

101 KROKŮ K LEPŠÍ HISTOLOGII

Úvod:

101 kroků k lepší histologii

Od pacienta až k patologovi vyžaduje příprava odebraných vzorků tkáně pro histologické vyšetření speciální péči, dovednost a správné postupy.

Tato příručka poskytuje praktické rady k technikám zpracování vzorku a shrnuje nejlepší postupy a navrhuje jednoduché způsoby, jak se vyhnout běžným chybám. Každý aspekt histologického procesu je popsán: odběr vzorku, přikrajování, zpracování v technikonu, zalévání, krájení a barvení (rutinní, speciální, imunohistochemie a in situ hybridizace).

Věříme, že každý popsáný krok Vám poskytne cenné připomínky k dobré histologické praxi a pomůže při odstraňování případných problémů, které se mohou během zpracování tkání vyskytnout.

• **Obsah**

• **1) Odběr a transport vzorku**

- Krok 1: Zamezit mechanickému poškození
- Krok 2: Zamezit vysušení vzorku
- Krok 3: Zamezit poškození teplem
- Krok 4: Zamezit chemickému poškození
- Krok 5: Správné označení vzorků
- Krok 6: Zajistit rychlou fixaci
- Krok 7: Použít vhodnou fixační nádobu
- Krok 8: Kontrolovat pH fixativa
- Krok 9: Zrychlit fixaci velkých vzorků
- Krok 10: Zamezit zbytečným zpožděním
- Krok 11: Šetrně zacházet se vzorky

• **2) Přikrajování**

- Krok 12: Kontrolovat stav fixace
- Krok 13: Přikrajovat vzorky na tenké řezy
- Krok 14: Zamezit poškození vzorku
- Krok 15: Zamezit křížové kontaminaci
- Krok 16: Použití molitanových podložek v kazetkách
- Krok 17: Zvolit vhodné kazety
- Krok 18: Zamezit přeplnění kazet
- Krok 19: Zřetelně označovat kazety

• **3) Zpracování ve tkáňovém automatu**

- Krok 20: Správný program
- Krok 21: Následná fixace
- Krok 22: Udržovat kvalitu roztoků a parafínu
- Krok 23: Používat vysoce kvalitní parafín
- Krok 24: Vyhýbat se nebezpečným činidlům

• 4) Zalévání tkání

Krok 25: Správná orientace vzorků

Krok 26: Zvolit vhodnou zalévací formu

Krok 27: Šetrně zacházet se vzorky

Krok 28: Zamezit nadměrnému ohřevu

Krok 29: Pravidelně kontrolovat teploty

Krok 30: Nepřeplňovat formičky

• 5) Krájení

Krok 31: Používat kvalitní žiletky a nože

Krok 32: Optimalizovat úhel náklonu nože

Krok 33: Pečlivě skrájet bločky

Krok 34: Zamezit poškození mrazem

Krok 35: Používat studené bločky

Krok 36: Krájet pomalu

• 6) Napínání řezů

Krok 37: Používat čistou vodu

Krok 38: Zajistit čistotu podložních skel

Krok 39: Zamezit křížové kontaminaci vzorků

Krok 40: Zamezit kontaminaci kožními buňkami

Krok 41: Nepracovat s více bločky současně

Krok 42: Kontrolovat teplotu vody v lázni

Krok 43: Zamezit shrnutí řezů

Krok 44: Vyvarovat se nadměrné expanze řezů

Krok 45: Při napínání řezy nepoškodit

Krok 46: Řezy pečlivě vybírat

Krok 47: Zamezit vzniku bublin pod řezem

Krok 48: Zvýšit přilnavost řezů

• 7) Sušení řezů

Krok 49: Před sušením nechat odkapat

Krok 50: Monitorovat teplotu sušení

Krok 51: Sušit přiměřenou dobu

• 8) Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)

Krok 52: Dodržovat časy barvení

Krok 53: Pravidelně sledovat kvalitu

Krok 54: Standardizovat podmínky barvení

Krok 55: Zajistit řádnou deparafinaci

Krok 56: Pravidelně měnit reagenty

Krok 57: Řezy důkladně hydratovat

Krok 58: Monitorovat kvalitu hematoxylinu

Krok 59: Zajistit úplné obarvení jádra - zmodrání

Krok 60: Zamezit nestejněmu barvení eosinem

Krok 61: Monitorovat pH eosinu

• 9) Montování, příprava trvalého preparátu

Krok 62: Důkladně odvodnit řezy před projasňováním a montováním

Krok 63: Zamezit oschnutí řezu před zamontováním

• 10) Speciální barvení

Krok 64: Vědět, co chceme vidět

Krok 65: Používat pozitivní kontrolu

Krok 66: Dodržovat časy barvení

Krok 67: Kontrolovat stabilitu barvicích roztoků

Krok 68: Správně skladovat barvicí roztoky

Krok 69: Přesně dodržovat protokol barvení

Krok 70: Zaznamenávat všechny změny

Krok 71: Standardizovat promývací kroky

Krok 72: Pečlivě nastavit mikroskop

● 11) Imunohistochemie (IHC)

Krok 73: Používat vysoce kvalitní řezy

Krok 74: Zajistit optimální fixaci

Krok 75: Zamezit problémům s přilnavostí řezů

Krok 76: Optimalizovat odstraňování parafínu a používání činidel

Krok 77: Vyhnout se koncentračním gradientům

Krok 78: Pečlivě vybírat protilátku

Krok 79: Číst návody k protilátkám

Krok 80: Optimalizovat odmaskovací metody

Krok 81: Brát v úvahu křížovou reaktivitu protilátek

Krok 82: Blokovat endogenní peroxidázy

Krok 83: Předcházet falešnému barvení pozadí

Krok 84: Používat vhodný detekční systém

Krok 85: Standardizovat promývání

Krok 86: Optimalizovat dobarvení jader

Krok 87: Používat vhodnou kontrolu

Krok 88: Výsledky vyhodnocovat opatrně

● 12) In situ hybridizace (ISH)

Krok 89: Používat vysoce kvalitní řezy

Krok 90: Zajistit optimální fixaci

Krok 91: Zamezit problémům s přilnavostí řezů

Krok 92: Optimalizovat odstraňování parafínu a dávkování činidel

Krok 93: Pečlivě vybírat hybridizační sondu

Krok 94: Číst návody k sondám

Krok 95: Optimalizovat pretreatment

Krok 96: Šetrně zacházet se vzorky

Krok 97: Používat vhodný detekční systém

Krok 98: Zamezit vypařování činidel

Krok 99: Standardizovat promývání

Krok 100: Používat vhodnou kontrolu

Krok 101: Výsledky vyhodnocovat opatrně

• 1) Odběr a transport vzorku

Krok 1: Zamezit mechanickému poškození

Krok 2: Zamezit vysušení vzorku

Krok 3: Zamezit poškození teplem

Krok 4: Zamezit chemickému poškození

Krok 5: Správné označení vzorků

Krok 6: Zajistit rychlou fixaci

Krok 7: Použít vhodnou fixační nádobu

Krok 8: Kontrolovat pH fixativa

Krok 9: Zrychlit fixaci velkých vzorků

Krok 10: Zamezit zbytečným zpožděním

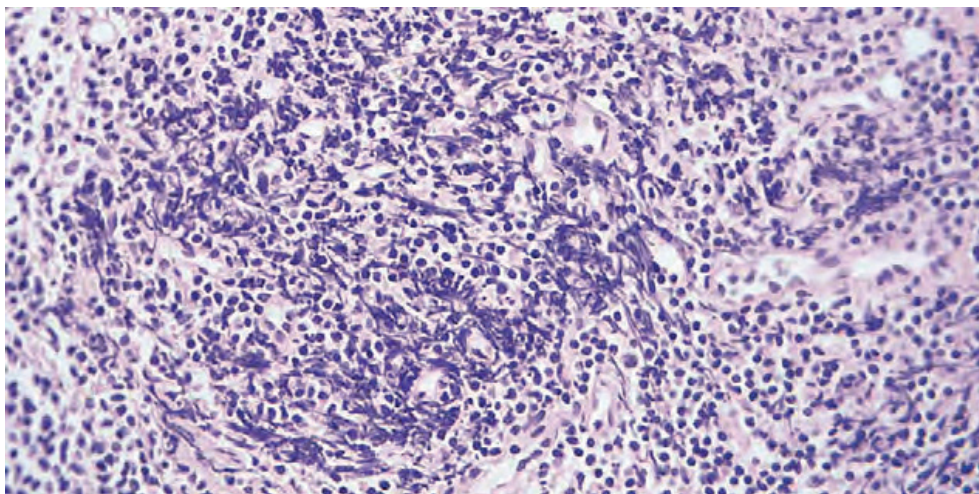
Krok 11: Šetrně zacházet se vzorky

• Odběr a transport vzorku

• Krok 1 : Zamezit mechanickému poškození

✓ Vzorek je třeba odebírat šetrně, aby nedošlo k jeho rozdrčení či roztržení. To platí jak pro odběr při chirurgickém zákroku, tak pro každou další manipulaci se vzorkem.

✗ Vzorek je při odběru rozdrčen nebo roztržen.

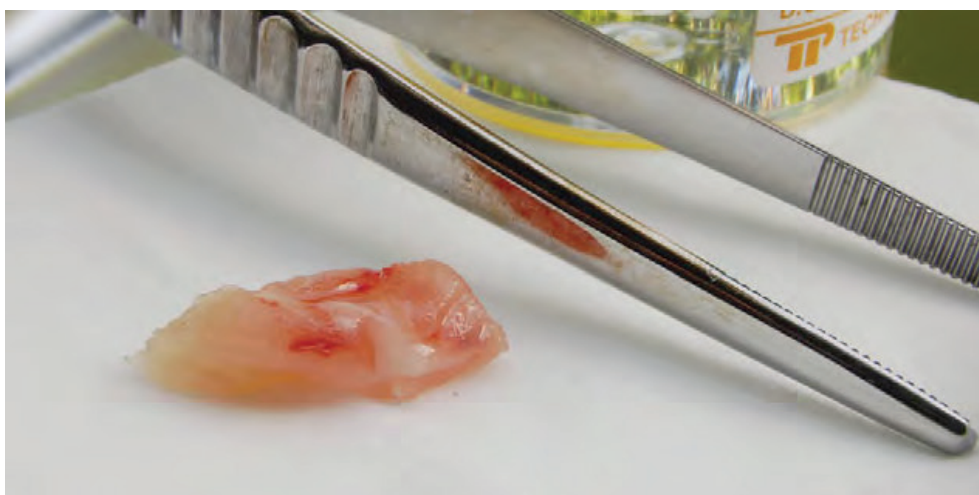


Obr: V této části lymfatické tkáně je její typická struktura rozdrčena. To je í charakterizováno tmavými, zkreslenými buněčnými jádry, z nichž některá jsou extrémně protáhlá a intenzivně bazofilní.

• Odběr a transport vzorku

• Krok 2: Zamezit vysušení vzorku

- ✓ Vzorek nesmí před fixací vyschnout. Pokud není fixace možná ihned, lze vyschnutí vzorku zabránit jeho zabalením do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem.
- ✗ Vzorek je před fixací po nějakou dobu ponechán na savém povrchu.

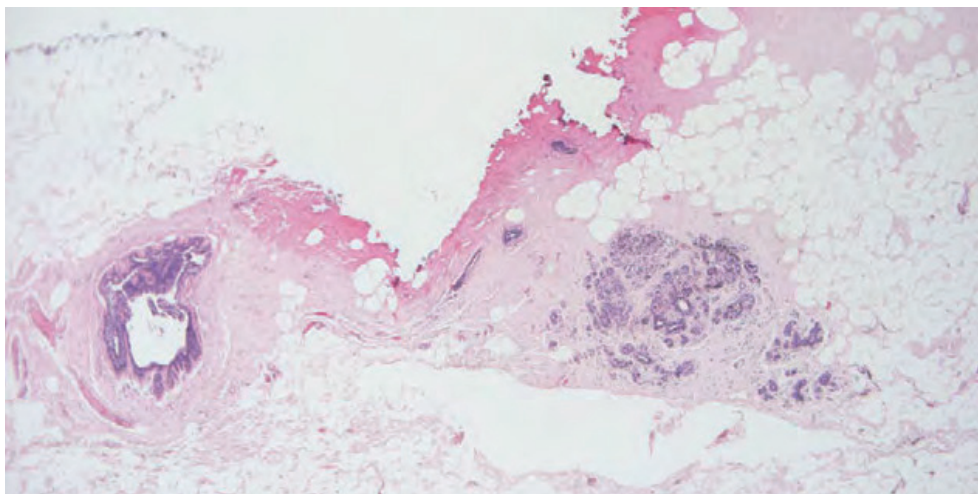


Obr: Tento čerstvý vzorek byl právě odebrán při chirurgickém zákroku. Protože je položen na absorpčním povrchu a v místnosti je vyšší teplota, bude poměrně rychle vysychat, dokud nebude umístěn ve fixačním roztoku.

• Odběr a transport vzorku

• Krok 3: Zamezit poškození teplem

- ✓ Poškozením způsobeným kauterizací se někdy nelze vyhnout. Pokud je to jen trochu možné, je třeba se se jakémukoliv tepelnému poškození vzorků vyvarovat.
- ✗ Jakékoli zbytečné lokální teplo působící na tkáně způsobí jejich poškození, náchylné k tomu jsou zejména čerstvé tkáně.

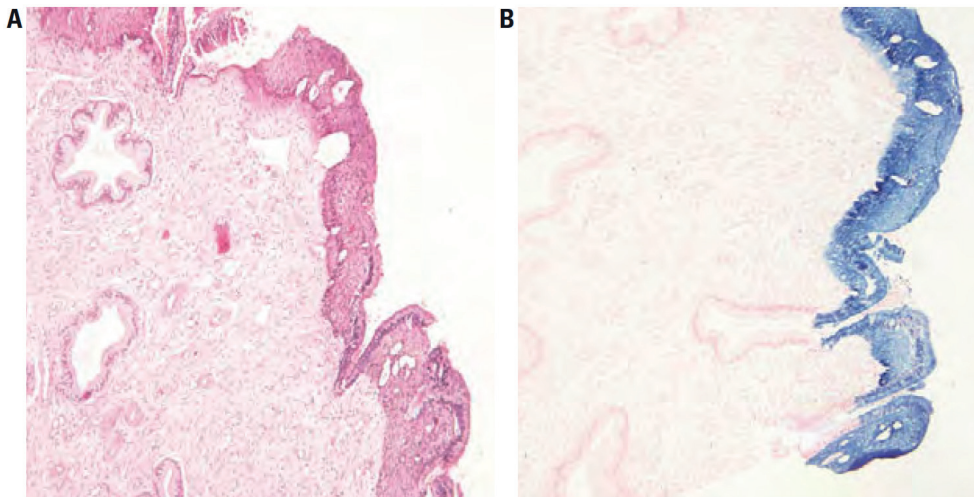


Obr: V okrajové části tohoto vzorku mammy je přítomna silná acidofilie se ztrátou jaderných a cytoplazmatických detailů. Tyto účinky jsou důsledkem tepelného poškození způsobeného během používání kauteru při odběru vzorku. Okolní žlazová tkáň není zasažena.

- Odběr a transport vzorku

- Krok 4: Zamezit chemickému poškození

- ✓ Vyvarovat se kontaminaci čerstvých vzorků cizími chemikáliemi nebo látkami, např. dezinfekčními prostředky.
- ✗ Povrch nefixované tkáně může být penetrován a poškozen cizími chemikáliemi nebo látkami.



