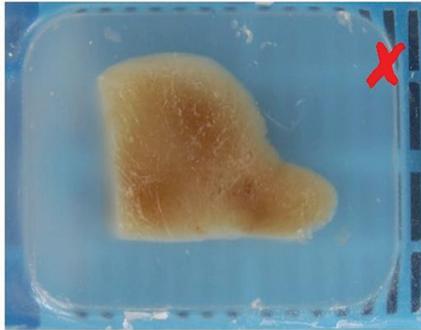
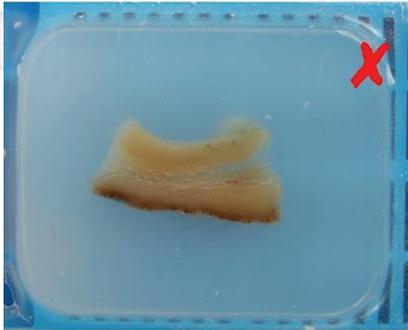
A. Darm



B. Zervix



C. Haut



↑ ↑ ↑ **Klinge** ↑ ↑ ↑

9. Ausstattung des Mikrotoms und Anwendung von Zusatzfunktionen

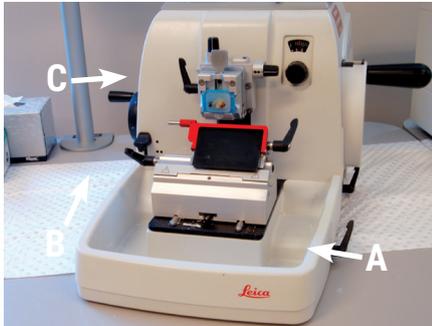
Bei Mikrotomen mit Probenrückzug wird die Probe im Aufwärtshub von der Klinge abgerückt. Vergewissern Sie sich, ob Ihr Mikrotom über einen derartigen Mechanismus verfügt.

- » Der Probenrückzug ist eine Funktion, die beim Schneiden wesentliche Vorteile bietet und die Lebensdauer der Klinge verlängert.
- » Bei Verwendung eines Mikrotoms mit Probenrückzug muss die Ausrichtung der Blockschnittfläche zur Messerschneide während des Abwärtshubs vorgenommen werden, also in der Vorwärtsposition, nicht während des Rückzugs.
- » Wenn der Block während des Probenrückzugs an der Messerschneide ausgerichtet wird, ergibt sich daraus in der nächsten Umdrehung des Handrads eine Vorwärtsbewegung um den Rückzugswert plus die ausgewählte Schnittdicke. Dabei wird ein besonders dicker Schnitt erstellt, wobei Probe und Klinge beschädigt werden können.
- » Mikrotome gibt es in manuellen, halbautomatischen und vollautomatischen Versionen.
- » Die automatischen Geräte erfordern weniger repetitive, manuelle Bewegungen, die zu Erkrankungen des Bewegungsapparats führen können.

10. Vorsicht beim Trimmen, Fräsen und bei der Grobbearbeitung

Diese Arbeitsschritte erfordern besondere Sorgfalt, da sie schnell zum irreversiblen Verlust oder der Beschädigung von diagnostisch relevantem Gewebe führen können.

- » Vergewissern Sie sich vor dem Trimmen grundsätzlich, dass alle Klemmvorrichtungen fest angezogen sind.
- » Beim Trimmen geht es darum, das Gewebe soweit freizulegen, dass an der neuerlichen Oberfläche ein repräsentativer Schnitt erzeugt werden kann.
- » Normalerweise wird mit einer Schnittdicke von 10-30 μm getrimmt.
- » Beim schnellen Grobtrimmen von sprödem Gewebe besteht eine besonders große Gefahr zur Beschädigung der Probenoberfläche². Seien Sie daher vor allem beim mechanischen Trimmen in 30- μm -Schnitten vorsichtig.
- » Zum Abschluss des Trimmens wird die Schnittfläche geglättet, indem einige Dünnschnitte abgetragen werden. Damit vermeiden Sie das in Abbildung 18B auf Seite 24 dargestellte Problem.



Der Klemmhebel A für die Messerhalterbasis, der Klemmhebel B für die seitliche Verschiebung sowie der Klemmhebel C für die x/y-Ausrichtung müssen fest angezogen sein, bevor Sie mit dem Trimmen beginnen. Andernfalls können der Block und die Klinge beschädigt werden.



