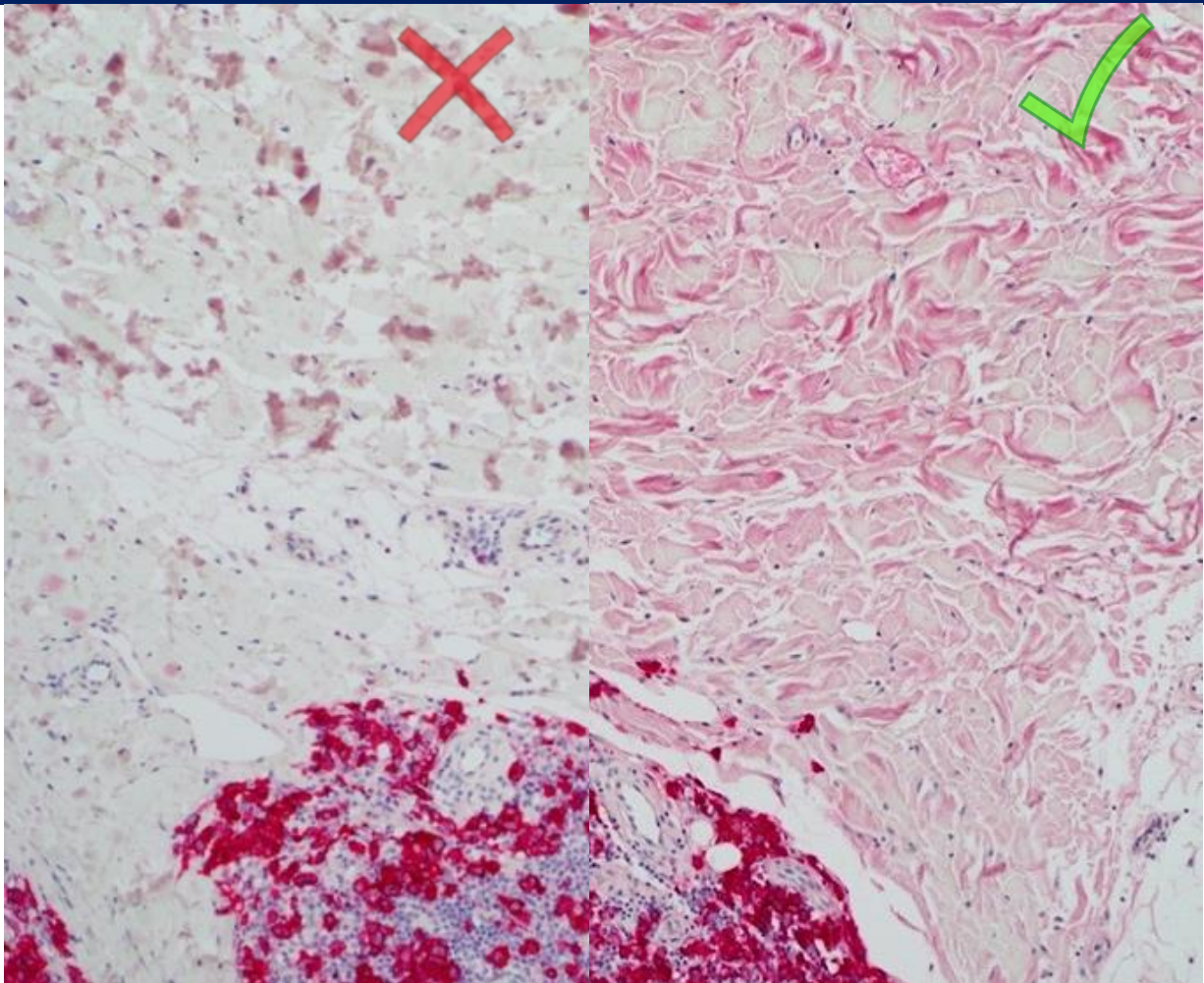


Methodenevaluierung

Zur Verminderung des Aufbrechens von
Kollagen in der Haut bei
immunhistochemischen Färbungen



Steinmann Alessandra
Praxisorientierte Diplomarbeit
Careum AG Bildungszentrum für Gesundheitsberufe
Höhere Fachschule für Biomedizinische Analytik
H17
Mai 2020 Labor Kempf und Pfaltz

Vorwort

In erster Linie möchte ich mich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin Daniela Joseph für die motivierenden Worte und ihre Geduld bedanken. Dafür, dass sie sehr viel Zeit investiert hat, die Arbeit gegen zu lesen und adäquate Rückmeldungen zügig kommunizierte.

Mein Dank gebührt auch meiner Chefin Sahika Marszewski, die mir die Zeit für Versuche und Fragen bezüglich dieser Diplomarbeit generös zur Verfügung gestellt hat.

Zudem möchte ich Alexander Benz danken. Als Facharzt war er eine grosse Hilfe, um die Korrektheit, betreffend der Theorie der Immunhistochemischen (IHC) Färbungen Melan A und CD30, zu bestätigen und diese zu ergänzen.

Ausserdem danke ich Susanne Härri von BioSystems, die jederzeit als Beraterin für Fragen zur Verfügung stand. Ihr Wissen bezüglich der Problematik bei den Versuchen war äusserst wertvoll.

Ich bedanke mich beim gesamten Laborteam für die harmonische Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich noch meinem Freund, meiner Familie und Freunden danken. Dafür, dass sie mir während der ganzen Zeit sehr viel Geduld und Verständnis entgegenbrachten.

In der vorliegenden Arbeit wird für die bessere Lesbarkeit die männliche Schreibweise verwendet. Damit sind selbstverständlich immer beide Geschlechter gemeint

Persönliche Erklärung

“Ich bestätige, die vorliegende schriftliche Arbeit mit dem Thementitel;

Methodenevaluierung

Zur Verminderung des Aufbrechens von
Kollagen in der Haut bei
immunhistochemischen Färbungen,

selbstständig verfasst zu haben.

Sämtliche Inhalte, die nicht von mir stammen, sind als Zitate gekennzeichnet und mit genauer Quellenangabe versehen, die im Literaturverzeichnis vollständig aufgeführt sind“

Alessandra Steinmann
BMA H17

Zürich, Mai 2020



Alessandra Steinmann

Glossar

Begriffe	Definition/ Erklärung
Anaplasie	Zustand von fehlender Differenzierung bei Zellen. Schnell wachsende maligne Zellen
Dermatansulfat	Saures Glykosaminoglykan, ein Bestandteil, das u.a. in Blutgefäßen, Haut und Sehnen vorkommt
Dextranpolymer	Dextran ist ein bakterielles Reservepolysaccharid, welches sich im Polymer aus gleichartigen Makromolekülen zusammensetzt
Fibronektin	Universelles Adhäsionsmolekül (Glykoprotein) bindet Zellen an Kollagen
Fusion	Verschmelzung
HIER	Heat induced Enzyme retrieval, auf Deutsch: Wärmeinduzierte Enzym Retribution. Zur Enttarnung der Epitope
Helikal	Spiralförmig auch Helixstruktur
In-situ-Hybridisierung	Methode weist DNA und RNA am Schnittpräparat (in situ) nach
Melanozyt	Pigmentbildende Zellen
Nävuszellnävus (NZN)	Braun bis schwarze Pigmente (Nävi) der Haut, die aus Nävuszellen gebildet werden
Polypeptid-Kette	Aminosäuren, die als Bausteine immer auf dieselbe Weise verbunden sind
Ratio	Verhältnis, Quotient
Zyklisch (Alkohol)	Molekül mit kreisförmig angeordneten Atomen

Zusammenfassung

Das verbreitete Intermedium Xylol wird in vielen Laboratorien bei der Dehydrierung und im Färbeprozess als Standard verwendet. Im Institut Kempf und Pfaltz gehört Xylol seit kurzem der Vergangenheit an. Das Institut legt Wert auf eine umweltfreundliche Arbeitsumgebung ohne schädigende Dämpfe. Folglich ist man im gesamten Arbeitsprozess von Xylol auf Isopropanol umgestiegen. Ein Intermedium mit erträglicherem Geruch. Wie die untenstehenden Bilder zeigen, bewirkte dies in der IHC eine schlechtere Darstellung des Kollagens.

Um das Kollagen morphologisch zu optimieren wurde der Arbeitsprozess adaptiert. Zur Verfügung standen 10 archivierte Hautproben. Die Proben wurden eigenständig zugeschnitten, dehydriert und ausgegossen. Für die Durchführung der Immunfärbungen wurden zwei der häufigsten IHC Färbungen, bei Kempf und Pfaltz gewählt. Nämlich Melan A und CD30. Die Darstellung des Kollagens ist bei diesen zwei Färbungen am schlechtesten. Zudem erschwert das aufgebrochene Kollagen das Scannen der Schnitte. Auf die Färbungen wird nicht vertieft eingegangen. Sie fungieren in dieser Arbeit nur als Instrument für eine bessere Vergleichbarkeit.

Der praktische Teil umfasst den Streckvorgang der Schnitte auf dem Warmwasserbad, mit und ohne anschliessendem Strecken auf der Streckplatte. Die Trocknungszeit der Schnitte im Ofen und die Schnittdicke. Der Färbeprozess im Gerät Leica Bond III bei Melan A und CD30 wurde angepasst. Es zeigte sich, dass vor allem die Hitze bei der Vorbehandlung für das Aufbrechen des Kollagens verantwortlich ist. Wird die Temperatur bei CD30 reduziert, entsteht eine rötliche Hintergrundfärbung (Hgf). Es mussten noch weitere Versuche unternommen werden, da das Ergebnis noch nicht zufriedenstellend war. Anpassungen, die eine Verbesserung der Darstellung bewirkten, sind bei nachfolgenden Versuchen übernommen worden.

Am Schluss des praktischen Teils wurde der Wunsch-Zustand mit dem Ist-Zustand mikroskopisch verglichen. Entsprechen die Resultate dieser Diplomarbeit den Erwartungen des Facharztes, werden sie als Standard in der Routine etabliert. Die Schnitte könnten somit wieder adäquat gescannt werden.

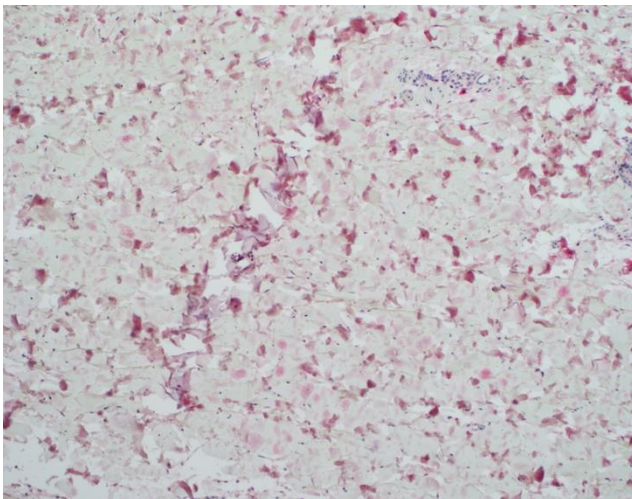


Abbildung 1: Aufgebrochenes Kollagen bei CD30. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

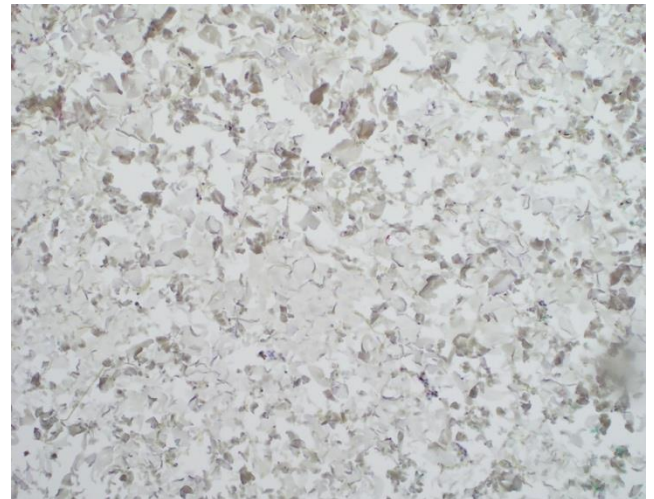


Abbildung 2: Aufgebrochenes Kollagen bei Melan A. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

Inhaltsverzeichnis:

Vorwort.....	I
Persönliche Erklärung.....	II
Glossar.....	III
Zusammenfassung.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Zielsetzungen.....	1
1.3 Fragestellungen.....	1
1.4 Vorgehen.....	2
1.5 Vorschau.....	2
2 Theorie.....	3
2.1 Anatomie der Haut	3
2.2 Aufbau von Kollagen.....	4
2.3 Dehydrierung.....	5
2.4 Isopropanol.....	5
2.5 Immunhistochemie.....	6
2.6 Funktionsweise Leica Bond III.....	8
2.7 Färbung Melan A und CD30.....	9
3 Material und Methodisches Vorgehen.....	10
3.1 Material.....	10
3.2 Methodisches Vorgehen.....	11
4 Ergebnisse.....	14
4.1 Verlaufsübersicht nach Versuch.....	14
4.2 Interpretation der Ergebnisse.....	15
4.3 Vergleich Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand.....	18
4.4 Diskussion/ Schlussfolgerungen.....	19
4.5 Fazit.....	19
5 Reflexion.....	20
Abbildungsverzeichnis.....	21
Tabellenverzeichnis.....	22
Literaturverzeichnis.....	24
Anhang 1 Ergebnisse der Versuche.....	27
Anhang 2 Mikroskopischer Vergleich Melan A.....	35
Anhang 3 Mikroskopischer Vergleich CD30.....	43
Anhang 4 Färbeprotokolle.....	50
Anhang 5 Dehydrierungsprotokoll Peloris.....	56
Methodenevaluierung.....	V
Zur Verminderung des Aufbrechens von Kollagen in der Haut bei immunhistochemischen Färbungen	
Steinmann Alessandra	

Anhang 6	Preisvergleich Xylol und Isopropanol.....	57
Anhang 7	Packungsbeilagen.....	58

Bild Titelblatt:

Links: Abbildung 10: Ist-Zustand CD30. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

Rechts: Abbildung 11: Wunsch-Zustand CD30. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

1 Einleitung

1.1 Motivation

Im Institut Kempf und Pfaltz wurde mir das Thema der Methodenevaluierung zur Verminderung des Aufbrechens von Kollagen in der Haut vorgestellt. Besonders betroffen sind die IHC Färbungen Melan A und CD30. Denn für die Diagnose und das Scannen der Schnitte ist es von grosser Dringlichkeit, die Darstellung des Kollagens zu verbessern. Die Schnitte können aufgrund der aufgebrochenen Struktur nicht gescannt werden. Der Scanner kann die Schnitte nicht richtig erfassen. Somit können die Bilder am Computer nicht ausgewertet werden. Mit dem Thema war ich äusserst zufrieden. Mit Freude konnte ich viele Versuche tätigen, die interessante Erkenntnisse hervorbrachten. Es motivierte mich auch, dass die Hersteller von den Ergebnissen profitieren könnten. Vorausgesetzt weitere Laboratorien steigen von Xylol auf Isopropanol um. Ausserdem interessiere ich mich für die Methoden der IHC, was das Erarbeiten der Theorie um so spannender machte.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist eine morphologische Verbesserung der Kollagendarstellung mit den erwähnten Färbungen. Wird dieses Ziel erreicht, können die Schnitte optimal gescannt und am Computer ausgewertet werden. Des Weiteren wird die Diagnosestellung vereinfacht. Die gewonnenen Anpassungen sollen am Ende im Färbeprotokoll standardisiert werden.

1.3 Fragestellungen

Folgende Fragen stellte ich mir vor dem praktischen Teil:

- Welche Anpassungen in der Präanalytik und der Vorbehandlung der Antikörper (Ak) müssen vorgenommen werden?
- Nimmt das Strecken des Schnittes nach dem Warmwasserbad auf der Streckplatte, Einfluss auf das Aufbrechen?
- Hat die Schnittdicke einen Einfluss?
- Kann das Färbeprotokoll der IHC Färbungen Melan A und CD30 durch Hitzereduktion optimiert werden?

1.4 Vorgehen

Der praktische Teil in der Disposition umfasst das selbständige Durchführen des Arbeitsprozesses mit 10 archivierten Hautproben. Diese werden eigenständig zugeschnitten, dehydriert, ausgegossen und geschnitten. Das erwartete Volumen der gesamten Objektträger beträgt mindestens 100 Schnitte. Gefärbt werden die Schnitte im Leica Bond III mit Melan A und CD30. Für die Adaption der Präanalytik und Vorbehandlung sind folgende Vorschläge gemacht worden:

- Beim ersten Versuch wird der Streckvorgang verglichen. Dabei strecken sich alle Schnitte im Warmwasserbad bei 42°C. Die Hälfte davon liegt zusätzlich eine Minute auf der Streckplatte bei 42°C.
- Nach dem Strecken wird mit allen Schnitten eine Trocknungszeit von 30 und 60min ausgetestet.
- Die Schnitte werden mit einer Schnittdicke von 1 µm, 2 µm und 3 µm gefärbt und miteinander verglichen.
- Das standardisierte Färbeprotokoll von Melan A und CD30 wird angepasst. Beginnend mit der Hitze Reduktion während der Vorbehandlung.

Reichen die zielorientierten Adaptionen, die in der Disposition beschrieben sind nicht aus, werden weitere Versuche unternommen. Das Färbeprotokoll wird entsprechend angepasst. Nach jedem Versuch werden die Schnitte eingedeckt und zusammen mit den Paraffinblöcken in einer Schublade gelagert. Jeder Schnitt wird kontinuierlich unter dem Mikroskop mithilfe einer Legende beurteilt. Am Schluss wird mit dem Facharzt der Wunsch-Zustand (angepasstes Färbeprotokoll) mit dem Ist-Zustand (standardisiertes Färbeprotokoll) mikroskopisch verglichen. Ausgehend von meinen Erkenntnissen entscheidet der Facharzt welche Adaptionen im Färbeprotokoll evaluiert werden.

1.5 Vorschau

In der Theorie werden wesentliche Informationen vermittelt, welche für das Verständnis und die Vollziehbarkeit der Arbeit essenziell sind. Beim Material wird die Auswahl der Hautproben begründet. Die Vorgehensweise und Durchführung der Versuche sind im methodischen Vorgehen genauer beschrieben.

Nachfolgend werden die Ergebnisse diagrammisch dargestellt. Gewonnene Erkenntnisse, inklusive der Problematik von CD30 werden interpretiert. Abschliessend wird der Ist-Zustand mit dem Wunsch-Zustand mithilfe positiver Vergleichspatienten verglichen.

Im Anhang werden die vollständigen Ergebnisse in Tabellenform, wie auch die mikroskopischen Bilder der Schnitte nach Versuch dargestellt. Zusätzlich sind die älteren standardisierten Färbeprotokolle für Melan A und CD30, sowie die angepassten Färbeprotokolle abgebildet. Neben dem Dehydrierungsprotokoll werden auch die Kosten bezüglich Verbrauch der Intermedien aufgeführt. Zum Schluss finden sich Packungsbeilagen, welche für die IHC Färbung wichtig sind.

2 Theorie

2.1 Anatomie der Haut

Kutis (Haut) setzt sich aus verschiedenen Schichten zusammen. Dazu gehören die beiden oberen Schichten Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut). Die Kutis und die darunter liegende Schicht Subcutis (Unterhaut) bilden zusammen die Hautdecke (Welsch & Kummer, 2014, S. 539).

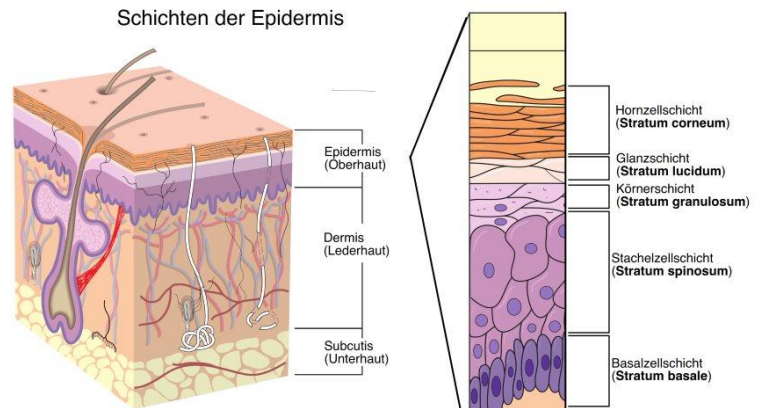


Abbildung 3: Aufbau der Haut (Hartmann, Datum unbekannt), Zugriff am 20.02.2020)

2.1.1 Epidermis

Die oberste, gefäßlose Schicht Epidermis ist aus mehrschichtigem verhorntem Plattenepithel aufgebaut. Als Hauptfunktion schützt sie den Körper gegen äussere Einflüsse, wie UV-Strahlen (Melanozyten) und mechanische Belastung (Korneozyten). Die Epidermis stellt eine unüberwindbare Barriere für Mikroorganismen dar. Hauptbestandteil sind mit über 90% Keratinozyten. Die Keratinozyten entstehen im Stratum basale und wandern zur obersten Schicht. Dort verwandeln sie sich in Hornzellen (Rudolf-Müller, 2016, Zugriff am 20.02.2020). Circa alle 4 Wochen erneuern sie sich, bevor sie als Hornzellen (Stratum disjunctum) abgeschilfert werden (Antwerpes, 2005, Zugriff am 20.02.2020). Folgende Schichten werden unterschieden:

- Stratum basale (Epithelschicht) Hauptbestandteil sind kubische bis prismatische basale Keratinozyten, die eine hohe Mitoserate aufweisen (Welsch & Kummer, 2014, S. 542).
- Stratum Spinosum (Stachelzellschicht) Kerne der Keratinozyten werden zunehmend pyknotisch. Vorkommen von immunkompetenten Lagerhanszellen (Antwerpes, 2006a, Zugriff am 23.02.2020).
- Stratum granulosum (Körnerzellschicht) Einleitung der Keratinisation (Verhornung der Keratinozyten in leblose Korneozyten) (Antwerpes, 2006b, Zugriff am 23.02.2020).
- Stratum lucidum (Glanzsicht) Kommt nur in Leistenhaut (stark verhornte Hautpartien) vor. Übergangsschicht zwischen lebender (Stratum granulosum) und toter Zellen (Stratum corneum) (Welsch & Kummer, 2014, S. 542).
- Stratum corneum (Hornschicht) Äusserste Schicht enthält viele tote, verhornte Korneozyten (Hornzellen), die weder Zellkern noch Zellorganellen aufweisen (ebd., S. 544).
 - Stratum disjunctum Oberster Teil des Stratum corneums. Hier findet die Abschilferung der Hornzellen statt (Hircin, 2006, Zugriff am 23.02.2020).

2.1.2 Dermis

Das spezielle, kollagenfaserreiche Bindegewebe der Haut schützt vor Verletzungen, speichert Wasser und verleiht der Haut Elastizität und Festigkeit. Hauptbestandteile der Dermis sind Kollagen, elastische Fasern, Mikrofibrillen, Hyaluronsäure, Dermatansulfat, Fibronectin, Nerven und Gefäße. Vorhanden sind verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen. Die Unterteilung der Dermis erfolgt in zwei Schichten (Welsch & Kummer, 2014, S. 548):

- Stratum papillare (Zapfenschicht): Unterhalb der Epidermis. Lockere Schicht, ist mehr mit Kollagen Typ III als Typ I aufgebaut und enthält reichlich Blutkapillaren. Sie ist verantwortlich für die Ernährung der Epidermis (ebd., S. 548).
- Stratum reticulare (Netzsicht): Die tiefere Epidermischicht ist mit dichtem, unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe aufgebaut. Spezifisch sind zapfenförmige Ausstülpungen, welche die Dermis und Epidermis verzahnen. Enthält mehr Typ-I Kollagen und dickere elastische Fasern (ebd., S. 548).

2.2 Aufbau von Kollagen

Das u.a. von Fibroblasten sezernierte Protein Kollagen macht ca. 25% der Gesamtproteinmenge aus (Welsch & Kummer, 2014, S. 112). Es ist der wichtigste Faserbestandteil von Haut, Sehnen, Knorpel, Knochen, Zähnen und Blutgefäße. Je nach Gewebe sorgt es für Reissfestigkeit, Flexibilität und Druckresistenz (Nicolay, 2004, Zugriff am 24.02.2020). Unterschieden werden 25 Isoformen je nach Aminosäuresequenz (Welsch & Kummer, 2014, S. 112).

Die Tertiärstruktur der wasserunlöslichen Kollagenmolekülen setzt sich aus drei jeweils helikalen α -Polypeptid-Ketten (Prokollagen) zusammen. Der hohe Anteil an Prolin, Hydroxyprolin und Glycin ermöglicht die Entfaltung einer stabilen Kollagenmatrix und Quervernetzung der Proteine. Die α -Ketten bilden eine Super-Triplehelix. Durch das umeinander winden der Moleküle entstehen Fasern, die Tropokollagene. Mit Aneinanderlagern mehrerer Tropokollagen-Tripelhelix wird die Quartärstruktur des Kollagens geschaffen, die Kollagenfibrillen (Nicolay 2004, Zugriff am 24.02.2020).

Es werden zwei Kollagenarten unterschieden:

- fibrilläre (faserbildende): V.a. Kollagentypen I, II, III, V und XI
- nicht fibrilläre (nicht faserbildende): V.a. Kollagentypen IV, VIII und X (Amboss, 2019, Zugriff am 24.02.2020)

Vorkommen der wichtigen Kollagentypen:

Typ I: Haut, Sehnen, Knochen, Dentin

Typ II: Knorpel, Glaskörper

Typ III: glatter Muskulatur, lymphatisches Gewebe, Knochenmark

Typ IV: Als zweidimensionales Netzwerk in Basallamina und in der Lamina externa der LinsenkapSEL (Lüllmann-Rauch et al., 2017, Zugriff am 24.02.2020)

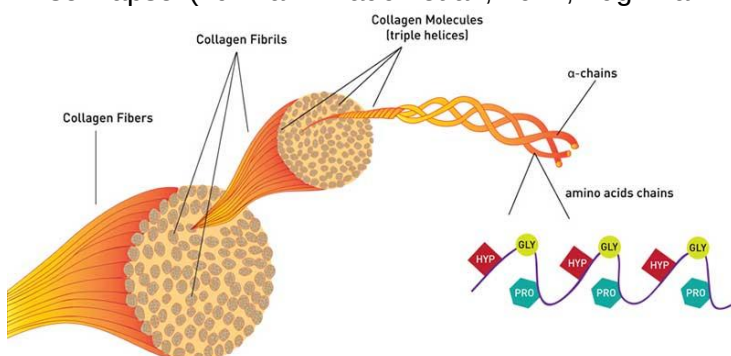


Abbildung 4: Molekularstruktur des Kollagens (Fendt, 2020), Zugriff am 24.02.2020

2.3 Dehydrierung

Nach Entnahme wird das Gewebe in Formalin fixiert. Formalin verhindert die enzymatische Autolyse des Gewebes und dient dem Erhalt der Struktur durch Quervernetzung (Gudrun, 2013, S. 55). Nach Zuschnitt und Einkapseln des fixierten Gewebes folgt die Dehydrierung (MVZ, 2018, Zugriff am 02.03.2020). Mittels aufsteigender Alkoholreihe wird das Formalin aus dem Gewebe verdrängt. Damit es in das flüssige hydrophobe Paraffin überführt werden kann, braucht es ein Intermedium. Das Intermedium muss sich gut mit Alkohol und Paraffin mischen können (Gudrun, 2013, S. 106). Das bis heute am häufigsten verwendete Intermedium ist Xylol. Xylol ist kostengünstig, aber umwelt- und gesundheitsschädigend. Nach der Dehydrierung wird an der Ausgießstation das mit Paraffin durchtränkte Gewebe gegossen und gekühlt, damit ein schneidbarer Block entsteht (ebd., S. 107).

Das Institut Kempf und Pfaltz legt Wert auf eine umweltfreundliche Arbeitsumgebung ohne schädigende Dämpfe. Deswegen wird seit kurzem in den Dehydrierungsautomaten (und Färbeautomaten) anstelle von Xylol, Isopropanol verwendet. Im Dehydrierungsautomat Peloris beginnt die Dehydrierung im Formalin, dann folgt 85% Ethanol und anschließend ein Gemisch aus 85% Ethanol und Isopropanol. Nachfolgend wird das Gewebe in Isopropanol und am Ende in Parablast inkubiert (Steinmann, 2020).

2.4 Isopropanol

Das Intermedium Isopropanol ist ein einfach aufgebauter, nicht-zyklischer sekundärer Alkohol (Römer 2013, Zugriff am 02.03.2020). Der einwertige Alkohol besteht aus Propan mit einer Hydroxygruppe an Position zwei. Isopropanol muss als Intermedium mit Alkohol mischbar sein. Bei Zimmertemperatur liegt Isopropanol als farblose Flüssigkeit vor (PharmaWiki 2020, Zugriff am 02.03.2020).

2.4.1 Vergleich Isopropanol und Xylol

Intermedium Isopropanol verdrängt Wasser und Alkoholverunreinigung langsamer aus dem Gewebe als Xylol. Die Dehydrierung mit Isopropanol dauert länger, härtet aber das Gewebe nicht so stark (Gudrun, 2013, S. 130). Im Interview erklärte Laustela, Applikationsspezialist von BioSystems, (Interview vom 03.01.2020) folgendes: *«Paraffin muss bei der Isopropanol Dehydrierung auf 81-82°C erwärmt werden, damit das Intermedium aus dem Gewebe verdunstet, da es sich nicht mit dem Paraffin mischt. Xylol wird direkt durch das flüssige Paraffin verdrängt [...]»*.

Nachteile der Entwässerung mit Isopropanol sind längere Programmzeiten und heiße Kassetten beim Giessen. Der häufige Reagenzienwechsel aufgrund der Verdunstung ist während des Dehydrierungsprozesses ökonomisch nicht sinnvoll. Es musste ein spezielles Fett-Dehydrierungsprogramm für fetthaltiges Gewebe erstellt werden, weil es im Routineprogramm schlecht dehydriert. Die stärkere Verbrennungsgefahr macht das Giessen unangenehm. Ein Vorteil ergibt sich durch eine bessere Luftqualität. (Kempf und Pfaltz, 2019a). Hinzu kommt, dass Isopropanol Dehydrierung im Vergleich zur Xylol Dehydrierung trotz höherem Verbrauch der einzelnen Reagenzien, kostengünstiger ausfällt (Lehmann, 2020).

2.5 Immunhistochemie

Das Prinzip der IHC beruht auf dem Nachweis von bestimmten Proteinen wie Antigenen (Ag) und anderen Strukturen (Schöpflin, 2019, S. 3)

Zum Einsatz kommen markierte Ak, welche eine hohe Affinität zum gesuchten, spezifischen Epitop oder Ag aufweisen. Das gesuchte Epitop oder Ag wird mit einem am Ak gekoppeltem Detektionssystem sichtbar gemacht. Ermöglicht durch ein Chromogen (Substrat), welches vom Markerenzym in ein farbiges, stabiles Endprodukt katalysiert wird. Das entstehende Signal gibt Auskunft, wieviel von der gesuchten Struktur im Schnitt vorhanden ist (ebd., S. 5-30).

Es gibt zahlreiche unterschiedliche Detektionsmethoden. Bei Vorhandensein von grosser Menge Ag wird die direkte Methode angewendet. Primär-Ak ist mit Enzym oder fluoreszierenden Farbstoff konjugiert. Bei der sensitiveren, indirekten Methode wird ein zweiter Sekundär-Ak eingesetzt. Dieser ist markiert und bindet an den Primär-Ak (ebd., S. 26f). Auf Unterkategorien der direkten und indirekten Methoden wird nicht weiter eingegangen.