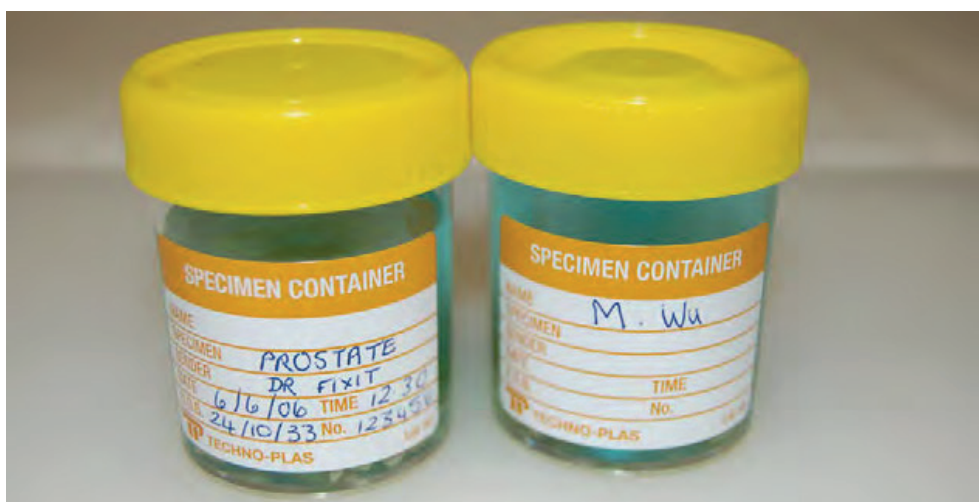
Obr: Monselův roztok (roztok síranu železitého, kyseliny sírové a kyseliny dusičné) je lokální hemostatický prostředek, používaný pro zastavení krvácení po slizniční biopsii. Roztok způsobuje koagulace a nekrózy slizničního povrchu. Pokud je použit před provedením biopsie, způsobuje lokální bazofilii a známky časně nekrózy, maskuje ve vzorku patologické změny, které mohou být přítomny. Artefakty spojené s použitím Monselova roztoku jsou nejčastěji pozorovány, když je pacient rebioptován nebo odeslán k rozšíření excize. Účinky roztoku jsou vidět na obrázku A - H&E barvení cervikální biopsie. Obrázek B - obarvený metodou Perl's, ukazuje rozsáhlé artefakty železa na povrchu vzorku.

- Odběr a transport vzorku

- Krok 5: Správné označení vzorků

✓ Každý vzorek by měl být označen natolik dobře, aby byl následně snadno identifikovatelný.

✗ Vzorek je označen později, případně neúplně.

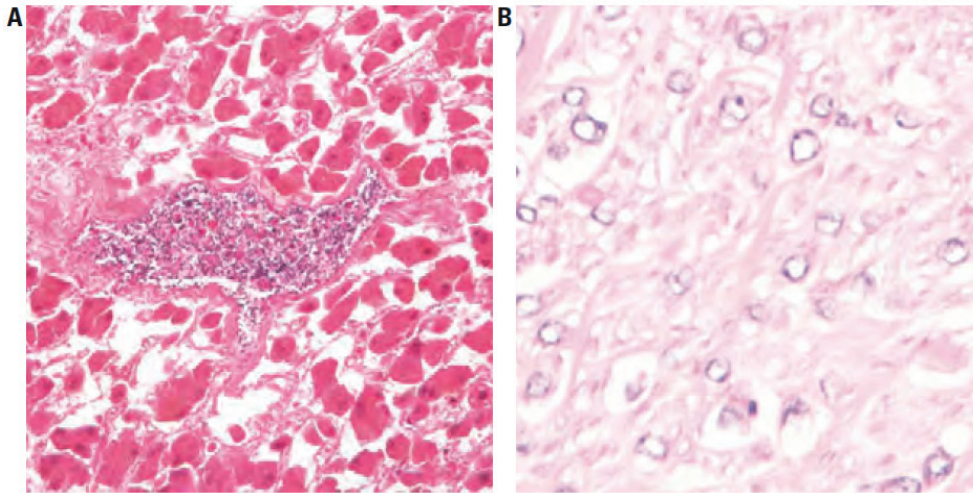


Obr: Vzorek s neúplně vyplněným štítkem, jako na tomto obrázku, by neměl být laboratoří standardně přijat. Musí být zaveden postup, který přesně určuje jak nakládat se vzorky, které do laboratoře přicházejí s nedostatečným označením nebo chybně vyplněnou průvodkou.

- Odběr a transport vzorku

- Krok 6: Zajistit rychlou fixaci

- ✓ Jakmile tkáň přestane být zásobována krví, dochází k její degeneraci. Abychom tomu zabránili, fixace vzorku musí být provedena bezodkladně. Pokud je třeba, aby vzorek zůstal na krátkou dobu nefixován, měl by být uchováván při 4 °C.
- ✗ Fixace je zpožděna.



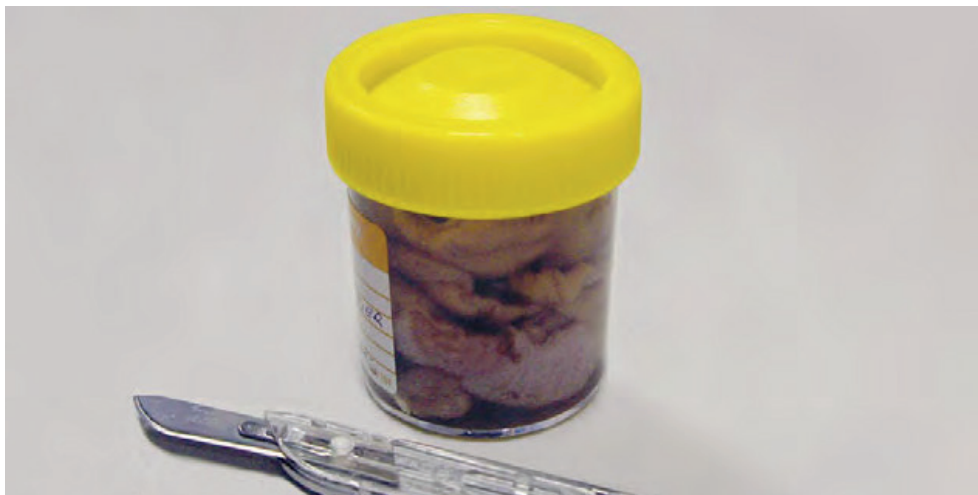
Obr: A) Vzorek jaterní autopsie (H&E) ukazuje výsledek opožděné fixace. Všimněte si špatně definovaných jader a neostrých cytoplazmatických detailů. V centrální části cévy je přítomno mnoho bakterií.

B) V tomto řezu fibro-svalové tkáně je jaderný chromatin velmi špatně konzervovaný, k čemuž došlo v důsledku dlouhého zpoždění fixace.

• Odběr a transport vzorku

• Krok 7: Použít vhodnou fixační nádobu

- ✓ Poměr objemu fixační tekutiny (fixativa) vůči vzorku by měl být nejméně 20 : 1, čemuž je třeba přizpůsobit i velikost fixační nádoby. Tím lze zabránit pokroucení čerstvého vzorku a je zajištěna i dobrá fixace.
- ✗ Vzorky jsou vměstnány do malé nádoby s nedostatkem fixativa.

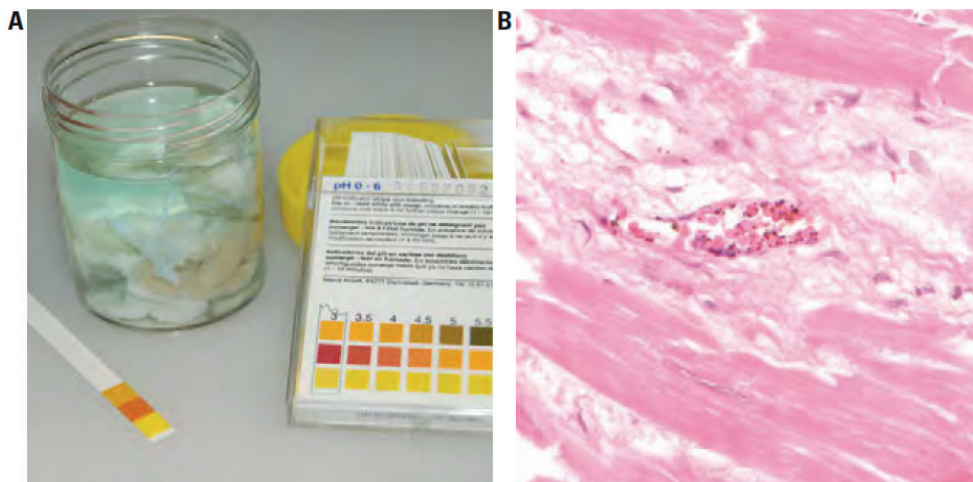


Obr: Tato nádobka je příliš malá pro takové množství materiálu. Malé množství fixační tekutiny a natlačení vzorku do kontejneru způsobí nedostatečnou fixaci.

- Odběr a transport vzorku

- Krok 8: Kontrolovat pH fixativa

- ✓ Fixativum je vysoce kvalitní a má optimální pH.
- ✗ Fixativum má špatnou kvalitu a neznámé pH. Je-li např. formol použit při kyselém pH, reakcí s hemoglobinem rychle vytváří „formalínový pigment“. Tento pigment je vytvářen i v neutrálních roztocích, ale mnohem pomaleji. U dobrých histologických preparátů by měl být formalínový pigment odstraněn ještě před barvením.



Obr. A) Zde použitý fixační prostředek má neuspokojivé pH 4,5. Pufrovaný formol měl mít pH 6,8-7,0.

B) Hnědočerný zrnitý deposit v cévě ve středu zorného pole je formalinový pigment. Snadno se tvoří často v souvislosti s erytrocyty, pokud je tkáň fixována v kyselém formolu.

• Odběr a transport vzorku

• Krok 9: Zrychlit fixaci velkých vzorků

- ✓ Rychlost penetrace fixativa závisí na rozměrech vzorku. Velké vzorky by měly být rychle přemístěny do laboratoře, aby mohly být dle potřeb přikrojeny a jednotlivé řezy správně fixovány.
- ✗ Velké vzorky jsou před přikrojením ponechány delší dobu ve fixativu. Střední část vzorku kvůli tomu může zůstat nefixovaná a tkáň znekrotizuje.



Obr: Tento velký vzorek (prasečí srdce) byl nakrájen, aby byl umožněn fixačnímu roztoku přístup ke všem částem tkáně. Lamely jsou přibližně 4-5 mm silné.

- **Odběr a transport vzorku**

- **Krok 10: Zamezit zbytečným zpožděním**

✓ Rychlý transport vzorku do laboratoře.

✗ Transport vzorků má nízkou prioritu a není dobře organizován.



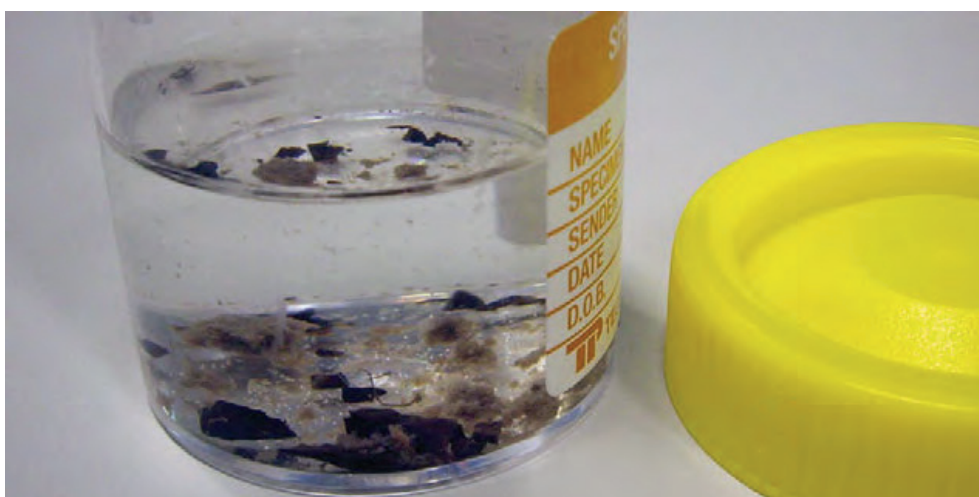
Obr: Priority jsou při dodávání vzorků do laboratoře důležité. Zejména, pokud se jedná o zmrazené vzorky.

- Odběr a transport vzorku

- Krok 11: Šetrně zacházet se vzorky

✓ Šetrné zacházení se vzorky – křehké vzorky zůstávají nedotčeny.

✗ Hrubé zacházení se vzorky – drobné jemné vzorky mohou být poškozeny.



Obr: Některé fragmenty tkáně na dně této nádoby způsobilo hrubé zacházení během přepravy vzorku. Původně se jednalo o soudržné fragmenty tkáně.

• 2) Přikrajování

Krok 12: Kontrolovat stav fixace

Krok 13: Přikrajovat vzorky na tenké řezy

Krok 14: Zamezit poškození vzorku

Krok 15: Zamezit křížové kontaminaci

Krok 16: Použití molitanových podložek v kazetkách

Krok 17: Zvolit vhodné kazety

Krok 18: Zamezit přeplnění kazet

Krok 19: Zřetelně označovat kazety

• Přikrajování

• Krok 12: Kontrolovat stav fixace

✓ Vzorky jsou zpracovávány okamžitě, zejména velké kusy tkáně, které by jinak mohly být nedostatečně fixovány.

✗ Na problémové vzorky se při fixaci nebere ohled.



Obr: Vzorky ve velkých nádobách by měly být zkontrolovány co nejdříve, aby bylo možno zajistit, že budou adekvátně zpracovány.

• Příkrajování

• Krok 13: Příkrajovat vzorky na tenké řezy

- ✓ Vždy se dbá na přípravu stejně tenkých lamel z velkých vzorků (max. tloušťka 3–4 mm). Důležité to je zejména u hustých tkání.
- ✗ Řezy jsou někdy silné i 6 mm a více a často nerovné.

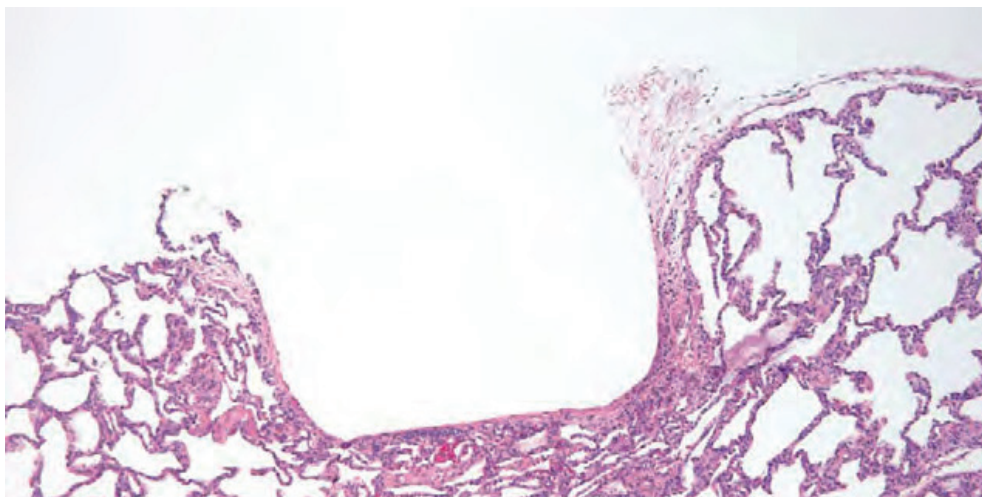


Obr: Na obrázku jsou zobrazeny rovnoměrné, tenké (2-3 mm) plátky nádoru připravené pro další zpracování. Takové by se měly zpracovávat efektivně a měly by se dobře krájet.

• Přikrajování

• Krok 14: Zamezit poškození vzorku

- ✓ Je třeba zamezit poškození jemných vzorků, zejména těch, které jsou neúplně fixovány. Se vzorky je třeba zacházet šetrně, nepotrhávat je a k řezání vždy používat ostré čepele.
- ✗ Hrubé zacházení se vzorky bez ohledu na stav jejich fixace. Použití tupé čepele.