Die mechanische Trimmvorrichtung ist vorsichtig einzusetzen, insbesondere bei der Grobbearbeitung in der unteren Einstellung, die einer Trimmschnittdicke von 30 μm entspricht und mit $\cdot\cdot$ gekennzeichnet ist.

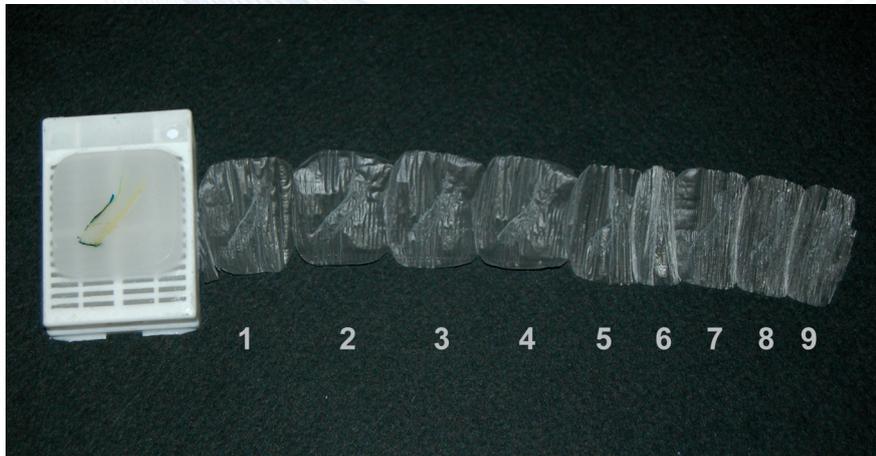


Konzentration ist auch bei der Betätigung des Grobtriebrads während der Grobbearbeitung geboten, um nicht ungewollt dicke Schnitte zu erzeugen und Schäden an der Probe zu vermeiden.

11. Faktoren, die die Schnittdicke beeinflussen

Stellen Sie die gewünschte Schnittdicke am Mikrotom ein. Beachten Sie aber, dass die tatsächlich erzeugte Schnittdicke von verschiedenen Faktoren abhängt.

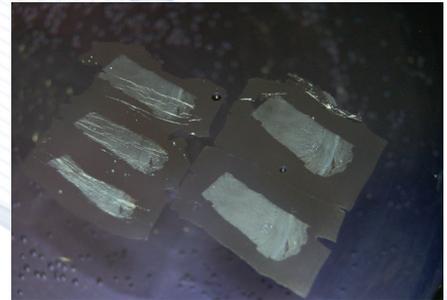
- » Ein kohäsiver Schnitt mit einer Dicke von 4 μm liefert unter Umständen mehr Informationen als ein Schnitt von 2 μm Dicke, der zahlreiche Brüche aufweist.
- » Beim Schneiden eines kalten Blocks kann es aufgrund der thermischen Ausdehnung passieren, dass die ersten Schnitte eines Schnittbands eine größere Schnittdicke aufweisen, als am Gerät angezeigt wird^{3,4}. Siehe dazu Schnitte 1, 2 und 3 in der nachfolgenden Abbildung.
- » Weitere Faktoren wie die Rotationsgeschwindigkeit, der eingestellte Freiwinkel und der Zustand der Messerschneide können die tatsächliche Schnittdicke ebenfalls beeinflussen.



12. Ausschließlich kalte Blöcke schneiden

Die Schnittqualität lässt sich häufig verbessern, wenn darauf geachtet wird, dass Probe und Wachs eine ähnliche Härte aufweisen. Aus diesem Grund sollten in den allermeisten Fällen kalte Blöcke geschnitten werden. Die Art und Weise, wie der Block gekühlt wird, ist wesentlich für das Schnittergebnis.

- » Kaltes Wachs bietet insbesondere den härteren Segmenten einer Probe besseren Halt und ermöglicht somit geringere Schnittdicken.
- » Legen Sie die Blöcke für einige Minuten auf eine Kühlplatte oder eine kalte, feuchte Oberfläche, z. B. auf schmelzendes Eis.
- » Wasser dringt in die oberen Schichten des Blocks ein und verursacht ein Aufschwellen des Gewebes, das sich so leichter schneiden lässt. Dies ist besonders bei zu stark entwässerten, trockenen oder brüchigen Proben maßgeblich.
- » Wenn Sie Ihre Blöcke stattdessen in ein Gefrierfach legen, können oberflächliche Risse entstehen, die aus einem Verlust der Adhäsion zwischen Gewebe und Wachs resultieren. Das erschwert die Darstellung bündiger, kohäsiver Schnitte.