Im Institut Kempf und Pfaltz wird hauptsächlich die indirekte Kompaktpolymer-Methode (Polymer Refine Red Detection) angewendet. Färbungen erfolgen mit Fast Red. Das entsprechende, katalysierende Enzym ist die Alkalische Phosphatase (BioSystems, 2019). Weitere Informationen sind auf Seite 8, «2.6 Funktionsweise Leica Bond III» beschrieben.

IHC wird zusammen mit der morphologischen Diagnostik für den Nachweis von Tumoren eingesetzt (Schöpflin, 2019, S. 17). Ak dienen zur Identifizierung und prognostischen Klassifizierung von Tumorzellen und Pathogenen (ebd., S. 18f).

2.5.1 Antikörper:

Ak sind Proteine aus der Klasse der Immunglobuline. Fünf Klassen werden unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgM und IgG. Sie bestehen aus zwei identisch schweren (H) und zwei identischen leichten Ketten (L; Kappa oder Lambda), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Schwere Ketten klassifizieren die Immunglobuline. Ag-bindende Region (Paratop) bindet spezifisch an das Epitop. Wie das folgende Bild am Beispiel des IgG zeigt, setzt sich jede Kette zusammen aus einer (Boenisch, 2003, S. 5):

- variablen, Ag-bindenden Region (Fab: Fragment antigen binding) -> Paratop (L und H-Kette)
- konstanten auch komplementbindenden Region (Fc: Fragment complement binding)

Anstelle von ganzen Ak werden oft nur Fab- und F(ab)₂-Fragmente eingesetzt. Die enzymatische Spaltung in Fragmente gelingt mit Proteasen Papain und Pepsin (ebd., S. 5f).

Für die Produktion der Ak werden verschiedene (polyklonale) oder identische (monoklonale) B-Zell Klone verwendet (ebd., S. 11f). Am besten geeignet für Immunmarkierungen sind Ak der Klasse IgM und IgG (ebd., S. 5).

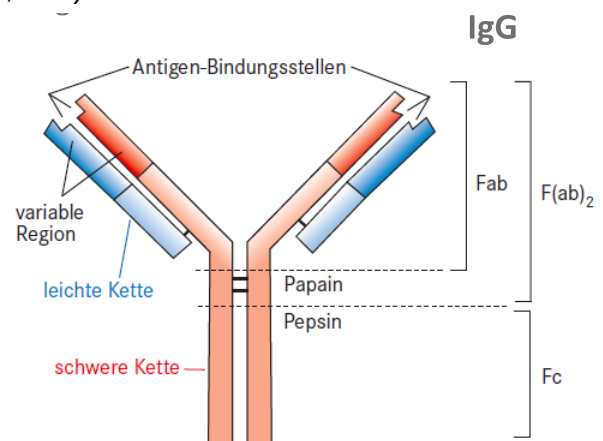


Abbildung 5: Aufbau IgG (Schöpflin, 2019)

2.5.2 Polyklonale Ak

Polyklonale Ak: Verschiedene heterogene Ak, die von unterschiedlichen Plasmazellen produziert werden. Sie binden an verschiedene Epitope eines Ag. Sobald eine Plasmazelle in Kontakt mit Fremdproteinen, wie z.B. Pathogene kommt, werden sie physiologisch im Körper exprimiert (Schöpflin, 2019, S. 9).

Die Gewinnung von polyklonalen Ak ist kostengünstiger und mit weniger Aufwand verbunden als die der monoklonalen Ak. Dafür unterliegt die Gewinnung der Pools, Chargenschwankungen. Für die Ak-Produktion werden hauptsächlich Kaninchen eingesetzt (danach folgen Ziegen, Schweine, Schafe etc.). Ag wird injiziert und durch deren Immunsystem werden entsprechende Ak gebildet, die dann aus dem Blutserum isoliert werden. (Boenisch, 2003, S. 7f)

2.5.3 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Ak sind immunchemisch identische Proteine. Sie werden von einem einzelnen Klon einer Plasmazelle produziert und richten sich gegen ein bestimmtes, einzelnes Epitop (hohe Affinität) (ebd., S.8).

Für die Gewinnung monoklonaler Ak wird dem Versuchstier, meistens einer Maus, eine fremde Substanz (Ag) verabreicht. Erkennt das Immunsystem diese Substanz als körperfremd, werden B-Lymphozyten gebildet. Um B-Lymphozyten zu isolieren, wird Milz oder Lymphknoten entnommen. Die isolierten B-Lymphozyten werden dann mit Myelomzellen fusioniert (Hybridisierung). Die neu entstandene Hybridomzelle besitzt dadurch zwei wichtige Fähigkeiten. Fähigkeit der B-Lymphozyten, zur Bildung spezifischer Ak und die der Myelomzellen, zu unbegrenztem Wachstum (in vitro) und Langlebigkeit. Danach wird selektiert, welcher Hybridom Zell Klon am spezifischsten an das gewünschte Epitop bindet. Es darf keine Kreuz Reaktivität entstehen. Nach der Selektion kommt es zur zeitlich unbegrenzten Ak-Produktion im Kulturmedium. Weitere Vorteile der monoklonalen Ak sind ihre hohe Homogenität und die gleichbleibende Qualität, auch von Charge zu Charge (ebd., S.8).

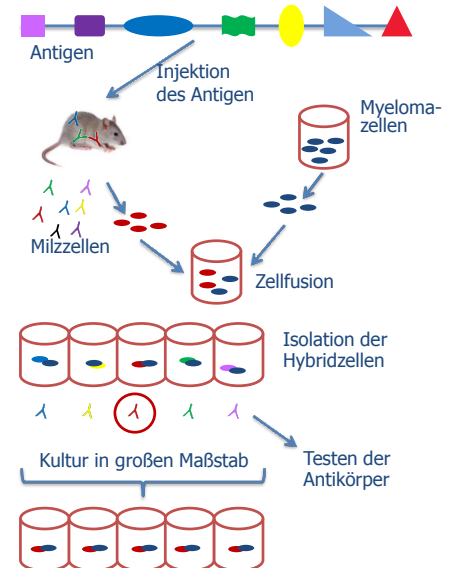


Abbildung 6: Herstellung monoklonaler Ak (Schöpflin, 2019)

2.6 Funktionsweise Leica Bond III

Das vollautomatische Gerät wird in der IHC eingesetzt um bestimmte Ag, Ak und Nukleinsäuren nachzuweisen. Es führt nebst den IHC-Färbungen bei Parablast- und Gefrierschnitten auch In-situ-Hybridisierung durch (Härri, Datum unbekannt a, S. 2f).

Leica Bond III besitzt 36 Reagenzstationen, eine Kapazität von 3 x 10 Objektträger pro Rack und drei Flüssigkeitsroboter, welche für den Waschpuffer, HIER-Lösung etc. verantwortlich sind. Für die Ag-Demaskierung stehen zwei Pufferlösungen oder Enzymlösungen zur Verfügung. ER1, ein Citratpuffer pH 6.0 und ER2, ein EDTA-Puffer pH 8.8. Die Enzymlösungen sind unterschiedlich konzentriert. Die Vorbehandlungstemperatur ist frei wählbar von Raumtemperatur (RT) bis 100°C pro Objektträger. Leica Bond III arbeitet mit der patentierten Covertile- Technologie. Das sind Plastik-Deckel für den Objektträger unter denen die Reaktion stattfindet. Vorteile der Covertile sind unter anderem eine behutsame Reagenzienapplikation, gleichmässige Verteilung der Reagenzien und Schutz vor Austrocknung. Mittels Kapillarwirkung können teure Reagenzien gespart werden, da 150ul für den ganzen Objektträger ausreichen (ebd., S. 3-6).

Färbungen erfolgen bei Kempf und Pfaltz hauptsächlich mit Fast Red und der zukunftsorientierten Kompakt Polymer Methode (Polymer Refine Red Detection). Dadurch ergibt sich mit dem entsprechenden Enzym, die alkalische Phosphatase, ein rotes Signal (BioSymstems, 2019).

Vor der Färbung werden die Schnitte getrocknet im Ofen und im Gerät entparaffiniert. Dann folgt die Demaskierung durch Hitzevorbehandlung (HIER) und Pufferlösung (ER1/2) oder Enzymlösung. Demaskierung bricht Proteinvernetzungen auf und legt so Epitope frei, damit sie an Ak binden können (Härri, Datum unbekannt a, S. 3).

2.6.1 Kompakt Polymer Refine Red Detection

Nach der Vorbehandlung wird der Primär-Ak auf dem Schnitt inkubiert. Am Ende der Inkubation wird der Schnitt mit Bond Waschpuffer gespült, um ungebundene Ak zu entfernen. Dieser Waschvorgang wird nach jeder Zugabe eines Reagenzes wiederholt. Für die Signalverstärkung wird ein Sekundär-Ak eingesetzt, der an die Primär-Ak bindet. Wie im rechten Bild ersichtlich wird, ist der Sekundär-Ak an einer «Dextranpolymer-Schnur» mit einer hohen Ratio an Enzymen gekoppelt. Dies verstärkt das Signal (Härri, Datum unbekannt b).

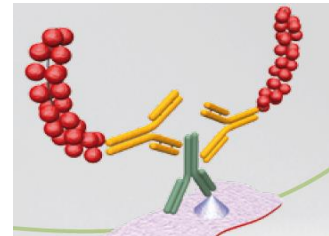


Abbildung 7: Kompaktes Polymer (Härri, Datum unbekannt)

Zum Schluss wird ein Chromogen beigegeben, das vom Markerenzym in ein farbiges stabiles Endprodukt umgesetzt wird. Mit Fast Red Substrat Chromogen entsteht ein rotes Signal. Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämatoxylin (ebd.).

Die Detektionsmethode bringt folgende Vorteile mit sich:

- Sie ist Streptavidin- und Biotinfrei, reagiert somit nicht mit endogenem Biotin.
- Hohe Sensivität aufgrund der hohen Ratio an Enzymen.
- Geringe räumliche Hinderung, da der Komplex eine kompakte Struktur besitzt (ebd.).
- Ak-Lösung und das Chromogen (Fast Red) enthalten Fungizid Levamisol (ProClin™), welches die endogene alkalische Phosphatase inaktiviert (Härri, Interview vom 22.02.2020)

2.7 Färbungen Melan A und CD30

Kempf und Pfaltz ist auf Dermatopathologie spezialisiert. Melan A und CD30 kommen in der Diagnostik oft zum Einsatz. CD30 für Lymphome, Melan A für Melanome.

Sie werden im Körper auch physiologisch in begrenztem Umfang produziert. Kommt es bei CD30 zu einer Überexpression, besteht der Verdacht auf eine neoplastische Erkrankung. Gleiches gilt für Melan A, wenn eine Überproduktion der Melanozyten stattfindet und folglich mehr Ag nachweisbar sind. Die Ag werden auch nachgewiesen, um die Linienzugehörigkeit von undifferenzierten Tumorzellen zu bestimmen (Benz, Interview vom 30.04.2020). Nachfolgend zu den jeweiligen Markern, werden Tumorarten in der Haut beschrieben.

2.7.1 Melan A (MART-1)

Melan A, ein Produkt des MART-1-Gens ist ein wichtiger Marker für epidermal und dermal gelegene Melanozyten (Pigmentzellen). Er spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Pigmentierung. Melanozyten findet man physiologisch in Haut und Netzhaut (Converse & Gross, 2001, Zugriff am 07.03.2020). Eingesetzt werden monoklonale Ak, welche die Diagnose von malignen Melanomen und Nebennierenrindenkarzinome ermöglichen (Agilent, 2013, Zugriff am 07.03.2020).

Maligne Melanom (MM):

MM ist ein von Melanozyten ausgehender bösartiger Tumor. Das Risiko zur Ausbildung wird von der Häufigkeit starker UV-Einstrahlung bestimmt. Typisch sind ungleichmässige, mehrfarbige und wachsende Flecken, die meist dunkler erscheinen als ein Nävuszellnävus (NZN). Mit der sog. ABCDE-Regel können Pigmentveränderungen makroskopisch beurteilt werden. Frühzeitige Metastasierung in Organen, besonders Haut, Lungen, Leber, Gehirn, Nieren und Knochen, macht das MM zur gefährlichsten Form der Hautkrebse (Walensi, 2009, Zugriff am 07.03.2020). Der Marker Melan A ist sehr wichtig, um im Falle einer Metastasierung, den invasionstiefen Primärtumor zu identifizieren (Benz, Interview vom 30.04.2020).

2.7.2 CD30: (Akronym für Cluster of differentiation 30)

TNFR-verwandtes Oberflächenprotein, auch Ki-1 Ag genannt, wird von aktiven T- und B-Lymphozyten exprimiert. Es ist an der Regulierung der Funktion, Differenzierung und Proliferation von normalen lymphoiden Zellen beteiligt. Als Marker weist es Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen, anaplastische, große Lymphomzellen und Deciduazellen (Endometriose) nach (Altmeyer, 2019, Zugriff am 07.03.2020). Aufgrund erhöhter Expression wird CD30 für die Differentialdiagnose von Hodgkin-Zell-Lymphomen und anaplastischen, grosszelligen T-Zell-Lymphomen (ALCL) eingesetzt (Ardit, 2020, Zugriff am 07.03.2020).

Das ALCL wird grob in zwei Typen eingeteilt. In systematische Lymphome, die innere Organe, Haut und/oder Lymphknoten betreffen und in primäre kutane Lymphome, welche nur die Haut befallen (Lymphoma Info, 2020, Zugriff am 07.03.2020).

Primär kutane ALCL

Das langsam proliferierende primär kutane ALCL ist ein seltenes Non-Hodgkin Lymphom. Charakteristisch ist eine uniforme Expression von CD30, auf blastären Zellen, sowie Form und Grösse der Zellen (Benz, Interview vom 30.04.2020). Auf der Haut bilden sich einzelne oder Ansammlungen von rötlichen Knötchen. Das Auftreten dieser Läsionen ist überall auf dem Körper möglich. Sie verschwinden nicht von selbst und können jucken sowie ulzerieren. Durch das langsame Wachstum bleiben sie oft unentdeckt (Rabello de Oliveira et al., 2013, Zugriff am 07.03.2020).

3 Material und methodisches Vorgehen

3.1 Material

Zur Herstellung aller Schnittpräparate standen 10 archivierte Hautproben zur Verfügung. Zusätzlich wurde ein Mikrotom, eine Streckplatte, ein Warmwasserbad und SuperFrost Plus™ Objektträger, welche für eine bessere Haftbarkeit der Schnitte sorgen, benötigt. Um die Ak-Reaktion plausibel vergleichen zu können, wurde Haut von bekannten, positiven Patienten und On-slide Kontrollen verwendet. Für die IHC Färbungen ist das Gerät Leica Bond III mit den entsprechenden Reagenzien benutzt worden.

3.1.1 Patientenmaterial

Patientenmaterial ist ein kostbares Gut. Für diese Diplomarbeit wurden Hautbiopsien ausgesucht, bei denen genügend Material vorhanden und die Diagnosestellung bereits abgeschlossen ist. Mit 10 Proben von unterschiedlichen Patienten kann eine grosse Anzahl von Schnitten hergestellt und verglichen werden. Das erwartete Volumen der gesamten Objektträger beträgt mindestens 100 Schnitte. Genügend Material ist für diese Diplomarbeit erforderlich, denn es wurden mehr Versuche getätigt, als in der Disposition beschrieben sind. Im Institut wird übrig gebliebenes Patientenmaterial in einem lichtgeschützten Schrank archiviert. Das Gewebe befindet sich dabei in einem mit Formalin gefüllten Gefäss. Die Proben wurden eigenständig zugeschnitten, mit Isopropanol dehydriert und ausgegossen. So sind aus den 10 archivierten Hautproben 10 Blöcke entstanden. Die Schnitte wurden kontinuierlich vor jedem Versuch hergestellt. Nach Abschluss der Diplomarbeit werden die jeweiligen Blöcke und Schnitte in der entsprechenden Routine-Ablage numerisch geordnet aufbewahrt.

3.1.2 Positive Kontrollen:

On-slide Kontrolle: Der CD30 Marker wird im Institut hauptsächlich bei Lymphom erkrankten Patienten gefärbt. Dies muss mit einer Tonsille On-slide Kontrolle überprüft werden. Da bei Kempf und Pfaltz selten Tonsille eingesandt wird, ist diese kostbar und knapp vorhanden. Zudem reicht es, die Ak-Reaktion für die Diplomarbeit nur bei einzelnen Versuchen zu überprüfen. Bei Versuch 2, 3, 7 und 8 wurden jeweils On-slide Kontrollen mitgeführt.

Positiver Vergleichspatient: Da Melan A auch physiologisch in der Haut zu finden ist, wird in der Routine keine Kontrolle mitgeführt. Auf Seite 18, bei «4.3 Vergleich Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand» wird die Darstellung des Kollagens und die Ak-Reaktion zusätzlich verglichen. Dafür wurden zwei Schnitte von einem positiven Vergleichspatient hergestellt und fotografiert. Dieser Vergleich wurde auch für CD30 angestellt, um eine Signalüberlagerung von Ak-Reaktion und Hgf auszuschliessen.

3.1.3 Reagenzien von BioSystems:

Für die Austestung wurden die Schnitte immunhistochemisch im Gerät Leica Bond III gefärbt. Folgende Reagenzien und Materialien werden benötigt:

Reagenzien	Detektionssystem
Dewax (Entparaffinierungslösung)	Bond Polymer Refine Red Detection AP/Fast Red
Epitope Retrieval Solution 2 Tris-EDTA-Puffer	Ak-Konzentrat und Diulent
Demineralisiertes Wasser	Weitere:
Bond Waschpuffer	Gegenfärbung Hämatoxylin
Ethanol 100%	Abfallcontainer

Tabelle 1: Reagenzien von BioSystems (Steinmann, 2020)

3.2 Methodisches Vorgehen

Bei allen Versuchen sind die Schnitte im vollautomatisierten Gerät Leica Bond III mit Melan A und/oder CD30 gefärbt worden. Anschliessend wurden die Schnitte über Isopropanol und dem Zwischenintermedium Ultra Clear dehydriert. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit dem Eindeckmedium CV-Ultra.

Ausgehend vom standardisierten Färbeprotokoll sind verschiedene Versuche getätigt worden. Mit dem Ziel, die Darstellung des Kollagens morphologisch zu optimieren. Weitere Informationen zur Färbemethode und dem Gerät, sind in der Theorie, S. 8, «2.6 Funktionsweise Leica Bond III» beschrieben.

3.2.1 Standardisiertes Färbeprotokoll / Ist-Zustand

In der Routine wird mit 3 µm geschnitten. Die Schnitte werden nur im Warmwasserbad gesteckt und für 30min im Ofen bei 60°C getrocknet. Im Bond folgt die Vorbehandlung mit Hitze, der Pufferlösung Citrat (H2) und der Vorbehandlungszeit (20min-40min). Dies ergibt z.B. die Abkürzung (H2/20). Antigene werden so demaskiert. Der Färbeprozess von Melan A und CD30 verläuft unter folgenden Bedingungen:

Färbung	Demaskierung H2		Ak	
	Zeit	Temperatur	Inkubationszeit	Verdünnung
Melan A	20min (H2/20)	100°C	15min	1/100
CD30	30min (H2/30)	95°C	30min	1/40

Tabelle 2: Standardisiertes Färbeprotokoll (Steinmann, 2020)

3.2.2 Wunsch-Zustand

Die Bedingungen sollten bei jedem Marker optimal aufeinander abgestimmt sein. Damit eine schöne Darstellung des Kollagens und eine intensive, plausible Ak-Reaktion erreicht wird. Um das Ziel dieser Diplomarbeit zu erreichen, wurden viele Versuche getätigt und verbessernde Erkenntnisse protokolliert. Anstrebenswert wäre eine Effizienzsteigerung, indem Zeit bei der Vorbehandlung und Ak- Inkubation gespart wird. Verbesserte Bedingungen sind in den nachfolgenden Versuchen übernommen worden. Anschliessend werden die Versuche genauer erläutert.

3.2.3 Melan A: Vergleich des Streckvorgangs und der Trocknungszeit Versuch (V)1

Bedingungen:	Melan A:	Mit Streckplatte	Ohne Streckplatte	Trocknungszeit im Ofen	
	Standard	+ 1min		60min	30min

Beim ersten Versuch wurde der Streckvorgang der Schnitte und die Trocknungszeit im Ofen verglichen. Am Mikrotom sind 40 Schnitte hergestellt worden (je vier Schnitte pro Patientenblock), die alle im Warmwasserbad gestreckt wurden. 20 Schnitte davon lagen zusätzlich eine Minute auf der Streckplatte bei 42°C. Von den 40 Schnitten kamen 10 Schnitte, die eine Minute auf der Streckplatte lagen und 10 Schnitte, die sich nur im Warmwasserbad streckten, für 30 Minuten in den Ofen bei 60°C. Der gleiche Vorgang wurde wiederholt, mit einer Trocknungszeit von 60 Minuten. Dann wurden alle Schnitte mit Melan A gefärbt. Für diesen Versuch reicht Melan A, da das Färbeprotokoll nicht verändert werden muss.

<u>Erkenntnis:</u>	Eine leicht positive Verbesserung der Kollagendarstellung wurde bei einer Trocknungszeit von 60min ohne Streckplatte entdeckt. Diese Anpassungen werden für die nachfolgenden Versuche als Standard übernommen. Bei diesem Versuch geht es nur um die Darstellung des Kollagens. Die Ak-Reaktion wurde nicht beurteilt.
--------------------	---

Tabelle 3: Versuch 1. Vergleich Streckvorgang und Trocknungszeit bei Melan A (Steinmann, 2020)

3.2.4 Beide: Austestung der Schnittdicke

V2

Bedingungen:	Melan A	CD30	Schnittdicke		
+Kontrolle bei CD30	Standard		1 µm	2 µm	3 µm

Nach evaluierter Trocknungszeit und Streckung sind 60 Schnitte für den zweiten Versuch hergestellt worden. Jeder Block wurde mit einer Dicke von 1 µm, 2 µm und 3 µm im Doppel geschnitten. Das ergibt sechs Schnitte von jeder Hautprobe. Die eine Hälfte der 60 Schnitte sind mit Melan A, die andere mit CD30 gefärbt worden. Mit der Fragestellung, ob die Ak-Reaktion bei dünneren Schnitten noch ausreichend stattfindet.

Erkenntnis:	Die Darstellung des Kollagens verbessert sich, je dünner die Schnitte sind. Dünne Schnitte ergeben eine schwache Ak-Reaktion, weil weniger Ag anzutreffen sind. Bei CD30, mit einer Schnittdicke von 3 µm, ist nur eine unbedeutend leichte Intensität der Hgf zu beobachten. Demgemäss wurde sie nicht mitbeurteilt. Der Indikator für eine optimale Reaktion ist eine Schnittdicke von 3 µm.
--------------------	--

Tabelle 4: Versuch 2. Austestung Schnittdicke bei Melan A und CD30 (Steinmann, 2020)

3.2.5 Beide: Hitzereduktion

V3

Bedingungen	Melan A	CD30	Vorbehandlung Temperatur					
			Melan A			CD30		
+ Kontrolle bei CD30	H2/20	H2/30	95°C	90°C	85°C	90°C	85°C	80°C

Aufgrund der Vermutung, dass die Hitze der Vorbehandlung grossen Einfluss auf das Aufbrechen des Kollagens hat, wurde die Temperatur reduziert. Zum Einsatz kamen je 30 Schnitte, die mit den Markern Melan A und CD30 gefärbt wurden. Ausgehend vom Standardprotokoll wurde die Temperatur bei der Vorbehandlung schrittweise um 5°C, bis auf 80°C reduziert. Zusätzlich bei CD30 ist eine Kontrolle auf den Objektträger aufgezogen worden.

Erkenntnis:	Eine schönere Darstellung des Kollagens zeigt sich bei einer Temperatursenkung. Parallel nimmt die Ak-Reaktion bei Melan A ab. Bei CD30 nimmt dafür die Intensität der Hgf zu. Die Kontrolle von CD30 zeigt eine optimale Ak-Reaktion bei 85°C. Bei 80°C ist die Ak-Reaktion sehr schwach vorhanden. Infolgedessen erübrigt sich auch die Austestung auf 80°C bei Melan A. Es wird mit 85 °C weiter getestet.
--------------------	---

Tabelle 5: Versuch 3. Hitzereduktion bei Melan A und CD30 (Steinmann, 2020)

3.2.6 Beide: Unterschiedliche Vorbehandlungszeit

V4

Bedingungen:	Melan A + CD30	Vorbehandlung Zeit		
		Melan A + CD30		
	85°C	H2/20	H2/30	H2/40

In der Hoffnung, Ak könnten stärker und spezifischer an die gesuchten Epitope binden, wurde die Vorbehandlungszeit bei Melan A verlängert. Um die Hgf von CD30 zu reduzieren, ist diese ergänzend um 10min verkürzt worden. Von den insgesamt 60 Schnitten sind für Melan A und CD30 je 10 Schnitte mit H2/20, H2/30 und H2/40 inkubiert worden.

Erkenntnis:	Zeitverlängerung bei der Vorbehandlung erzielt bei beiden Färbungen eine Verschlechterung der Kollagendarstellung. Dafür wird die Ak-Reaktion bei Melan A stärker. Ausserdem nimmt die Intensität der Hgf von CD30 zu. Die Kollagendarstellung bei CD30 ist mit einer verkürzten Vorbehandlung (H2/20) am besten und wird nachfolgend übernommen. Weil das Kollagen bei Melan A (H2/30) genügend gut dargestellt wird, werden im Versuch 9 die Vorbehandlungszeiten H2/20 und H2/30 nochmals verglichen.
--------------------	--

Tabelle 6: Versuch 4. Unterschiedliche Vorbehandlungszeit bei Melan A und CD30 (Steinmann, 2020)

Die folgenden Anpassungen auf der nächsten Seite konzentrieren sich darauf, die Hgf von CD30 zu vermindern. Gleichzeitig muss eine optimale Ak-Reaktion bewahrt werden.

3.2.7 CD30: Testdurchlauf ohne Ak

V5

Bedingungen:	CD30	Vorbehandlung Temperatur		
Ohne AK	H2/20	100°C	85°C	RT

Dieser Versuch dient dazu herauszufinden, welche Reagenzien Auslöser für die Hgf sind. Dafür in Frage käme zum Beispiel die Primär Ak-Lösung oder andere Reagenzien von BioSystems. Es wurden 30 Schnitte hergestellt, je drei Schnitte von einem Block. Je 10 Schnitte wurden bei 100°C, 85°C und RT demaskiert. Die Ak- Zugabe fiel weg.

Erkenntnis:	Es bestätigte sich, dass eine Reduzierung der Temperatur bessere Folgen auf das Kollagen hat. Bei RT ist die Darstellung am schönsten. Auf dem Gewebe ist die Hgf verschwunden. Unter den angepassten Bedingungen sind somit die Primär-Ak für die unspezifischen Reaktionen verantwortlich.
--------------------	--

Tabelle 7: Versuch 5. Testdurchlauf ohne Ak bei CD30 (Steinmann, 2020)

3.2.8 CD30: Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit mit H2/20

V6

Bedingungen:	CD30	Ak-Inkubationszeit	
	H2/20	15min	30min

Für diesen Versuch wurden 20 Schnitte hergestellt. 10 Schnitte sind bei 15, die restlichen bei 30min, mit dem Ak inkubiert worden. Die Vorbehandlungszeit wurde um 10min verkürzt, damit die Hgf minimiert wird.

Erkenntnis:	Eine Verkürzung der Inkubationszeit von 30 auf 15min vermindert die Hgf. Die verkürzte Vorbehandlungszeit verbessert die Darstellung des Kollagens leicht. Beim nächsten Versuch wird die Inkubationszeit von 15min übernommen und die Vorbehandlungstemperatur von 85°C beibehalten.
--------------------	---

Tabelle 8: Versuch 6. Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit mit H2/20 bei CD30 (Steinmann, 2020)

3.2.9 CD30: Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40

V7

Bedingungen:	CD30	Ak-Verdünnung			Ak-Inkubationszeit
+ Kontrolle	H2 /20	1/20	1/30	1/40	15min

Bei diesem Versuch wird zusätzlich mit der CD30 Kontrolle die Ak-Reaktion geprüft. Es wurden insgesamt 30 Schnitte auf On-slide Kontrollen aufgezogen. Von denen je 10 Schnitte mit einer Ak-Verdünnung von 1/20, 1/30 und 1/40 für 15min inkubiert wurden.

Erkenntnis:	Eine Reduktion der Hgf, sowie eine Verbesserung der Kollagendarstellung konnte bei einer Ak-Verdünnung von 1/30 beobachtet werden. Die Reaktionsstärke der Ak ist bei allen drei Verdünnungen gut. Die Ak-Verdünnung von 1/30 wird standardisiert.
--------------------	--

Tabelle 9: Versuch 7. Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40 bei CD30 (Steinmann, 2020)

3.2.10 Melan A: Vergleich der Vorbehandlungszeit von H2/20 und H2/30, mit unterschiedlicher Ak-Inkubationszeit

V8

Bedingungen:	Melan A	Vorbehandlung Zeit		Ak-Inkubationszeit	
	H2	H2/20	H2/30	15min	30min

Um die Intensität der Ak-Reaktion und den Verlauf der Kollagendarstellung noch besser beurteilen zu können, wurden 40 Schnitte hergestellt. Bei einer Vorbehandlungszeit von H2/20 sind je 10 Schnitte für 15 und 30min mit den Ak inkubiert worden. Den Vorgang wiederholte ich mit H2/30.

Erkenntnis:	Die Kollagendarstellung ist bei H2/20 schöner, dafür ist die Ak-Reaktion schwächer. Umgekehrt verhält es sich mit H2/30. Bezogen auf die Ak-Inkubationszeit von 15 und 30min zeigt die Ak-Reaktion keinen grossen Unterschied. Die Vorbehandlungszeit von H2/20 und die Ak-Inkubationszeit wird beibehalten.
--------------------	--

Tabelle 10: Versuch 8. Vergleich der Vorbehandlungszeit von H2/20 und H2/30, mit unterschiedlicher Ak-Inkubationszeit bei Melan A (Steinmann, 2020)

4 Ergebnisse

4.1 Verlaufsübersicht nach Versuch

Die folgenden Diagramme enthalten den Mittelwert der besten Ergebnisse und ermöglichen so den Verlauf der Versuche darzustellen. Als Interpretationshilfe wird eine verkürzte Legende dargestellt. Beim ersten und zweiten Versuch von Melan A, sowie auch beim ersten Versuch von CD30, wurde das Standardfärbeprotokoll (Istzustand) ausgeführt. Die Anpassungen beim siebten und achten Versuch bringen die besten Ergebnisse (Wunschzustand) hervor. Der fünfte Versuch von CD30 gibt Hinweise über die Ursache der Hgf, ist aber für den Verlauf der Versuche nicht relevant. Somit wird er nicht aufgeführt.