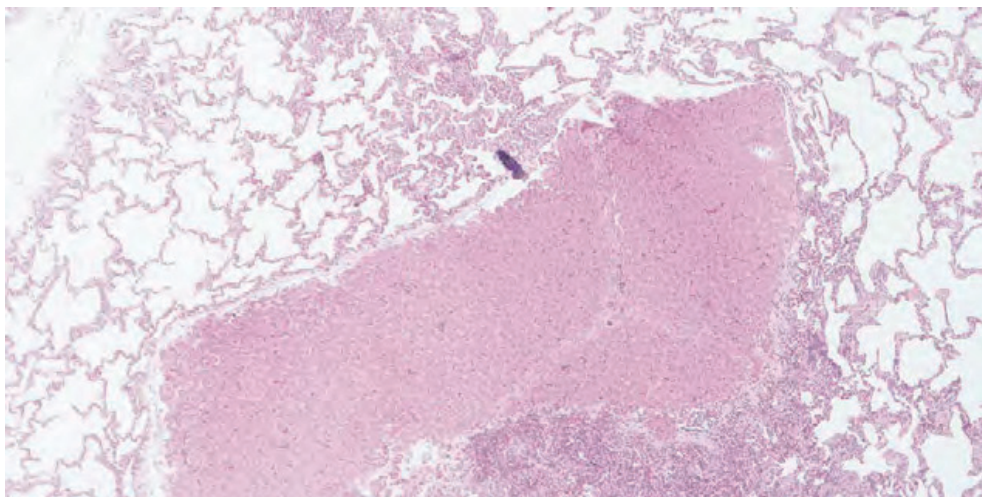
Obr. Řez plic obarvený H&E vykazuje zřejmé lokální poškození, způsobné silným stiknutím pinzety při manipulaci se vzorkem. Čerstvé nebo částečně fixované tkáně jsou nejnáchylnější. K poškození může ale dojít i u fragilních fixovaných vzorků.

• Přikrajování

• Krok 15: Zamezit křížové kontaminaci

✓ Vzorek zpracovávat na čistém povrchu, aby se zabránilo jeho kontaminace jiným vzorkem.

✗ Někdy se povrch řezné desky mezi vzorky téhož typu řádně nečistí. To je však chyba, kvůli které může být např. maligní vzorek kontaminován benigním vzorkem.

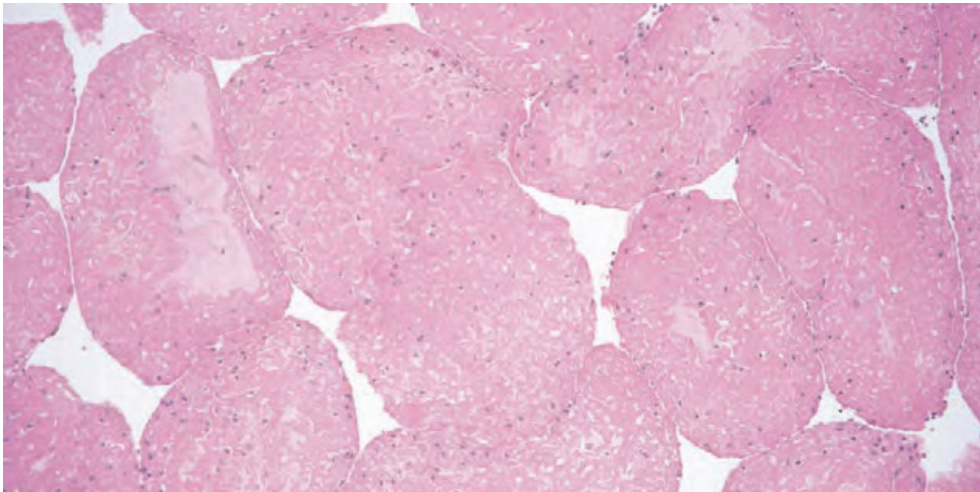


Obr. Řez plic obarvený H&E obsahující cizí tkáň (játra).

• Přikrajování

• Krok 16: Použití molitanových podložek v kazetkách

- ✓ Aby nedošlo ke stlačení tkáně a jejímu nechtěnému poškození, zejména jedná-li se o čerstvé nebo neúplně fixované vzorky, neumísťujte tkáň mezi molitanové podložky. Týká se to zejména vzorků získaných jehlovou (punkční) biopsií.
- ✗ Drobné, čerstvé nebo neúplně fixované vzorky jsou někdy umístěny mezi molitanové podložky, vloženy do kazetky a poté fixovány. To ale může zapříčinit vznik různých artefaktů.

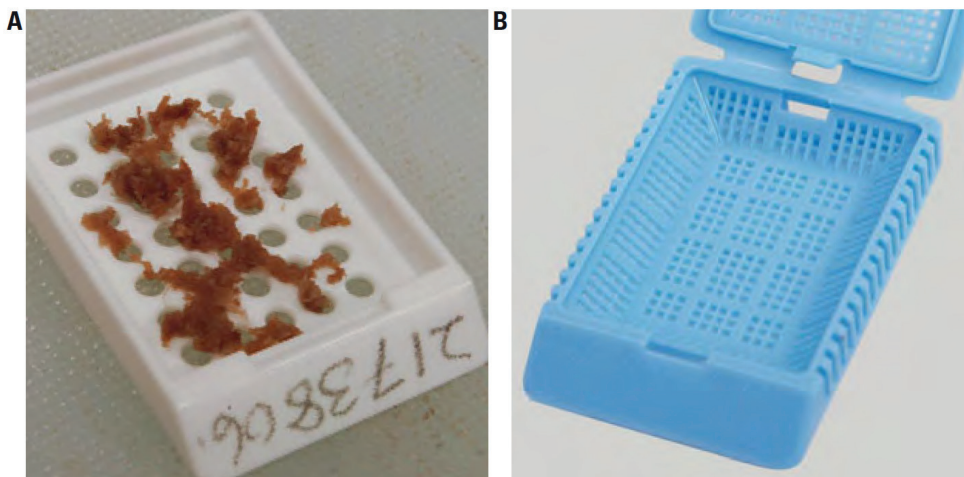


Obr: Trojúhelníkové prostory viditelné v této části řezu jsou způsobeny použitím molitanové podložky v kazetě na čerstvý nebo málo fixovaný vzorek.

- **Přikrajování**

- **Krok 17: Zvolit vhodné kazety**

- ✓ Je třeba zvolit kazety vhodné pro zpracováváný typ vzorku. Tkáňové fragmenty se totiž během zpracování vzorku zmenšují, a pokud by otvory v kazetě byly příliš velké, fragmenty vzorku by mohly během zpracování uniknout do použitých roztoků, v horším případě se přilepit k jinému vzorku.
- ✗ Při umisťování vzorků do kazet je používán pouze jeden typ kazet.



Obr: A) Některé z menších fragmentů tkáně mohou unikat skrz otvory v kazetě. Během zpracování se tkáň scvrkává a může otvory vyplavat snadněji.

B) Pro malé fragmenty tkání jsou k dispozici kazety s jemnými perforacemi.

• Přikrajování

• Krok 18: Zamezit přeplnění kazet

✓ Kazety nejsou přeplněné tkáněmi, aby bylo umožněno reagencím snadno pronikat do vzorku. Pokud je vzorek velký, použije se další kazeta.

✗ Kazety jsou často přeplněny tkání, což omezuje přístup činidel.

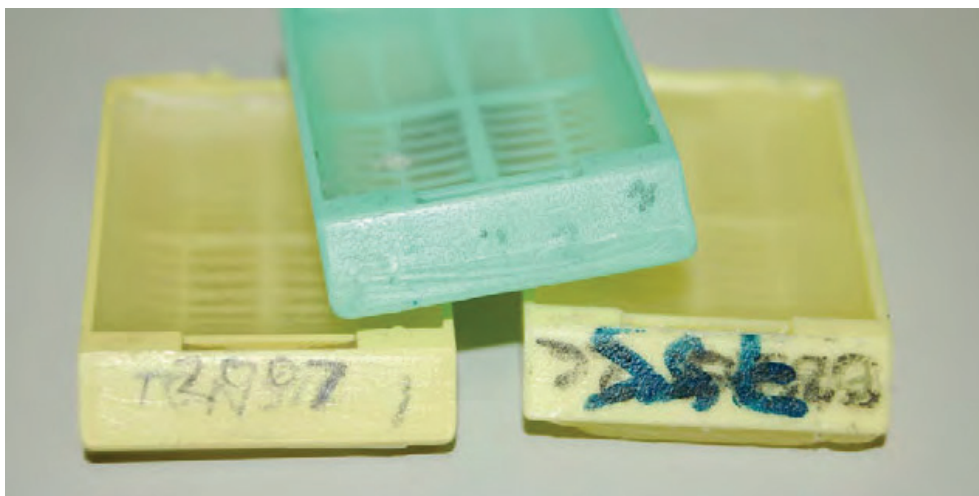


Obr: Tyto kazety jsou přeplněné. Pokud budou takto zpracované, vzorky budou zdeformované a je pravděpodobné, že jejich prosycení nebude úplné.

- **Přikrajování**

- **Krok 19: Zřetelně označovat kazety**

- ✓ Kazety jsou vždy jasně označeny. Přesná identifikace vzorků má zásadní význam.
- ✗ Někdy je obtížné přečíst označení na kazetách a je třeba si i domýšlet.



Obr: Nečitelné štítky s kazetami jsou naprosto nepřijatelné.

baria

• 3) Zpracování ve tkáňovém automatu

Krok 20: Správný program

Krok 21: Následná fixace

Krok 22: Udržovat kvalitu roztoků a parafínu

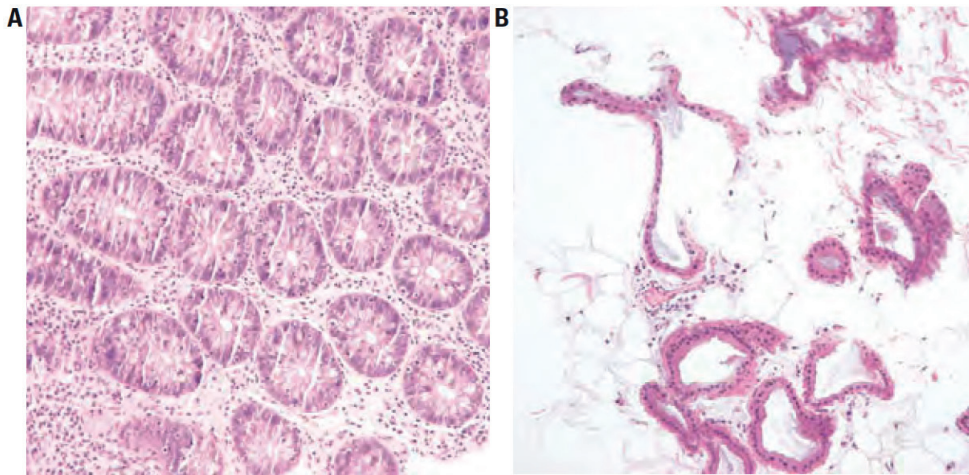
Krok 23: Používat vysoce kvalitní parafín

Krok 24: Vyhýbat se nebezpečným činidlům

- **Zpracování ve tkáňovém automatu**

- **Krok 20: Správný program**

- ✓ Je třeba mít program vhodný pro tkáň konkrétního typu i velikosti.
- ✗ Nevhodně zvolený program, např. velmi dlouhý program pro malý endoskopický vzorek nebo naopak velmi krátký program pro velký vzorek tukové tkáně prsu.



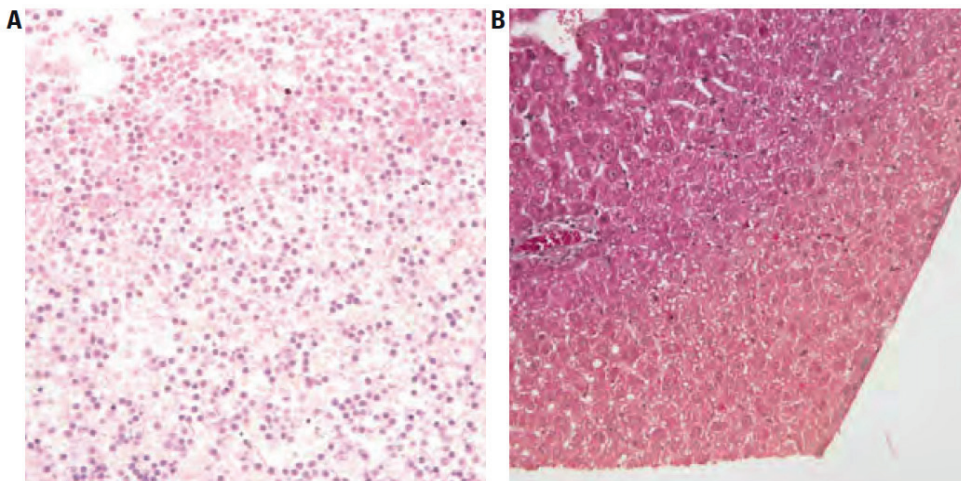
Obr. A) Endoskopická biopsie byla neúměrně dlouhou dobu v technikonu a stala se velmi křehkou. V důsledku toho je v celém řezu vidět mnoho jemných trhlin. Špatná technika krájení ještě tento problém zhorší (H&E).

B) Tato fotografie malého místa podkožní tkáně z velkého tukového vzorku ukazuje účinky nedostatečného zpracování v technikonu. Vazivová i tuková tkáň jsou špatně prosycené a tudíž fragmentované, zatímco epiteliální tkáň žláz vykazuje nedostatečně ohraničená jádra a zvláštní barvení v důsledku zadržovaného rozpouštědla (H&E).

- **Zpracování ve tkáňovém automatu**

- **Krok 21: Následná fixace**

- ✓ Pro optimální zpracování a dobrou morfolonii by tkáň měla být dobře fixována (ihned po odběru a dostatečně dlouho). Pokud tomu tak není, fixace by měla být zopakována.
- ✗ U neúplně fixovaných vzorků lze pozorovat zónovou fixaci, kdy vnější části vzorku jsou fixovány formolem, zatímco hlubší oblasti zafixoval alkohol, který tkáň dofixuje v případě nedostatečné formolové fixace. Alkohol maskuje některé imunohistochemické reakce a ty nemusí dávat specifické výsledky.



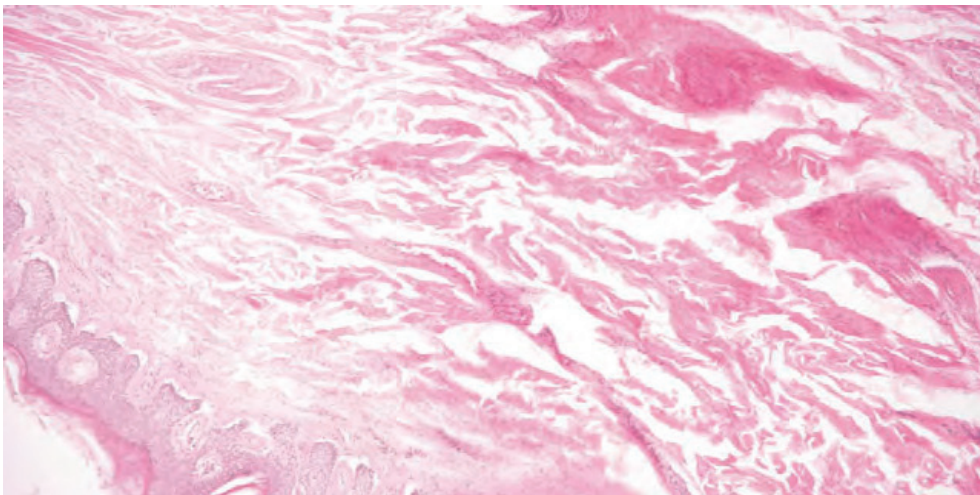
Obr. A) Účinky zónové fixace na řezu kostní dřeně (H&E). V horní levé části jsou erythrocyty neporušené, zatímco v dolní části jsou hemolyzované.

B) Malé zvětšení vzorku jater barvených trichromem. Zbarvení vnější části vzorku se liší od vnitřní části.

- **Zpracování ve tkáňovém automatu**

- **Krok 22: Udržovat kvalitu roztoků a parafínu**

- ✓ Při výběru činidel se řídit zavedenými směrnici, případně k tomu využívat systém řízení roztoků v tkáňových automatech, jako je třeba Peloris™ od Leica Microsystems.
- ✗ Směrnice či systémy řízení činidel v tkáňových automatech, jsou ignorovány. To může vést k tomu, že jsou používána neúčinná, kontaminovaná nebo ředěná činidla, výsledkem čehož může být špatná kvalita zpracování.