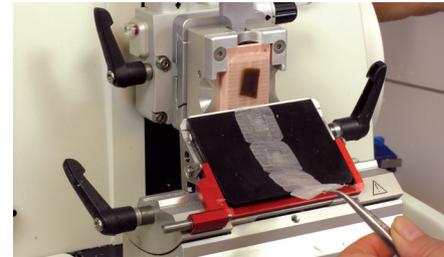


Die links dargestellten Schnitte wurden aus einem relativ warmen, nicht gekühlten Block erstellt. Die Schnitte auf der rechten Seite stammen aus demselben Block, der jedoch zuvor auf abschmelzendem Eis gekühlt wurde.

13. Technik zur Herstellung gleichförmiger, hochwertiger Dünnschnitte

Erfahrung lässt sich durch nichts ersetzen, aber es gibt gewisse Grundregeln, die den Weg zum erfahrenen Histologen und die anstehenden Aufgaben erleichtern.

- » Verwenden Sie einen Abschnitt der Klinge, der nicht zum Trimmen eingesetzt wurde.
- » Wenn Sie den Grobtrieb nutzen, achten Sie darauf, nicht ungewollt dicke Schnitte zu erzeugen, um Schäden an der Klinge und vor allem an der Probe vorzubeugen.
- » Wenn der Block warm wird oder tiefere Gewebeschichten dargestellt werden sollen, muss unter Umständen eine erneute Kühlung erfolgen.
- » Eine langsame, gleichförmige Schneidbewegung steht für minimale Gewebestauchung und liefert grundsätzlich die besten Ergebnisse.
- » Die Schneidbewegung darf nicht unterbrochen und dann fortgesetzt werden, da sonst innerhalb eines Schnitts Bereiche unterschiedlicher Dicke entstehen.
- » In manchen Labors ist es gängige Praxis, die Schnittfläche des gekühlten Blocks unmittelbar vor dem Schneiden vorsichtig anzuhauchen. Der warme, feuchte Atem fördert die interne Kohäsion der Schnitte, er führt jedoch auch zur thermischen Ausdehnung, was wiederum in dickeren Schnitten resultiert³.
- » Verunreinigungen an der Unter- oder Oberkante des Blocks oder der Rückseite der Klinge können die Kohäsion innerhalb eines Schnittbands beeinträchtigen und das Band während der Aufwärtsbewegung von der Klinge drängen. Entfernen Sie gegebenenfalls vorhandene Verunreinigungen, kühlen Sie den Block erneut und beginnen Sie dann von vorn.



Dieses Schnittband wurde in einer langsamen, gleichmäßigen Bewegung aus einem gut infiltrierten und gekühlten Block geschnitten. Die Schnitte weisen selbst vor dem Aufschwimmen kaum Anzeichen für eine Stauchung auf.

14. Richtige Auswahl von Objektträgern und Beschichtung

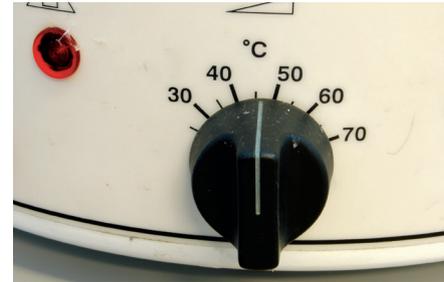
Objektträger und Beschichtung werden in Abhängigkeit von der anschließend einzusetzenden Färbemethode gewählt.

- » Objektträger müssen grundsätzlich fett- und staubfrei sein. Achten Sie außerdem auf eine ordnungsgemäße Lagerung und Handhabung.
- » Wenn eine immunhistochemische Färbung, eine Enzymvorbehandlung zur In-situ-Hybridisierung oder generell eine längere Inkubation vorgesehen ist, sind geladene Objektträger oder Beschichtungen wie Aminoalkylsilan (AAS) zu verwenden. Auch einige Spezialfärbungen, insbesondere jene, bei denen alkalische Reagenzien verwendet werden, können zur Ablösung der Schnitte führen.
- » Objektträger müssen immer exakt und entsprechend der jeweiligen Laborrichtlinien gekennzeichnet werden.