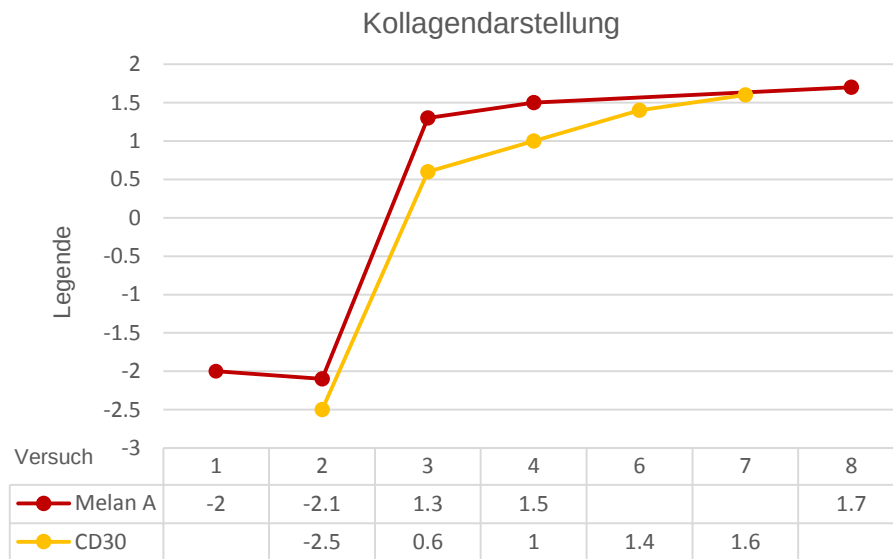


Diagramm 1: Verlaufsübersicht Kollagendarstellung nach Versuch (Steinmann, 2020)

Morphologische Interpretation des Kollagens	
1.1 bis 2	Kein Aufbrechen/ Optimale Darstellung
0.1 bis 1	Sehr leichtes Aufbrechen/ Gute Darstellung
-0.1 bis -1	Leichtes Aufbrechen
-1.1 bis -2	Mittelschweres Aufbrechen
-2.1 bis -3	Schweres Aufbrechen, z.T. sogar mit Loch

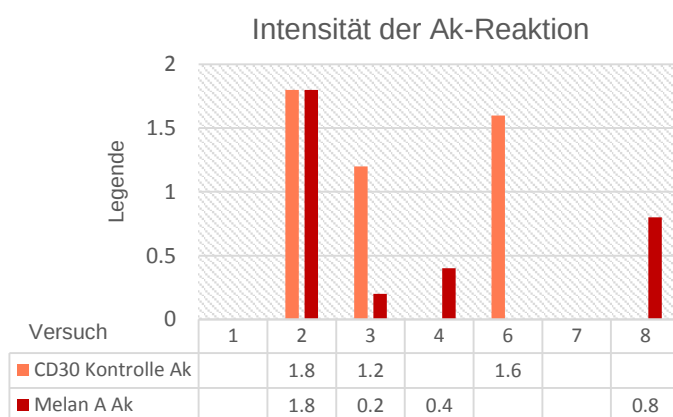


Diagramm 2: Verlaufsübersicht Ak-Reaktion nach Versuch (Steinmann, 2020)

Intensität der Ak-Reaktion	
1.1 bis 2	Optimal
0.1 bis 1	Genügend
-0.1 bis -1	Schwach

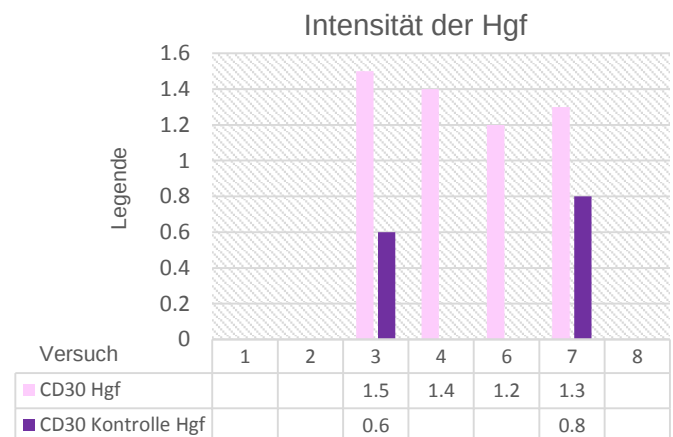


Diagramm 3: Verlaufsübersicht Hgf nach Versuch (Steinmann, 2020)

Intensität der Hgf	
1.1 bis 2	Stark
0.1 bis 1	Vorhanden
-0.1 bis -1	Nicht vorhanden

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Wie auf der vorherigen Seite als Diagramme aufgeführt, wurde das Hauptziel dieser Diplomarbeit erreicht. Das Aufbrechen des Kollagens konnte durch entsprechende Anpassungen und dem Vergleich semiquantitativer Ergebnisse weitgehend vermindert werden. Somit ist das Scannen wieder möglich. Auch konnten die Plausibilität und Stärke der Ak-Reaktion bewahrt werden. Leider ist es bei CD30 nicht gelungen, die Hgf genügend zu reduzieren.

4.2.1 Fragestellungen der Disposition

Angrenzend, werden Fragestellungen von der Disposition beantwortet und entsprechende Erkenntnisse erläutert.

Fragestellung:

Nimmt das Strecken des Schnittes nach dem Warmwasserbad, auf der Streckplatte, Einfluss auf das Aufbrechen?

- V1 Ja, es zeigt sich, dass die Struktur des Kollagens stärker aufbricht, wenn die Schnitte zusätzlich eine Minute auf der Streckplatte lagen. Eine verlängerte Trocknungszeit von 60min schont das Kollagen.

Fragestellung:

Hat die Schnittdicke einen Einfluss?

- V2 Die Schnittdicke hat Einfluss. Je dünner die Schnitte, desto weniger bricht das Kollagen auf. Leider verhält es sich mit der Stärke der Ak-Reaktion genau umgekehrt. Da auf den dünneren Schnitten weniger Ag anzutreffen sind, fällt die Ak-Reaktion, viel schwächer aus. Bevorzugt wird daher eine Schnittdicke von 3 µm mit optimaler Ak-Reaktion.

Fragestellung:

Kann das Färbeprotokoll der IHC Färbungen Melan A und CD30 durch Hitzereduktion optimiert werden?

- V3 Wie die jeweiligen Diagramme zeigen, kann es das. Sobald die Hitze reduziert wird, verschönert sich die Darstellung des Kollagens bei beiden Färbungen. Dadurch entstand die Vermutung, dass Hitze eine zentrale Rolle beim Aufbrechen des Kollagens einnimmt. Während bei Melan A parallel dazu, die Stärke der Ak-Reaktion abnimmt, entsteht bei CD30 eine rosige Hgf. Die Ak-Reaktion bei CD30 nimmt auch ab, ist bei 85°C aber dennoch sehr gut vorhanden. Bei 80°C fällt die Ak-Reaktion viel zu schwach aus. Daher wird eine Vorbehandlungstemperatur von 85°C bevorzugt. Die bevorzugte Anpassung ist im Diagramm mit einem grünen Pfeil markiert.

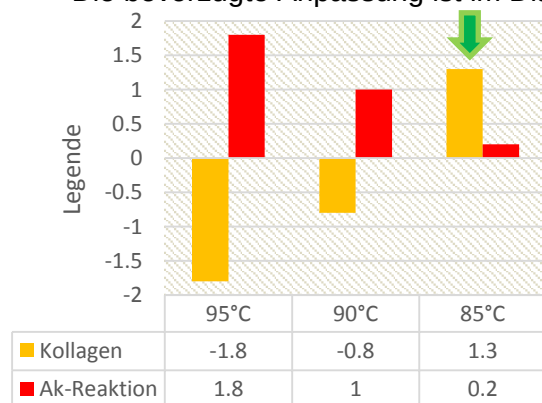


Diagramm 4: Versuch 3. Hitzereduktion bei Melan A (Steinmann, 2020)

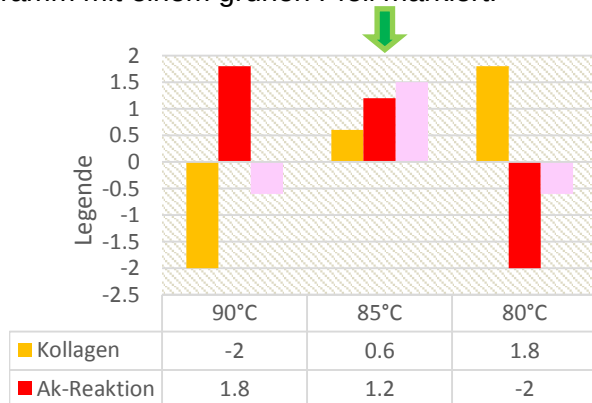


Diagramm 5: Versuch 3. Hitzereduktion bei CD30 (Steinmann, 2020)

Weitere Fragen, die sich während des methodischen Vorgehens stellten und das Färbeprotokoll betreffen, werden nachfolgend beantwortet. Beginnend mit der IHC Färbung Melan A.

4.2.2 Fragestellungen bei Melan A

Fragestellung:

Kann die Ak-Reaktion, infolge einer Zeitverlängerung der Vorbehandlung verstärkt werden, ohne dass sich die Morphologie des Kollagens verschlechtert?

- V4 Leider nicht. Die Ak-Reaktion wird stärker, jedoch leidet die Kollagendarstellung darunter. Bei einer Zeitverlängerung von 10min (H2/30) kann trotzdem eine genügend bis gute Darstellung des Kollagens erreicht werden.

Fragestellung:

Wie wirkt sich eine zusätzliche Verkürzung der Ak-Inkubationszeit auf den Schnitt aus?

- V8 Eine Ak-Inkubationszeit von 15min (H2/20) wirkt sich optimal auf das Kollagen aus. Während eine verlängerte Vorbehandlungszeit die Ak-Reaktion verstärkt. Zeigt eine Ak-Inkubationszeit von 15 und 30min keinen grossen Unterschied. Anbei werden die Ergebnisse von Versuch 8 im Diagramm dargestellt. Hiermit enden die Fragestellungen zu Melan A.

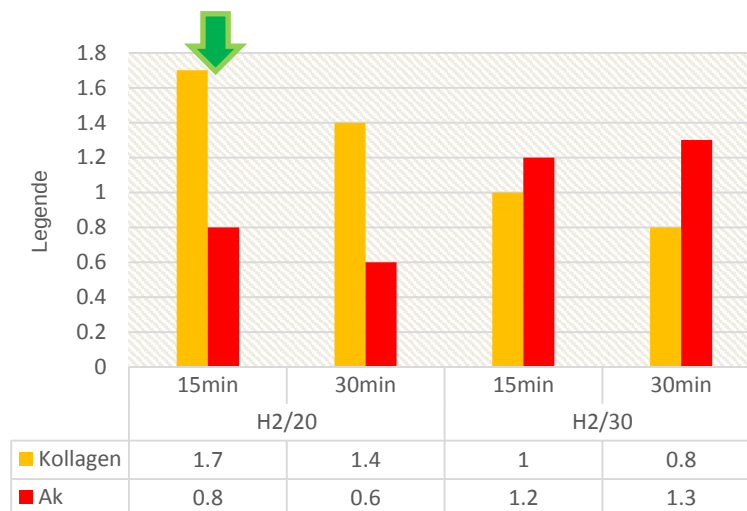


Diagramm 6: Versuch 8. Unterschiedliche Vorbehandlungs- und Ak-Inkubationszeit bei Melan A (Steinmann, 2020)

4.2.3 Fragestellungen bei CD30

Fragestellung:

Kann die Hgf durch Verändern der Vorbehandlungszeit reduziert werden? Dabei darf die verbesserte Kollagendarstellung nicht darunter leiden.

- V4 Ja kann es. Eine Vorbehandlungszeit von H2/20 reduziert nicht nur die Hgf, auch die Kollagendarstellung verbessert sich.

Fragestellung:

Kann eine Verkürzung der Ak-Inkubationszeit die Hgf reduzieren?

- V6 Eine Ak-Inkubation von 15min bewirkt eine morphologische Verbesserung des Kollagens und reduziert gleichzeitig die Hgf.

Fragestellung:

Wird die Hgf vermindert, wenn die Ak- Verdünnung, hinsichtlich der Konzentration angepasst wird?

- V7 Eine Steigerung der Ak-Konzentration von 1/40 auf 1/30 vermag die Hgf, sowohl bei den 10 Patienten, als auch bei den Kontrollen, zu vermindern. Gleichzeitig verbessert sich bei einer Verdünnung von 1/30, die Kollagendarstellung und die Ak-Reaktion. Bei einer Verdünnung von 1/20 wird ähnliches beobachtet. Zusätzlich bricht das Kollagen stärker auf und die Intensität der Hgf bei den Kontrollen nimmt zu.

4.2.4 Problematik von CD30

Wie bereits erwähnt, konnte die Hgf bei den 10 Patientenproben nicht genügend vermindert werden. Die Plausibilität der Ak-Reaktion der 10 Patienten wurde zusätzlich mit einem positiven Vergleichspatient bestätigt. Damit eine Signalüberlagerung von Ak-Reaktion und Hgf ausgeschlossen werden kann. Der Nachweis ist fotografisch auf der nächsten Seite zu finden.

Fragestellung:

Woher entsteht die Hgf bei CD30?

Diese Frage konnte trotz mehrfachem fachlichen Austausches mit einem Mitarbeiter von BioSystems nicht gänzlich geklärt werden. Anbei werden meine Vermutungen und Gedanken geäußert.

Als Ursache konnte die endogene alkalische Phosphatase, welche mit dem Chromogen Fast Red ein Signal erzeugt, ausgeschlossen werden. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zum einen, da bei Melan A trotz Verwendung des gleichen Färbekitts und Ak-Verdünnungs Diulents, keine Hgf entsteht. Zum anderen enthalten Chromogen- und Ak-Lösungen das Fungizid Levamisol (ProClin™). Levamisol blockiert die endogene alkalische Phosphatase, was die Spezifität der Detektionsmethode verbessert.

Fast Red ist ein disperser Farbstoff. Deshalb wurde versucht, die Hgf durch eine verlängerte Dehydrierung heraus zu differenzieren. Der Erfolg blieb leider aus. Daher wurde der Zusammenhang zwischen Hgf und der Dispersität des Farbstoffs nicht weiterverfolgt.

Weiter Überlegungen zu der Hgf sind in der Diskussion beschrieben.

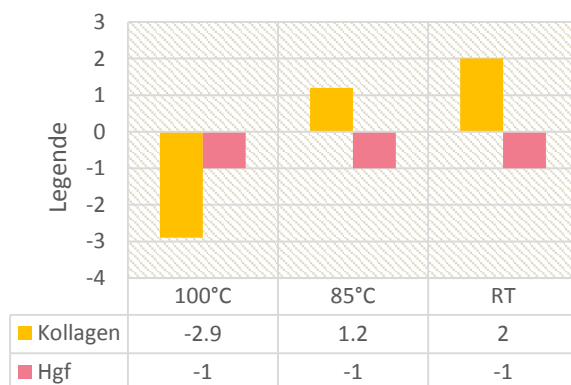


Diagramm 7: Versuch 5. Testdurchlauf ohne Ak bei CD30
(Steinmann, 2020)

Im Diagramm wird ersichtlich, wie stark Hitze die Kollagendarstellung beeinflusst. Die morphologisch beste Darstellung kann mit einer Vorbehandlung, bei RT erreicht werden. Somit bestätigt der fünfte Versuch die Erkenntnis vom dritten Versuch.

4.3 Vergleich Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand

Am Schluss ist mit dem Facharzt der Wunsch-Zustand (angepasstes Färbeprotokoll) mit dem Ist-Zustand (standardisiertes Färbeprotokoll) mikroskopisch verglichen worden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden Schnitte von positiven Patienten verwendet. Ausgehend von meinen Erkenntnissen entschied der Facharzt, welche Adaptionen im Färbeprotokoll evaluiert werden. Diese sind hiernach beschrieben.

Melan A							
Ist-Zustand				Wunsch-Zustand			
Vorbehandlung		Ak		Vorbehandlung		Ak	
Zeit	Temperatur	Inkubationszeit	Konzentrat	Zeit	Temperatur	Inkubationszeit	Konzentrat
H2/20	100°C	15min	1/100	H2/20	85°C	15min	1/100

Tabelle 11: Vergleich Färbeprotokoll Melan A, Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand (Steinmann, 2020)

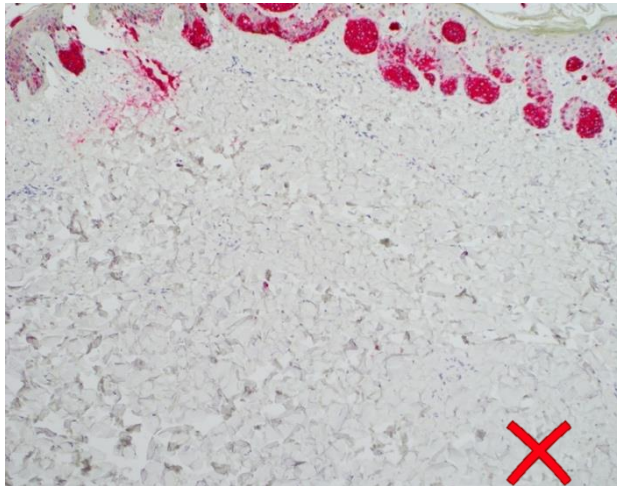


Abbildung 8: Ist-Zustand Melan A. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

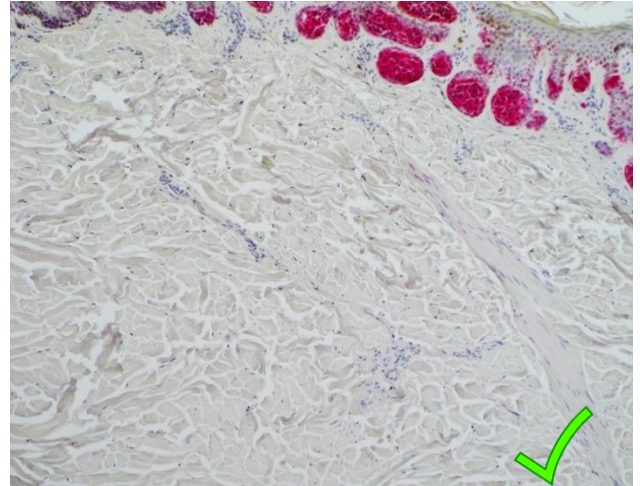


Abbildung 9: Wunsch-Zustand Melan A. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

Die Intensität der Ak-Reaktion bei einer Vorbehandlungszeit von H2/20 und einer Ak-Inkubation von 15min ist laut dem Facharzt für die Diagnosestellung ausreichend.

CD30							
Ist-Zustand				Wunsch-Zustand			
Vorbehandlung		Ak		Vorbehandlung		Ak	
Zeit	Temperatur	Inkubationszeit	Konzentrat	Zeit	Temperatur	Inkubationszeit	Konzentrat
H2/30	95°C	30min	1/40	H2/20	85°C	15min	1/30

Tabelle 12: Vergleich Färbeprotokoll CD30, Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand (Steinmann, 2020)

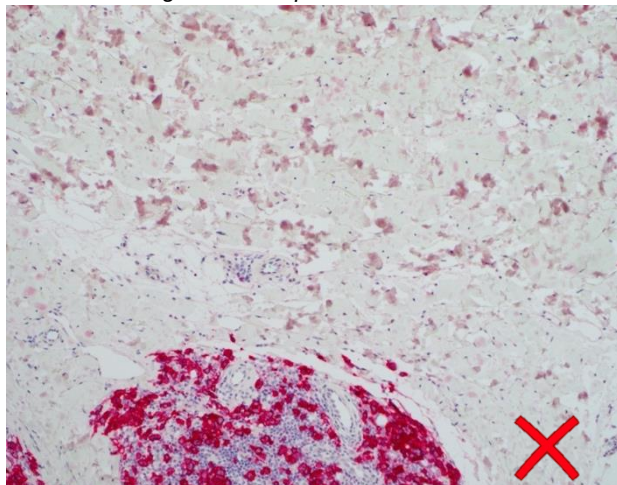


Abbildung 10: Ist-Zustand CD30. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

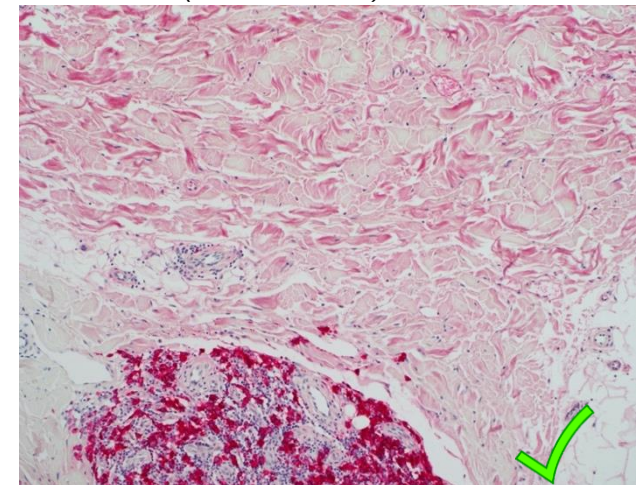


Abbildung 11: Wunsch-Zustand CD30. 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

Mit dem positiven Patienten (Wunsch-Zustand) konnte eine Signalüberlagerung von Hgf und Ak-Reaktion ausgeschlossen werden.

Auswertung	
✓	Brauchbar
✗	Nicht brauchbar

4.4 Diskussion/ Schlussfolgerung

Die wichtigste Erkenntnis dieser Diplomarbeit betrifft die Vorbehandlungstemperatur im Bond III. Wird die Temperatur auf 85°C gesenkt, verschönert sich die morphologische Darstellung des Kollagens bei beiden Färbungen erheblich. Unterstützt wird die gute Darstellung des Kollagens von der verlängerten Trocknungszeit im Ofen bei 60°C. Dies wirkt sich aber nachteilig auf die Effizienz des Arbeitsprozesses aus. Dem Entgegen wirkt die verkürzte Ak-Inkubationszeit von 15min bei CD30.

Um die Erkenntnisse zu bestätigen und Ideen für weiterführende Versuche zu erlangen, wurde mit Schlüsselbegriffen in verschiedenen Datenbanken recherchiert.

Leider sind keine hilfreichen Studien gefunden worden. Keine, die im Zusammenhang mit dieser Diplomarbeit von Nutzen wären. So wurden eigene Vermutungen angestellt. Wie die Hgf entsteht und in welchem Bereich weiter ausgetestet werden könnte.

Hitze ermöglicht die Demaskierung der Ag. Durch Senkung der Vorbehandlungstemperatur im Bond III auf 85°C ist die spezifische Markierung der gesuchten Ag vermutlich nicht mehr ausreichend. Abgeleitet von der Theorie würde erwartet werden, dass es zu einer Abschwächung der Ak-Reaktion kommt. Dieser Effekt bestätigt sich bei Melan A (V3) sowie bei den On-slide Kontrollen von CD30 (V3). Das einzige Reagenz, welches die beiden IHC Färbungen unterscheidet, ist die Ak-Verdünnungslösung (des Ak-Konzentrates). Deshalb wurde beim fünften Versuch ein CD30 Testdurchlauf, ohne Ak durchgeführt. Das zugehörige Diagramm ist auf Seite 17 zu finden. Mikroskopisch konnte beim fünften Versuch keine Hgf mehr festgestellt werden. Dadurch etablierte sich folgende Vermutung:

Durch die Temperatursenkung auf 85°C wird die Fähigkeit der monoklonalen primären Ak von CD30, spezifisch an die Ag zu binden, eingeschränkt. Das Risiko für Kreuz Reaktivität mit unbekannten Proteinen steigt. Auch eine verlängerte Vorbehandlungszeit kann dem nicht entgegenwirken. Die Ursache könnte in der Methode zur monoklonalen Gewinnung oder in den vorgefertigten Ak-Lösungen zu finden sein. Denn die Ak-Lösungen enthalten noch andere Proteine. Die genauen Zusammensetzungen sind im Anhang bei «7 Packungsbeilage beschrieben».

Beim wiederholten Mikroskopieren der eingedeckten Schnitte, die einen Monat zuvor gefärbt wurden, machte ich eine schockierende Entdeckung. Die Signalstärke der beiden IHC Färbungen ist schwächer geworden. Durch weitere sorgfältige Überprüfung konnte dieser Effekt bei allen anderen Färbungen (ausser HE) beobachtet werden. Dies stellt ein schwerwiegendes Problem für die Ärzte dar. Da bereits hergestellte Schnitte in Zukunft nicht mehr zur Unterstützung einer aktuellen Diagnose hinzugezogen werden können. Die Ursache für das Ausbleichen konnte innerhalb des zur Verfügung stehenden Zeitrahmens nicht festgestellt werden. In Verdacht steht das Isopropanol selbst, das Zwischenintermedium Ultra Clear oder das dazu gehörende Eindeckmedium CV Ultra.

4.5 Fazit

Das Hauptziel der vorliegenden Diplomarbeit wurde erreicht. Trotzdem möchte das Institut die geschilderte Problematik, welche mit der Verwendung von Isopropanol einhergehen, in Zukunft nicht mehr hinnehmen. Es wird daher der Umstieg auf ein anderes Intermedium diskutiert. In Frage dafür käme das Intermedium Ottix plus, ein Gemisch von aliphatischem Kohlenwasserstoff. Die Zeit bis der Umstieg erfolgt, wird mit dem angepassten Standardfärbeprotokoll überbrückt.

5 Reflexion

Es überraschte mich, wie umfangreich und verworren das Erarbeiten eines Themas sein kann. Ich bin dankbar für diese Erfahrung, auch dass ich in zukünftige Arbeiten davon profitieren kann. Das in der Disposition vorgeschlagene Vorgehen mit den entsprechenden Fragestellungen war ein guter Ansatz, reichte aber bei weitem nicht aus, um das Ziel zu erreichen. Ich bin dem Institut sehr dankbar, wie grosszügig sie mir die Zeit für den gesamten Prozess zur Verfügung stellten. Die motivierende und fachliche Unterstützung meines Diplomarbeitsbetreuers und meiner Mitarbeiter haben mir während dieser Zeit sehr geholfen, der Arbeit gerecht zu werden und dran zu bleiben.

Die akribische Auseinandersetzung mit der Theorie war für mich sehr lehrreich und vermochte meinen Wissensdurst zu aktivieren. Schwieriger gestaltete sich die Erarbeitung der Theorie von Melan A und CD30. Da ich keine zufriedenstellende Literatur im Institut oder Zuhause zur Verfügung hatte, musste ich mich allein mit der Internetrecherche begnügen. Glücklicherweise bekam ich dabei Hilfe von einem Facharzt, der sich mit den Markern bestens auskennt.

Die Durchführung der Versuche generierte bei Misserfolgen nicht nur Enttäuschungen, sie motivierten auch, mich noch intensiver mit der Problematik und den gewonnenen Erkenntnissen auseinanderzusetzen.

Enttäuschend fand ich, dass ich nicht von diversen Datenbanken profitieren konnte. So fiel der Zugriff auf Studien weg, die meine Erkenntnisse bestätigen oder mir neue Denkanstösse hätten liefern können. Vor allem in Bezug zur Hgf wären externe Erkenntnisse sehr hilfreich gewesen. Dadurch sah ich mich verpflichtet, selbst Hypothesen aufzustellen indem ich Theorie und Praxis vereine.

Herausfordernd stellte sich das Erstellen der Fotos dar. Ein direkter Vergleich aller hergestellten Schnitte war aufgrund der Qualität nicht möglich. Deshalb versuchte ich, innerhalb eines Versuches, immer die gleiche Stelle beim selben Patienten zu fotografieren. Dies gestaltete sich schwierig. Zum einen, da ich einige Schnitte wiederholen musste und sich daher die Schichten auf den Fotos unterscheiden. Auch Luftsinschlüsse und Schmutz auf den Objektträgern erschwerten die Auswahl. Ein weiteres Problem ergab sich durch die zeitliche Abschwächung des Signals bei den Färbungen. Da ich dies erst gegen Ende des Erarbeitens der Diplomarbeit bemerkte, konnte ich die Schnitte nicht wiederholen. Daher wählte ich Schnitte, bei denen das Signal noch genügend stark vorhanden war.

Im Nachhinein wären mir viel Zeit und Nerven erspart geblieben, hätte ich vor dieser Diplomarbeit einen Excel-Kurs absolviert. Erst recht konnte ich durch das langwierige Erstellen der Linien und Säulendiagramme viel lernen.

In Anbetracht des geleisteten Aufwandes bin ich dennoch sehr zufrieden, die Chance bekommen zu haben, eine solch forschende Arbeit schreiben zu dürfen.

Ungeachtet des geplanten Umstiegs auf Ottix plus hoffe ich, dass auch weitere Firmen oder Laboratorien in Zukunft von meinen Ergebnissen profitieren können.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufgebrochenes Kollagen bei CD30. 10fache Vergrößerung.....	IV
Abbildung 2: Aufgebrochenes Kollagen bei Melan A. 10fache Vergrößerung.....	IV
Abbildung 3: Aufbau der Haut.....	3
Abbildung 4: Molekularstruktur des Kollagens.....	4
Abbildung 5: Aufbau IgG.....	6
Abbildung 6: Herstellung monoklonaler Ak.....	7
Abbildung 7: Kompaktes Polymer.....	8
Abbildung 8: Ist-Zustand Melan A. 10fache Vergrößerung.....	18
Abbildung 9: Wunsch-Zustand Melan A. 10fache Vergrößerung.....	18
Abbildung 10: Ist-Zustand CD30. 10fache Vergrößerung.....	18
Abbildung 11: Wunsch-Zustand CD30. 10fache Vergrößerung.....	18
Abbildung 12: Dehydrierungsprotokoll Peloris.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien von BioSystems	10
Tabelle 2: Standardisiertes Färbeprotokoll	11
Tabelle 3: Versuch 1. Vergleich Streckvorgang und Trocknungszeit bei Melan A	11
Tabelle 4: Versuch 2. Austestung Schnittdicke bei Melan A und CD30	12
Tabelle 5: Versuch 3. Hitzereduktion bei Melan A und CD30	12
Tabelle 6: Versuch 4. Unterschiedliche Vorbehandlungszeit bei Melan A und CD30	12
Tabelle 7: Versuch 5. Testdurchlauf ohne Ak bei CD30	13
Tabelle 8: Versuch 6. Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit mit H2/20 bei CD30	13
Tabelle 9: Versuch 7. Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40 bei CD30	13
Tabelle 10: Versuch 8. Vergleich der Vorbehandlungszeit von H2/20 und H2/30, mit unterschiedlicher Ak-Inkubationszeit bei Melan A	13
Tabelle 11: Vergleich Färbeprotokoll Melan A, Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand	18
Tabelle 12: Vergleich Färbeprotokoll CD30, Ist-Zustand mit Wunsch-Zustand	18
Tabelle 13: Mittelwert der Ergebnisse bei Melan A	28
Tabelle 14: Mittelwert der Ergebnisse bei CD30	28
Tabelle 15: Versuch 1. Ergebnisse: Vergleich Streckvorgang und Trocknungszeit bei Melan A	30
Tabelle 16: Versuch 2. Ergebnisse: Austestung Schnittdicke bei Melan A	30
Tabelle 17: Versuch 2. Ergebnisse: Austestung Schnittdicke bei CD30	30
Tabelle 18: Versuch 3. Ergebnisse: Hitzereduktion bei Melan A	31
Tabelle 19: Versuch 3a. Ergebnisse: Hitzereduktion bei CD30	31
Tabelle 20: Versuch 3b. Ergebnisse: Hitzereduktion bei CD30	31
Tabelle 21: Versuch 4. Ergebnisse: Unterschiedliche Vorbehandlungszeit bei Melan A	32
Tabelle 22: Versuch 4. Ergebnisse: Unterschiedliche Vorbehandlungszeit bei CD30	32
Tabelle 23: Versuch 5. Ergebnisse: Testdurchlauf ohne Ak bei CD30	32
Tabelle 24: Versuch 6. Ergebnisse: Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit mit H2/20 bei CD30	33
Tabelle 25: Versuch 7a. Ergebnisse: Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40 bei CD30	33
Tabelle 26: Versuch 7b. Ergebnisse: Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40 bei CD30	34
Tabelle 27: Versuch 8. Ergebnisse: Vergleich der Vorbehandlungszeit von 20min und 30min, mit unterschiedlicher Ak Inkubationszeit bei Melan A	34
Tabelle 28: Versuch 1a. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache Vergrößerung	36
Tabelle 29: Versuch 1b. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache Vergrößerung	37
Tabelle 30: Versuch 2. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	38
Tabelle 31: Versuch 3. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	39
Tabelle 32: Versuch 4. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	40
Tabelle 33: Versuch 8a. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	41
Tabelle 34: Versuch 8b. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	42
Tabelle 35: Versuch 2. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	44
Tabelle 36: Versuch 3. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung	45
Tabelle 37: Versuch 4. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache Vergrößerung	46
Tabelle 38: Versuch 5. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.)	