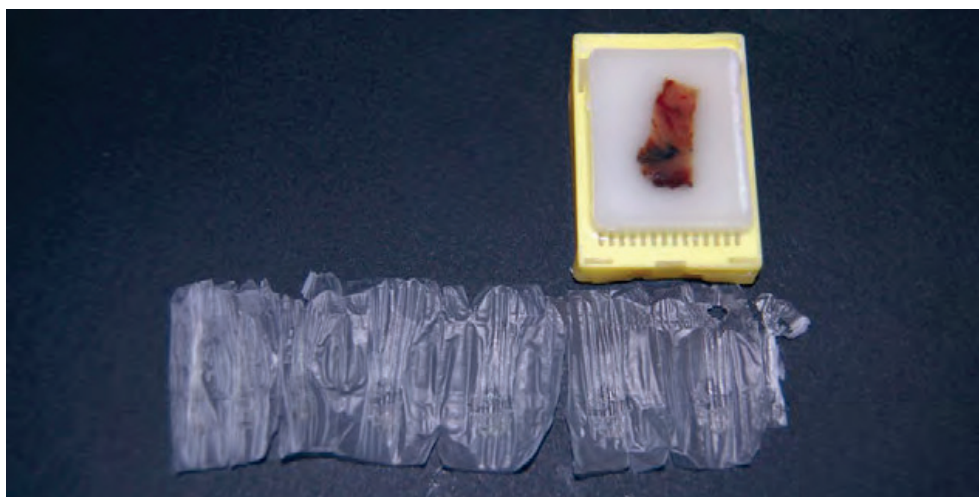


Obr: V řezu velkého vzorku kůže – špatné zachování denzního kolagenu je způsobeno nedostatečným prosycením. V tomto případě šlo pravděpodobně o použití kontaminovaných roztoků.

• Zpracování ve tkáňovém automatu

• Krok 23: Používat vysoce kvalitní parafín

- ✓ K infiltraci a zalévání je používán vysoce kvalitní parafín, což vede ke snadnému krájení bloků.
- ✗ K prosycení a zalévání je používán levný a méně kvalitní parafín z málo známých zdrojů, což vede k problémům při krájení bloků.

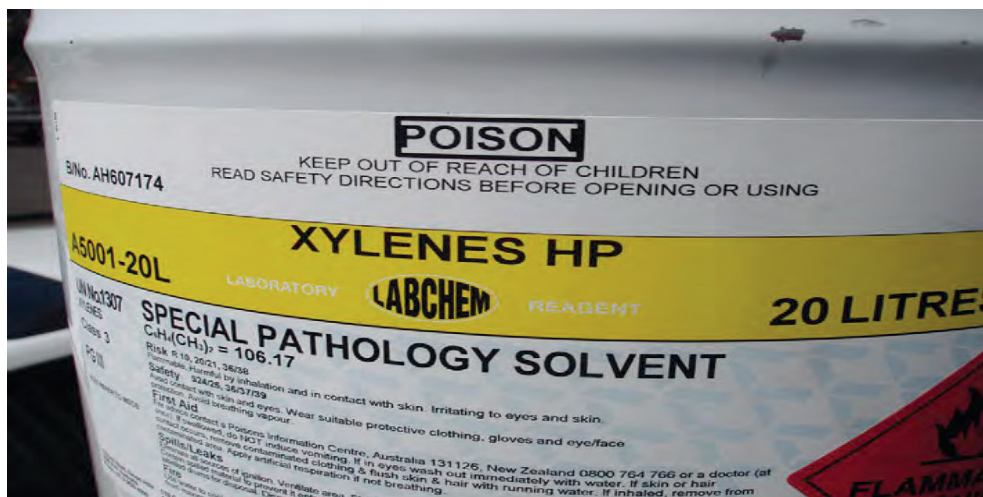


Obr: Z tohoto vychlazeného bloku byla pomalu nakrájena série řezů. Řezy vykazují značné stlačení, které není při krájení vychlazených bloků obvyklé. Zde stlačení vzniklo z důvodu použití nekvalitního parafínu, který neprosytil dostatečně tkáň.

- Zpracování ve tkáňovém automatu

- Krok 24: Vyhýbat se nebezpečným činidlům

- ✓ Pokud je to možné, vyhýbat se zdraví škodlivým činidlům na bázi xylenu.
- ✗ Škodlivost čidel na bázi xylenu není vůbec brána v potaz.



Obr: Bezxylenové zpracování může zlepšit chemickou bezpečnost provozu laboratoře, aniž by došlo k narušení kvality zpracování vzorků.

• 4) Zalévání tkání

Krok 25: Správná orientace vzorků

Krok 26: Zvolit vhodnou zalévací formu

Krok 27: Šetrně zacházet se vzorky

Krok 28: Zamezit nadměrnému ohřevu

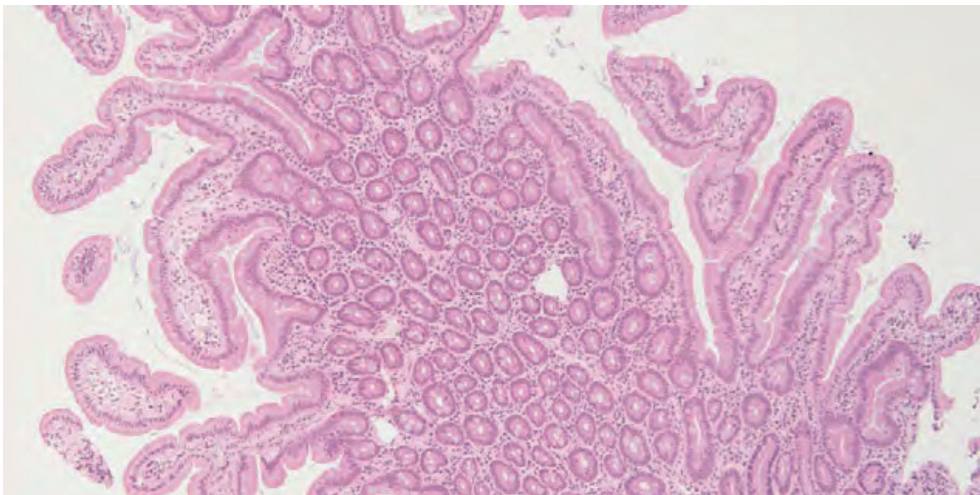
Krok 29: Pravidelně kontrolovat teploty

Krok 30: Nepřeplňovat formičky

- **Zalévání tkání**

- **Krok 25: Správná orientace vzorků**

- ✓ Vzorky jsou správně orientovány. Kompetentním přikrajováním lze získat vzorky s rovnými povrchy. Laboranti provádějící zalévání mají přístup k popisu každého vzorku a jsou řádně proškoleni.
- ✗ Orientace vzorku při zalití není správná, což může konečně vést i ke ztrátě tkáně, neboť je zapotřebí její opětovné zalévání. Některé špatně připravené vzorky pak vyžadují rozsáhlé skrajování na mikrotomu, než se podaří získat použitelný řez.

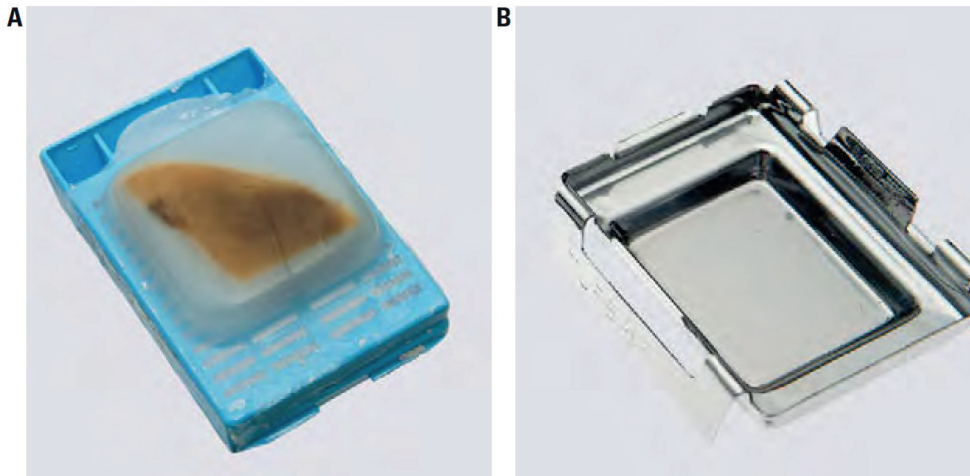


Obr: Tato endoskopická biopsie byla nesprávně orientována a ukazuje pouze povrch sliznice.

• Zalévání tkání

• Krok 26: Zvolit vhodnou zalévací formu

- ✓ Pro každý vzorek je pro zalévání zvolena forma vhodné velikosti.
- ✗ Pro vzorky je užívána jedna forma univerzální velikosti. Někdy se tak může stát, že se tkáň dotýká okrajů formičky.



Obr. A) Zalévací forma použitá pro tento vzorek byla příliš malá. Vzorek je v kontaktu s okrají bloku a může se obtížněji krájet.

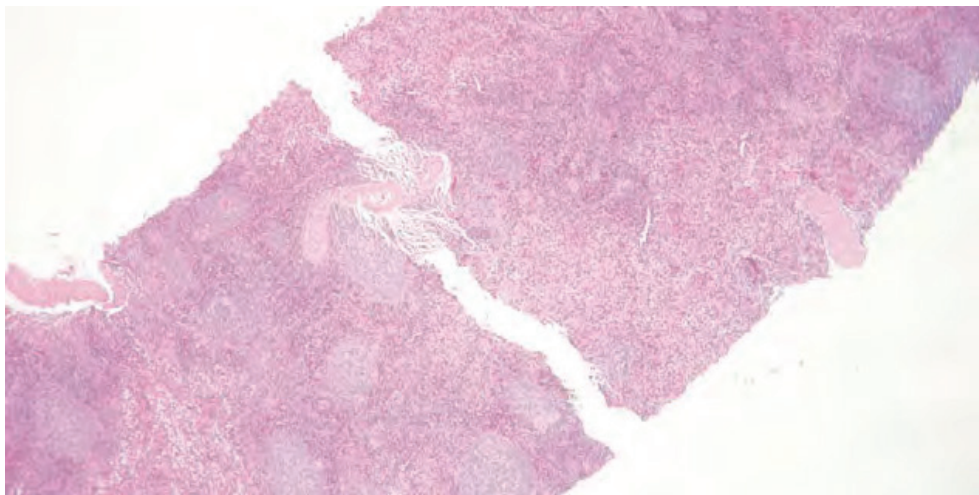
B) Zalévací formy různých velikostí pro různé velikosti vzorků.

- **Zalévání tkání**

- **Krok 27: Šetrně zacházet se vzorky**

✓ Šetrné zacházení se vzorky během zalévání.

✗ Hrubé zacházení se vzorky během zalévání. U některých tkání vlivem toho může dojít k jejich zlomení.

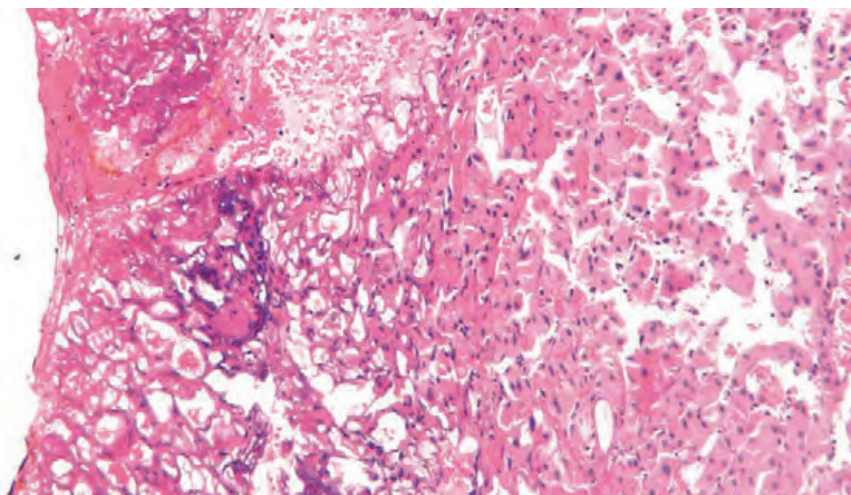


Obr: H&E preparát sleziny, která byla během zalévání zlomena při pokusu o přitisknutí ke dnu zalévací formy.

• Zalévání tkání

• Krok 28: Zamezit nadměrnému ohřevu

- ✓ Před manipulací se vzorky je pinzeta zahřívána na teplotu totožnou s bodem tání parafínu.
- ✗ Pinzeta je zahřívána na teplotu vyšší, než je bod tání parafínu, čímž může dojít k lokálnímu poškození vzorku teplem.

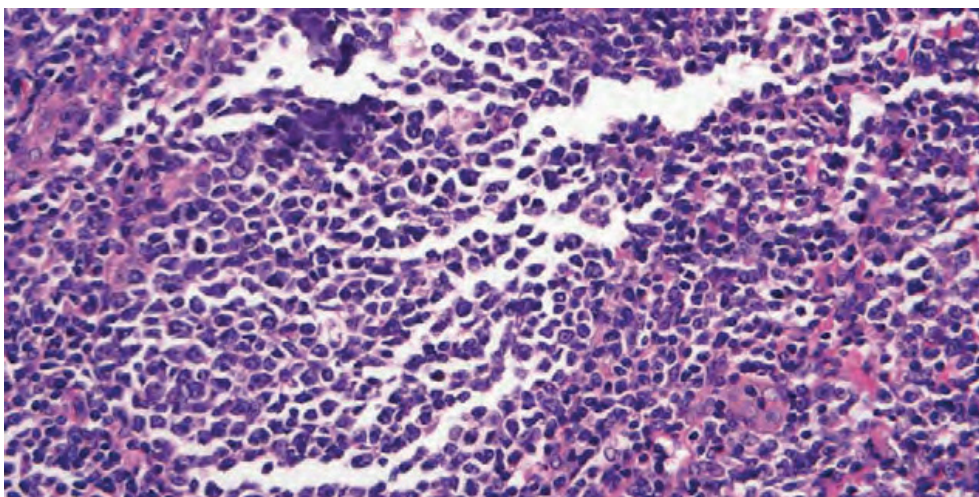


Obr: Fotografie zobrazuje povrch části jater (H&E). Rozsáhlé lokální poškození, které činí tkáň téměř nerozpoznatelnou, bylo způsobeno aplikací tepla na tkáň při zalévání.

• Zalévání tkání

• Krok 29: Pravidelně kontrolovat teploty

- ✓ Teplota desky zalévací linky i teplota zásobníku parafínu je pravidelně kontrolována.
- ✗ Pokud teplota desky zalévací linky není pravidelně nebo vůbec kontrolována, může dojít k poškození vzorku vlivem nadměrného zahřátí.



Obr: Tato lymfatická uzlina byla poškozena přehřátím kazetky ve vyhřívaném modulu zalévací linky. Všimněte si scvrknutých, pyknotických jader a rozsáhlých trhlin. Podobné praskliny mohou být také způsobeny napínáním řezů v příliš teplé vodní lázni nebo sušením řezů plovoucích na skle na velké kapce na horké plotýnce.

- **Zalévání tkání**

- **Krok 30: Nepřeplňovat formičky**

- ✓ Formičky jsou plněny parafínem na optimální úroveň a nepřetékají.
- ✗ Formičky jsou přeplněny, před krájením je proto nutné kazety oškrábat vzadu i po hranách. V opačném případě by bločky v mikrotomové upínací čelisti seděly nerovnoměrně a způsobovaly nestabilitu, což by mohlo vést až k poškození tkáně.



Obr: Bloky, které se přelily při přeplnění zalévacích forem parafínem.