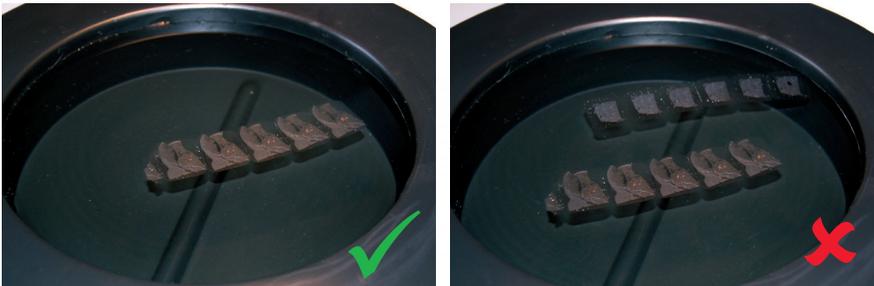
15. Schnitte vorsichtig im Wasserbad aufschwimmen lassen

Beim Aufschwimmen soll sich der Schnitt auf seine ursprünglichen Abmessungen ausdehnen und vollständig entfalten.

- » Achten Sie unbedingt auf die richtige Temperatur, die 5-9 °C unter dem Schmelzpunkt des Wachses liegen soll.
- » Vergewissern Sie sich, dass das Wasser sauber und frei von Blasen und Schnittresten ist, um einer Kreuzkontamination vorzubeugen.
- » Legen Sie die Schnitte mit der glatten, glänzenden Seite nach unten in das Wasserbad.
- » Platzieren Sie sie mit einer vorsichtigen, streichenden Bewegung auf der Wasseroberfläche.
- » Die Schnitte können leicht beschädigt werden, wenn Sie versuchen, Falten oder Blasen mit einem Pinsel oder einer Pinzette herauszustreichen.
- » Prüfen Sie die Schnitte an der Wasseroberfläche auf Fehler, die jetzt besonders gut erkennbar sind.
- » Lassen Sie die Schnitte nur so lange aufschwimmen, bis sie vollständig abgeflacht sind. Bleiben sie zu lange im Wasser, kann darunter die Morphologie in empfindlichen Gewebezonen leiden.
- » Nehmen Sie die Objektträger vertikal aus dem Wasser, damit das Wasser gut ablaufen kann. Auf diese Weise wird auch verhindert, dass der Schnitt vom Objektträger rutscht.



- » Halten Sie die Objektträger noch kurz senkrecht, um überschüssiges Wasser abtropfen zu lassen, bevor Sie sie in einen Trockner oder Wärmeofen legen.
- » Ziehen Sie die Wasseroberfläche zwischen Proben mit einem fusselfreien Tuch ab, um Gewebereste zu entfernen und einer Kreuzkontamination vorzugreifen.
- » Um Verwechslungen zu vermeiden, sollten Sie immer nur Schnitte aus ein und demselben Block im Wasserbad haben.



Schnitte aus zwei verschiedenen Blöcken dürfen nicht gleichzeitig im Wasserbad bearbeitet werden. Selbst wenn die Schnitte von unterschiedlichen Probentypen stammen, besteht ein erhöhtes Risiko für Verwechslung und Kreuzkontamination. Daher ist ein derartiges Vorgehen konsequent zu vermeiden.

16. Objektträger angemessen trocknen

Angemessenes Trocknen trägt wesentlich dazu bei, dass die Schnitte vollständig entwässert und geglättet sind, keine Wärmeschäden aufweisen und sich beim Färben nicht abheben.

- » Unter dem Schnitt befindliches Wasser muss vor dem Trocknen ablaufen können. Dies ist von besonderer Relevanz, wenn die Objektträger flach auf einer Wärmeplatte getrocknet werden sollen⁵.
- » Objektträger können senkrecht ins Rack gestellt und dann in einem Wärmeofen getrocknet werden.
- » In der Regel sollte die Trocknungstemperatur 65 °C nicht überschreiten.
- » Eine übermäßige Erwärmung beim Trocknen kann zum Sieden von Wassertropfen führen, die sich eventuell noch unter dem Schnitt befinden, was entsprechende Gewebeschäden hervorruft.
- » Die Trocknungszeit sollte 10-30 Minuten betragen.
- » Bei manchen empfindlichen Proben lassen sich bessere Ergebnisse erzielen, wenn für längere Zeit und bei 37 °C getrocknet wird. Hier kann der Trocknungsprozess mehrere Stunden dauern, erfolgt teilweise über Nacht.