<i>10fache Vergrößerung</i>	47
Tabelle 39: Versuch 6. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.)	
<i>10fache Vergrößerung</i>	48
Tabelle 40: Versuch 7. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.)	
<i>10fache Vergrößerung</i>	49
Tabelle 41: Preisvergleich Xylol und Isopropanol.....	57

Literaturverzeichnis

- Agilent (2013). *Melan-A (Concentrate)*. Zugriff am 07.03.2020 unter:
[https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/antibodies-controls/primary-antibodies/melan-a-\(concentrate\)-76638#productdetails](https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/antibodies-controls/primary-antibodies/melan-a-(concentrate)-76638#productdetails)
- Altmeyer, P. (2019). *CD30*. Zugriff am 07.03.2020 unter:
<https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/cd30-18672>
- Amboss Fachwissen für Mediziner (2019). *Bindegewebe*. Zugriff am 24.02.20 unter:
<https://www.amboss.com/de/wissen/Bindegewebe>
- Antwerpes, F (2004). *Desquamation*. Zugriff am 23.02.20 unter:
<https://flexikon.doccheck.com/de/Desquamation>
- Antwerpes, F. (2005). *Keratinozyt*. Zugriff am 20.02.2020 unter:
<https://flexikon.doccheck.com/de/Keratinozyt>
- Antwerpes, F. (2006a). *Stratum spinosum*. Zugriff am 23.02.2020 unter:
[https://flexikon.doccheck.com/de/Stratum spinosum](https://flexikon.doccheck.com/de/Stratum_spinosum)
- Antwerpes, F. (2006b). *Stratum granulosum*. Zugriff am 23.02.2020 unter:
[https://flexikon.doccheck.com/de/Stratum granulosum](https://flexikon.doccheck.com/de/Stratum_granulosum)
- Ardit, Z. (2020). *CD30*. Zugriff am 07.03.2020 unter:
<https://flexikon.doccheck.com/de/CD30>
- Benz, A. (30.04.2020). Interview: *Marker Melan A und CD30*. Ort: Labor Kempf und Pfaltz Zürich.
- BioSystems (2018). Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper Melan A. Packungsbeilage. Muttenez: BioSystems AG.
- BioSystems (2019). *BOND Polymer Refine Red Detection*. Packungsbeilage. Muttenez: BioSystems AG.
- Boenisch, T. (2003). *Handbuch Immunchemische Färbemethoden* (3. Auflage). Carpinteria: DakoCytomation Corp.
- Cell Marque (2017). *CD30 (Ber-H2) Mouse Monoclonal Antibody*. Packungsbeilage. Rocklin: Sierra College Blvd.
- Converse, P. & Gross, M. (2001). *Melan A; Mlana*. Zugriff am 07.03.2020 unter:
<https://www.omim.org/entry/605513>
- Fendt, T. (2020). *Molekularstruktur des Kollagens*. Bildmaterial. Zugriff an 24.02.2020 unter:
<https://www.brainperform.de/kollagen/>
- Fischer Kompakt (Datum unbekannt). *Polypeptidkette*. Zugriff am 21.05.2020 unter :
https://www.fischerverlage.de/?template=glossar_detail&id=188153
- Gudrun, L. (2013). *Histotechnik. Praxislehrbuch für Biomedizinische Analytik* (2. Auflage). Linz: SpringerWienNewYork

- Hartmann, T. (Datum unbekannt). *Aufbau der Haut*. Zugriff am 20.02.2020 unter: <https://www.osteopathie-in-lueneburg.de/haut/>
- Härri, S. (Datum unbekannt a). *Leica Bond-III Vollautomat für IHC & ISH*. Unveröffentlichtes Weiterbildungsdokument. Muttenz: BioSystems AG.
- Härri, S. (Datum unbekannt b). *Kompaktes Polymer*. Unveröffentlichtes Weiterbildungsdokument. Muttenz: BioSystems AG.
- Härri, S. (22.02.2020). Interview: *Inaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase*. Ort: Labor Kempf und Pfaltz.
- Hircin, E. (2006). *Stratum disjunctum*. Zugriff am 23.02.2020 unter: https://flexikon.doccheck.com/de/Stratum_disjunctum
- Kempf und Pfaltz (2019a). *Einbettungsprotokoll mit Isopropanol*. Interne Dokumente (nur auf Anfrage). Zürich: Kempf und Pfaltz.
- Kempf und Pfaltz (2019b). *IHC Alte Färbeprotokolle Melan A und CD30*. Unveröffentlichtes Dokument. Zürich: Kempf und Pfaltz
- Kempf und Pfaltz (2020). *IHC Neue Färbeprotokolle Melan A und CD30*. Unveröffentlichtes Dokument. Zürich: Kempf und Pfaltz
- Laustela, S. (03.01.2020). Interview: *Verdrängungsprinzip von Paraffin bei der Isopropanol Dehydrierung*. Ort: Labor Kempf und Pfaltz Zürich.
- Lehmann, H. (2020). *Tabelle: Preisvergleich Xylol und Isopropanol*. Unveröffentlichtes Dokument. Zürich: Kempf und Pfaltz.
- Lüllmann-Rauch, R. et al. (2017). *Das Gewebe – Die Gewebetypen im Überblick*. Zugriff am 24.02.2020 unter: <https://www.lecturio.de/magazin/gewebetypen-des-koerpers/>
- Lymphoma Info (2020). *Anaplastic Large Cell (Ki-1 / CD-30) Lymphoma*. Zugriff am 07.03.2020 unter: <https://www.lymphomainfo.net/nhl/types/alcl.html>
- MZV für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik Trier (2018). *Der Weg der Probe*. Zugriff am 02.03.2020 unter: <file:///Users/ale/Desktop/Histologie/Der%20Weg%20der%20Probe.html>
- Nicolay, N. (2004). *Kollagen*. Zugriff am 24.02.20 unter: <https://flexikon.doccheck.com/de/Kollagen>
- PharmaWiki (2007). *Isopropanol*. Zugriff am 02.03.20 unter: <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Isopropanol>
- Rabello de Oliveira, L. et al. (2013). *Primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma*. Zugriff am 07.03.2020 unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875977/>
- Römer, G. (2013). *Isopropanol*. Zugriff am 02.03.20 unter: <https://flexikon.doccheck.com/de/Isopropanol>
- Rudolf-Müller, E. (2016). *Epidermis*. Zugriff am 20.02.2020 unter: <https://www.netdoktor.de/anatomie/epidermis/>

Schöpflin, A. (2019). *Vertiefung Histologie – IHC Workshop*. Unveröffentlichtes Weiterbildungsdokument. Muttenz: BioSystems AG.

Steinmann, A. (2020). *Aufgebrochnes Kollagen bei CD30*. 10fache Vergrößerung. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). *Aufgebrochnes Kollagen bei Melan A*. 10fache Vergrößerung. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). *Ist-Zustand Melan A*. 10fache Vergrößerung. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). *Wunsch-Zustand Melan A*. 10fache Vergrößerung. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). *Ist-Zustand CD30*. 10fache Vergrößerung. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). *Wunsch-Zustand CD30*. 10fache Vergrößerung. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). *Dehydrierungsprotokoll Peloris*. Selbsterstelltes Bildmaterial. Zürich.

Steinmann, A. (2020). Tabellen 1- 38. Selbsterstellte Tabellen. Zürich

Steinmann, A (2020). Diagramme 1-7. Selbsterstellte Diagramme. Zürich

Walensi, M. (2009). *Malignes Melanom*. Zugriff am 07.03.2020 unter:
https://flexikon.doccheck.com/de/Malignes_Melanom

Welsch, U. & Kummer, W. (2014). *Lehrbuch Histologie* (4. Auflage). München: Elsevier Urban & Fischer

Anhang 1 Ergebnisse der Versuche

1.1 Ergebnisse

Nachfolgend werden die semiquantitativen Ergebnisse jedes Versuchs tabellarisch aufgeführt. Um den Verlauf der Versuche übersichtlicher vergleichen und interpretieren zu können, wird zuerst nur der Mittelwert der Ergebnisse «1.1.3» dargestellt. Zusätzlich werden für die Bedingungen und Anpassungen, Abkürzungen verwendet. Mittelwerte lassen sich mit der Legende «1.1.2» beurteilen. Abkürzungen werden anschliessend im Verzeichnis «1.1.1» erklärt. Die vollständigen Tabellen mit Ergebnissen (Rohdaten) finden sich bei «1.2».

1.1.1 Abkürzungsverzeichnis

Bond

Vorbehandlung		Antikörper	
Z	Zeit	I	Inkubationszeit
T	Temperatur °C	V	Verdünnung

Markierungen:

Optimalste Ergebnisse (Anpassungen werden nachfolgend übernommen)
--

Anpassungen und Ergebnisse

Darstellung von			
K	Kollagen	Hgf	Hintergrundfärbung
Ak	Ak-Reaktion	V.	Versuch
Ergebnisse			
Ø	Mittelwert (10 Patientenproben, Kontrollen und Vergleichspatienten)		

1.1.2 Legende Mittelwert der Ergebnisse

Morphologische Interpretation des Kollagens	
1.1 bis 2	Optimale Darstellung: Kein Aufbrechen des Kollagens
0.1 bis 1	Genügende Darstellung: Sehr leichtes Aufbrechen des Kollagens
-0.1 bis -1	Ungenügende Darstellung: Leichtes Aufbrechen
-1.1 bis -2	Ungenügende Darstellung: Mittelschweres Aufbrechen
-2.1 bis -3	Ungenügende Darstellung: Schweres Aufbrechen, z.T. sogar mit Loch

Intensität der Ak-Reaktion		Intensität Hgf-Färbung	
1.1 bis 2	Optimale Reaktion	1.1-2	starke Hgf
0.1 bis 1	Genügende Reaktion	0.1 bis 1	Hgf
-0.1 bis -1	Schwache Reaktion: z.T. nicht vorhanden	-0.1 bis -1	schwach bis gar nicht vorhanden
-1.1 bis -2	Sehr schwache Reaktion bis gar nicht vorhanden		

1.1.3 Mittelwert der Ergebnisse

Melan A Bond III					Anpassungen (x) /Ergebnisse (Ø)					
V.	Vorbehandlung		Antikörper:							
1	Z	T	I	V	Streckplatte	+ 1min		ohne		
	H2/20	100°C	15min	1/100	Trocknen im Ofen 60°C	30min	60min	30min	60min	
	Standard				Darstellung von	K				
					Patient Ø	-2.6	-2.4	-2.4	-2	
2	H2/20	100°C	15min	1/100	Schnittdicke	1 µm		2 µm		3 µm
	Standard				Darstellung von	K	Ak	K	Ak	K Ak
					Patient Ø	-0.7	-1.1	-1.7	0.4	-2.1 1.8
	H2/20	x	15min	1/100	T	95°C		90°C		85°C
3					Darstellung von	K	Ak	K	Ak	K Ak
					Patient Ø	-1.8	1.8	-0.8	1	1.3 0.2
	x	85°C	15min	1/100	Z	20min		30min		40min
					Darstellung von	K	Ak	K	Ak	K Ak
4					Patient Ø	1.5	0.4	0.5	1.2	-1 1.8
	x	85°C	x	1/100	Z	20min		30min		
					I	15min	30min	15min	30min	
					Darstellung von	K	Ak	K	Ak	K Ak
8					Patient Ø	1.7	0.8	1.4	0.6	1 1.2 0.8 1.3

Tabelle 13: Mittelwert der Ergebnisse bei Melan A (Steinmann, 2020)

CD30 Bond III					Anpassungen (x) /Ergebnisse (Ø)																
V.	Vorbehandlung		Antikörper																		
2	Z	T	I	V	Schnittdicke		1 µm		Kontrolle		2 µm		Kontrolle		3 µm		Kontrolle				
	H2/30	95°C	30min	1/40	Darstellung		K		Ak		K		Ak		K		Ak				
	Standard				Patient Ø		-0.2		-1.2		-1.7		0.9		-2.5		1.8				
3	H2/30	x	30min	1/40	T	90°C		Kontrolle		85°C		Kontrolle		80°C		Kontrolle					
				Darstellung	K	Hgf	Ak	Hgf	K	Hgf	Ak	Hgf	K	Hgf	Ak	Hgf					
				Patient Ø	-2	-0.6	1.8	-0.8	0.6	1.5	1.2	0.6	1.8	-0.6	-2	-1					
4	x	85°C	30min	1/40	Z	20min				30min				40min							
					Darstellung	K				Hgf				K		Hgf		K		Hgf	
					Patient Ø	1.0				1.4				0.5		1.8		-1.6		1.6	
5	H2/20	x	ohne Ak		T	100°C				85°C				RT							
				Darstellung	K				Hgf				K		Hgf		K		Hgf		
				Patient Ø	-2.9				-1				1.2		-1		2.0		-1		
6	H2/20	85°C	x	1/40	I	15min						30min									
					Darstellung	K				Hgf				K		Hgf					
					Patient Ø	1.4				1.2				1.6		1.6					
7	H2/20	85°C	x	x	I	10min															
				V	1/20		Kontrolle		1/30		Kontrolle		1/40		Kontrolle						
				Darstellung	K	Hgf	Ak	Hgf	K	Hgf	Ak	Hgf	K	Hgf	Ak	Hgf					
				Patient Ø	0.8	1.2	1.8	2	1.6	1.3	1.6	0.8	1.1	1.6	1.5	2.0					

Tabelle 14: Mittelwert der Ergebnisse bei CD30 (Steinmann, 2020)

1.2 Vollständige Ergebnisse der Versuche

1.2.1 Legende

Auswertung	
✓	Brauchbar
✗	Nicht brauchbar

Morphologische Interpretation des Kollagens	
++	Optimale Darstellung: Kein Aufbrechen des Kollagens
+	Genügende Darstellung: Sehr leichtes Aufbrechen des Kollagens
-	Ungenügende Darstellung: Leichtes Aufbrechen
- -	Ungenügende Darstellung: Mittelschweres Aufbrechen
- - -	Ungenügende Darstellung: Schweres Aufbrechen, z.T. sogar mit Loch

Intensität der Antikörper-Reaktion	
++	Optimale Reaktion
+	Genügende Reaktion
-	Schwache Reaktion: z.T. nicht vorhanden
- -	Sehr schwache Reaktion bis gar nicht vorhanden

Intensität Hgf-Färbung	
+ +	starke Hgf
+	Hgf
-	schwach bis gar nicht vorhanden

1.2.2 Tabellen Ergebnisse

Versuch 1 Vergleich des Streckvorgangs und der Trocknungszeit

+ 1min Streckplatte Trocknungszeit im Ofen Darstellung von	Melan A H2/30 100°C			
	Mit		ohne	
	30min	60min	30min	60min
	Kollagen		Kollagen	
1	---	--	--	---
2	---	--	--	--
3	--	---	---	--
4	--	-	---	-
5	---	---	---	--
6	--	--	---	--
7	---	---	--	---
8	--	--	--	-
9	---	---	---	--
10	---	---	---	--
Auswertung:	-26	-24	-24	-20

Tabelle 15: Versuch 1. Ergebnisse: Vergleich Streckvorgang und Trocknungszeit bei Melan A

Versuch 2 Austestung der Schnittdicke

IHC Färbung Vorbehandlung Schnittdicke Darstellung von:	Melan A H2/20 100°C					
	1 µm		2 µm		3 µm	
	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion
1	-	--	--	-	---	++
2	-	-	--	-	--	++
3	+	-	--	+	--	++
4	-	-	--	+	--	++
5	+	-	-	+	--	++
6	+	-	-	+	-	++
7	-	-	--	-	--	+
8	-	-	-	+	--	++
9	-	-	--	+	--	+
10	-	-	--	+	---	++
Auswertung:	- 7	- 11	- 17	+ 4	- 21	+ 18

Tabelle 16: Versuch 2. Ergebnisse: Austestung Schnittdicke bei Melan A (Steinmann, 2020)

IHC Färbung: Vorbehandlung Schnittdicke Darstellung von:	CD30 H2/30 95°C					
	1 µm	1 µm Kontrolle	2 µm	2 µm Kontrolle	3 µm	3 µm Kontrolle
	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion
2	-	-	--	+	--	++
3	+	-	--	++	--	++
4	+	-	-	+	--	++
5	-	--	--	+	---	++
6	+	--	-	+	--	++
7	-	-	--	+	---	++
8	-	-	-	+	--	++
9	+	-	--	+	---	+
10	-	-	--	-	---	++
Auswertung:	- 2	- 12	- 17	+ 9	- 25	+ 18

Tabelle 17: Versuch 2. Ergebnisse: Austestung Schnittdicke bei CD30 (Steinmann, 2020)

Versuch 3 Hitzereduktion

IHC Färbung: Vorbehandlung	Melan A H2/20					
Temperatur	95°C		90°C		85°C	
Darstellung von:	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion
1	---	++	--	+	+	+
2	---	++	-	+	++	-
3	--	++	--	+	+	+
4	--	++	-	+	++	-
5	-	+	-	+	+	+
6	--	++	-	++	+	+
7	---	+	--	+	+	-
8	--	++	-	+	+	-
9	---	++	--	+	+	+
10	--	++	-	+	++	+
Auswertung:	- 23	✗ + 18	- 14	✗ + 10	+ 13	✓ + 2

Tabelle 18: Versuch 3. Ergebnisse: Hitzereduktion bei Melan A (Steinmann, 2020)

	CD30 H2/30							
Ak-Verdünnung	90°C		90°C Kontrolle		85°C		85°C Kontrolle	
Darstellung von	Kollagen	Hgf	Ak-Reaktion	Hgf	Kollagen	Hgf	Ak-Reaktion	Hgf
1	---	-	++	-	+	+	+	+
2	--	-	++	-	-	++	+	+
3	--	-	++	-	+	++	++	+
4	--	-	++	-	+	+	+	-
5	-	+	+	-	+	+	++	+
6	--	-	++	-	+	++	+	+
7	---	-	++	-	+	++	+	+
8	--	-	+	-	-	+	+	-
9	--	+	++	+	+	++	+	+
10	-	-	++	-	+	+	+	+
Auswertung	- 20	- 6	✗ 1.8	- 8	+ 6	+ 15	✓ + 12	+ 6

Tabelle 19: Versuch 3a. Ergebnisse: Hitzereduktion bei CD30 (Steinmann, 2020)

IHC Färbung: Vorbehandlung	CD30 H2/30			
Ak-Verdünnung	80°C		80°C Kontrolle	
Darstellung von	Kollagen	Hgf	Ak-Reaktion	Hgf
1	++	-	+	-
2	++	-	++	-
3	++	-	++	-
4	++	-	+	-
5	+	+	++	-
6	++	-	++	-
7	++	+	++	-
8	+	-	++	-
9	++	-	++	-
10	++	-	+	-
Auswertung	+ 18	- 6	✗ - 20	- 10

Tabelle 20: Versuch 3b. Ergebnisse: Hitzereduktion bei CD30 (Steinmann, 2020)

Versuch 4 Unterschiedliche Vorbehandlungszeit

IHC Färbung:	Melan A 85°C					
Temperatur Vorbehandlung						
Zeit Vorbehandlung	20min		30min		40min	
Darstellung von:	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion
1	++	+	+	+	+	++
2	++	+	+	+	-	++
3	+	-	+	+	-	++
4	++	+	++	+	-	+
5	++	+	-	++	--	++
6	+	+	-	+	-	++
7	+	-	+	+	-	+
8	+	+	+	++	-	++
9	+	+	-	+	--	++
10	++	-	+	+	-	++
Auswertung:	+ 15	✓ + 4	+ 5	✓ + 12	- 10	✗ + 18

Tabelle 21: Versuch 4. Ergebnisse: Unterschiedliche Vorbehandlungszeit bei CD30 (Steinmann, 2020)

IHC Färbung:	CD30 85°C					
Temperatur Vorbehandlung						
Zeit Vorbehandlung	20min		30min		40min	
Darstellung von:	Kollagen	Hgf	Kollagen	Hgf	Kollagen	Hgf
1	++	+	++	++	-	+
2	++	++	+	++	--	++
3	+	++	-	+	--	+
4	+	++	+	++	-	++
5	+	+	+	++	--	++
6	+	+	+	++	-	+
7	-	+	-	++	--	++
8	+	+	+	++	-	++
9	+	+	+	+	--	+
10	+	++	-	++	--	++
Auswertung:	+ 10	✓ + 14	+ 5	✗ + 18	- 16	✗ + 16

Tabelle 22: Versuch 4. Ergebnisse: Unterschiedliche Vorbehandlungszeit bei Melan A (Steinmann, 2020)

Versuch 5 Testdurchlauf ohne Ak

IHC Färbung:	CD30 H2/20					
Temperatur Vorbehandlung	100°C		85°C		RT	
Darstellung von:	Kollagen	Hgf	Kollagen	Hgf	Kollagen	Hgf
1	---	-	+	-	++	-
2	---	-	+	-	++	-
3	---	-	++	-	++	-
4	---	-	+	-	++	-
5	---	-	+	-	++	-
6	---	-	+	-	++	-
7	---	-	+	-	++	-
8	--	-	++	-	++	-
9	---	-	+	-	++	-
10	---	-	+	-	++	-
Auswertung:	- 29	✗ - 10	+ 12	✓ - 10	+ 20	✓ - 10

Tabelle 23: Versuch 5. Ergebnisse: Testdurchlauf ohne Ak bei CD30 (Steinmann, 2020)

Methodenevaluierung

Zur Verminderung des Aufbrechens von Kollagen in der Haut
bei immunhistochemischen Färbungen

Versuch 6 Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit mit H2/20

IHC Färbung	CD30 H2/20 85°C			
Ak-Inkubationszeit	15min		30min	
Darstellung von	Kollagen	Hgf	Kollagen	Hgf
1	++	+	++	+
2	+	+	++	++
3	++	++	++	+
4	+	+	+	++
5	+	+	+	++
6	+	+	++	+
7	++	+	++	++
8	++	+	++	++
9	+	++	+	++
10	+	+	+	+
Auswertung:	+ 14	+ 12	+ 16	+ 16

Tabelle 24: Versuch 6. Ergebnisse: Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit mit H2/20 bei CD30 (Steinmann, 2020)

Versuch 7 Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40

IHC Färbung:	CD30 H2/20 85°C							
Ak-Verdünnung	1/20		1/20 Kontrolle		1/30		1/30 Kontrolle	
Darstellung von	Kollagen	Hgf	Ak-Reaktion	Hgf	Kollagen	Hgf	Ak-Reaktion	Hgf
1	+	+	++	++	++	+	++	+
2	+	+	++	++	++	+	+	+
3	+	+	++	++	+	+	++	+
4	+	++	+	++	+	++	++	+
5	+	+	++	++	++	+	+	-
6	+	+	++	++	+	++	++	++
7	+	+	++	++	++	+	+	+
8	+	+	++	++	+	+	+	+
9	+	+	++	++	++	+	++	-
10	-	++	+	++	++	++	++	++
Auswertung	+ 8	+ 12	+ 18	+ 20	+ 16	+ 13	+ 16	+ 8

Tabelle 25: Versuch 7a. Ergebnisse: Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40 bei CD30 (Steinmann, 2020)

	CD30 H2/20 85°C			
Ak-Verdünnung	1/40		1/40 Kontrolle	
Darstellung von	Kollagen	Hgf	Ak-Reaktion	Hgf
1	++	+	++	++
2	+	+	++	++
3	++	++	++	++
4	+	++	+	++
5	++	+	++	++
6	+	+	+	++
7	+	++	+	++
8	-	++	+	++
9	+	++	++	++
10	+	++	+	++
Auswertung	+ 11	+ 16	+ 15	+ 20

Tabelle 26: Versuch 7b. Ergebnisse: Ak-Verdünnung: 1/20, 1/30 & 1/40 bei CD30 (Steinmann, 2020)

Versuch 8 Vergleich der Vorbehandlungszeit von 20min und 30min, mit unterschiedlicher Ak Inkubationszeit

IHC Färbung Temperatur	Melan A 85°C							
Zeit Vorbehandlung	20min				30min			
Ak-Inkubationszeit	15min		30min		15min		30min	
Darstellung von:	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion	Kollagen	Ak-Reaktion
1	++	+	++	+	+	+	+	+
2	++	+	++	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	+	+	+	+
4	++	+	++	+	++	+	++	+
5	++	+	++	+	+	++	+	++
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	+	+	+	+
8	++	-	+	+	-	+	-	++
9	++	+	++	+	++	+	+	+
10	++	+	++	+	+	+	+	++
Auswertung	+ 17	+ 8	+ 16	+ 6	+ 10	+ 11	+ 8	+ 13

Tabelle 27: Versuch 8. Ergebnisse: Vergleich der Vorbehandlungszeit von 20min und 30min, mit unterschiedlicher Ak Inkubationszeit bei Melan A (Steinmann, 2020)

Anhang 2 Mikroskopischer Vergleich Melan A

Nachfolgend werden mikroskopische Bilder von Patienten dargestellt. Es wurde versucht innerhalb eines Versuches immer die gleiche Stelle beim selben Patienten zu fotografieren. Dadurch das einzelne Schnitte wiederholt werden mussten, ist dies nicht immer erkennbar. Aufgrund der zeitlichen Abschwächung des Signals wurden Schnitte gewählt, bei denen die Ak-Reaktion noch genügend sichtbar war.

2.1 Legende

Auswertung	
	Brauchbar
	Nicht brauchbar

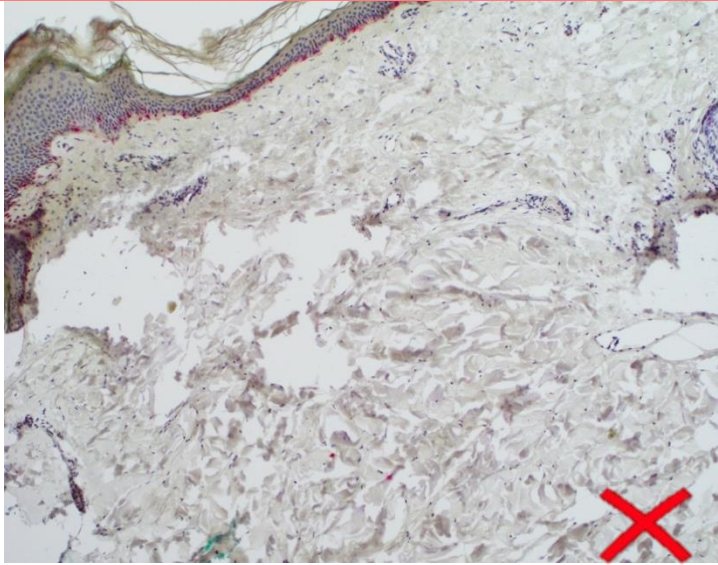
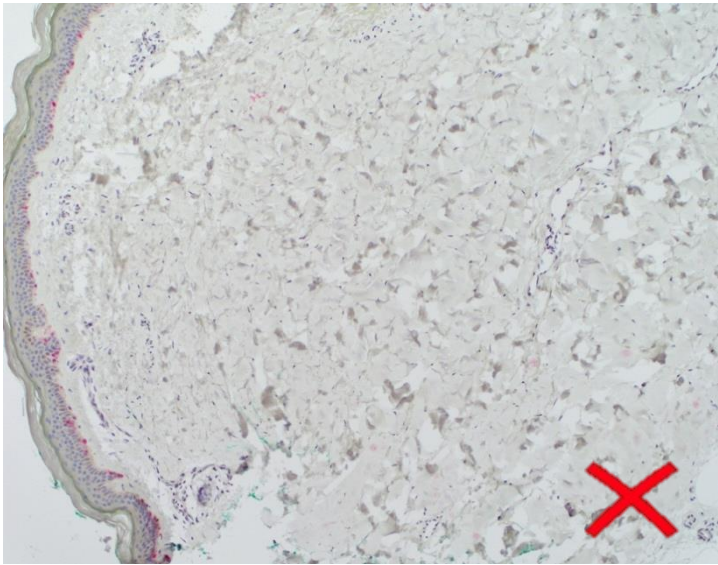
Versuch 1a		Vergleich des Streckvorgangs und der Trocknungszeit
Kollagen		Ak-Reaktion
		+ 1min Streckplatte
		Trocknungszeit im Ofen 30min
		Bei diesem Versuch geht es nur um die Darstellung des Kollagens.
		Trocknungszeit im Ofen 60min
		Bei diesem Versuch geht es nur um die Darstellung des Kollagens.

Tabelle 28: Versuch 1a. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

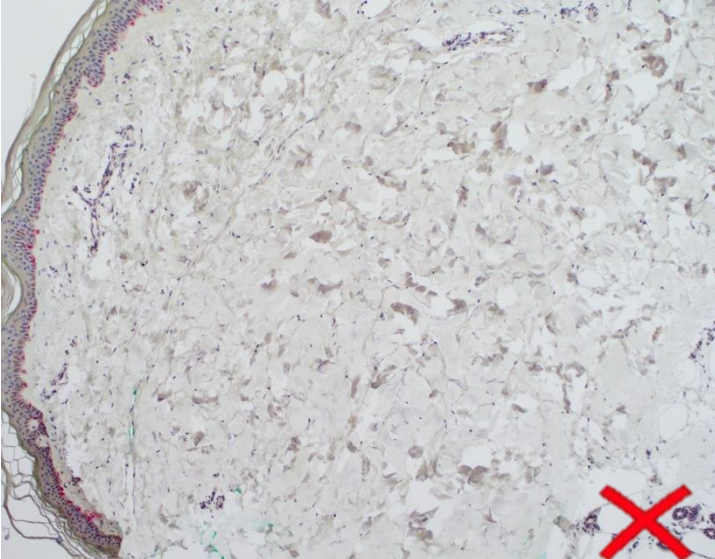
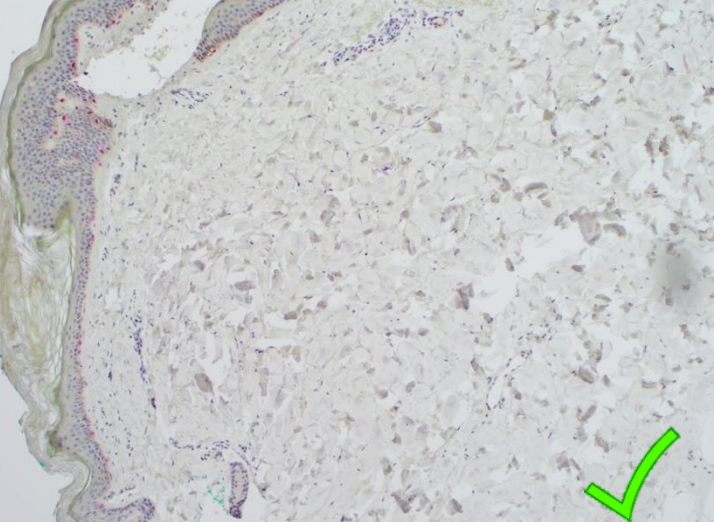
Versuch 1b	Vergleich des Streckvorgangs und der Trocknungszeit	
Kollagen		Ak-Reaktion
Ohne Streckplatte		
Trocknungszeit im Ofen 30min		
		Bei diesem Versuch geht es nur um die Darstellung des Kollagens.
Trocknungszeit im Ofen 60min		
		Bei diesem Versuch geht es nur um die Darstellung des Kollagens.