• 5) Krájení

Krok 31: Používat kvalitní žiletky a nože

Krok 32: Optimalizovat úhel náklonu nože

Krok 33: Pečlivě skrájet bločky

Krok 34: Zamezit poškození mrazem

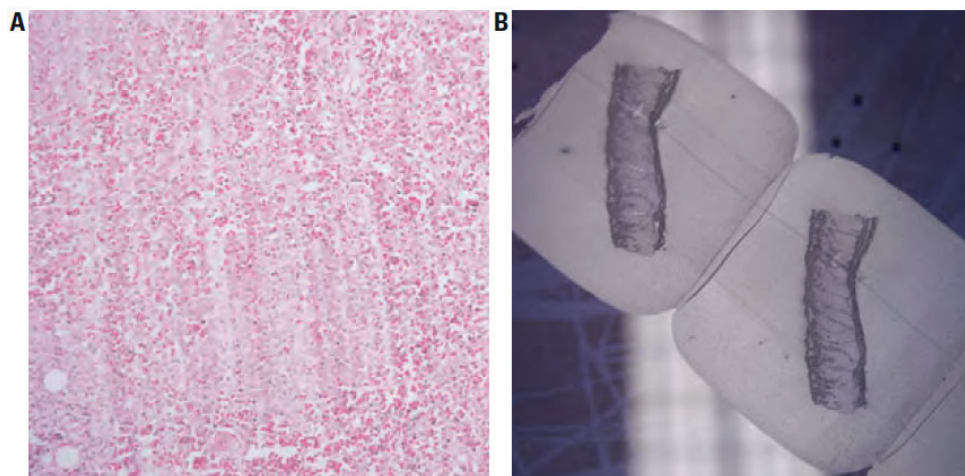
Krok 35: Používat studené bločky

Krok 36: Krájet pomalu

• Krájení

• Krok 31: Používat kvalitní žiletky a nože

- ✓ Pro krájení je nutné vždy používat vysoce kvalitní a ostré žiletky.
- ✗ Pokud je v řezech přítomno velké množství jemných rýh, je to známka toho, že jsou čepelky již tupé a že je třeba je vyměnit.



Obr: A) Řez sleziny (H&E), na kterém je patrné mnoho jemných rýh, které vznikly použitím vadné žiletky.

B) Řezy biopsie kůže plovoucí na vodní lázni. Již zde je viditelné poškození vadnou žiletkou.

• Krájení

• Krok 32: Optimalizovat úhel náklonu nože

- ✓ Úhel sklonu nože musí být vždy správně nastaven pro každý typ mikrotomu i žiletky.
- ✗ Úhel sklonu nože není při změnách podmínek (jiný mikrotom, nový typ čepele, jiné zalévací médium atd.) nikdy upravován.

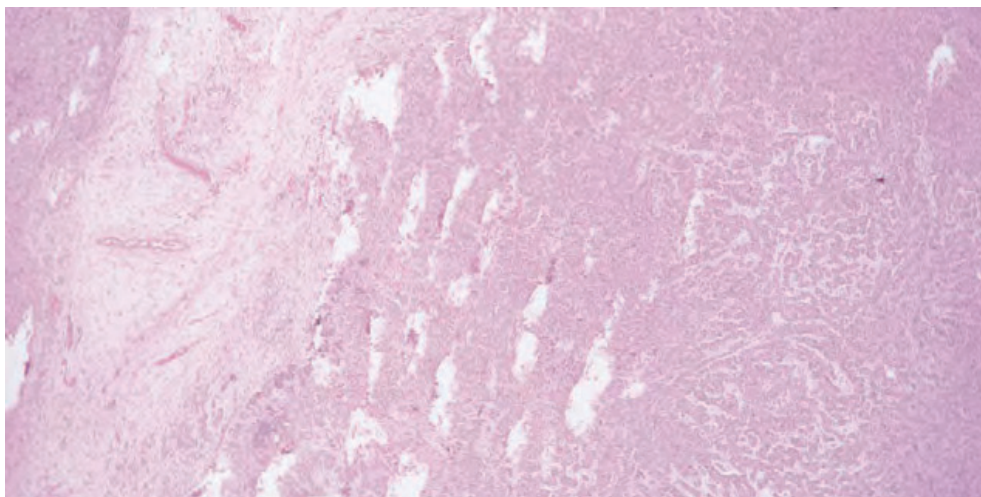


Obr: Tato série řezů byla nakrájena z vychlazeného bloku, a přesto řezy vykazují značnou kompresi (30-40%). V tomto případě stačí změnit úhel náklonu žiletky.

- **Krájení**

- **Krok 33: Pečlivě skrájat bločky**

- ✓ Bločky jsou pečlivě skrajovány tak, aby došlo k odhalení tkáně. Dalším skrojením je vyrovnán povrch vzorku a tkáň je prokrojena do požadované hloubky.
- ✗ Bločky jsou kvůli úspoře času skrájeny jen nahrubo, nejsou prokrájené a jejich povrch je nerovný.



Obr: Počáteční nešetrné skrajování vylámalo fragmenty tkáně viditelné v přehledném barvení (H&E).

- Krájení

- Krok 34: Zamezit poškození mrazem

- ✓ Bločky jsou chlazené na studeném mokrému povrchu a při krájení jsou vychlazené.
- ✗ Bločky jsou před krájením zmrazeny, což někdy zapříčiní jejich prasknutí.



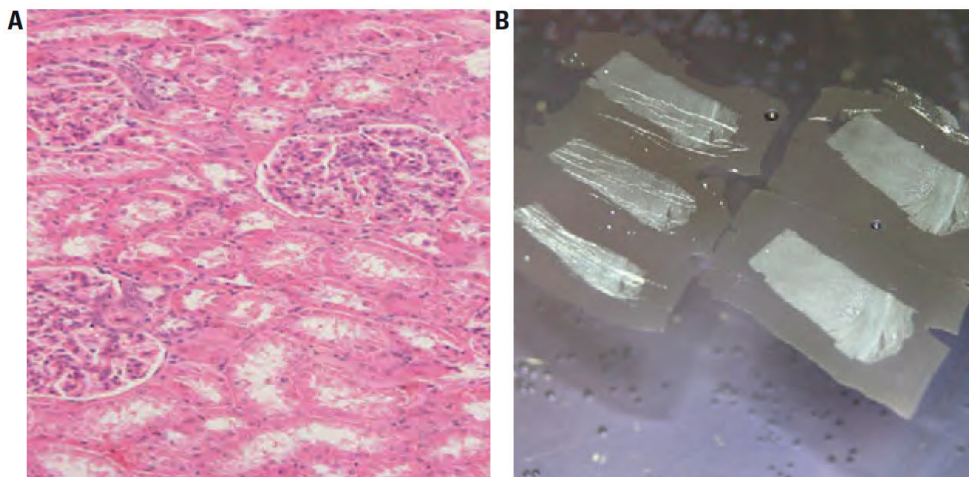
Obr: Blok před krájením přemražený v -15°C . Je vidět popraskaný parafín kolem tkáně. Trhliny mohou způsobit obtížnější krájení a napínání, protože parafín nepřiléhá ke tkáni.

• Krájení

• Krok 35: Používat studené bločky

✓ Bločky jsou při krájení vždy vychlazené.

✗ Občas se může stát, že se blok delším stáním mimo chladicí podložku opět ohřeje, což může vést k nadměrnému shrnutí řezů.



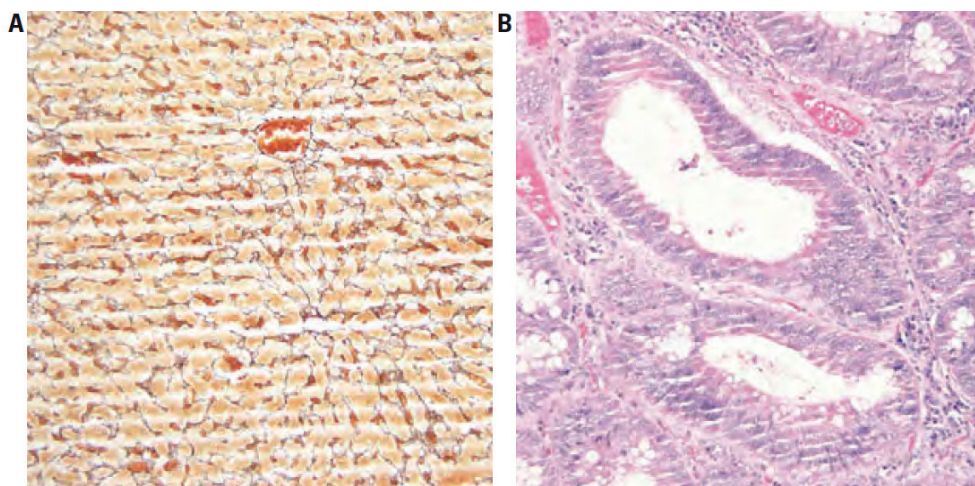
Obr.: A) Deformace glomerulů v této části ledvin je způsobena nadměrnou kompresí řezu při krájení (H&E).

B) Řezy z tohoto bloku napnuté na vodní lázni. Řezy vlevo byly krájeny z nevychlazeného bloku. Řezy vpravo jsou krájeny z chlazeného bloku.

• Krájení

• Krok 36: Krájet pomalu

- ✓ Krájení probíhá pomalu, šetrně a rovnoměrně.
- ✗ Krájení je rychlé, probíhá ve spěchu a s vědomím, že případné shrnutí řezu lze napravit v napínací lázni.



Obr: A) Krysí játra (barvení na retikulín) jsou křehká tkáň, vykazují jemné rýhy, které vznikly příliš rychlým krájením studeného bloku. Podobným problémům je možné předejít tím, že blok nebude příliš studený a zároveň bude pomaleji krájen. Někdy jsou tyto drobné rýhy způsobeny špatně utaženou žiletkou v držáku.

B) Přehledné barvení H&E ukazuje, co udělá rychlé krájení. Obarvená žlazová tkáň ukazuje jemné rýhování, které vzniklo rychlým krájením přechlazeného bloku.

• 6) Napínání řezů

Krok 37: Používat čistou vodu

Krok 38: Zajistit čistotu podložních skel

Krok 39: Zamezit křížové kontaminaci vzorků

Krok 40: Zamezit kontaminaci kožními buňkami

Krok 41: Nepracovat s více bločky současně

Krok 42: Kontrolovat teplotu vody v lázni

Krok 43: Zamezit shrnutí řezů

Krok 44: Vyvarovat se nadměrné expanse řezů

Krok 45: Při napínání řezy nepoškodit

Krok 46: Řezy pečlivě vybírat

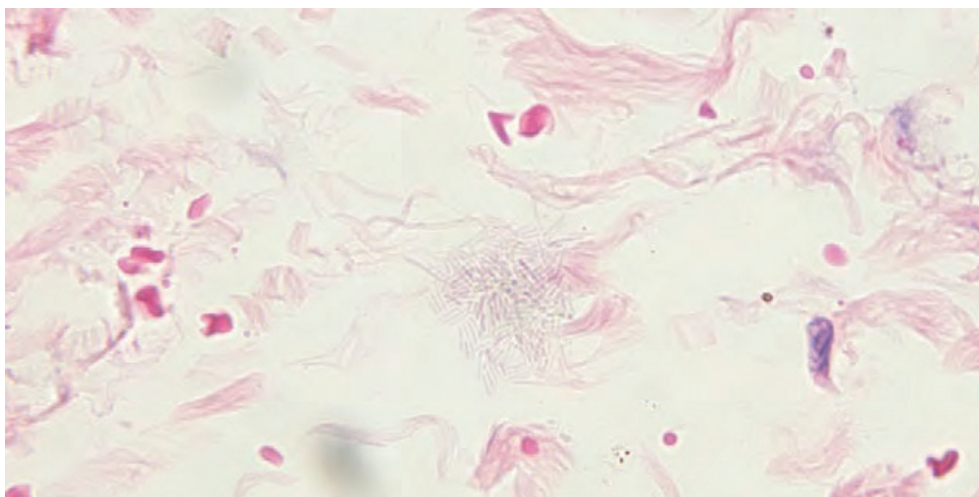
Krok 47: Zamezit vzniku bublin pod řezem

Krok 48: Zvýšit přilnavost řezů

• Napínání řezů

• Krok 37: Používat čistou vodu

- ✓ Voda ve vodní lázni pro napínání řezů je pravidelně vyměňována.
- ✗ Voda ve vodní lázni pro napínání řezů je pravidelně doplňována, ale vyměňována jen příležitostně. To může vést k její kontaminaci plísněmi apod., které pak mohou přilnout na řez nebo podložní sklo.

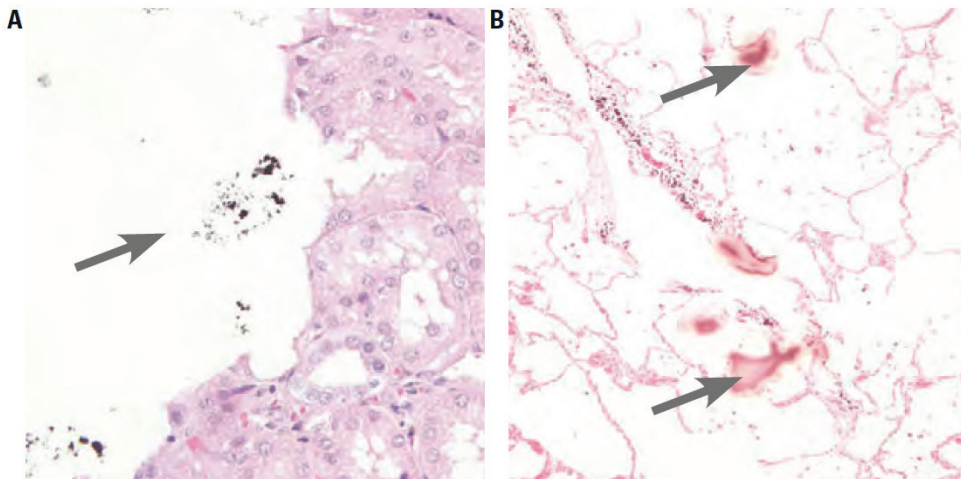


Obr: Řez serózy části GIT v přehledném barvení (H&E). Shluky slabě se barvicích mikroorganismů jsou přítomny uvnitř tkáně. Jsou ale také vidět mimo řez. Pravděpodobným zdrojem těchto kontaminujících organismů byla vodní lázeň pro napínání řezů.

• Napínání řezů

• Krok 38: Zajistit čistotu podložních skel

- ✓ Před použitím podložních skel je vždy třeba ověřit jejich čistotu. Manipulace s nimi by však měla být minimalizována, aby nedošlo k jejich kontaminaci kožními buňkami.
- ✗ Čistota podložních skel není vůbec ověřována, což se může projevit na výsledku práce.



Obr. A) Tento řez ledvin byl znehodnocen černým pigmentem, který ulpěl na skle před použitím. Pigment se objevil i pod řezem na dalších částech skla.

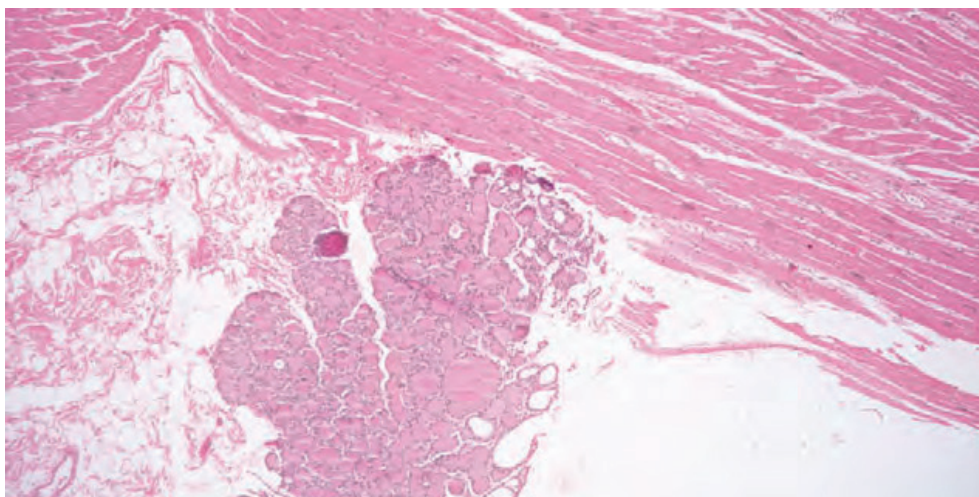
B) Řez tkáně plic obsahující louže obarveného tkáňového adheziva. Adhezivum (mohlo být na bázi želatiny) bylo buď součástí lázně na napínání řezů. Bílkoviny v adhezivu se po odpaření vody koncentrovaly. Pro odstranění tohoto problému je třeba před sušením odstranit co nejvíce vody pod řezem.