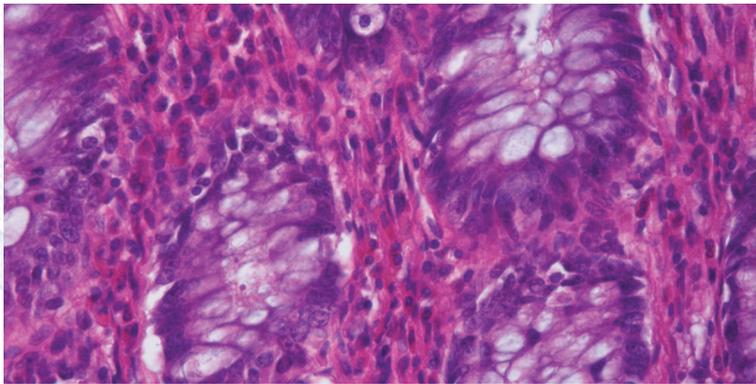
17. Mikrotom gründlich reinigen und instand halten

Gewebe- und Wachsreste sind nach jeder Verwendung des Mikrotoms zu entfernen. Außerdem ist eine regelmäßige vorbeugende Wartung zu empfehlen.

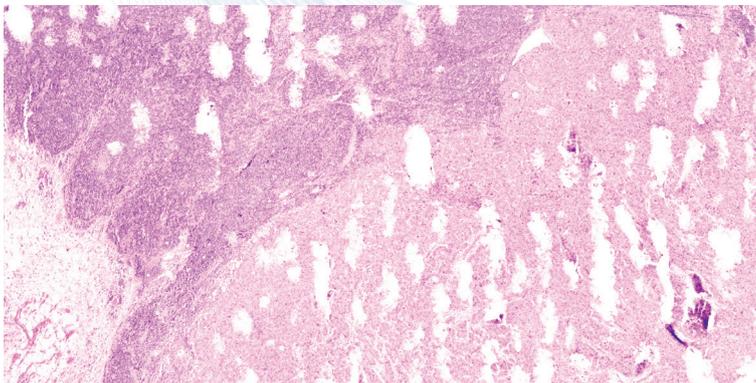
- » Reinigen Sie das Gerät täglich.
- » Entfernen Sie Messer und Klingen, bevor Sie mit der Reinigung beginnen.
- » Der Messerhalter lässt sich entnehmen, damit alle Bereiche gut zugänglich und leicht zu reinigen sind.
- » Entfernen Sie Schnittreste am besten mit einem trockenen Pinsel.
- » Die Außenflächen des Instruments dürfen nicht mit Alkohol oder Xylol gereinigt werden, da sie gegen diese Lösemittel nicht beständig sind. Generell ist die Exposition gegenüber Xylol zu vermeiden. Stattdessen werden ein Paraffinentferner, ein milder, handelsüblicher Haushaltsreiniger oder Wasser und Seife empfohlen.
- » Achten Sie darauf, dass bei der Reinigung keine Flüssigkeit in das Innere des Geräts gelangt.
- » Lassen Sie das Gerät mindestens einmal jährlich durch einen qualifizierten Servicetechniker überprüfen.
- » Befolgen Sie die im Gerätehandbuch vermerkten Wartungshinweise und verwenden Sie die empfohlenen Schmiermittel.

18. Häufige Fehler erkennen und korrigieren

Die folgenden Fehler treten bei Paraffinschnitten häufig auf:



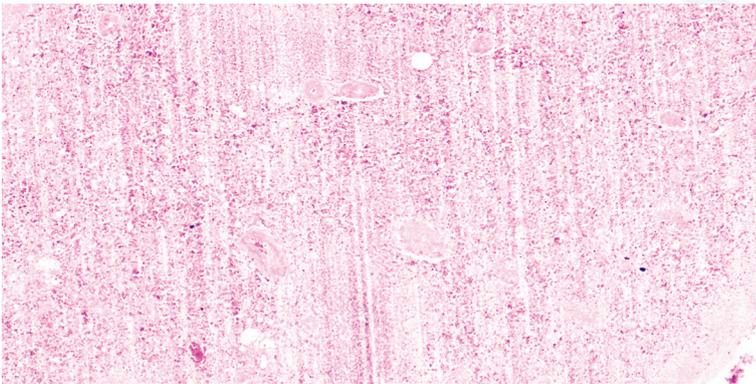
A. Schnitt zu dick



B. Löcher infolge des Trimmens

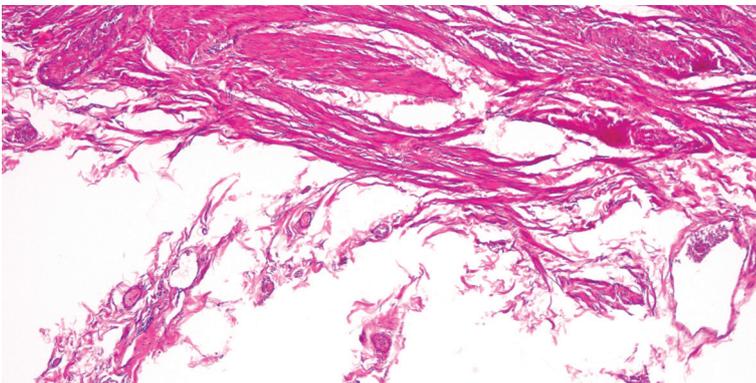
- » Mikrometer falsch eingestellt
- » Anhauchen des kalten Blocks, um das Schneiden zu erleichtern
- » Erster Schnitt eines Schnittbands
- » Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- » Unzureichende Infiltration
- » Neukalibrierung des Mikrotoms erforderlich

- » Block wurde zu schnell getrimmt
- » Schnittfläche nach dem Trimmen nicht durch Dünnschnitte geglättet
- » Falsche Schnittdicke beim Trimmen
- » Getrimmter Block spröde (übermäßige Infiltration?) oder zu kalt



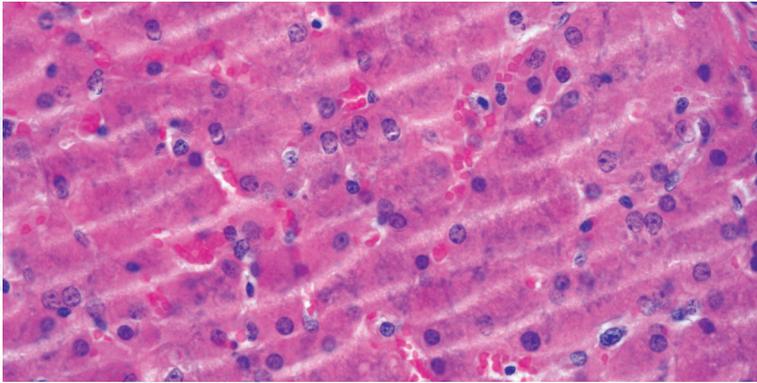
C. Klingenspuren (vertikale Riefen im Schnitt)

- » Messer oder Klinge beschädigt
- » Unzureichende Infiltration
- » Block enthält harte Segmente, z. B. Kalk
- » Verunreinigungen in ungefiltertem Wachs
- » Ausfall von Puffersalzen in der Probe



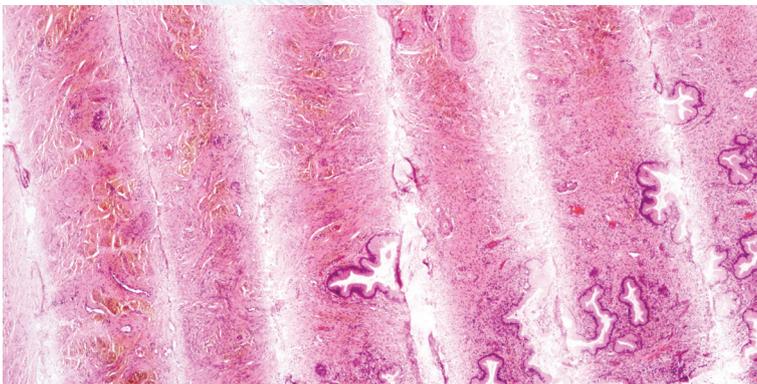
D. Gewebebrüche

- » Unachtsame Handhabung der Probe beim Trimmen
- » Unzureichende Infiltration (unvollständige Entwässerung, Klärung oder Infiltration)
- » Grobes Vorgehen zur Entfernung von Falten beim Aufschwimmen
- » Zu lange Verweilzeit im Wasserbad oder zu hohe Temperatur des Wasserbads