Tabelle 29: Versuch 1b. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

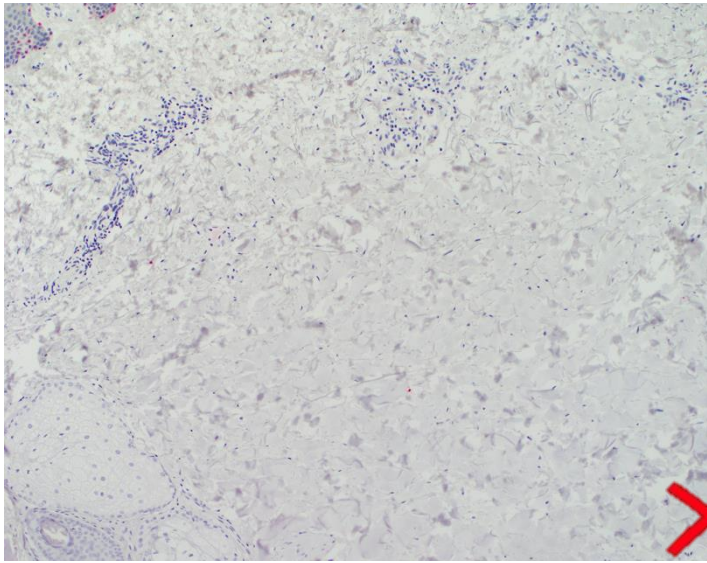
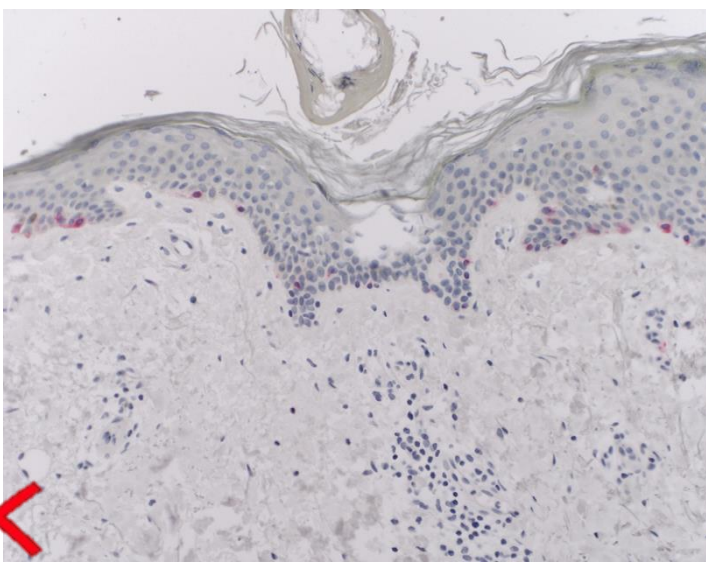
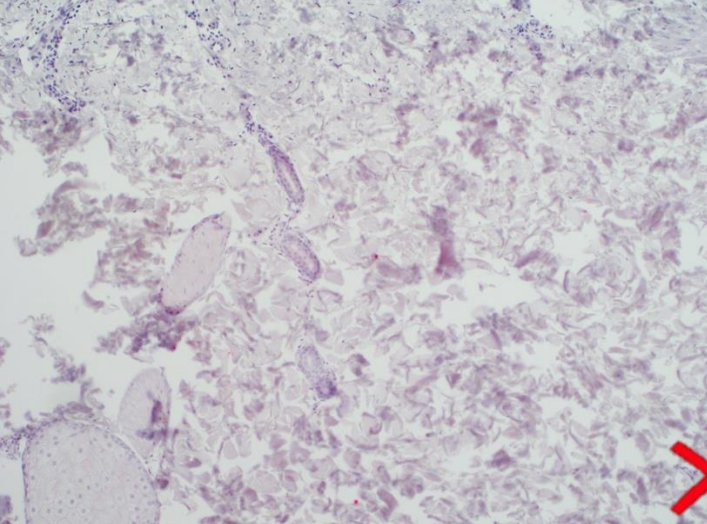
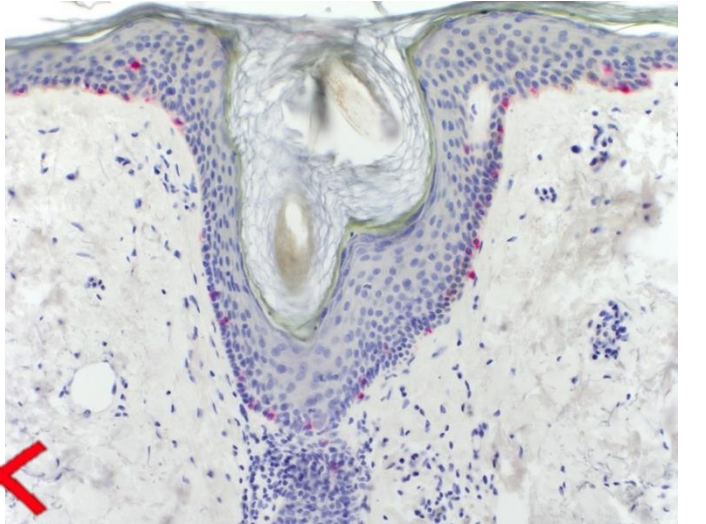
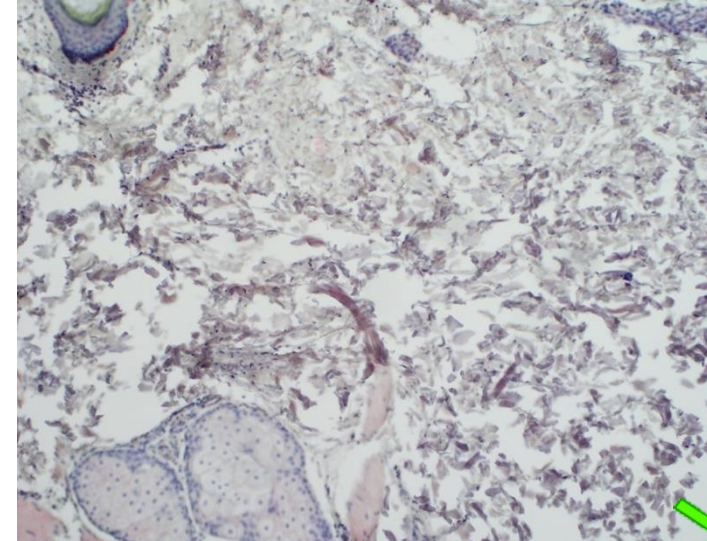
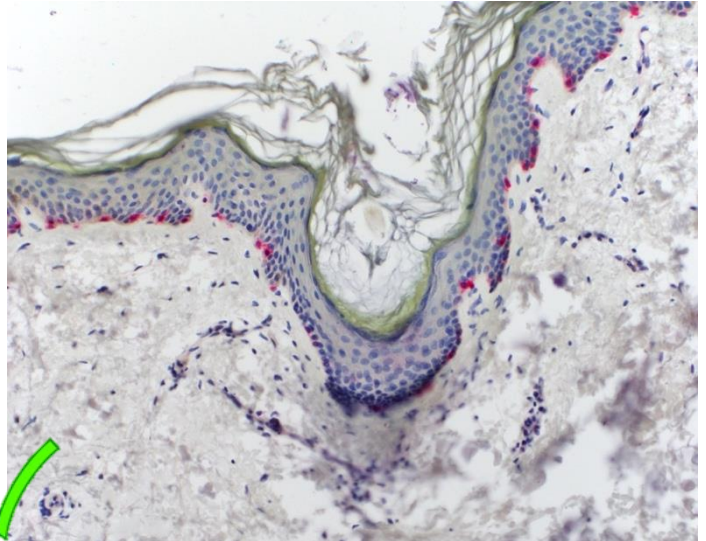
Versuch 2		Unterschiedliche Schnittdicke	
Kollagen		Ak-Reaktion	
1µm			
			
2µm			
			
3µm			
			

Tabelle 30: Versuch 2. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

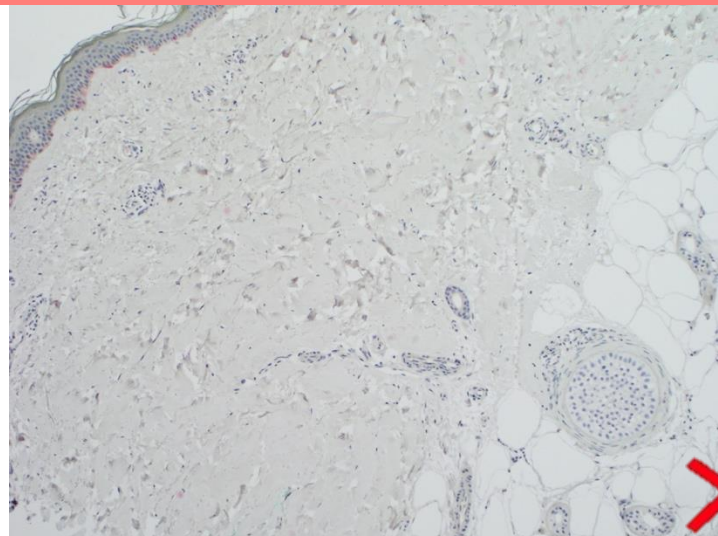
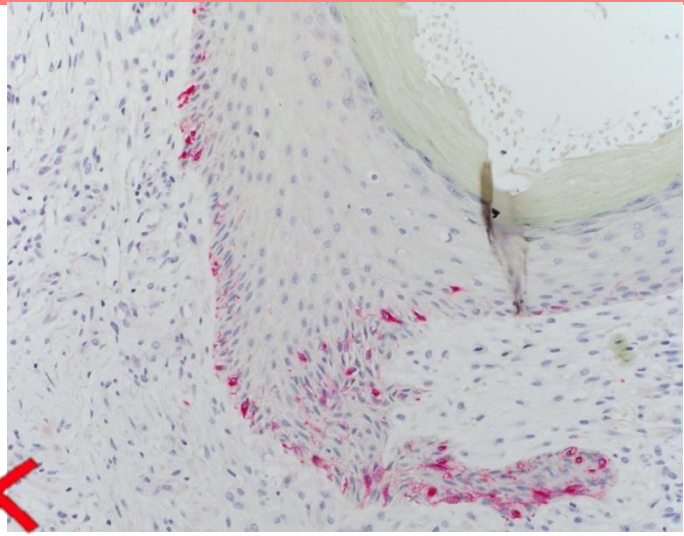
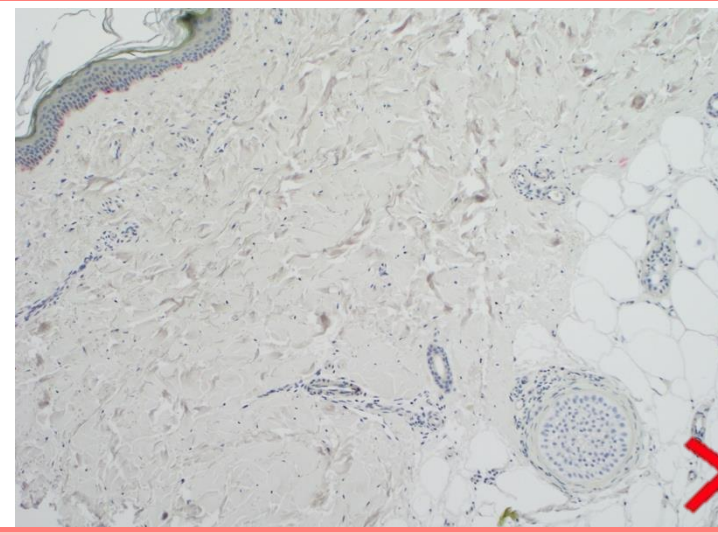
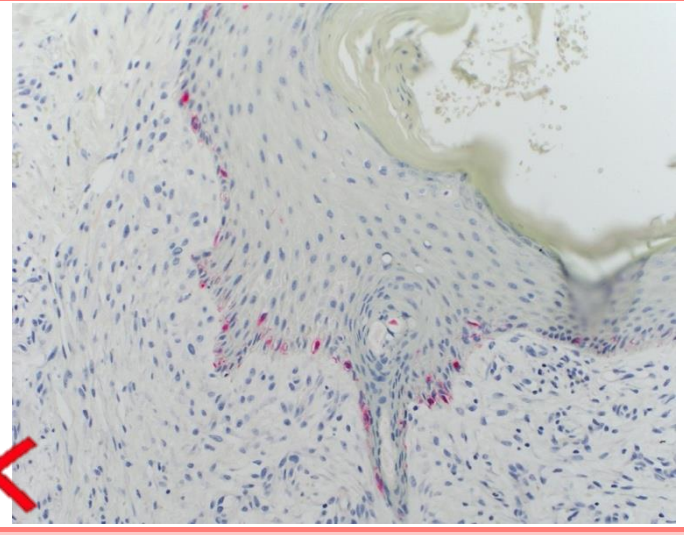
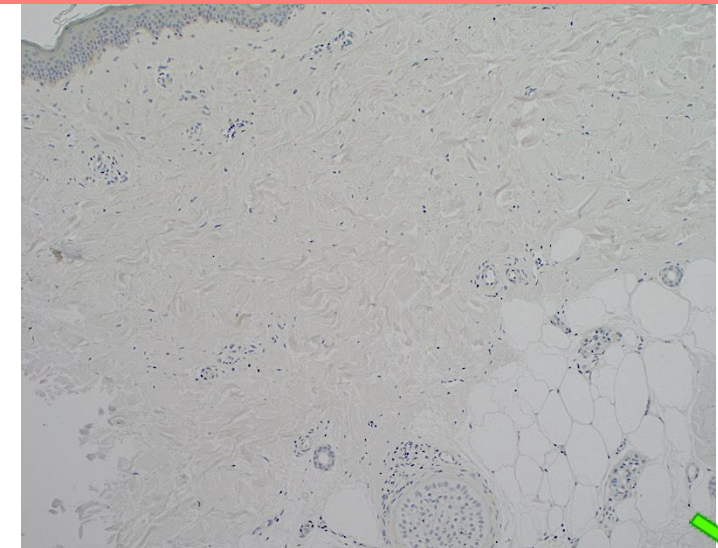
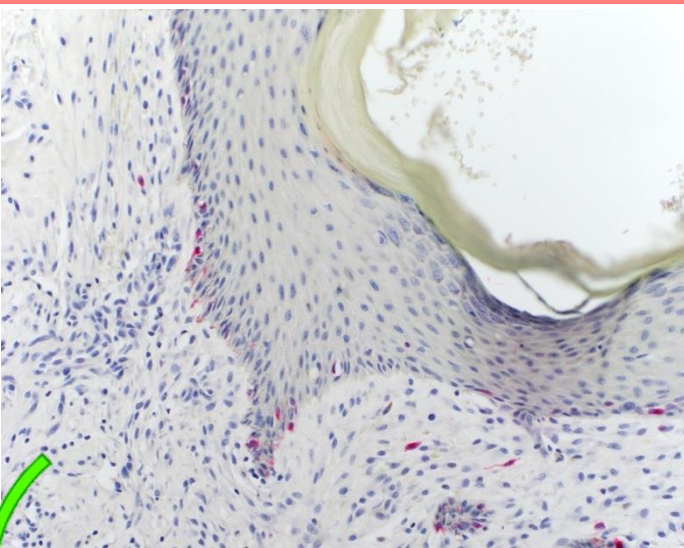
Versuch 3		Hitzereduktion	
Kollagen		Ak-Reaktion	
95°C			
			
90°C			
			
85°C			
			

Tabelle 31: Versuch 3. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

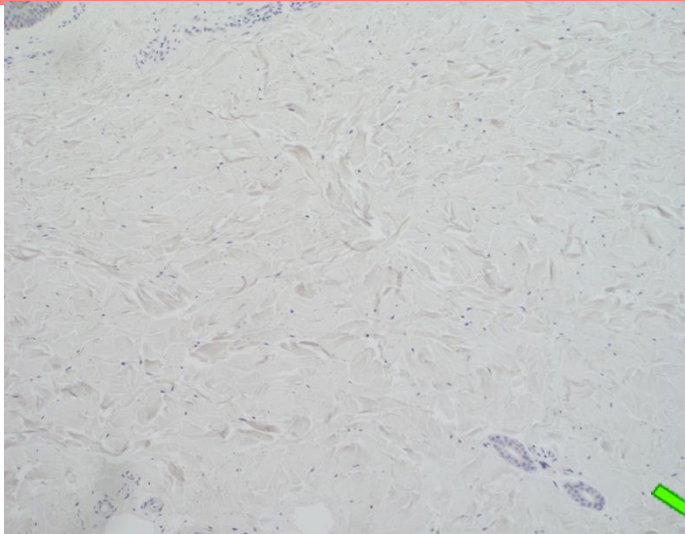
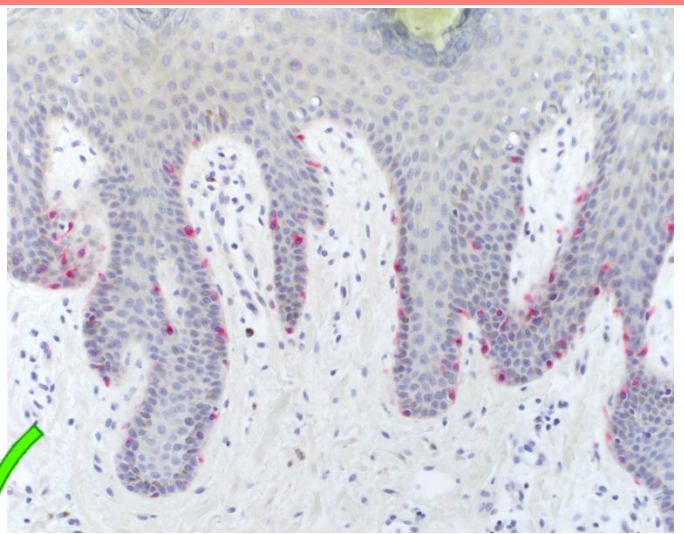
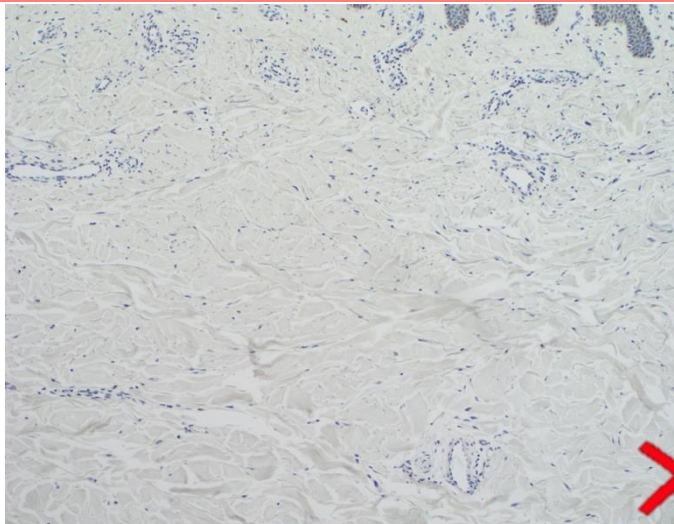
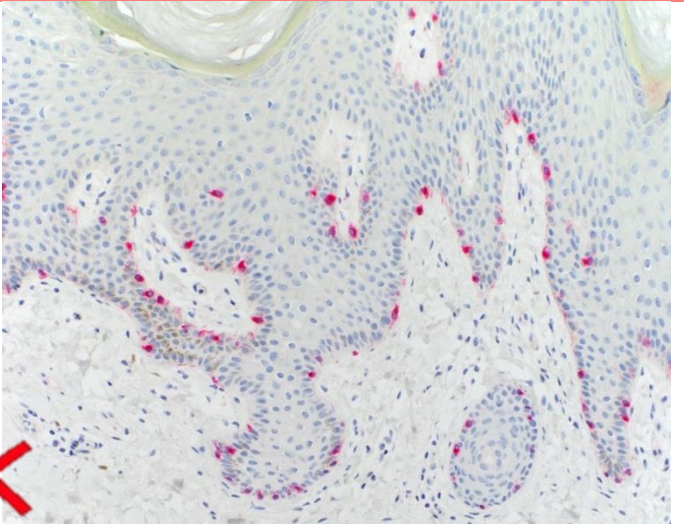
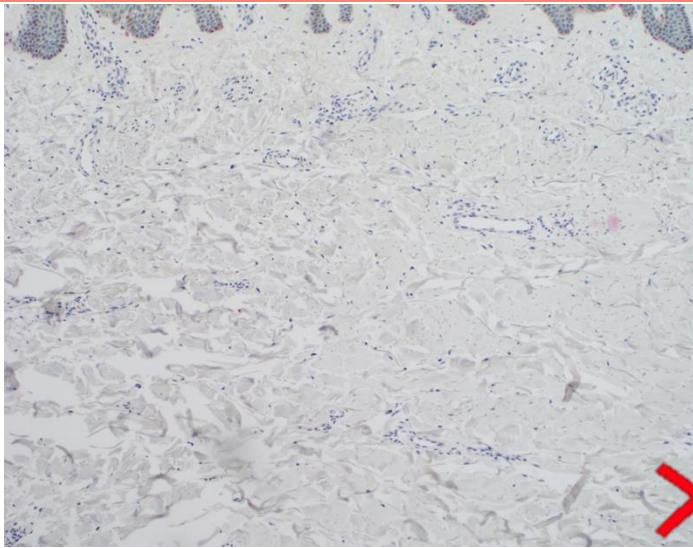
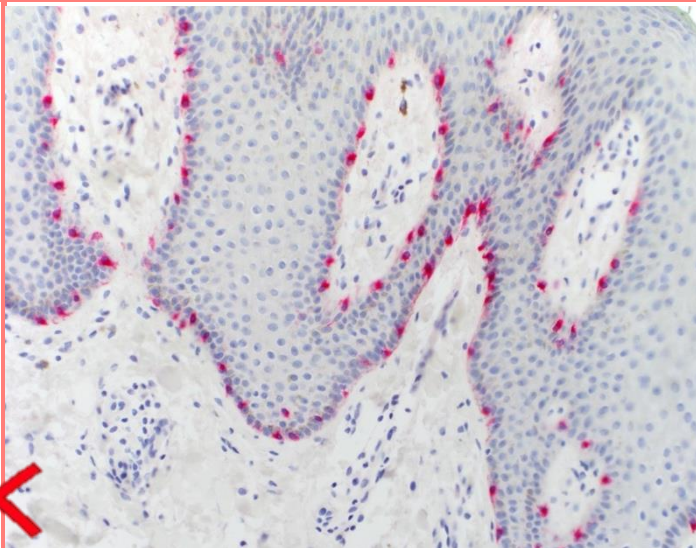
Versuch 4		Unterschiedliche Vorbehandlungszeit	
Kollagen		Ak-Reaktion	
20min			
			
30min			
			
40min			
			

Tabelle 32: Versuch 4. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

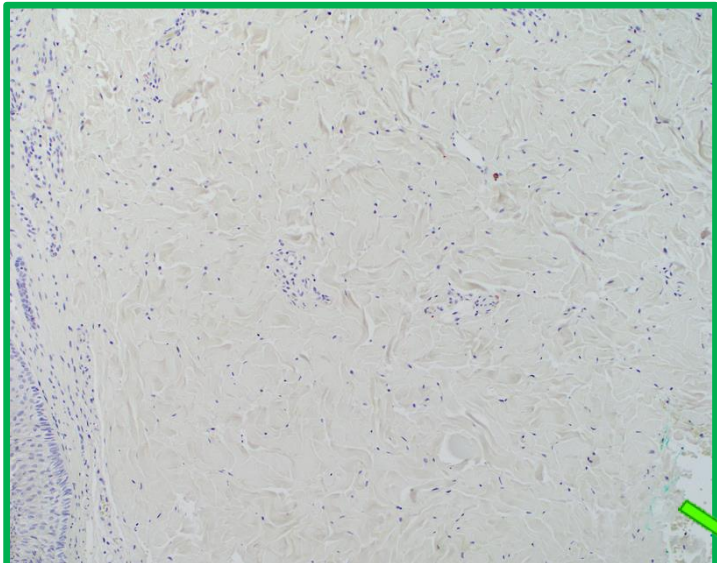
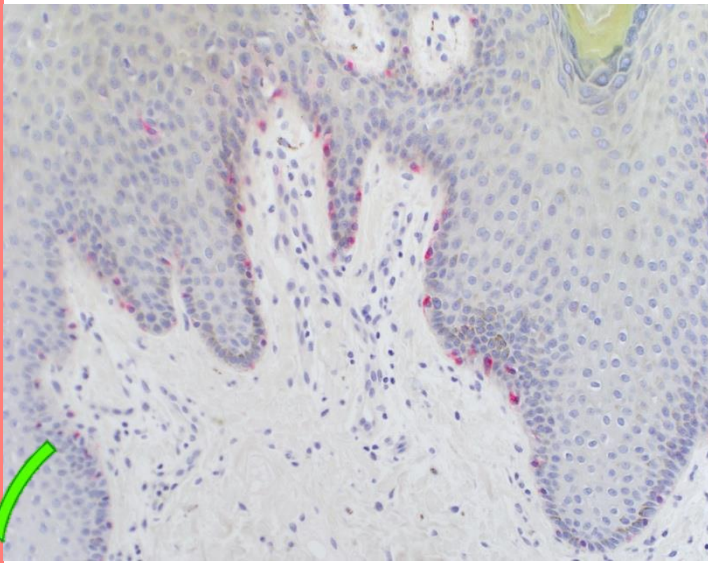
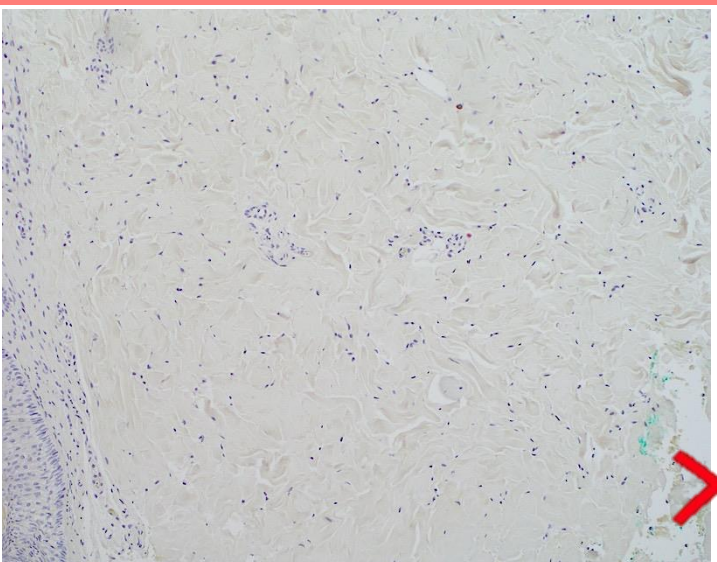
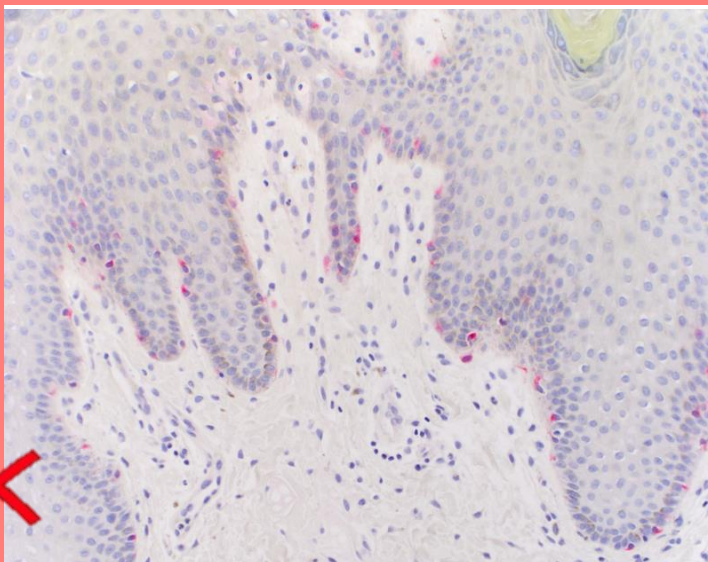
Versuch 8a		Vergleich der Vorbehandlungszeit von H2/20 und H2/30, mit unterschiedlicher Ak- Inkubationszeit	
Kollagen		Ak-Reaktion	
Vorbehandlungszeit H2/20			
Ak-Inkubationszeit 15min			
			
Ak-Inkubationszeit 30min			
			

Tabelle 33: Versuch 8a. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

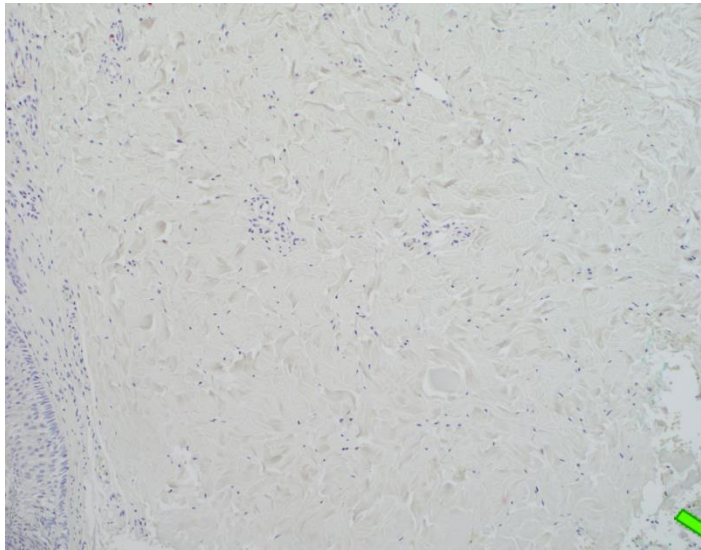
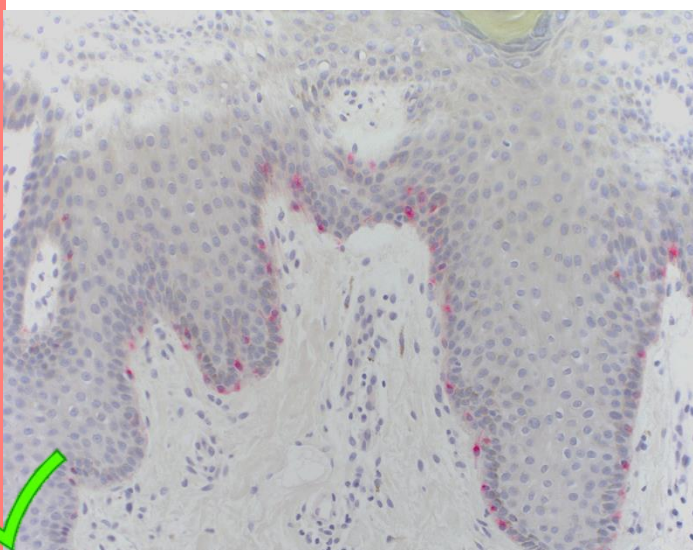
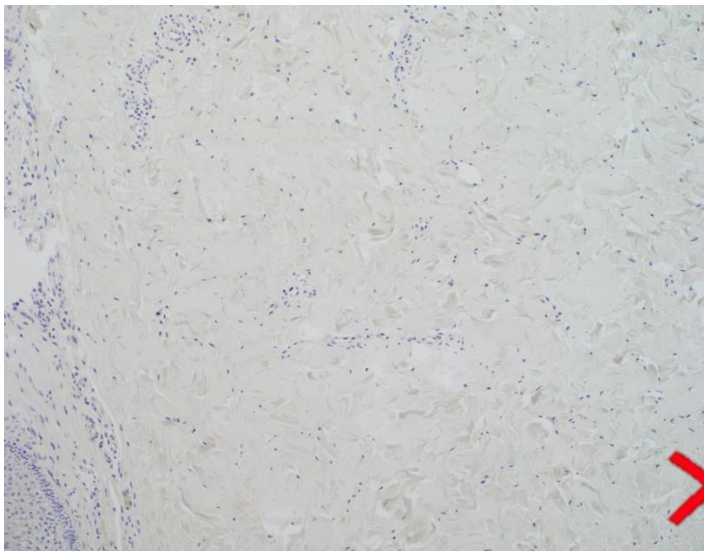
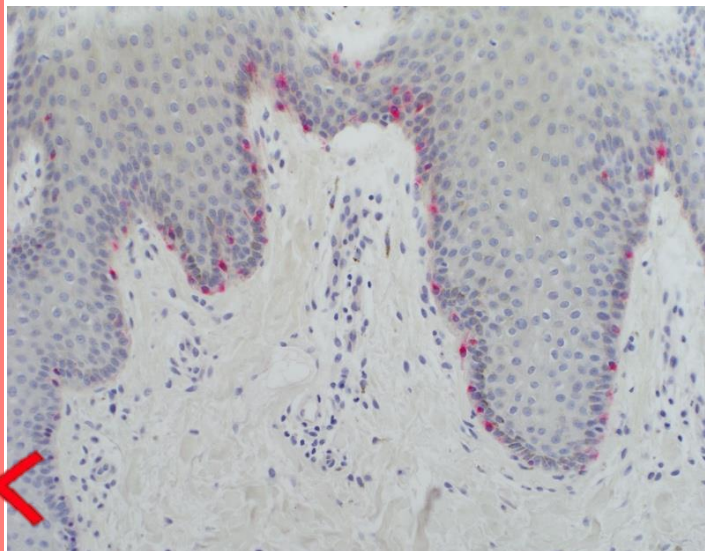
Versuch 8b		Vergleich der Vorbehandlungszeit von H2/20 und H2/30, mit unterschiedlicher Ak- Inkubationszeit	
Kollagen		Ak-Reaktion	
Vorbehandlungszeit H2/30			
Ak-Inkubationszeit 15min			
			
Ak-Inkubationszeit 30min			
			

Tabelle 34: Versuch 8b. Mikroskopischer Vergleich bei Melan A. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

Anhang 3 Mikroskopischer Vergleich CD30

Nachfolgend werden mikroskopische Bilder von Patienten dargestellt. Es wurde versucht innerhalb eines Versuches immer die gleiche Stelle beim selben Patienten zu fotografieren. Dadurch das einzelne Schnitte wiederholt werden mussten, ist dies nicht immer erkennbar. Aufgrund der zeitlichen Abschwächung des Signals wurden Schnitte gewählt, bei denen die Ak-Reaktion noch genügend sichtbar war.