:

• Napínání řezů

• Krok 39: Zamezit křížové kontaminaci vzorků

- ✓ Mezi krájením různých bloků je voda dobře vyčištěna od zbytků řezů z předchozího bloku.
- ✗ Mezi krájením různých bloků není voda dobře vyčištěna od zbytků řezů z předchozího bloku a dochází ke křížové kontaminaci, která může vést ke zmatkům či dokonce i k nepřesné diagnóze.

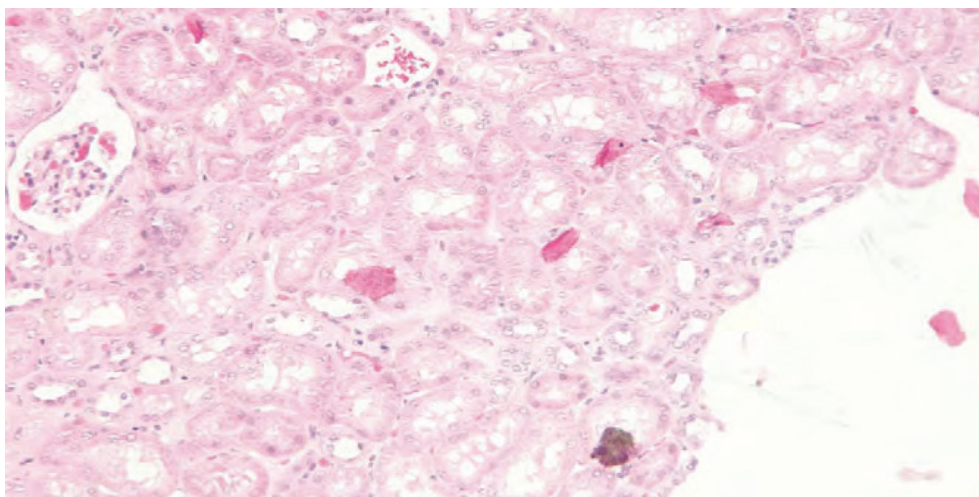


Obr: Řez srdečního svalu kontaminovaného fragmentem štítné žlázy z jiného vzorku. Příklad kontaminace vznikl ve vodní lázni.

• Napínání řezů

• Krok 40: Zamezit kontaminaci kožními buňkami

- ✓ Aby nedošlo ke kontaminaci vzorků kožními buňkami, při práci je třeba se vyvarovat česání vlasů a mnutí rukou.
- ✗ „Někteří laboranti kontaminují skla jejich kožními buňkami více než jiní. Zřejmě nevědí, jak se tomu dá zabránit.“



Obr: Řez ledviny, obsahující velké množství kožních buněk. Když přilnou k řezu během napínání, drží se na povrchu velmi pevně. Zde se barví eozinem.

• Napínání řezů

• Krok 41: Nepracovat s více bločky současně

- ✓ Při napínání nikdy nepracujeme s více bločky současně.
- ✗ Při práci s řezy z více bloků současně hrozí nepřesná identifikace vzorků, zejména pokud jsou vzorky stejné.



Obr: Obrázek ukazuje dva současně nakrájené bloky. Tato praxe může způsobit zmatek a vést k nepřesné identifikaci a chybnému natažení řezů.

- **Napínání řezů**

- **Krok 42: Kontrolovat teplotu vody v lázni**

- ✓ Teplota vody v napínací lázni by měla mít o 5-10°C méně, než je bod tání parafínu. Řezy se díky tomu snadno vyrovnají a parafín ještě nebude tát.
- ✗ Pokud napínání v lázni trvá déle než 15 sekund, hrozí roztavení vosku a s ním i poškození integrity tkáně.

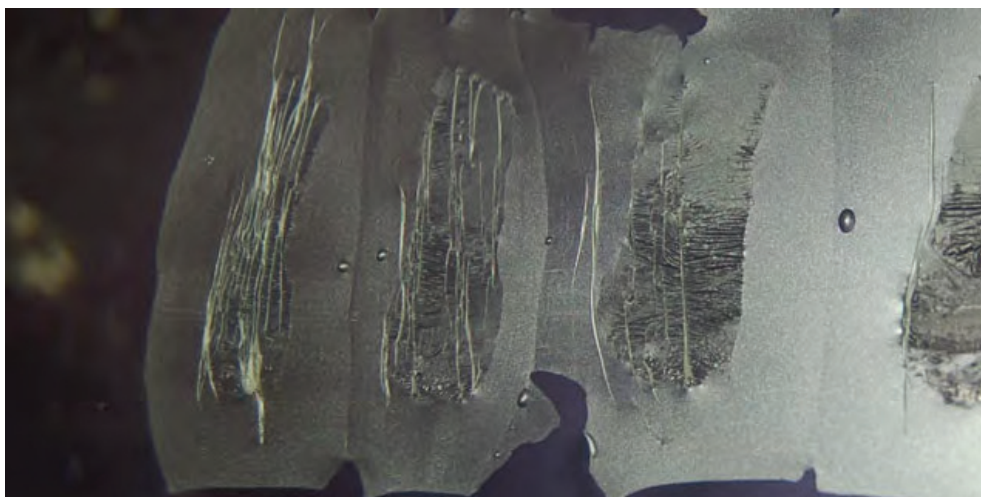


Obr: Tyto řezy kůže jsou potrhane v důsledku napínání na příliš teplé vodě. Nejnáchylnější k tomuto problému jsou špatně zpracované tkáně.

• Napínání řezů

• Krok 43: Zamezit shrnutí řezů

- ✓ Řezy se v napínací lázni snadno vyrovnají.
- ✗ Nedochází k napnutí správně ukrojených řezů a řezy jsou shrnuté. Mírné zvýšení teploty vody v lázni by tento problém mohlo vyřešit.

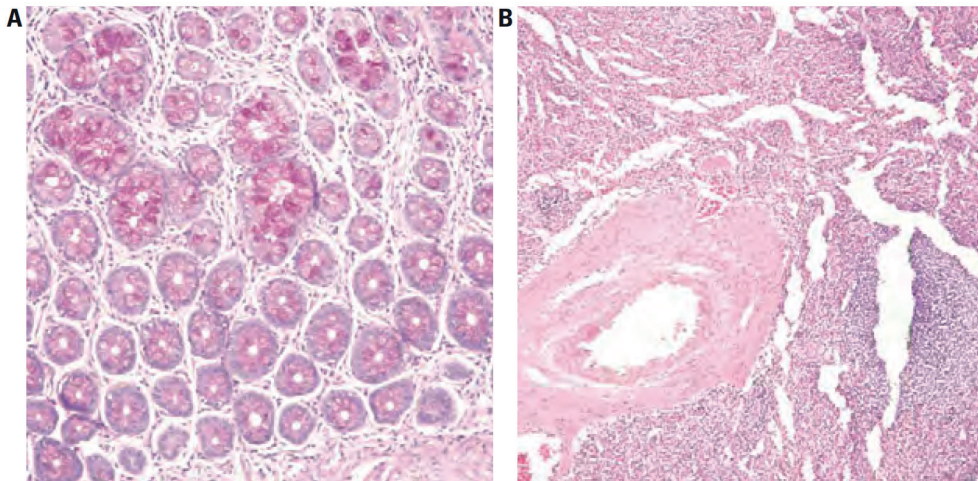


Obr: V tomto případě se shrnuté řezy nenapnuly. Pečlivější krájení a mírně teplejší voda by tento problém překonaly.

• Napínání řezů

• Krok 44: Vyvarovat se nadměrné expanze řezů

- ✓ Řezy jsou na vodní hladině v lázni ponechány jen do té doby, než dojde k jejich napnutí. Poté jsou ihned přeneseny na podložní sklo.
- ✗ Z pohodlnosti jsou řezy v lázni ponechány delší dobu, což může způsobit jejich roztrhání a může vést k poškození tkáně, zejména jemných vzorků, např. lymfatické tkáně.



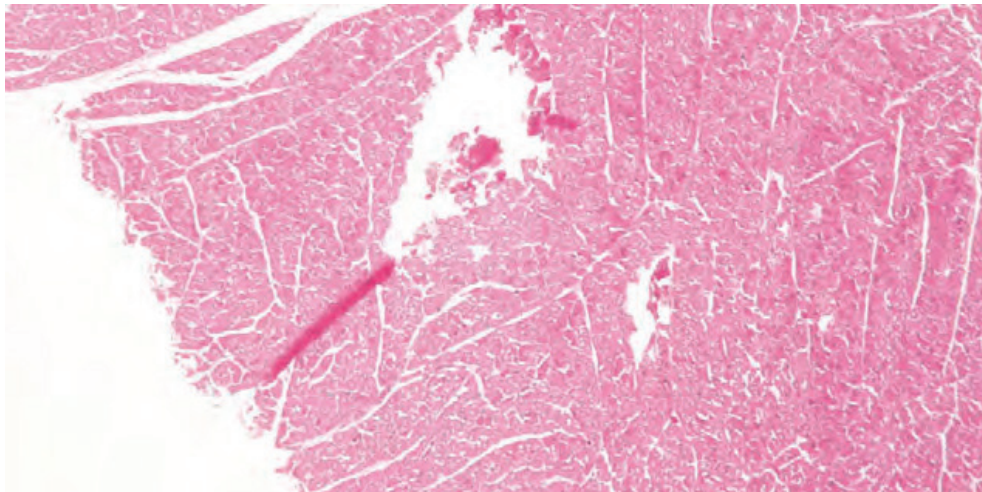
Obr. : A) Řez vzorku střevní sliznice v barvení PAS ukazuje lamina propria, která je nadměrně roztažená – žláčky jsou oddělené od vaziva. Tento příklad způsobila příliš horká napínací lázeň.

B) Část lymfatické tkáně, která praskla v důsledku nadměrného vypnutí ve vodní lázni. Lymfoidní a hematopoetické tkáně jsou obzvláště náchylné k poškození při procesu napínání.

• Napínání řezů

• Krok 45: Při napínání řezy nepoškodit

- ✓ Při napínání je dbána nejvyšší opatrnost, pokud je z řezu potřeba mechanicky odstranit shrnutí. Pomocť si lze štětečkem, pinzetou nebo háčkem.
- ✗ Při narovnávaní řezů na vodní hladině není brán zřetel na jemnost tkání a záhyby a shrnutí jsou odstraňovány nešetrně. Poškození může být makroskopické nebo jen mikroskopické.

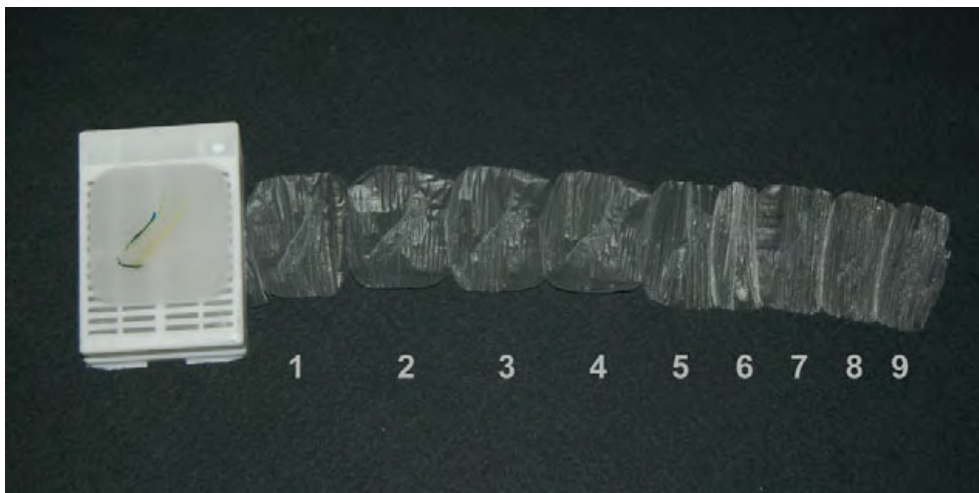


Obr. : Řez srdečního svalu ukazuje mechanické poškození způsobené při pokusu o odstranění záhybu v řezu (srdce, H&E).

- Napínání řezů

- Krok 46: Řezy pečlivě vybírat

- ✓ První nebo druhý řez nejsou použity, protože vychlazený blok se průchodem čepele zahřívá a dochází k tepelné expanzi parafínu. Teprve po několikerém projetí žiletky přes blok se teploty vyrovnají a lze ukrojit kvalitní řez.
- ✗ První nebo druhý řez jsou použity, protože vypadají nejlépe.

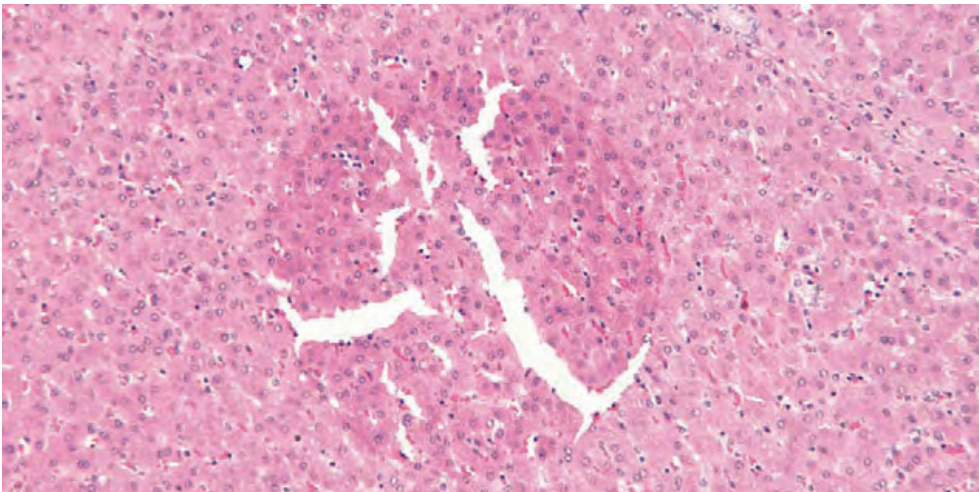


Obr.: Série řezů z bloku očíslovaná v pořadí od ukrojení. Všimněte si, že první dva řezy jsou nejširší. S delší dobou krájení a zahříváním bloku řezy se více krabatí. Přestože mikrotom byl nastaven na $3\mu\text{m}$, byla tloušťka prvních dvou řezů $4\text{-}5\mu\text{m}$ z důvodu tepelné expanze parafínu.

• Napínání řezů

• Krok 47: Zamezit vzniku bublin pod řezem

- ✓ Bublinky, vznikající ve vodní lázni zahříváním vody musí být odstraněny před položením řezu na hladinu vodní lázně.
- ✗ Bublinky jsou v lázni ignorovány a při položení řezu na hladinu se pod ním zachytí. Předpokládá se, že bubliny zmizí během sušení řezu na skle. Po vyschnutí řezu se v místech bublin řez roztrhá.