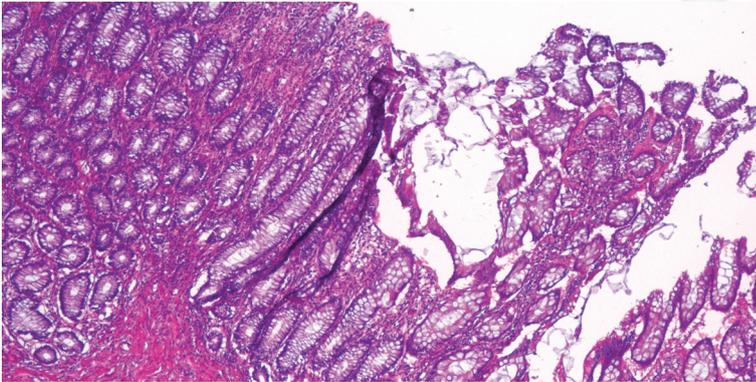
E. Feinrisse oder feine Rattermarken

- » Übermäßige Infiltration des Gewebes
- » Block zu kalt
- » Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- » Klemmvorrichtungen nicht fest angezogen
- » Freiwinkel falsch eingestellt



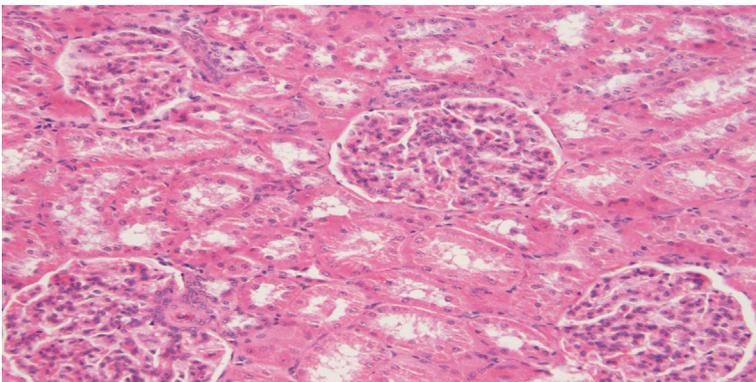
F. Grobe Rattermarken

- » Klemmvorrichtungen nicht fest angezogen
- » Sehr harte oder sehr große Probe
- » Unzureichende Infiltration
- » Freiwinkel zu klein
- » Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- » Mikrotomverschleiß



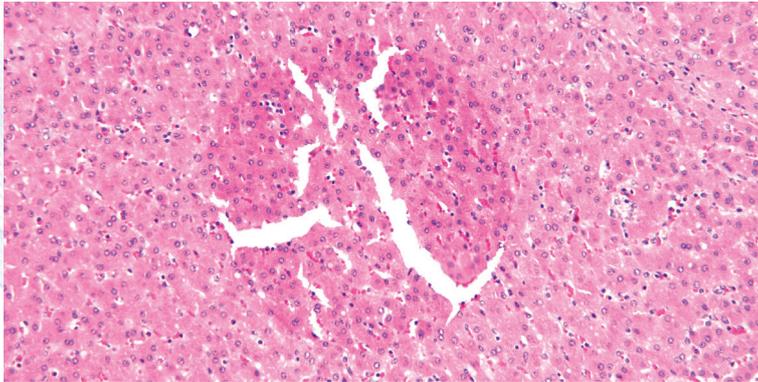
G. Falten

- » Fehler beim Aufschwimmen
- » Unzureichende Fixierung oder Infiltration (Gewebe hat keinen Halt)
- » Warmer Block
- » Schnitt zu dünn
- » Freiwinkel zu groß
- » Wasserbad zu heiß



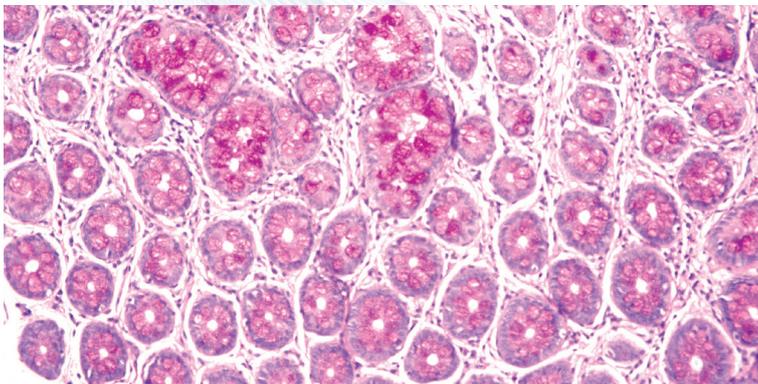
H. Deutliche Gewebestauchung

- » Unzureichende Infiltration (Gewebe hat keinen Halt)
- » Warmer Block
- » Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- » Messerschneide stumpf
- » Freiwinkel zu groß
- » Wachs schlechter Qualität