3.1 Legende

Auswertung	
	Brauchbar
	Nicht brauchbar

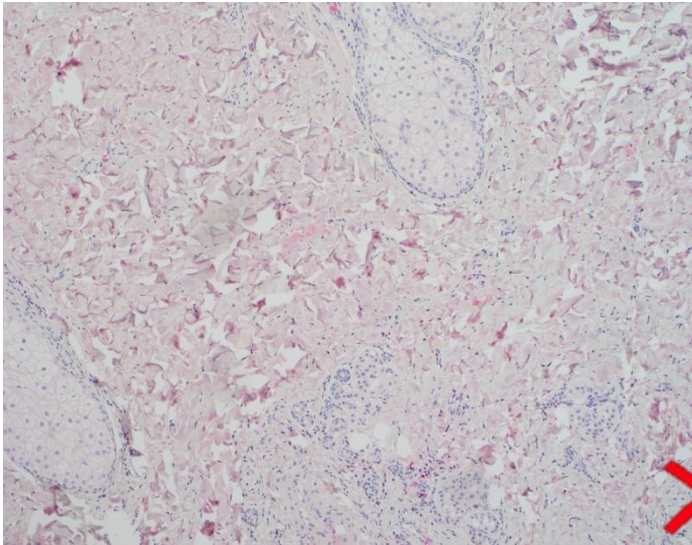
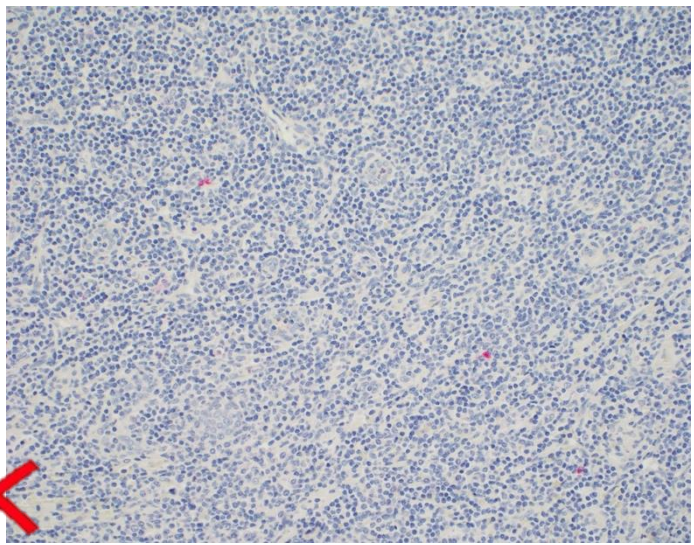
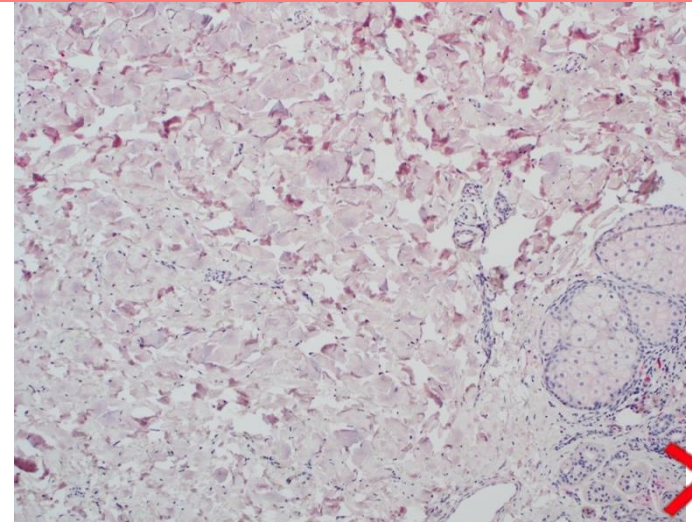
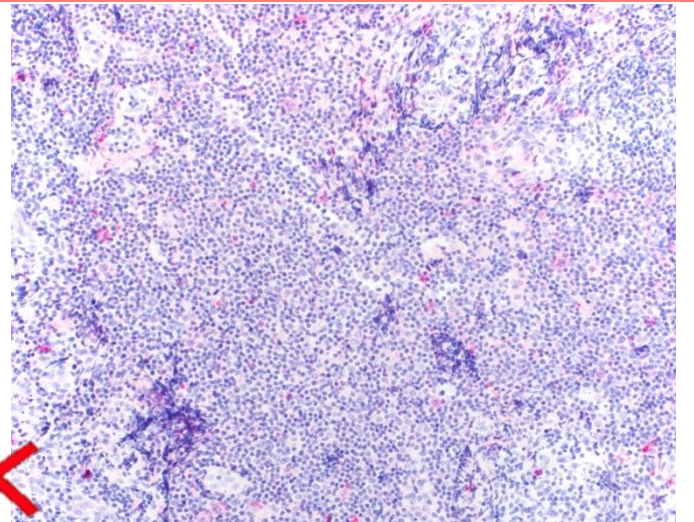
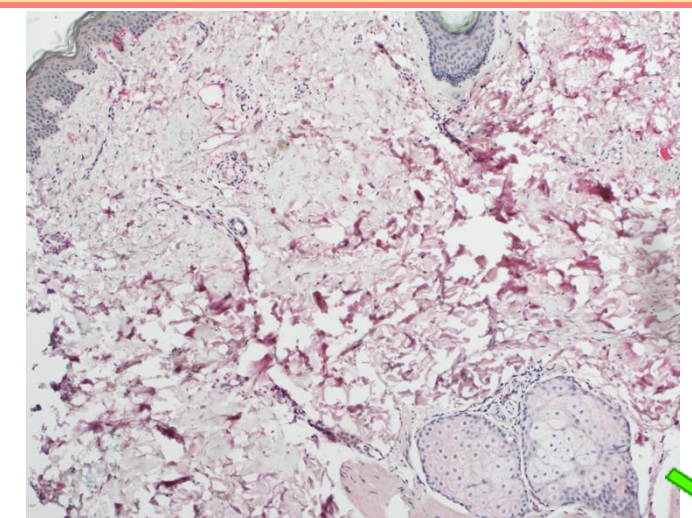
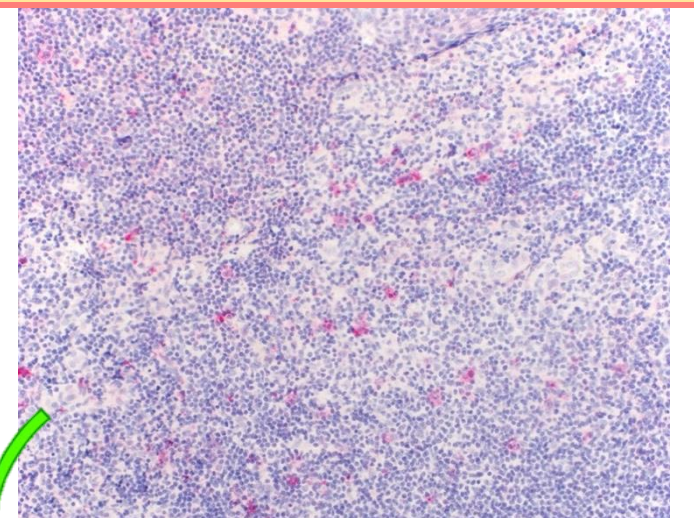
Versuch 2		Unterschiedliche Schnittdicke	
Kollagen		Ak-Reaktion	
1µm			
			
2µm			
			
3µm			
			

Tabelle 35: Versuch 2. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

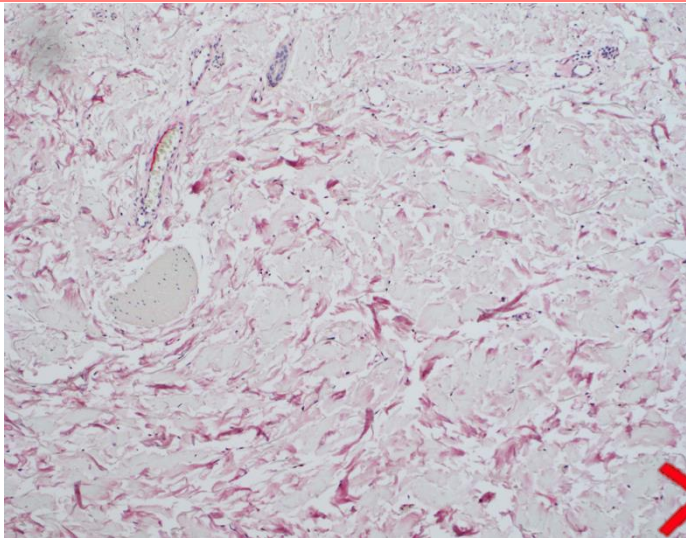
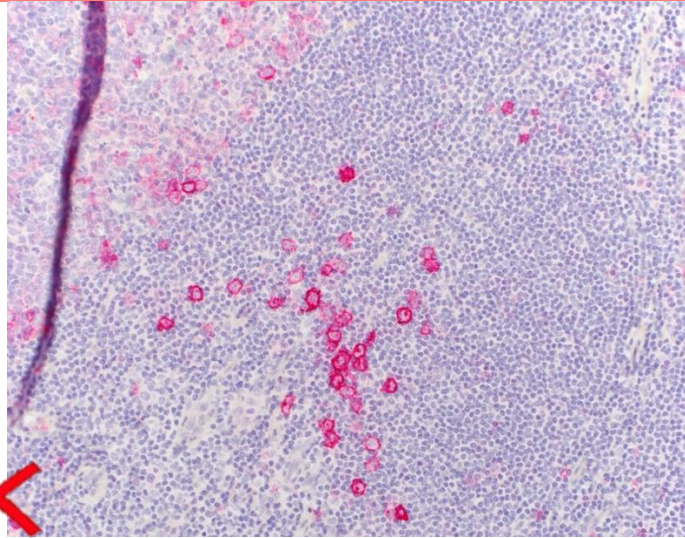
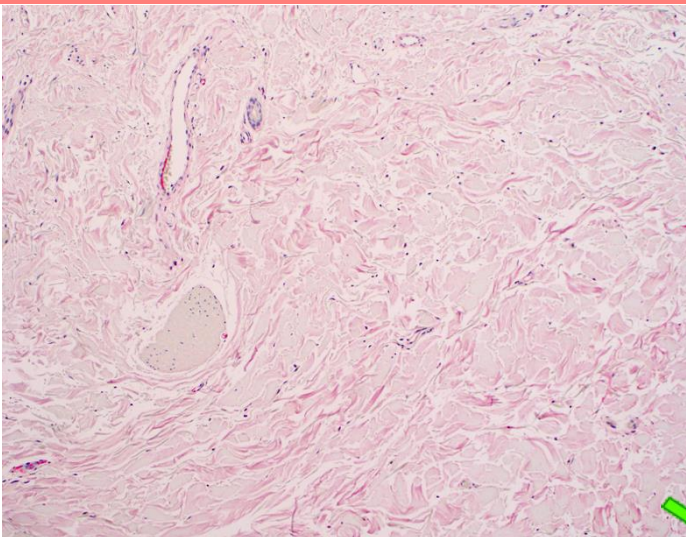
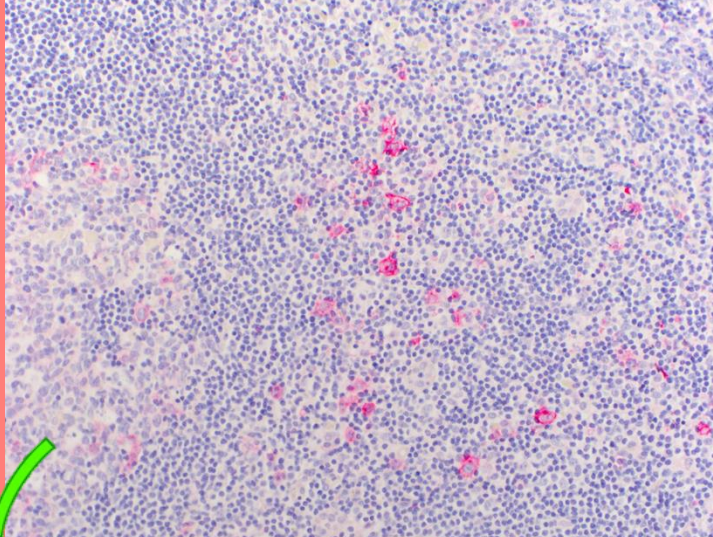
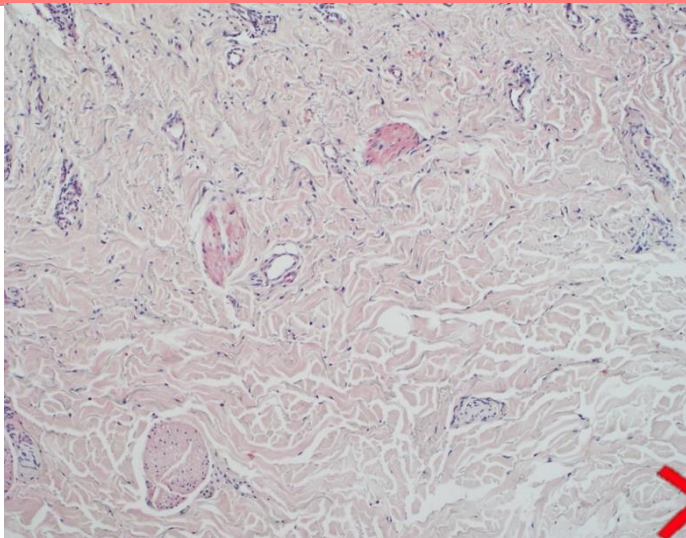
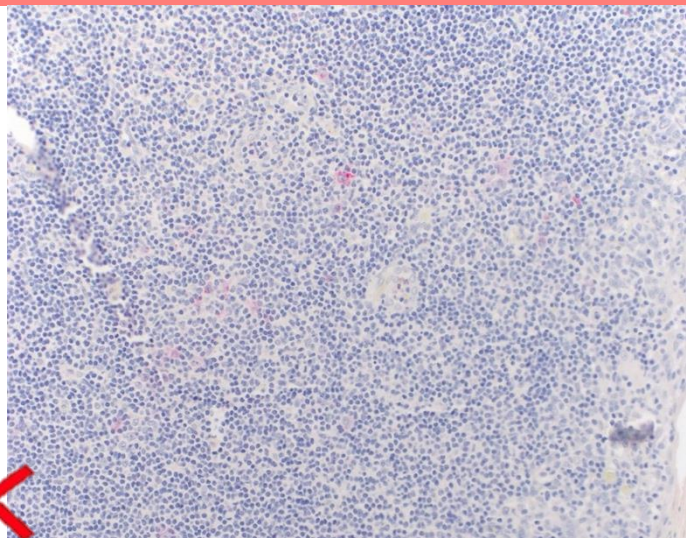
Versuch 3		Hitzereduktion	
Kollagen & Hgf		Ak-Reaktion	
90°C			
			
85°C			
			
80°C			
			

Tabelle 36: Versuch 3. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache & (r.) 20fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

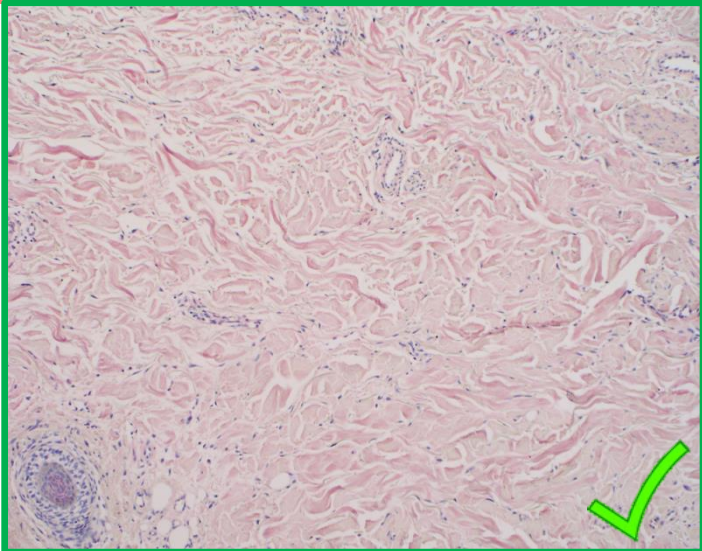
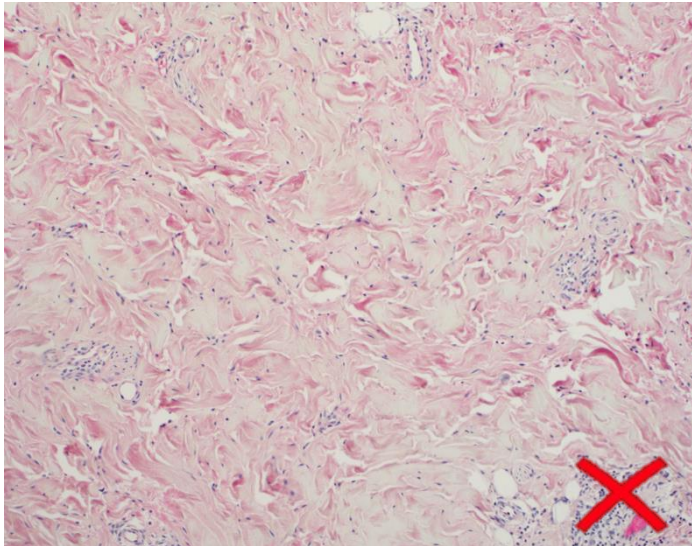
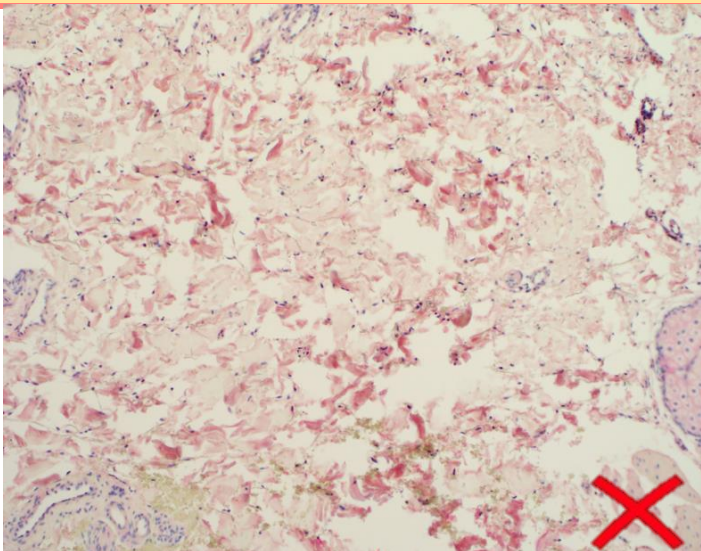
Versuch 4		Zeitverlängerung	
Kollagen & Hgf		Ak-Reaktion	
20min			
	Dieser Versuch wurde ohne Kontrolle durchgeführt		
30min			
	Dieser Versuch wurde ohne Kontrolle durchgeführt		
40min			
	Dieser Versuch wurde ohne Kontrolle durchgeführt		

Tabelle 37: Versuch 4. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

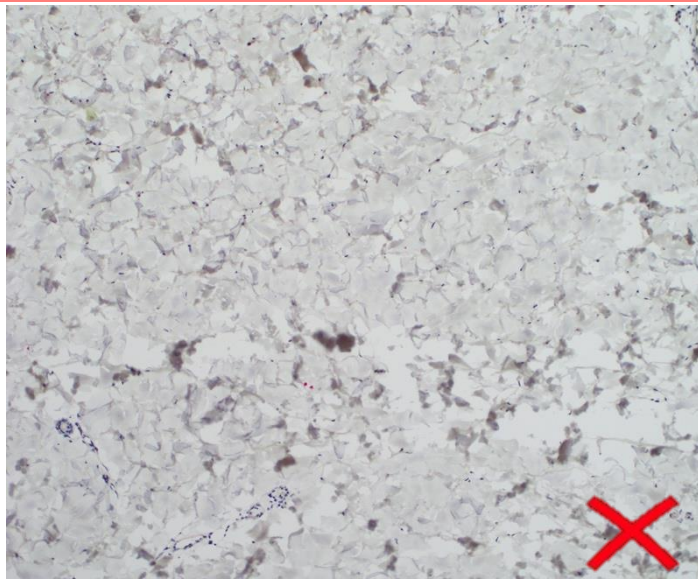
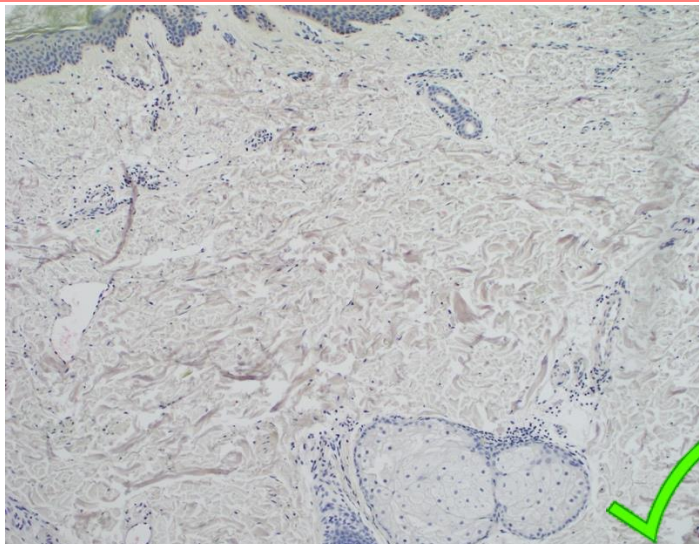
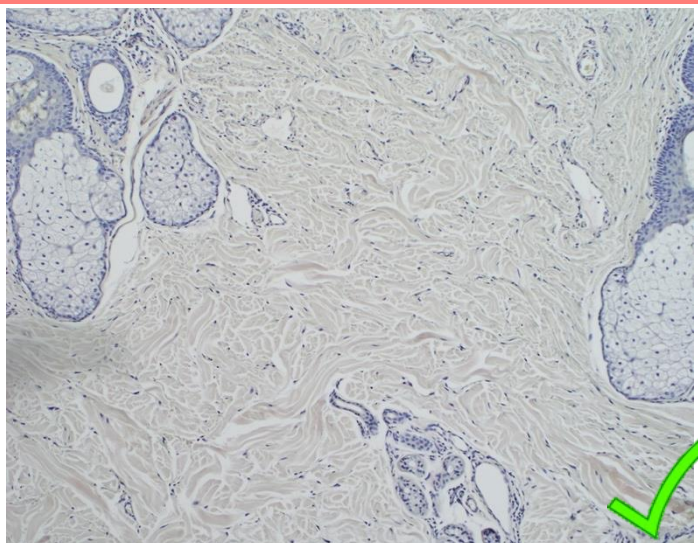
Versuch 5		Testdurchlauf ohne Ak	
Kollagen & Hgf		Ak-Reaktion	
100°C			
	Dieser Versuch wurde ohne Ak durchgeführt		
85°C			
	Dieser Versuch wurde ohne Ak durchgeführt		
RT			
	Dieser Versuch wurde ohne Ak durchgeführt		

Tabelle 38: Versuch 5. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

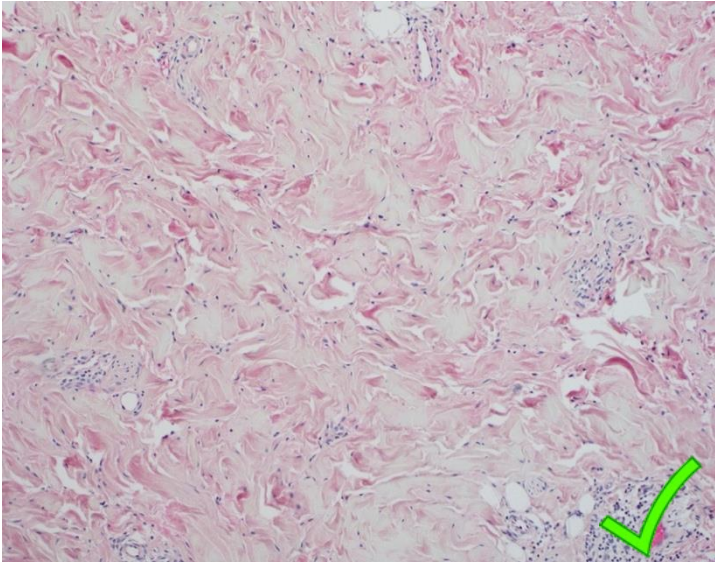
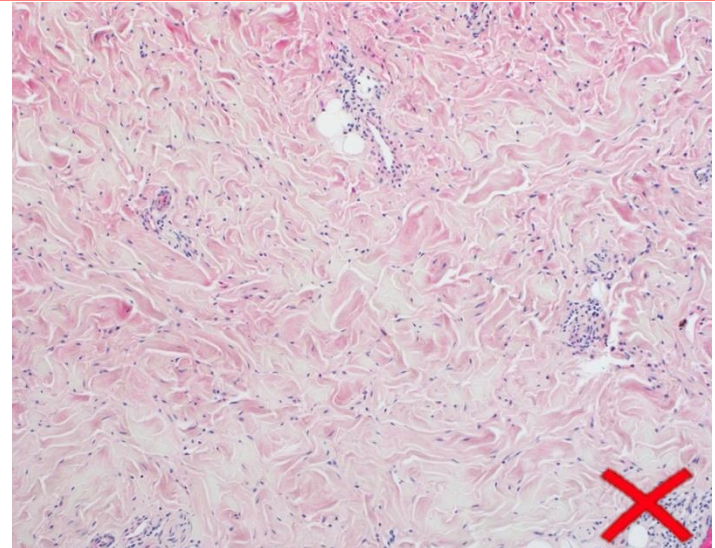
Versuch 6		Unterschiedliche Ak-Inkubationszeit	
Kollagen & Hgf		Ak-Reaktion	
		15min	
		Dieser Versuch wurde ohne Kontrolle durchgeführt	
		30min	
		Dieser Versuch wurde ohne Kontrolle durchgeführt	