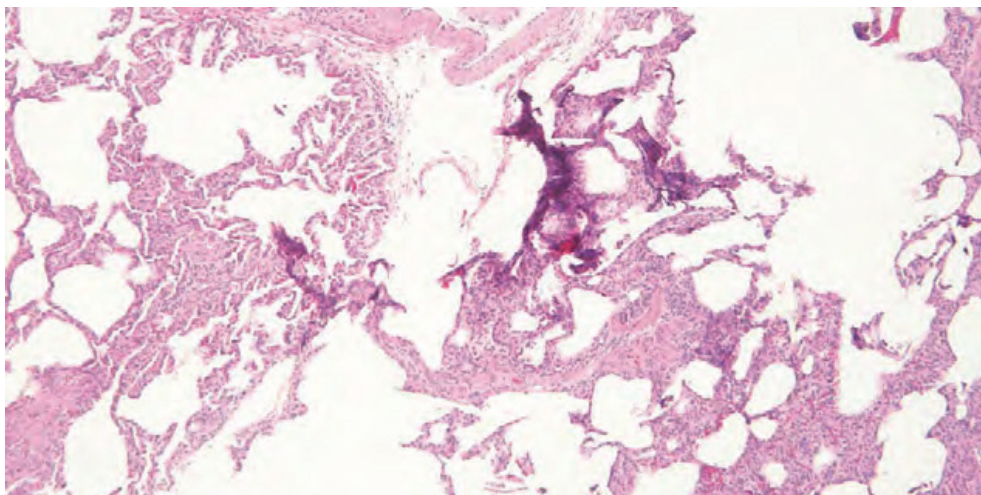
Obr.: Řez jater obarvený H&E, ukazující kruhovou, popraskanou oblast, kde se řez nadzvedl. Příčinou byla právě bublina z napínací lázně, která ulpěla zespona řezu a zabránila přilnutí řezu ke sklu.

- **Napínání řezů**

- **Krok 48: Zvýšit přilnavost řezů**

- ✓ Použitím kvalitních skel, např. nabitých nebo potahovaných skel.

- ✗ Někdy mají řezy tendenci uplavat ze skla, zejména při vaření u imunohistochemických metod nebo histologických metod, vyžadujících zahřívání skel. Potom je třeba použít potahovaná skla.



Obr. : Oblast tkáně plic, která se při barvení nadzvedla a přeložila se na vedlejší úsek tkáně (H&E).

- **7) Sušení řezů**

Krok 49: Před sušením nechat odkapat

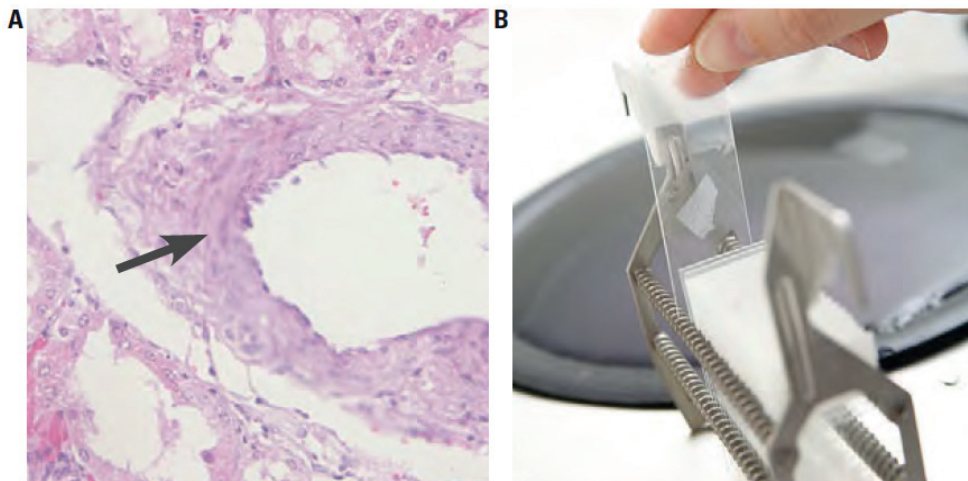
Krok 50: Monitorovat teplotu sušení

Krok 51: Sušit přiměřenou dobu

• Sušení řezů

• Krok 49: Před sušením nechat odkapat

- ✓ Skla s napnutými řezy jsou před sušením zbavena přebytečné vody.
- ✗ Ze skel se důkladně neslije nebo neodsaje voda a jsou sušena ve svislé pozici.



Obr. : A) Tento řez byl sušen ve vodorovné poloze, ale voda z pod řezu nebyla odstraněna. Výsledkem je nadzvednutí tkáně a její rozostření v rovině pozorování zbytku řezu.

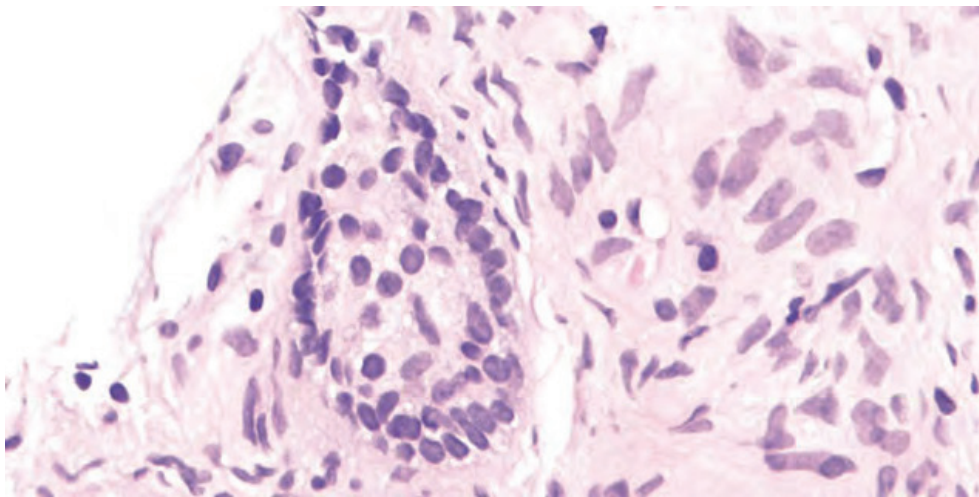
B) Řez na tomto obrázku byl právě vytažen z napínací lázně. Voda se slije krátkým postavením skla do vodorovné polohy a následně je sklo položeno na vyhřívanou desku k sušení.

- Sušení řezů

- Krok 50: Monitorovat teplotu sušení

✓ Teplota sušení by měla být pečlivě monitorována.

✗ Pokud bude sušící deska příliš horká, v řezech vzniknou bubliny, které negativně ovlivní výsledek barvení.

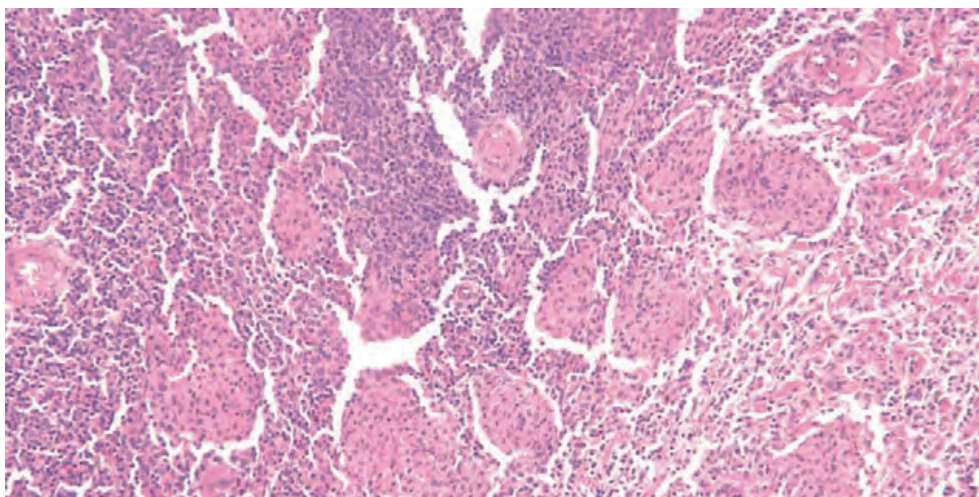


Obr. Řez prostaty sušený na příliš horké plotýnce. Jádra jsou neostrá, což je jev způsobený například příliš vysokou teplotou sušení, ale může vzniknout také u špatně zpracované tkáně. Toto rozmělnění jader se nejčastěji vyskytuje na okrajích řezu a častěji postihuje epitelální tkáň. Jádra jsou nerovnoměrně barvena a mohou se přibarvovat růžově nebo naopak silně modře či zcela postrádají detaily.

• Sušení řezů

• Krok 51: Sušit přiměřenou dobu

- ✓ Minimální a maximální doba sušení řezů je kontrolována.
- ✗ Sušení řezů probíhá nahodile. Dlouhé sušení při vyšších teplotách způsobuje bubliny na řezu a praskání řezů.



Obr. Řez lymfatickou uzlinou v přehledném barvení H&E, která vykazuje rozsáhlé praskání v důsledku dlouhodobého sušení při příliš vysoké teplotě. Takové praskliny mohou být také způsobeny jinými faktory, včetně příliš dlouhého zpracování v tkáňovém automatu.

• **8) Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

Krok 52: Dodržovat časy barvení

Krok 53: Pravidelně sledovat kvalitu

Krok 54: Standardizovat podmínky barvení

Krok 55: Zajistit řádnou deparafinaci

Krok 56: Pravidelně měnit reagenty

Krok 57: Řezy důkladně hydratovat

Krok 58: Monitorovat kvalitu hematoxylinu

Krok 59: Zajistit úplné obarvení jádra - zmodrání

Krok 60: Zamezit nestejněměrnému barvení eosinem

Krok 61: Monitorovat pH eosinu

- **Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

- **Krok 52: Dodržovat časy barvení**

✓ Každý krok barvení trvá přesně stanovenou dobu.

✗ „Když není dost času, některé kroky zkracujeme nebo vynecháváme.“ Po podobném jednání dochází k nekonzistentním výsledkům.

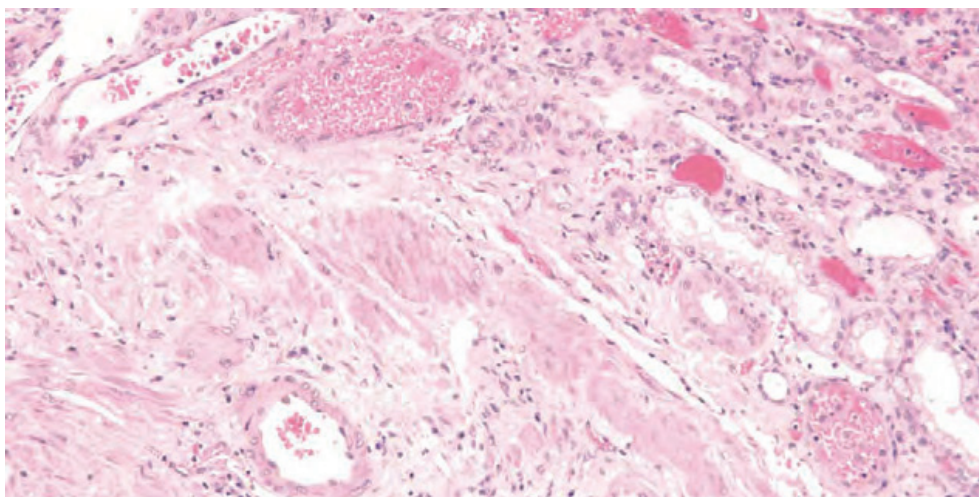


Obr: Tyto stejně silné řezy ze stejného bloku jsou manuálně obarvené přehledným barvením H&E, ale dvěma různými laboranty. I makroskopicky je zde patrný rozdíl v intenzitě barvení.

- Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)

- Krok 53: Pravidelně sledovat kvalitu

- ✓ Kvalita barvení je pravidelně sledována používáním kontrolních řezů.
- ✗ Kontroly nejsou pro barvení H&E vůbec používány. Není možné z nich zjistit, jestli je špatné barvení způsobeno špatnými činidly, chybným protokolem anebo nedostatečnou fixací.



Obr: Ledvina, obsahující množství eosinofilních buněk s dobře zachovalou jadernou strukturou, umožňující spolehlivé hodnocení kvality barvení H&E. Podobně se dá použít i placenta.

- **Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

- **Krok 54: Standardizovat podmínky barvení**

- ✓ Počet ponoření skel v reagentiích v barvicím automatu, časy promývání a odkapávání skel jsou optimalizovány pro všechny kroky barvení.
- ✗ Počet ponoření skel, časy promývání a odkapávání nejsou konzistentní. Rozpouštědla i činidla jsou rychle kontaminována, barvení není stejnoměrné.



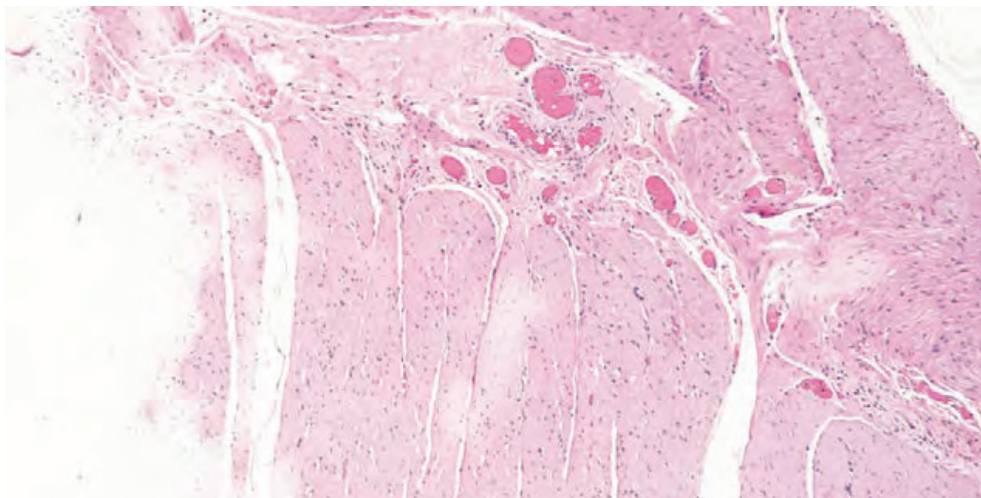
Obr: Jedním z výhod používání automatického barvicího přístroje je to, že míchání, doba praní a odkapávání jsou stále stejné. Jakékoliv změny protokolu jsou kontrolovány, což zajišťuje dobré výsledky.

- Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)

- Krok 55: Zajistit řádnou deparafinaci

✓ Optimalizovat způsob deparafinace.

✗ Někdy se parafín nepodaří odstranit úplně, což vede k tvorbě neobarvených, příp. nerovnoměrně barvených oblastí v řezu.

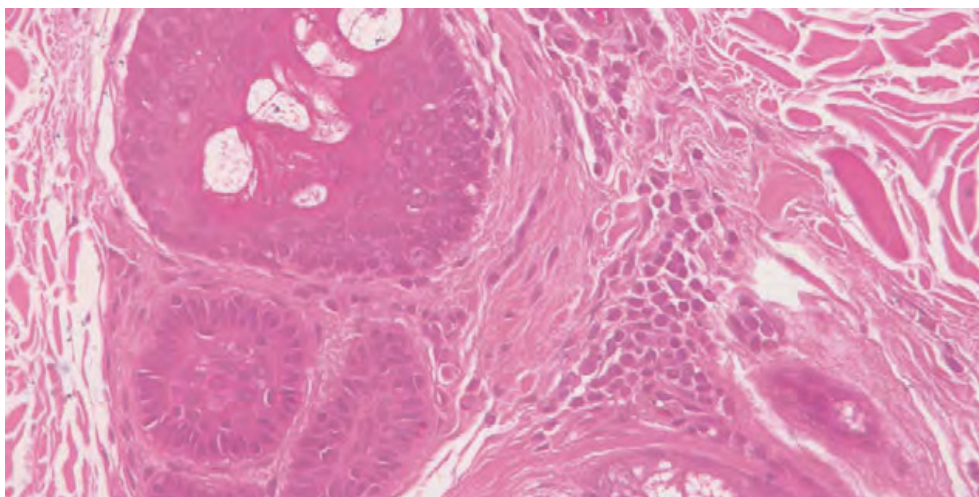


Obr: Tento řez obarvený H&E zobrazuje v levé části velkou neobarvenou plochu a několik menších oblastí, které jsou buď částečně obarvené, nebo neobarvené. To je způsobeno nedodatečným odparafinováním řezu.