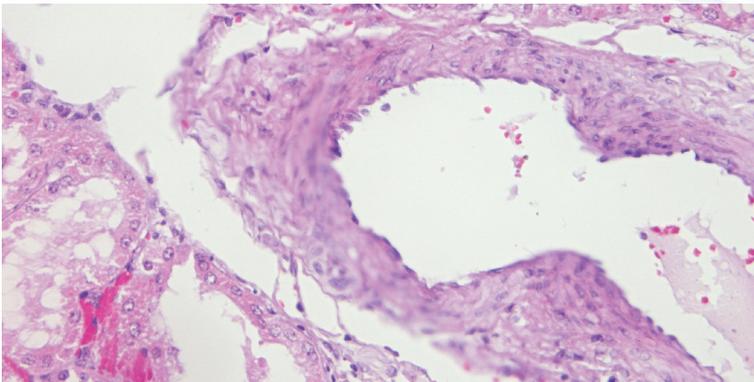
I. Blasen unter dem Schnitt

- » Blasen am Boden und an den Wänden des Wasserbads
- » Probleme beim Aufziehen mit Blasenbildung unter dem Schnitt

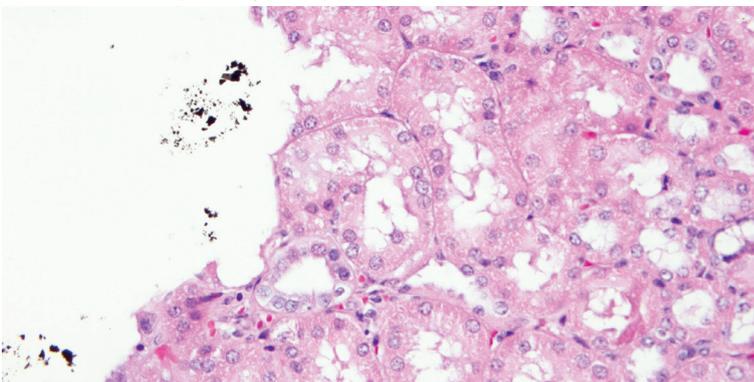


J. Zu starke Ausdehnung während des Aufschwimmens

- » Wasserbad zu heiß
- » Verweildauer des Schnitts im Wasserbad zu lang
- » Unzureichende Fixierung oder Infiltration (Lösungsmittelrückstände)



K. Nicht abgeflachter Schnitt mit schlechter Haftung am Objektträger



L. Staubreste

- » Unzureichende Schnittqualität (Falten, Blasen)
 - » Wasserbad zu kalt
 - » Verwendung nicht beschichteter Objektträger
 - » Schnitt nach dem Aufschwimmen nicht ausreichend abgetropft
 - » Trocknungszeit zu kurz
 - » Trocknungstemperatur zu niedrig
-
- » Objektträger verschmutzt
 - » Wasseroberfläche nicht abgezogen oder Wasserbad kontaminiert
 - » Objektträger mit Schnitten in staubiger Umgebung abgetropft, getrocknet oder gelagert
 - » Reste der Bleistiftmine nach Beschriftung

Referenzen

1. Leica Biosystems Instruction Manual Leica RM2235 V1.3 Nussloch: Leica Biosystems 2008.
2. Rolls GO, Farmer NJ, Hall JB. Artifacts in Histological and Cytological Preparations (Artefakte bei der histologischen und zytologischen Präparation). Melbourne: Leica Biosystems 2008, 106.
3. Rolls G. 101 Steps to Better Histology (101 Schritte zu einer besseren Histologie). Melbourne: Leica Biosystems 2008.
4. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique, 4th ed. (Zellulärpathologietechnik, 4. Ausg.). London: Butterworths, 1985.
5. Santoianni RA, Hammami A. Nuclear Bubbling an Overlooked Artifact (Nukleare Blasenbildung eines übersehenen Artefakts). The Journal of Histotechnology, 1990;13;135-136.

LeicaBiosystems.com/de/



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

knowledgepathway.com

LEICA BIOSYSTEMS

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

Copyright © 2021 Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd, Melbourne, Australien. Alle Rechte vorbehalten.
LEICA und das Leica Logo sind eingetragene Warenzeichen der Leica Microsystems IR GmbH.
Andere Logos, Produkt- und/oder Unternehmensnamen können Markenzeichen der jeweiligen Eigentümer sein.

210550 Rev A - 04/2021