Tabelle 39: Versuch 6. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

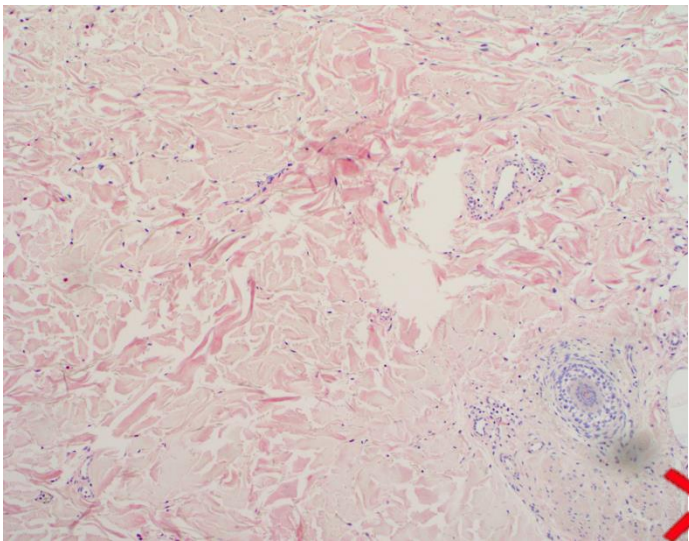
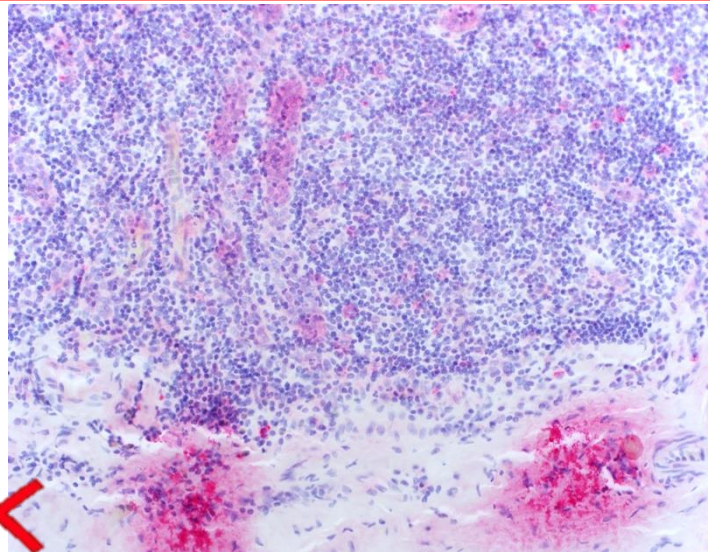
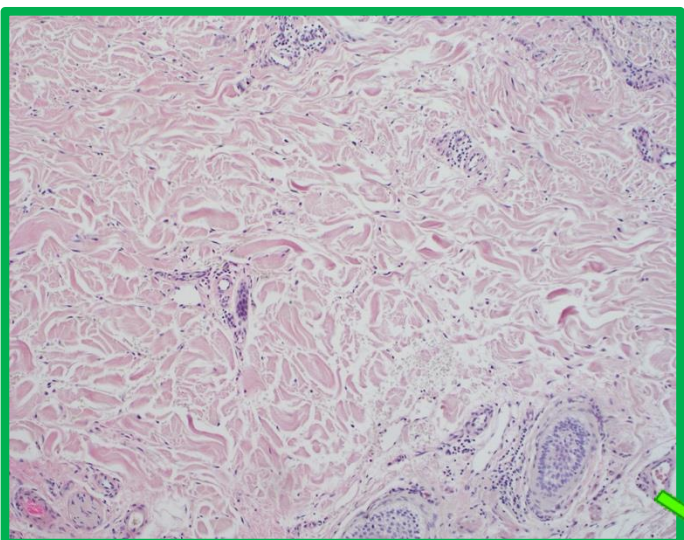
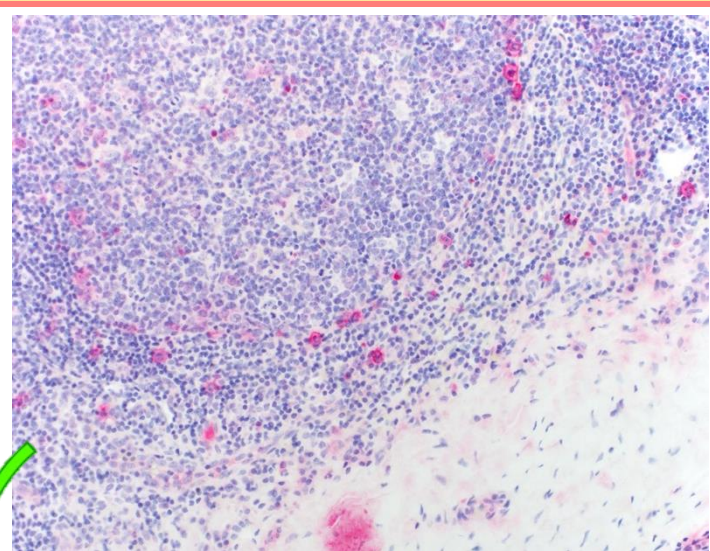
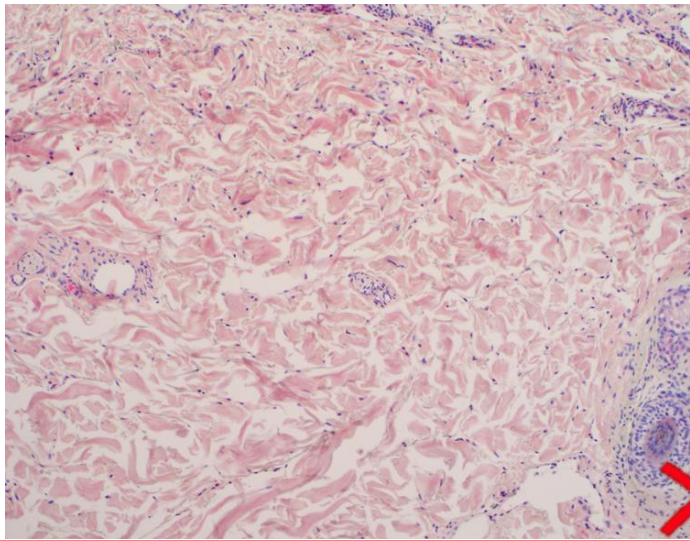
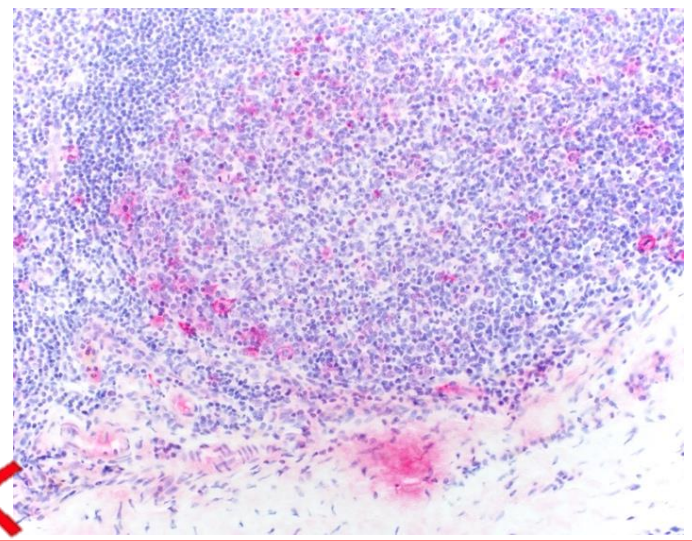
Versuch 7		Testdurchlauf ohne Ak	
Kollagen & Hgf		Ak-Reaktion	
1/20			
			
1/30			
			
1/40			
			

Tabelle 40: Versuch 7. Mikroskopischer Vergleich bei CD30. (L.) 10fache Vergrößerung (Steinmann, 2020)

Anhang 4 Färbeprotokolle

4.1 Altes Färbeprotokoll Melan A

Austestung von IHC-Antikörpern		erstellt: 04.06.2013, bmu
		geprüft: 07.10.2015, jha
		freigegeben: 07.10.2015, QMB
		Version: 004
		Dokument-Nr.: 13.100.002

Dieses Dokument ist geistiges Eigentum von kempf und pfaltz und darf ohne Einwilligung der Institutsleitung weder kopiert noch anderweitig vervielfältigt werden.

Revalidierung mit Tons. ohne Xylol mit kürzerer Vorbehandlung da das Kollagen immer so stark aufbricht.

Antikörper: CD 30 Ber-H2

Klon: Ber-H2

Hersteller: Cell Marque

Ablauf

	erledigt (Datum/Visum)
1. Informationsbeschaffung zum Verfahren (Literatur-Suche, andere Labors)	<u>14.08.2019 jha</u>
2. Bestellung der Reagenzien	<u>14.08.2019 jha</u>
3. Festlegung der Mitglieder des Projekt-Teams	<u>14.08.2019 jha</u>
Leiter/in: <u>WKE</u>	
Mitwirkende: <u>DDO</u>	
4. Definition von Positiv- und Negativ-Kontrollen für Testphase	<u>14.08.2019 jha</u>
Positiv-Ko: <u>Tonsille</u>	
Negativ-Ko: _____	
5. Testphase: Ausarbeitung der optimalen Bedingungen für das neue Verfahren (Färbe- / PCR-Bedingungen).	
Ziel: Erarbeitung der optimalen Verfahrensbedingungen.	
Hilfsmittel zur Austestung der Antikörper:	
- Datenblatt (Wiederherstellung, Verdünnung, ev. Vorbehandlung)	
- Literatur	
- Rückfrage mit Lieferant	
Vorgehen:	
- ggf. Antikörper wieder herstellen gem. Datenblatt, wird der Antikörper bei -20°C gelagert, angegebenes Verdünnungsmedium mit Glycerol 1:2 verdünnen	
- Verdünnung:	
- höchste Konzentration bei nicht bekannter Vorbehandlung	
- höchste, tiefste, ev. mittlere Konzentration bei bekannter Vorbehandlung	
- Vorbehandlung:	
- nach Datenblatt	
- falls keine Angaben vorhanden sind:	
	ER1 20' 95°
	ER2 30' 95°
	Enzym1 5'

Die Resultate in der Tabelle unter Punkt 6 eintragen.

Danach erfolgen evtl. weitere Austestungen nach Rücksprache mit dem Auftraggeber.

Antikörper: Melan A Clon 103

6. **Projektphase:** Anwendung des Verfahrens für wissenschaftliche Studie bzw. für Routine-Diagnostik durch Austestung von Erkrankungsfällen und Kontrollfällen

Datum	Vorbehandlung	Verdünnung	Inkubationszeit	Biopsie-Nr./Kontrolle	Test-Nr.	Resultat
12.11.2019	H ₂ 20'	1:50 1:100	15'	B19.101974	1 2	
12.11.2019	H ₂ 20'	1:50 1:100	15'	B19.101928 C	3 4	
12.11.2019	H ₂ 20'	1:50 1:100	15'	B19.101960 D	5 6	
12.11.2019	H ₂ 20'	1:50 1:100	15'	B19.101959 D	7 8	
12.11.2019	H ₂ 20'	1:50 1:100	15'	B19.101975	9 10	
	1:50 ist aktuell in Gebrauch, es wird ausgetestet, ob der Antikörper auch mit einer Verdünnung von 1:100 verwendet werden kann.					

7. Validierung des Verfahrens durch Auswertung der Resultate aus der Projektphase (vgl. Punkt 6.) und Bemerkungen:

Analoge Kontrolle → neue Verdünnung 1:100

8. **Freigabe** nach Zielerreichung

Einführung des Verfahrens in die Routine-Diagnostik bzw. Veröffentlichung der wissenschaftlichen Resultate (Poster, Vortrag, Publikation)

Datum / Visum:

M. Ulf 12/11/19
(IL / Facharzt)

4.2 Altes Färbeprotokoll CD30

Austestung von IHC-Antikörpern Dieses Dokument ist geistiges Eigentum von kemf und pfaltz und darf ohne Einwilligung der Institutsleitung weder kopiert noch anderweitig vervielfältigt werden. Antikörper: <u>CD 30 Ber-H2</u> Klon: <u>Ber-H2</u> Hersteller: <u>Cell Marque</u> Ablauf 1. Informationsbeschaffung zum Verfahren (Literatur-Suche, andere Labors) 2. Bestellung der Reagenzien 3. Festlegung der Mitglieder des Projekt-Teams 4. Definition von Positiv- und Negativ-Kontrollen für Testphase 5. Testphase: Ausarbeitung der optimalen Bedingungen für das neue Verfahren (Farbe- / PCR-Bedingungen).	erstellt: 04.06.2013, bmu geprüft: 07.10.2015, jha freigegeben: 07.10.2015, QMB Version: 004 Dokument-Nr.: 13.100.002 erledigt (Datum/Visum) <u>14.08.2019 jha</u> <u>14.08.2019 jha</u> <u>14.08.2019 jha</u> <u>14.08.2019 jha</u>
---	--

Leiter/in: WKF

Mitwirkende: DJO

Positiv-Ko: Tonsille

Negativ-Ko: _____

Hilfsmittel zur Austestung der Antikörper:

- Datenblatt (Wiederherstellung, Verdünnung, ev. Vorbehandlung)
- Literatur
- Rückfrage mit Lieferant

Vorgehen:

- ggf. Antikörper wieder herstellen gem. Datenblatt, wird der Antikörper bei -20°C gelagert, angegebenes Verdünnungsmedium mit Glycerol 1:2 verdünnen
- Verdünnung:
 - höchste Konzentration bei nicht bekannter Vorbehandlung
 - höchste, tiefste, ev. mittlere Konzentration bei bekannter Vorbehandlung
- Vorbehandlung:
 - nach Datenblatt
 - falls keine Angaben vorhanden sind:
 - ER1 20' 95°
 - ER2 30' 95°
 - Enzym1 5'

Die Resultate in der Tabelle unter Punkt 6 eintragen.

Danach erfolgen evtl. weitere Austestungen nach Rücksprache mit dem Auftraggeber.

Antikörper: CD 30 Bei-H2

6. **Projektphase:** Anwendung des Verfahrens für wissenschaftliche Studie bzw. für Routine-Diagnostik durch Auswertung von Erkrankungsfällen und Kontrollfällen

Datum	Vorbehandlung	Verdünnung	Inkubationszeit	Biopsie-Nr./Kontrolle	Test-Nr.	Resultat
15.08.19	H ₂ 40 95	1:40	30'	Tonsille oX.	1	
15.08.19	H ₂ 30 95	1:40	30'	Tonsille oX	2	wie 1
15.08.19	H ₂ 30 95	1:40	15'	Tonsille oX	3	zu schwach
15.08.19	H ₂ 20 95	1:40	30'	Tonsille oX	4	zu schwach
15.08.19	H ₂ 20 95	1:40	15'	Tonsille oX	5	zu schwach
20.08.19	H ₂ 30 95	1:40	45'	Tonsille oX	6	wie 2
20.08.19	H ₂ 20 95	1:40	45'	Tonsille oX	7	schlechter als 6

7. Validierung des Verfahrens durch Auswertung der Resultate aus der Projektphase (vgl. Punkt 6.) und Bemerkungen:

→ Protokoll entspr. Nr. 2

8. **Freigabe** nach Zielerreichung

Einführung des Verfahrens in die Routine-Diagnostik bzw. Veröffentlichung der wissenschaftlichen Resultate (Poster, Vortrag, Publikation)

Datum / Visum: 22/8/19
(IL / Facharzt)

4.3 Neues Färbeprotokoll Melan A

Austestungsversuch Melan A

Datum	Vorbehandlung Zeit: Temperatur:	Verdünnung	Ak- Inkubationszeit	Biopsie-Nr./ Kontrolle	OT Nr.	Resultat
12.03 2020	30min 85°C	1:100	15min	320.17733 Vergleich	1 DA	Kollagen: + Ak-Reaktion: ++
12.03 2020	20min 85°C	1:100	15min	320.17733 Resultat DA	2 DA	Kollagen: ++ Ak-Reaktion: t(+)

Kollagen + Ak-Reaktion:

Legende: + gut
++ sehr gut

Hgf (Hintergrundfärbung)

+ Hgf vorhanden
++ Hgf stark

13.03.2020

Austestung ②
in Routine
JAA

4.4 Neues Färbeprotokoll CD30

STU

Austestungsversuch CD30:

Datum	Vorbehandlung Zeit: Temperatur:	Verdünnung	Inkubationszeit (AK)	Biopsie-Nr./ Kontrolle	OT Nr.	Resultat	
12.03 2020	30min 85°C	1:30	15min	820.17882 NSB Standard	1 (Standard)	Kollagen: + (+) AK-Reaktion: ++ " Kontrolle: ++	Hgf +-
12.03 2020	20min 85°C	1:30	15min	820.17882 NSB Resultat DA	2 (DA) +K	Kollagen: ++ AK-Reaktion: ++ " Kontrolle: +	Hgf +(-)

Kollagen + AK-Reaktion:

Legende: + gut
++ sehr gut

Hgf (Hintergrundfärbung)
+ Hgf vorhanden
++ Hgf stark

12.03.2020

keine Unterschiede
zwischen ① und ②
jss

→ Austestung ②
in Routine
jss

Anhang 5 Dehydrierungsprotokoll Peloris

PROGRAMMANZEIGE

Schritt	Reagenz	Dauer	Temp.	D/V	Rührer	Abtropfzeit
1	Formalin	40	55 °C	Umgebung	Mittel	10
2	85 % Ethanol	25	55 °C	Umgebung	Mittel	10
3	85 % Ethanol	35	55 °C	Umgebung	Mittel	10
4	80/20 Ethanol / IPA	35	55 °C	Umgebung	Mittel	10
5	80/20 Ethanol / IPA	75	55 °C	Umgebung	Mittel	10
6	IPA	25	55 °C	Umgebung	Mittel	10
7	IPA	45	55 °C	Umgebung	Mittel	10
8	IPA	100	55 °C	Umgebung	Mittel	10
9	Wachs	70	85 °C	Vakuum	Mittel	10
10	Wachs	60	85 °C	Vakuum	Mittel	10
11	Wachs	50	65 °C	Vakuum	Mittel	10

Anhang 6 Preisvergleich Xylol und Isopropanol

Xylol Entwässerung

Fixierlösung

Dehydrierung/Rehydrierung

	Formalin	100% Alk.	95% Alk.	70% Alk.
Einheit	5l			
Preis/ Einheit CHF	12.80	21.99	21.19	20.40
Einheiten Verbrauch	8.67	138.67	1.33	23.00
Kosten pro Monat CHF	110.93	3'049.28	28.25	469.20

Intermedium

Wachs

Eindeckmedium

	Xylol	Parablast	Eukitt	Entsorgung
Einheit	5l	1kg	500ml	
Preis/ Einheit CHF	19.20	6.40	63.20	
Einheiten Verbrauch	68.00	375.67	3.33	
Kosten pro Monat CHF	1'305.60	2'404.27	210.67	2'212.35

Durchschnitt Kostenverbrauch von 3 Monaten = CHF

Isopropanol Entwässerung

Dehydrierung mit Intermedium

Eindeckmedium

	Formalin	85% Alk	85% + IPA	Isopropanol (IPA)	Parablast
Einheit	5l				1kg
Preis/ Einheit CHF	12.80	38.00	42.00	28.00	6.40
Verbrauch pro Einheit	5.30	24.00	15.00	16.00	234.00
Kosten pro Monat CHF	67.84	912.00	630.00	448.00	1'497.60

Rehydrierung

Zwischenintermedium

Eindeckmedium

	100% Alk	94% Alk	70% Alk	Ultra Clear	CV Ultra	Entsorgung
Einheit	5l				250ml	
Preis/ Einheit CHF	21.99	21.19	20.40	58.00	95.20	
Einheiten Verbrauch	40.60	1.50	7.00	28.00	5.00	
Kosten pro Monat CHF	892.79	31.79	142.80	1624.00	476.00	2'123.30

Durchschnitt Kostenverbrauch von 3 Monaten = CHF

$$\text{Preis pro Einheit} \times \text{Verbrauch pro Einheit} = \text{Kosten pro Monat}$$

Tabelle 41: Preisvergleich Xylol und Isopropanol (Lehmann, 2020)

Anhang 7 Packungsbeilagen

BOND Polymer Refine Red Detection

Bestellnr.: DS9390

Verwendungszweck

Dieses Nachweissystem ist für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.

BOND Polymer Refine Red Detection ist ein biotinfreies, polymeres, an Alkalische Phosphatase (AP)-Linker gekoppeltes Antikörperkonjugatsystem für den Nachweis von gewebegebundenen Maus- und Kaninchen-IgG- sowie einigen Maus-IgM-Primärantikörpern. Es ist für die Färbung von formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe mit dem automatischen BOND-System vorgesehen (enthält das Leica BOND-MAX-System und das Leica BOND-III-System).

Die klinische Auswertung einer Färbung bzw. das Nichtvorhandensein einer Färbung sollte von morphologischen Untersuchungen begleitet werden. Geeignete Kontrollen sollten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests durch einen qualifizierten Pathologen durchgeführt werden.

BOND Polymer Refine Red Detection muss mit optimalen Laborverfahren bei Gewebekontrollen verwendet werden. Um Gewissheit zu haben, sollten Labors jede Patientenprobe, falls nötig, zusammen mit positiven, negativen und anderen gewebespezifischen Kontrollen einfärben.

Zusammenfassung und Erläuterung

Immunhistochemische Methoden können dazu verwendet werden, die Anwesenheit von Antigenen in Geweben und Zellen zu demonstrieren (sehen Sie dazu "Das Arbeiten mit BOND-Reagenzien" in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch).

BOND Polymer Refine Red Detection verwendet eine neuartige kontrollierte Polymerisationstechnologie zur Herstellung von polymeren AP-Linker-Antikörperkonjugaten. Das Nachweissystem vermeidet die Verwendung von Streptavidin und Biotin und weist daher keine unspezifische Färbung aufgrund von endogenem Biotin auf.

BOND Polymer Refine Red Detection funktioniert wie folgt:

- Ein vom Anwender bereitgestellter spezifischer Primärantikörper wird aufgetragen.
- Das Post-Primary-IgG-Linker-Reagenz lokalisiert Mausantikörper.
- Das Poly-AP-IgG-Reagenz lokalisiert Kaninchenantikörper.
- Das Substratchromogen Fast Red macht den Komplex als rotes Präzipitat sichtbar.
- Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau) ermöglicht die Sichtbarmachung der Zellkerne.

Die Verwendung des BOND Polymer Refine Red Detection in Verbindung mit dem automatischen BOND-System reduziert die Wahrscheinlichkeit menschlicher Fehler und die natürlichen Schwankungen, die beim individuellen Verdünnen von Reagenzien, manuellen Pipettieren und Auftragen der Reagenzien auftreten.

Mitgelieferte Reagenzien

Die gelieferten Reagenzien reichen für 20 individuelle BOND-Färbeläufe (maximal 100 Objektträger) aus.

Um die Höchstzahl von 100 Objektträgern mit diesem Detektionssystem zu erreichen, müssen Objektträger in Mengen von 5 oder höher gemäß der Objektträgerfärbungsanordnung zusammengefasst werden. Werden weniger als 5 Objektträger zusammengefasst, wird eine geringere Anzahl gefärbter Objektträger erhalten.

1. Post Primary AP (15 ml) Kaninchen-anti-Maus-IgG (<10 µg/mL) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,1% ProClin™ 950, die 10% Tiereserum enthält.
2. Polymer AP (15 ml) Anti-Kaninchen-Poly-AP-IgG (<25 µg/mL) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,09% ProClin™ 950, die 10% Tiereserum enthält.
3. Red Part A (4,5 mL) Aktivator in 0,5% ProClin™ 950.
4. Red Part B (1,0 mL) Substrat.
5. Red Part C (1,0 mL) Substrat.
6. Red Part D (32 mL) 0,5% ProClin™ 950 enthaltende Pufferlösung.
7. Hämatoxylin (15 mL) < 0,1% Hämatoxylin.

Verdünnung und Mischung

BOND Polymer Refine Red Detection ist für die Verwendung mit dem BOND-System optimiert.

Rekonstitution, Mischen, Verdünnen oder Titrieren dieser Reagenzien ist nicht erforderlich.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Eine vollständige Liste der Materialien, die für die Probenbehandlung und die immunhistochemische Färbung mit dem BOND-System benötigt werden, befindet sich im Abschnitt "Das Arbeiten mit BOND-Reagenzien" in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch.

Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach dem Ablauf des auf dem Schlittengriffetiketts angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Unmittelbar nach Gebrauch wieder bei 2–8 °C aufbewahren.

Es gibt keine klaren Anzeichen für eine Instabilität dieses Produkts, weshalb zusammen mit unbekannten Proben positive und negative Kontrollen bearbeitet werden sollten (sehen Sie dazu "Qualitätskontrolle" im Abschnitt "Das Arbeiten mit BOND-Reagenzien" in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch).

Falls eine unerwartete Färbung beobachtet wird, die nicht durch unterschiedliche Labormethoden erklärt werden kann, und ein Problem mit dem Nachweissystem vermutet wird, wenden Sie sich sofort an Ihre örtliche Vertriebsfirma oder die Regionalniederlassung von Leica Biosystems.

Andere als die oben angegebenen Lagerungsbedingungen müssen vom Anwender selbst getestet werden¹.

Vorsichtsmaßnahmen

- **WARNHINWEIS:** Einige Einbettmittel können bewirken, dass das rote Chromogen kristallisiert oder verblasst.
- **VEWENDEN SIE FOLGENDE EINBETTMITTEL NICHT:** DPX, Entellan®®, Leica CV Mount, Eukitt® quick-hardening mounting medium, Surgipath MM 24®, Surgipath Sub-X® und Pertex. Sie sind für die Verwendung mit diesem Produkt nicht geeignet. DS9390
- Verblässen oder Kristallisieren wurde in Verbindung mit folgenden Produkten nicht beobachtet: Leica CV Ultra Mounting Media (Kat.-Nr. 14070937891), Poly-Mount® (Polysciences Inc. Kat.-Nr. 08381), VectaMount™ (Vector Laboratories Kat.-Nr. H-5000) und Limonene Mount (Electron Microscopy Sciences Kat.-Nr. 17987-01). ^{Page 8}
- Dieses Nachweissystem ist für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Die Aktivator- und die Substratlösung können Reizungen der Haut, Augen, Schleimhäute und oberen Atemwege verursachen. Tragen Sie beim Umgang mit Reagenzien Einweghandschuhe. Entsorgen Sie die Materialien gemäß den örtlichen Vorschriften.
- Ein Exemplar des Sicherheitsdatenblattes erhalten Sie von Ihrer örtlichen Vertriebsfirma oder der Regionalniederlassung von Leica Biosystems. Alternativ können Sie auch über die Webseite von Leica Biosystems unter www.LeicaBiosystems.com ein Exemplar beziehen.
- Behandeln Sie Präparate vor und nach der Fixierung sowie sämtliche damit in Berührung kommenden Materialien so, als ob diese Infektionen übertragen könnten und entsorgen Sie sie unter Beachtung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen². Pipettieren Sie Reagenzien niemals mit dem Mund und vermeiden Sie den Kontakt von Haut und Schleimhäuten mit Reagenzien oder Präparaten. Falls Reagenzien oder Präparate mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, spülen Sie diese mit reichlich Wasser. Holen Sie anschließend ärztlichen Rat ein.
- Beachten Sie bei der Entsorgung potentiell toxischer Bestandteile die behördlichen und örtlichen Vorschriften.
- Mikrobielle Kontaminationen sollten minimiert werden, da es sonst zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen kommen kann.
- Die Verwendung anderer als den angegebenen Inkubationszeiten oder Temperaturen kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Diesbezügliche Änderungen müssen vom Anwender selbst getestet werden¹.
- Vermeiden Sie eine Mischung der Reagenzien verschiedener Nachweissysteme.

Gebrauchsanleitung

Das BOND Polymer Refine Red Detection wurde zur Verwendung mit dem *IHC Protocol J auf dem automatischen BOND-System entwickelt. Die Betriebsparameter für die Verwendung der Nachweissystemreagenzien im BOND-Prozessierungsmodul wurden von Leica Biosystems optimiert. Eine Anleitung zum Anzeigen dieser Parameter finden Sie in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch.

Produktspezifische Einschränkungen

BOND Polymer Refine Red Detection wurde von Leica Biosystems zur Verwendung mit BOND- Zusatzreagenzien optimiert. Labore können eigene Primärantikörper einsetzen, wenn diese mit dem BOND Primary Antibody Diluent (Bestellnr. AR9352) auf geeignete Konzentrationen verdünnt wurden. Anwender, die andere als die empfohlenen Testverfahren verwenden, müssen unter diesen Umständen die Verantwortung für die Auswertung der Patientenergebnisse übernehmen.

Die geeigneten Konzentrationen anwenderspezifischer Primärantikörper können aufgrund von Unterschieden bei der Gewebefixierung und der Wirksamkeit der Antigenverstärkung variieren und müssen empirisch bestimmt werden. Bei der Optimierung der Retrieval-Bedingungen und Primärantikörperkonzentrationen sollten negative Reagenzkontrollen eingesetzt werden.

Zusätzlich zur klinischen Interpretation einer Färbung oder bei fehlender Färbung sollten morphologische Untersuchungen und geeignete Kontrollen durchgeführt werden.

Sie sollten unter Berücksichtigung der klinischen Geschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen beurteilt werden.

BOND Polymer Refine Red Detection muss mit optimalen Laborverfahren bei Gewebekontrollen verwendet werden. Um Gewissheit zu haben, sollten Labors jede Patientenprobe, falls nötig, zusammen mit positiven, negativen und anderen gewebespezifischen Kontrollen einfärben.

Einige Eindeckmedien sind nicht kompatibel mit BOND Polymer Refine Red Detection (Verwendungszweck).

Es wird eine schnelle Alkohol-/Xylol-Dehydratisierung empfohlen.

Wenden Sie sich für weitere Informationen an Ihre örtliche Vertriebsfirma oder an die Regionalniederlassung von Leica Biosystems.

Fehlersuche

Maßnahmen zur Abhilfe beim Auftreten von Fehlern finden Sie in Referenz 3.

Falls Sie ungewöhnliche Färbeergebnisse beobachten, wenden Sie sich an Ihre örtliche Vertriebsfirma oder an die Regionalniederlassung von Leica Biosystems.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur Immunfärbung mit BOND-Reagenzien finden Sie in den Abschnitten Grundlegende Vorgehensweise, Erforderliches Material, Probenvorbereitung, Qualitätskontrolle, Assay-Verifizierung, Deutung der Färbung, Schlüssel der Symbole auf den Etiketten und Allgemeine Einschränkungen in "Das Arbeiten mit BOND-Reagenzien" in Ihrem BOND-Benutzerhandbuch.

Bibliografie

1. Clinical laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
 2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
 3. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
- ProClin™ 950 ist eine Marke von Supelco, einem Unternehmen der Sigma-Aldrich Corporation.

Ausgabedatum

18 Dezember 2019

Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper

Melan A

Produkt-Nr.: NCL-L-MelanA

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

NCL-L-MelanA ist zur qualitativen lichtmikroskopischen Identifizierung von humanem Melan A in Paraffinschnitten vorgesehen. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

Immunhistochemische (IHC) Färbetechniken gestatten die optische Darstellung von Antigenen mittels sequentieller Anwendung eines spezifischen Antikörpers zum Antigen (primärer Antikörper), eines sekundären Antikörpers zum primären Antikörper und eines Enzymkomplexes mit einem chromogenen Substrat, jeweils getrennt durch dazwischen liegende Waschschrte. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt am Ort des Antigens. Die Probe kann dann gegengefärbt und mit einem Deckglas versehen werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und unterstützen die Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die mit einem bestimmten Antigen assoziiert sein könnten.

Klon

A103

Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Fusionsprotein, das dem humanen Melan A entspricht.

Spezifität

Humanes Melan A erkennt eine 20 bis 22 kD Doublette in Melan A mRNA-positiven Melanomzelllinien. Reagiert nicht mit Melan A mRNA-negativen Zelllinien.

Reagenzzusammensetzung

NCL-L-MelanA ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Ig-Klasse

IgG1

Gesamtproteinkonzentration

Total Protein

Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 22,5 mg/L laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie in Paraffinschnitten

Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER): Bitte Gebrauchsanweisung für Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 befolgen.

Empfohlene Verdünnung: 1:50 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

Visualisierung: Bitte Gebrauchsanweisung für Novolink™ Polymer Detection Systems befolgen. Wenn Sie weitere Produktinformationen oder Unterstützung wünschen, setzen Sie sich bitte mit ihrem Händler vor Ort oder mit der Zweigniederlassung von Leica Biosystems in Verbindung beziehungsweise besuchen Sie die Internetseite von Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

Die Leistungsfähigkeit dieses Antikörpers sollte bestätigt werden, wenn er mit anderen manuellen Färbesystemen oder automatisierten Plattformen eingesetzt wird.

Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Probenvorbereitung

Für paraffineingebettete Gewebeschnitte ist das empfohlene Fixativ 10% neutral gepuffertes Formalin.

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Reagenz wurde aus Zellkulturüberstand zubereitet. Das Reagenz ist ein biologisches Produkt und sollte mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden.

Dieses Reagenz enthält Natriumazid. Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.LeicaBiosystems.com erhältlich. Die entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell

infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.¹ Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden. Ärztlichen Rat einholen. Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebeparbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen.

Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie-/Biopsie-/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden.

Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.²

Für die positive Gewebekontrolle wird Haut empfohlen.

Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren.

Für die negative Gewebekontrolle wird Zerebellum empfohlen.

Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden.

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färbeargebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.³ Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. In Abhängigkeit von der Art der verwendeten Immunfärbung können solche Ergebnisse auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen bzw. mit Enzymkomplexen (Avidin-Biotin, Streptavidin, markiertes Polymer) plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Antigenstelle ist mit einem Schnitt jedes Patientenpräparates anstelle des primären Antikörpers eine unspezifische negative Reagenzkontrolle zu verwenden.

Patientengewebe

Die mit NCL-L-MelanA gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbeintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle zu bewerten. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Antigen in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch-negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

Erwartete Ergebnisse

Normale Gewebe

Klon A103 weist das Melan A-Antigen im Zytoplasma von Melanozyten nach. Nebennierenrinde und Hoden können ebenfalls leicht positiv sein. (Anzahl der insgesamt untersuchten Normalgewebeproben = 48).

Anomale Gewebe

Klon A103 färbte 12/120 untersuchten Tumoren, einschließlich Tumoren der Haut (12/77, einschließlich 12/15 malignen Melanomen, 0/16 Plattenepithelkarzinomen, 0/14 Basalzellkarzinomen, 0/10 Schweißdrüsenkarzinomen, 0/10 Dermatofibrosarkomen, 0/3 metastatischen Adenokarzinomen, 0/3 malignen Schwannomen, 0/2 adenoid-zystischen Karzinomen, 0/1 Fibrosarkom, 0/1 Talgdrüsen-Adenokarzinom, 0/1 pleomorphen undifferenzierten Sarkom und 0/1 Leiomyosarkom), Leberkarzinomen (0/5), Ovarialtumoren (0/4), Lungenkarzinomen (0/4), papillären Schilddrüsenkarzinomen (0/4), Hirntumoren (0/2), Plattenzellkarzinomen des Ösophagus (0/2), Mammakarzinomen (0/2), Adenokarzinomen des Magens (0/2), Weichteiltumoren (0/2), Plattenepitheltumoren der Zunge (0/2), metastatischen Tumoren unbekannter Ätiologie (0/2), Nierenzellkarzinomen (0/2), Plattenepithelkarzinomen des Zervix (0/2), Seminomen der Hoden (0/2), Adenokarzinomen von Kolon (0/2) und Rektum (0/2), Plattenepithelkarzinomen des Kehlkopfes (0/1) und atypische karzinoide Tumoren des Thymus (0/1) (Anzahl der insgesamt untersuchten Proben von Tumorgewebe = 120).

NCL-L-MelanA wird als Hilfe zur Bewertung von Melan A in melanozytären Läsionen empfohlen.

Allgemeine Beschränkungen

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung des IHC-Objektträgers sowie Bewertung der Färbeargebnisse.

Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.⁴

Eine exzessive oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Bewertung von Ergebnissen gefährden.

Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Antikörper von Leica Biosystems Newcastle Ltd sind wo angezeigt für die Verwendung entweder auf gefrorenen oder in Paraffin eingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

Literatur - Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Shidham VB, Qi D, Rao RN, et al. Improved immunohistochemical evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma with 'MCW Melanoma Cocktail'-a mixture of monoclonal antibodies to MART- 1, melan-A, and tyrosinase. BioMed Central cancer. 2003; 3(1):15.
6. Loy TS, Philips RW and Linder CL. A103 immunostaining in the diagnosis of adrenal cortical tumors: an immunohistochemical study of 316 cases. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2002; 126(2):170–172.
7. Clarkson KS, Sturdess IC and Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). Journal of Clinical Pathology. 2001; 54:196–200.
8. De Vries TJ, Smeets M, de Graaf R et al. Expression of gp100, MART-1, tyrosinase and S100 paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. Journal of Pathology. 2001; 193:13–20.
9. Fang D, Hallman J, Sangha N et al. Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes. American Journal of Pathology. 2001; 158(6):2107–2115.
10. Blessing K, Grant JJH, Sanders DSA et al. Small cell malignant melanoma: variant of nevoid melanoma. Clinicopathological features and histological differential diagnosis. Journal of Clinical Pathology. 2000; 53:591–595.
11. Blessing K, Sanders DS, Grant JJ. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody Melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. Histopathology. 1998; 32 (2):139-146.
12. De Vries TJ, Trancikova D, Ruiter D et al. High expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, tyrosinase and TRP-1 in uveal melanoma. British Journal of Cancer. 1998; 78(9): 1156-1161.
13. De Vries TJ, Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruiter DJ and Van Muijen GNP (1997) Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1 and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. Cancer Research 1997; 57: 3223-3229.
14. Chen YT, Stockert E, Jungbluth A et al. Serological analysis of melan-A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1996; 93:5915–5919.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Reagenzienzusammensetzung, Gesamtproteinkonzentration, Anwendungsempfehlungen, Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen, erwartete Ergebnisse.

Ausgabedatum

02 November 2018

CD30 (Ber-H2) Mouse Monoclonal Antibody

Zur Verwendung In Der In Vitro Diagnostik (IVD)

Produktbezeichnung

REF	Beschreibung
130M-94	0,1 ml Konzentrat
130M-95	0,5 ml Konzentrat
130M-96	1,0 ml Konzentrat
130M-97	1,0 ml vorverdünnt einsatzbereit
130M-98	7,0 ml vorverdünnt einsatzbereit

Definition der Symbole

KEY-CODE	Balkencode
P	Vorverdünnung
C	Konzentrat
A	Aszites
E	Überstand
S	Serum
DIL	Verdünnungsbereich des Konzentrats

Verwendungszweck

Dieser Antikörper ist für die Verwendung in der *In Vitro*-Diagnostik bestimmt.

CD30 (Ber-H2) Mouse Monoclonal Primary Antibody wird zum Laborgebrauch bei der Erkennung des Proteins CD30 in formalinfixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe verwendet, das im Rahmen qualitativer immunhistochemischer (IHC) Tests gefärbt wurde.

Die Ergebnisse, die mithilfe dieses Produkts erlangt werden, müssen von einem qualifizierten Pathologen zusammen mit der relevanten Patienten-Anamnese, anderen Diagnosetests und entsprechenden Protokollen interpretiert werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Anti-CD30 weist ein formalinresistentes Epitop nach, das von Sternberg-Reed-Zellen im klassischen Hodgkin-Lymphom, dem Großteil der anaplastischen großzelligen Lymphome, in primär kutanen CD30-positiven lymphoproliferativen T-Zell-Erkrankungen,¹⁻³ und in embryonalen Karzinomen exprimiert wird.⁴ Gelegentlich lassen sich diffus großzellige B-Zell-Lymphome mit diesem Antikörper anfärben.³ Dieser Antikörper färbt außerdem Plasmazellen in Paraffin-eingebettetem Gewebe sowie reaktive Immunoblasten. Das Färbungsmuster von Anti-CD30 ist unterschiedlich beim Lymphom, wo eine membranöse Färbung sowie eine

Akzentuierung im Bereich der Golgi-Zone auftritt, und beim embryonalen Karzinom, wo sich lediglich eine membranöse Färbung zeigt.⁴

Prinzipien und Verfahren

Der angegebene primäre Antikörper kann als primärer Antikörper für die immunohistochemische Färbung von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeabschnitten verwendet werden. Im Allgemeinen erlaubt die immunohistochemische Färbung in Verbindung mit einem an HRP oder alkalische Phosphatase gekoppelten Nachweissystem die Visualisierung von Antigenen durch die aufeinanderfolgende Verwendung eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) gegen das Antigen, eines Sekundärantikörpers (Link-Antikörper) gegen den Primärantikörper, eines Enzymkomplexes und eines chromogenen Substrats mit dazwischen liegenden Waschschritten. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens resultiert in einem sichtbaren Reaktionsprodukt an der Antigenstelle. Die Probe kann dann gegengefärbt und es kann ein Coverslip angewandt werden. Danach kann die Probe gegengefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt werden. Das Ergebnis wird unter dem Lichtmikroskop interpretiert.

Materialien und Verfahren

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Produktzusammensetzung	
Vorverdünnung: Verdünnt mit	Tris-Puffer, pH 7,3 – 7,7, mit 1% BSA und <0,1% Natriumazid
Konzentrat: Verdünnt mit	Tris-Puffer, pH 7,3 – 7,7, mit 1% BSA und <0,1% Natriumazid
Host	maus
Isotype	IgG ₁ /k
Empfohlener Verdünnungsbereich für die Arbeitslösung	1:50–1:200
Quelle	Überstand

Auf dem Produktetikett finden Sie chargenspezifische Informationen über folgende Punkte:

1. Antikörper-Immunglobulinkonzentration
2. Quelldetails

Rekonstitution, Mischung, Verdünnung, Titrierung

Der vorverdünnte Antikörper ist gebrauchsfertig und wurde für die Färbung optimiert. Es ist keine Rekonstitution, Mischung, Verdünnung oder Titrierung erforderlich. Der konzentrierte Antikörper wurde für eine Verdünnung mit dem Cell Marque Diamond: Antibody Diluent innerhalb des auf dem Produktetikett angegebenen Verdünnungsbereichs optimiert.

Benötigte, jedoch nicht gelieferte Materialien und Reagenzien

Die folgenden Reagenzien und Materialien können für das Färbeverfahren erforderlich sein, sind aber nicht im Lieferumfang des Primärantikörpers enthalten:

1. Positive und negative Kontrollgewebe
2. Mikroskop-Objektträger, positiv geladen
3. Trockenschrank mit der Leistung zur Aufrechterhaltung einer Temperatur von 53–65 °C
4. Färbeschalen oder Wannen
5. Timer
6. Xylol oder Xyloersatz
7. Ethanol oder Reagenzalkohol
Hinweis: Cell Marques einstufige Vorbehandlung, Trilogy™ (Kat.-Nr. 920P-06) kann die Schritte 6 und 7 oben ersetzen.
8. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
9. Gerät zum Erhitzen, z. B. elektrischer Drucktopf zur Gewebevorbehandlung
10. Nachweissystem, z. B. HiDef Detection™ HRP Polymer System (Kat.-Nr. 954D-20) oder HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (Kat.-Nr. 962D-20)
11. Chromogen, z. B. DAB Substrate Kit (Kat.-Nr. 957D-20) oder Permanent Red Chromogen Kit (Kat.-Nr. 960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween®* 20 (Kat.-Nr. 935B-09)
13. Hematoxylin oder Gegenfärbung
14. Verdünnungsmittel für Antikörper, z. B. Diamond: Antibody Diluent (Kat.-Nr. 938B-05) oder Emerald: Antibody Diluent (Kat.-Nr. 936B-08)
15. Peroxide Block (Kat.-Nr. 925B-05) zum Gebrauch mit HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents zum Gebrauch mit Streptavidin-Biotin Nachweis
17. Negatives Kontrollreagenz (Kat.-Nr. 939B-02 universell)
18. Mounting Medium
19. Deckgläser
20. Lichtmikroskop (40–400 fache Vergrößerung)

Lagerung und Handhabung

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und die Stabilität des Antikörpers zu erhalten, nach jedem Durchlauf Spender-Verschlusskappe wieder aufsetzen und die Flasche sofort in aufrechter Position in den Kühlschrank stellen.

Jedes Antikörper-Reagenz ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei korrekter Aufbewahrung ist das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Reagenz nach Ablauf des Verfallsdatums für die angegebene Lagermethode nicht mehr verwenden.

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen bei Instabilität der Reagenzien. Aus diesem Grund müssen immer gleichzeitig positive und negative Kontrollgewebe zusammen mit unbekannten Proben gefärbt werden. Kontaktieren Sie den Technischen Support von Cell Marque, wenn der Verdacht einer A1 Reagenzieninstabilität besteht.

Entnahme und Vorbereitung der Proben zur Analyse

Entsprechend der Laborroutinemethode aufgearbeitete, neutral-gepufferte formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben sind zur Verwendung mit diesem Primärantikörper

geeignet, wenn sie in Verbindung mit Cell Marque-Nachweisskits eingesetzt werden (siehe Abschnitt „Nicht im Lieferumfang enthaltene erforderliche Materialien und Reagenzien“). Hinweis: Mit Cell Marque kann nur die Leistung bei menschlichem Gewebe bewertet werden. Das empfohlene Gewebefixiermaterial ist 10 % neutral-gepuffertes Formalin. Infolge verlängerter Gewebefixierung oder besonderer Prozesse wie einer Dekalzifikation bei der Vorbereitung des Knochenmarks können unterschiedliche Ergebnisse auftreten.

Jeder Schnitt muss die geeignete Stärke aufweisen (ca. 3 µm) und auf einen positiv geladenen Glasobjektträger aufgebracht werden. Die mit Gewebeschnitten bestückten Objektträger können mindestens 2 Stunden (nicht länger als 24 Stunden) bei 53–65 °C im Ofen angebacken werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmassnahmen

1. Treffen Sie beim Umgang mit den Reagenzien angemessene Vorsichtsmaßnahmen. Verwenden Sie beim Umgang mit mutmaßlichen Karzinogenen oder toxischen Materialien Einweg-Handschuhe und Laborkittel (Beispiel: Xylen).
2. Vermeiden Sie den Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder Schleimhäuten. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen mit reichlich Wasser ausspülen.
3. Patientenproben und alle Materialien, die mit diesen in Berührung gekommen sind, sind als biogefährliche Materialien zu behandeln und müssen unter Einhaltung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Niemals mit dem Mund pipettieren.
4. Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien, da dies zu unkorrekten Ergebnissen führen könnte.
5. Der Benutzer muss Inkubationszeiten und Temperaturen überprüfen.
6. Die vorverdünnten, gebrauchsfertigen Reagenzien sind optimal verdünnt, so dass eine weitere Verdünnung zu einer geringeren Antigenfärbung führen könnte.
7. Die konzentrierten Reagenzien können auf der Grundlage der Validierung durch den Benutzer optimal verdünnt werden. Jedes verwendete Verdünnungsmittel, das hier nicht speziell empfohlen wird, muss ebenfalls durch den Benutzer sowohl hinsichtlich seiner Kompatibilität als auch seiner Auswirkungen auf die Stabilität validiert werden.
8. Bei anweisungsgemäßer Verwendung wird dieses Produkt nicht als Gefahrstoff eingestuft. Das Konservierungsmittel in dem Reagenz ist weniger als 0,1 % Natriumazid und erfüllt bei der angegebenen Konzentration nicht die Kriterien für einen Gefahrstoff gemäß OSHA (USA). Siehe SDS.
9. Der Benutzer muss jegliche von den in der Packungsbeilage angegeben abweichenden Lagerungsbedingungen validieren.
10. Das Verdünnungsmittel kann Rinderserumalbumin enthalten und der Überstand kann Rinderserum enthalten. Fetales Rinderserum enthaltende Produkte und Rinderserumalbumin enthaltende Produkte werden von kommerziellen Anbietern gekauft. Ursprungszertifikate der für diese Produkte verwendeten tierischen Quelle sind bei Cell Marque in den Akten. Die Zertifikate bestätigen, dass die Rinderquellen aus Ländern mit einem unerheblichen BSE-Risiko stammen und nennen Rinderquellen aus den USA und Kanada.
11. Wie bei allen von biologischen Quellen stammenden Produkten sind entsprechende Verfahren zu befolgen.

Gebrauchsanweisung

Empfohlene Färbeprotokolle für den angegebenen primären Antikörper:

HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (Kat.-Nr. 954D-20)

1. Verfahren Epitopdemaskierung: HIER, Reagenz Epitopdemaskierung: Trilogy
2. Inkubationszeit für antikörper (Minuten): 10-30
3. Inkubationszeit für HiDef Detection Amplifier (Minuten): 10
4. Inkubationszeit für HiDef Detection Polymer Detector (Minuten): 10
5. Inkubationszeit für DAB (Minuten): 1-10
6. Dehydrieren und eindecken.

HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (Kat.-Nr. 962D-20)

1. Verfahren Epitopdemaskierung: HIER, Reagenz Epitopdemaskierung: Trilogy
2. Inkubationszeit für antikörper (Minuten): 10-30
3. Inkubationszeit für HiDef Detection Amplifier (Minuten): 10
4. Inkubationszeit für HiDef Detection Polymer Detector (Minuten): 10
5. Inkubationszeit für Permanent Red (Minuten): 15-30
6. Dehydrieren und eindecken.

Verfahren Zur Qualitätskontrolle

Positive Gewebekontrolle

Zusammen mit jedem Färbedurchlauf muss eine positive Gewebekontrolle mitlaufen. In diesem Gewebe können Zell- oder Gewebestandteile enthalten sein, die sich sowohl positiv als auch negativ färben und damit als Positiv- wie auch als Negativkontrolle verwendet werden können. Die Kontrollprobe muss aus frischem Gewebe einer Autopsie, Biopsie oder einem chirurgischen Eingriff bestehen und so schnell wie möglich auf identische Weise wie die Probenschnitte präpariert oder fixiert werden. Die Verwendung eines Kontrollschnitts, der auf andere Weise als das Testpräparat fixiert oder präpariert worden ist, dient der Kontrolle für alle Reagenzien und Verfahrensschritte, mit Ausnahme der Fixierung und Gewebepreparation.

Eine Probe mit schwach positiver Färbung ist zur optimalen Qualitätskontrolle und zur Erkennung von geringfügigerem Reagenzienabbau besser geeignet. Eine positive Gewebekontrolle für den angegebenen primären Antikörper kann folgendes umfassen:

Positive Gewebekontrolle	
Gewebe	Visualisierung
Klassisches Hodgkin-Lymphom	Zellmembran
Lymphom	Zellmembran

Nachweislich positive Gewebekontrollen dürfen nur zur Kontrolle der korrekten Leistung von verarbeitetem Gewebe und Testreagenzien verwendet werden und nicht als Hilfe bei der Erstellung einer spezifischen Diagnose von Patientenproben. Wenn mit der positiven

Gewebekontrolle keine angemessene positive Färbung nachgewiesen werden kann, müssen die Ergebnisse mit den Testpräparaten als ungültig gewertet werden.

Negative Gewebekontrolle

Für die negative Gewebekontrolle kann das gleiche Gewebe verwendet werden wie für die Positivkontrolle. Die Vielzahl der in den meisten Gewebeschnitten vorkommenden Zellarten bietet Stellen zur internen Negativkontrolle, die allerdings vom Benutzer überprüft werden müssen. Aufgabe der nichtfärbenden Komponenten ist es, das Fehlen spezifischer Färbungen nachzuweisen und auf unspezifische Hintergrundfärbungen hinzuweisen. Bei spezifischer Färbung der negativen Gewebekontrolle müssen die mit den Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig gewertet werden.

Unerklärliche Abweichungen

Unerklärliche Abweichungen bei Kontrollen sollten unverzüglich dem Technischen Support von Cell Marque mitgeteilt werden. Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle die Spezifikationen nicht erfüllen, sind die Patientenergebnisse ungültig. Siehe Abschnitt „Fehlerbehebung“ in dieser Packungsbeilage. Identifizieren und korrigieren Sie das Problem, und wiederholen Sie anschließend das gesamte Verfahren mit den Patientenproben.

Negatives Kontrollreagenz

Für jede Probe muss ein negatives Kontrollreagenz mitlaufen, um die Interpretation der Ergebnisse zu unterstützen. Ein negatives Kontrollreagenz wird anstelle der Primärantikörperkontrolle zur Bewertung von unspezifischer Färbung durchgeführt. Der Objektträger sollte mit negativem Kontrollreagenz behandelt werden, das den Wirtsspezies des Primärantikörpers entspricht und idealerweise über dieselbe IgG-Konzentration verfügt. Die Inkubationszeit des negativen Kontrollreagenzes sollte der Inkubationszeit des primären Antikörpers entsprechen.

Interpretation der Ergebnisse

Das Immunofärbeverfahren hat ein gefärbtes Reaktionsprodukt zur Folge, das an den vom Primärantikörper lokalisierten Antigenstellen zu Präzipitat führt. Weitere Informationen zu den zu erwartenden Farbreaktionen sind der Packungsbeilage des entsprechenden Detektionssystems zu entnehmen. Ein mit immunohistochemischen Verfahren vertrauter qualifizierter Pathologe muss vor der Interpretation der Ergebnisse die positiven und negativen Gewebekontrollen evaluieren.

Positive Gewebekontrolle

Die gefärbte positive Gewebekontrolle muss zuerst untersucht werden, um zu gewährleisten, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktionieren. Ein ordnungsgemäß gefärbtes Reaktionsprodukt in den Zielzellen ist Anzeichen für eine positive Reaktionsfähigkeit. Weitere Informationen zu den zu erwartenden Farbreaktionen sind der Packungsbeilage des Detektionssystems zu entnehmen. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Wirkungsstärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer hell- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen. Wenn mit der positiven Gewebekontrolle keine angemessene positive Färbung nachgewiesen werden kann, müssen die Ergebnisse mit den Testpräparaten als ungültig bewertet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle wird nach der positiven Gewebekontrolle untersucht, um zu überprüfen, ob die spezifische Anfärbung des Zielantigens mit dem Primärantikörper korrekt erfolgt ist. Nicht vorhandene spezifische Färbung in der negativen Gewebekontrolle

CD30 (Ber-H2) Mouse Monoclonal Antibody

bestätigt die fehlende unspezifische Kreuzreaktivität mit Zellen oder Zellkomponenten. Bei spezifischer Färbung der negativen Gewebekontrolle müssen die mit den Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig bewertet werden. Bei Auftreten von unspezifischer Färbung ist das Erscheinungsbild diffus. In Gewebeschnitten, die nicht optimal fixiert wurden, kann es auch zum sporadischen Auftreten von leichter Färbung von Bindegewebe kommen. Zur Interpretation der Färbegergebnisse sollten intakte Zellen verwendet werden. Nekrotische oder degenerierte Zellen weisen eine unspezifische Färbung auf.

Patientengewebe

Die Untersuchung der Patientenproben erfolgt zum Schluss. Die Intensität der positiven Färbung muss unter Berücksichtigung der Hintergrundfärbungen der negativen Reagenzkontrolle bewertet werden. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist. Eventuell kann zur Unterstützung bei der Identifikation von falsch-negativen Reaktionen ein Antikörper-Panel verwendet werden (siehe Abschnitt „Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse“). Bei der Interpretation aller immunhistochemischen Ergebnisse sollte die Morphologie aller Gewebeproben zusätzlich auch mit Hilfe eines mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnittes untersucht werden. Die morphologischen Befunde der Patientenproben und die dazugehörigen klinischen Daten müssen von einem qualifizierten Pathologen interpretiert werden.

Einschränkungen

1. Die Antikörperfarbe hat keinen Einfluss auf das Ergebnis.
2. Dieses Reagenz ist nur für den professionellen Gebrauch, da Immunhistochemie ein aus mehreren Schritten bestehendes Verfahren ist, das eine spezielle Schulung bei der Auswahl der geeigneten Reagenzien, Gewebe, Fixierung und Aufbereitung, der richtigen Vorbereitung des immunhistochemischen Objektträgers und Interpretation der Färbungsergebnisse erfordert.
3. Nur für den Laborgebrauch.
4. Nur für die Verwendung in der *In vitro*-Diagnostik.
5. Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Aufbereitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, zum Einschluss von Antikörpern oder zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können die Folge von Abweichungen bei Fixierungs- und Einbettungsmethoden sowie von dem Gewebe inhärenten Unregelmäßigkeiten sein.
6. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
7. Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung oder Nichtfärbung muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests evaluiert werden. Dieser Antikörper ist für den Gebrauch in einem Antikörper-Panel, falls zutreffend, bestimmt. Es liegt in der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit dem Färbeverfahren und der Vorbereitung der Objektträger (einschließlich Antikörper, Reagenzien und Diagnose-Panels) vertraut zu sein. Die Färbung muss in einem zertifizierten und lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen vorgenommen werden, der für die Überprüfung der gefärbten Objektträger sowie die Gewährleistung der adäquaten positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
8. Cell Marque Antikörper und Reagenzien werden in der optimalen Konzentration zur Verwendung entsprechend der Gebrauchsanweisung geliefert. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es

müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und protokolliert werden. Die Benutzer tragen unter allen Umständen unbedingt die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.

9. Cell Marque bietet Primäntikörper in konzentrierter Form an, damit der Benutzer diese später entsprechend seiner Entscheidung für und unter Einhaltung der geeigneten Validierungstechniken optimal für den jeweiligen Gebrauch verdünnen kann. Die Verwendung von anderen als den hier empfohlenen Verdünnungsmitteln muss von den Benutzern validiert werden. Nach erfolgter Validierung des Primäntikörpers kann jede Abweichung von den empfohlenen Testverfahren die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und protokolliert werden. Die Benutzer tragen unter allen Umständen unbedingt die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.
10. Dieses Produkt ist nicht für die Verwendung bei der Durchflusszytometrie bestimmt.
11. Bei Geweben, die im Vorfeld nicht getestet wurden, können unerwartete Reaktionen mit den verwendeten Reagenzien auftreten. Aufgrund der biologischen Schwankungen bei Antigenexpression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben können unerwartete Reaktionen auch bei getesteten Gewebegruppen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Wenden Sie sich mit einer Dokumentation mutmaßlicher, unerwarteter Reaktionen an den Technischen Support von Cell Marque.
12. Gewebe von mit dem Hepatitis B-Virus infizierten Personen und die das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) enthalten, können eine nichtspezifische Färbung mit Meerrettichperoxidase aufweisen.
13. Bei Verwendung in Verfahren zur Blockierung können normale Seren von derselben tierischen Quelle wie die Sekundäntiseren aufgrund der Wirkung von Autoantikörpern oder natürlichen Antikörpern zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen.
14. Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund der nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten sichtbar werden. Sie können auch durch die Aktivität der Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogenen Peroxidase (Cytochrom C) oder des endogenen Biotins verursacht werden (Beispiel: Leber, Gehirn, Brust, Niere), je nach Art der verwendeten Immunfärbetechnik.
15. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist.
16. Die vorverdünnten Antikörperprodukte sind als gebrauchsfertige Produkte optimiert. Aufgrund möglicher Unterschiede bei der Gewebefixierung und -aufbereitung ist es ggf. erforderlich, die Inkubationszeit der Primäntikörper bei einzelnen Proben zu erhöhen oder zu senken.
17. Der Antikörper in Kombination mit Detektionssystemen und Zubehör erkennt Antigene, die die routinemäßige Formalinfixierung, Gewebepreparierung und das Schneiden überleben. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, haften, wie das unter allen anderen Umständen auch der Fall wäre, selbst für die Interpretation und Validierung der Patientenergebnisse.

CD30 (Ber-H2) Mouse Monoclonal Antibody

Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse

Siehe folgende Reaktionstabellen:

Normale Studie			
Gewebe	Anzahl gefärbt (+)	Gesamtzahl	Anmerkungen
Gehirn	0	1	
Nebennierenrinde	0	1	
Eierstock	0	1	
Bauchspeicheldrüse	0	1	
Nebenschilddrüse	0	1	
Hypophyse	0	1	
Hoden	0	1	
Schilddrüse	0	1	
Brust	0	2	
Milz	0	1	
Tonsille	0	1	
Thymus	0	1	
Knochenmark	0	1	
Lunge	0	2	
Herz	0	1	
Speiseröhre	0	1	
Magen	0	1	
Dünndarm	0	1	
Darm	0	1	
Leber	0	1	
Speicheldrüse	0	1	
Gallenblase	0	1	
Niere	0	1	
Blase	0	1	
Prostata	0	2	
Uterus	0	1	
Eileiter	0	1	
Ureter	0	1	
Gebärmutterhals	0	1	
Skelettmuskel	0	1	
Glatter Muskel	0	3	

Normale Studie			
Gewebe	Anzahl gefärbt (+)	Gesamtzahl	Anmerkungen
Haut	0	1	
Periphere Nerven	0	1	
Mesothel	0	1	
Fett	0	1	
Plazenta	0	1	

Dieser Antikörper färbt normale Gewebe wie in der Literatur angezeigt.

Krankheitsgewebestudie			
Gewebe	Anzahl gefärbt (+)	Gesamtzahl	Anmerkungen
Anaplastisches großzelliges Lymphom	1	1	
Klassisches Hodgkin-Lymphom	1	1	
Invasives Duktalkarzinom der Brust	0	23	
Kolonadenokarzinom	0	19	

Dieser Antikörper färbt Tumore wie in der Literatur angezeigt.

Fehlersuche

1. Falls die positive Kontrolle eine schwächere Färbung als erwartet aufweist, sollten andere positive Kontrollen, die im selben Färbedurchlauf enthalten waren, überprüft werden, um zu bestimmen, ob dies auf den primären Antikörper oder auf eines der üblichen Sekundärreagenzien zurückzuführen ist.
2. Falls die Positivkontrolle negativ ist, sollten andere Positivkontrollen aus demselben Durchlauf geprüft werden, um festzustellen, ob die Ursache im Zusammenhang mit dem Primärantikörper oder einem der üblichen Sekundärreagenzien steht. Gewebe können unsachgemäß gewonnen, fixiert oder entparaffiniert worden sein. Entnahme, Lagerung und Fixierung der Gewebeproben müssen sachgemäß ausgeführt werden.
3. Wenn es zu einer übermäßigen Hintergrundfärbung kommt, können hohe Spiegel endogenen Biotins vorliegen. Es sollte ein Verfahren zur Blockierung von Biotin durchgeführt werden, es sei denn, dass ein Biotin-freies Detektionssystem verwendet wird. In diesem Fall würde jegliches vorhandenes Biotin nicht zu einer Hintergrundfärbung beitragen.
4. Wenn nicht das gesamte Paraffin entfernt wurde, sollte das Entparaffinierungsverfahren wiederholt werden.
5. Wenn die Gewebeschnitte vom Objektträger abgewaschen werden, sollten die Objektträger überprüft werden, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind. Weitere Möglichkeiten, die sich negativ auf die Gewebefärbung auswirken könnten sind unzureichendes Trocknen des Gewebeschnittes auf dem Objektträger vor dem Färben oder

CD30 (Ber-H2) Mouse Monoclonal Antibody

eine Formalinfixierung, die nicht ordnungsgemäß neutral-gepuffert wurde. Auch die Dicke der Gewebeschnitte könnte dazu beitragen.

Zur Mängelbehebung ziehen Sie bitte die Gebrauchsanweisung heran oder kontaktieren Sie den Technischen Support von Cell Marque unter techsupport@cellmarque.com.

Literatur

1. Schwarting R, et al. BER-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. *Blood*. 1989; 74:1678-89.
2. George DH, et al. Primary anaplastic large cell lymphoma of the central nervous system: prognostic effect of ALK-1 expression. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27:487-93.
3. Hedvat CV, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's Lymphoma. *Hum Pathol*. 2002; 33:968-74.
4. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and Genomic Applications*. 4th Edition Saunders Elsevier. 2014; p702.

Haftungsausschluss

*TWEEN ist eine eingetragene Handelsmarke der Croda International PLC.

©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. Alle Rechte vorbehalten. SIGMA-ALDRICH ist eine in den USA und anderen Ländern eingetragene Handelsmarke der Sigma-Aldrich Co. LLC. Cell Marque, Trilogy, Dedere und HiDef Detection sind Handelsmarken der Sigma-Aldrich Co. LLC oder ihrer Tochtergesellschaften.

 www.cellmarque.com

 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900

EC	REP
----	-----

 EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4
Implementation date 15 Nov 2017