- **Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

- **Krok 56: Pravidelně měnit reagentie**

- ✓ Rozpouštědla a barvicí lázně jsou pravidelně měněny v závislosti na počtu obarvených řezů.
- ✗ Obměna rozpouštědel a barvicích činidel není pravidelná a jsou používány do té doby, dokud nedojde k poklesu kvality barvení.



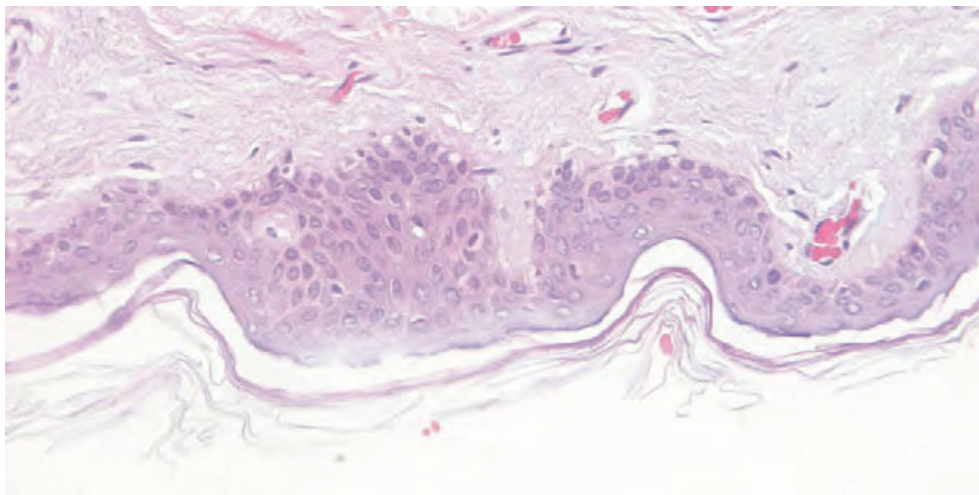
Obr. Řez obarvený hematoxylinem špatné kvality s rozbředlými konturami řezu.

- Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)

- Krok 57: Řezy důkladně hydratovat

✓ Řezy jsou před barvením hematoxylinem důkladně hydratovány.

✗ Roztok hematoxylinu se rychle znehodnocuje alkoholem, příp. i zbytkovým xylem, což vede k nerovnoměrnému obarvení řezu.

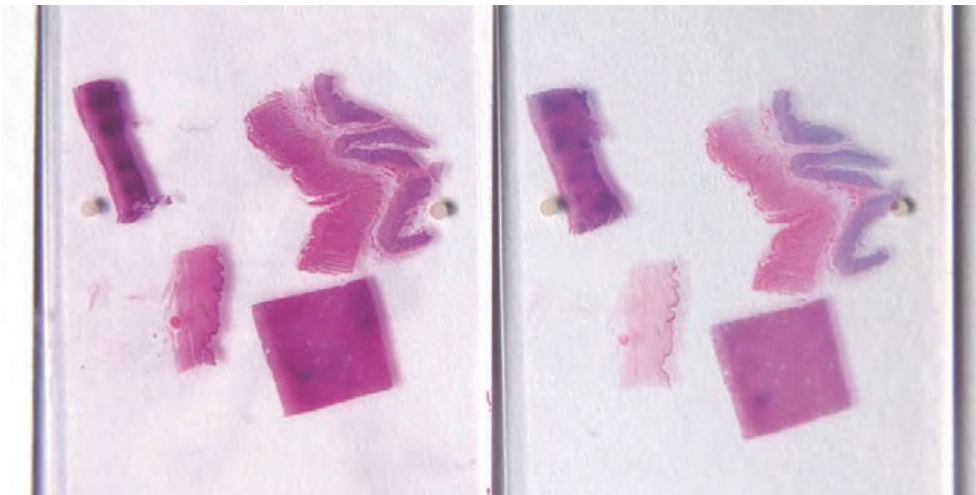


Obr: Nerovnoměrné barvení viditelné v epidermis bylo způsobeno zbytkovým xylem a stopami parafínu přítomnými v řezu při barvení hematoxylinem.

- **Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

- **Krok 58: Monitorovat kvalitu hematoxylinu**

- ✓ Barvicí schopnost hematoxylinu se vlivem postupného naředování roztoků či postupující oxidací časem snižují a je vhodné je monitorovat. Pokud změny pozorujeme téměř ze dne na den, je třeba hledat chybu právě v oxidaci, která mohla být uspišena např. intenzivnějším provzdušňováním během barvení či teplotou okolí.
- ✗ Barvení hematoxylinem ze dne na den mění svou intenzitu a nikdo se nesnaží to pochopit. Rychlost oxidace zvyšují například plocha květy (hladiny), zvýšené provzdušňování lázně intenzivním ponořováním skel nebo okolní teplota.

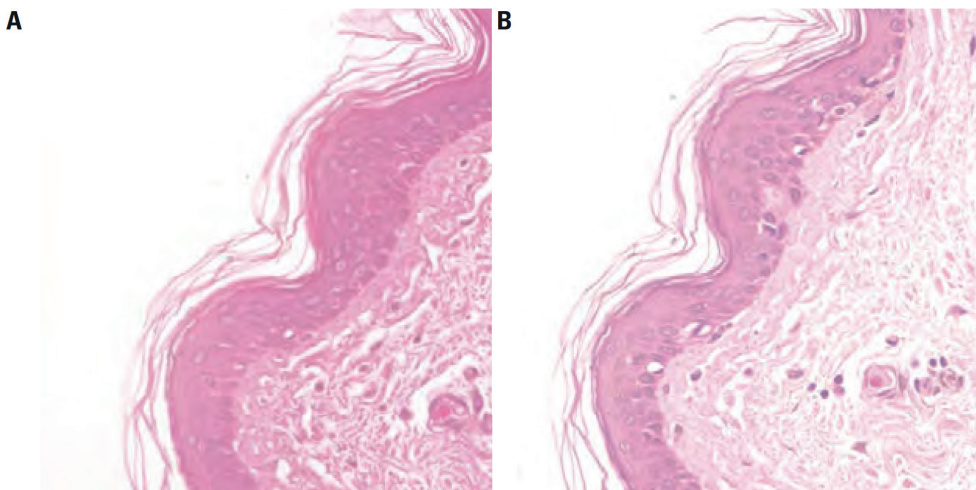


Obr: Dva řezy ze stejného kontrolního bloku. Byly barveny H&E s použitím identických protokolů na automatizovaném barvicím přístroji. Rozdíl mezi barvením je 7 dní. Makroskopicky je zřejmá variace úrovně barvení.

- Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)

- Krok 59: Zajistit úplné obarvení jader - zmodránění

- ✓ Při barvení hematoxylinem je standardně užívána pramenitá voda. Ta však není všude dostatečně alkalická, vlivem čehož by nemuselo dojít k úplnému obarvení jader, která by se pak nejevila jako modrá, ale jako růžová. Proto po barvení hematoxylinem se skla nechávají projít lázní Scottova činidla (Scott's alkaline tap water substitute T. W. S.), příp. amoniakem, které výše uvedený problém spolehlivě vyřeší.
- ✗ Růžově se mohou jevit i jadra, která byla nedostatečně obarvena hematoxylinem, příp. přebarvena eosinem.



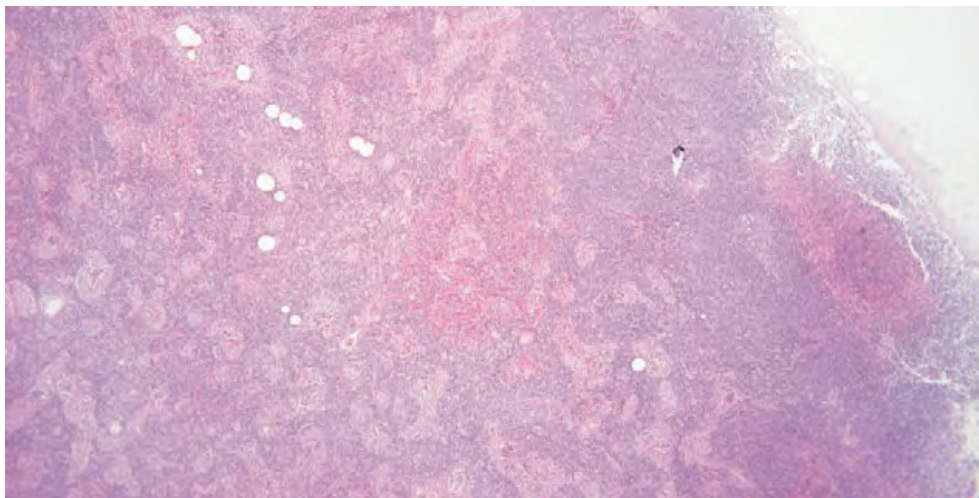
Obr. A) Špatně definovaná jadra po příliš krátkém modránění. Jadra epidermis jsou růžová (H&E, kůže).

B) Druhý řez byl ponechán v modrací lázni delší dobu. Jadra jsou mnohem lépe definována (kůže, H&E)

- **Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

- **Krok 60: Zamezit nestejnémému barvení eosinem**

- ✓ Po použití Scottova roztoku nebo jiné modrací lázni, by mělo následovat velmi důkladné promytí skel v pramenité vodě, aby se odstranily zbytky těchto roztoků z řezu.
- ✗ Špatné vyprání řezů po modrání způsobí slabé a nerovnoměrné barvení eosinem.

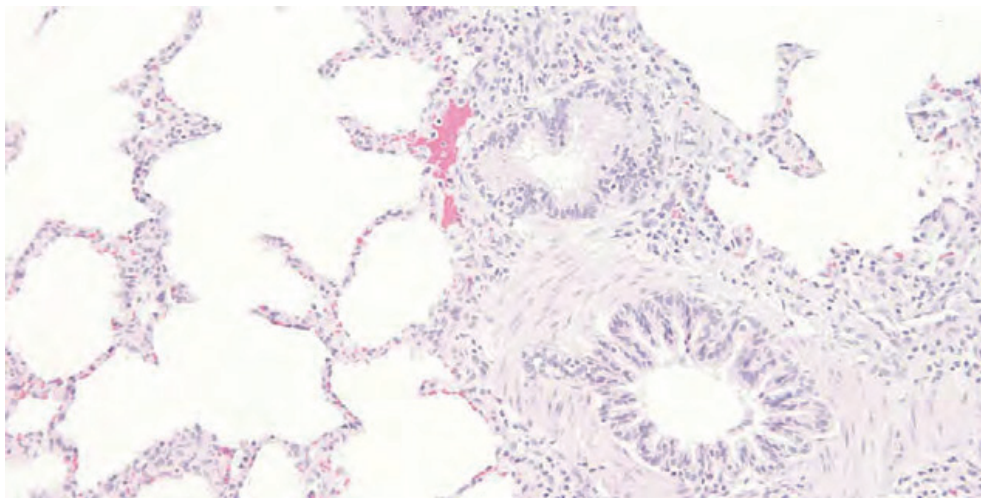


Obr: Řez sleziny (H&E) demonstruje špatné vymytí alkalického činidla ze vzorku před barvením eosinem. Všimněte si nepravidelného barvení.

- **Rutinní barvení (hematoxylin/eosin)**

- **Krok 61: Monitorovat pH eosinu**

- ✓ Pro optimální barvení by pH roztoku eosinu mělo být udržováno na hodnotě 5,0. Vlivem použití pramenité vody při přípravě roztoku se může pH měnit. Snížení pH lze docílit např. přidávkem několika kapek kyseliny octové.
- ✗ Měření pH eosinu se neprovádí. Když intenzita barvení klesne (přenesení do alkalické vody z vodovodu může způsobit vzestup pH roztoků eosinu), roztok se prostě vymění.



Obr: Řez plic (H&E). Dobarvení eosinem je příliš slabé. Všimněte si, že jedinými strukturami, které jsou obarveny eosinem, jsou erytrocyty.

baria

- **9) Montování, příprava trvalého preparátu**

Krok 62: Důkladně odvodnit řezy před projasňováním a montováním

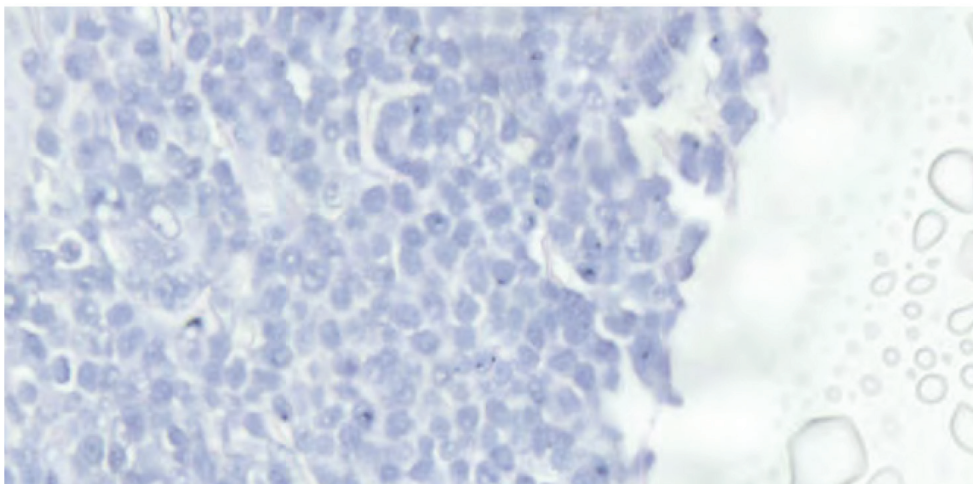
Krok 63: Zamezit oschnutí řezu před zamontováním

- **Montování, příprava trvalého preparátu**

- **Krok 62: Důkladně odvodnit řezy před projasňováním a montováním**

✓ Před projasněním v xylenu jsou řezy řádně odvodněny.

✗ Řezy jsou narychlo přeneseny z alkoholu do xylenu. Projasňování v xylenu, který byl kontaminován vodou, vede ke ztrátě mikroskopických detailů a zastření řezu po zamontování.

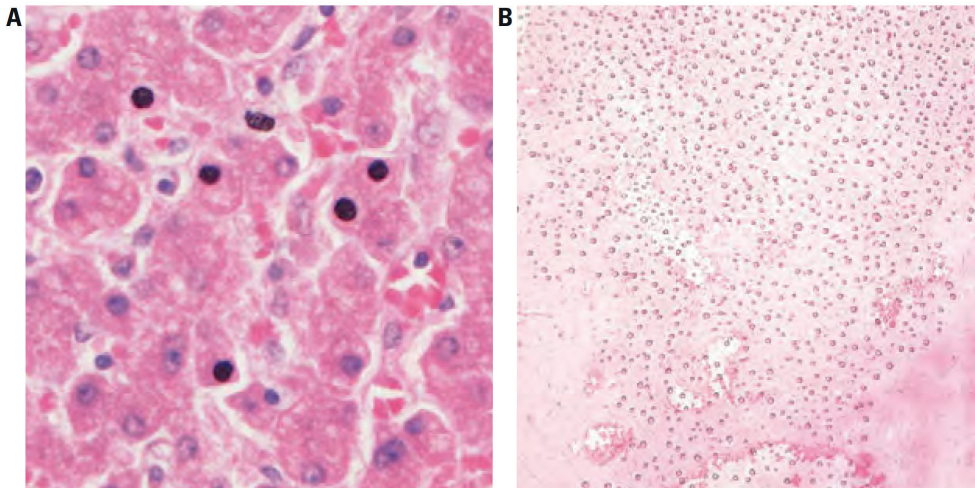


Obr: Tento řez nemohl být dostatečně projasněn, protože nebyl správně odvodněn. Makroskopicky je vidět zastření detailů a při bližším zkoumání můžeme spatřit drobné kapénky vody.

- **Montování, příprava trvalého preparátu**

- **Krok 63: Zamezit oschnutí řezu před zamontováním**

- ✓ Krycí sklo je třeba montovat rychle, aby řez nezaschnul. Při montování používáme vysoce kvalitní montovací média, u nichž máme ověřeno, jak se budou chovat v řádu měsíců či let.
- ✗ Řezy před zamontováním občas oschnou, což způsobí zčernání některých jader. Levné montovací médium kupované jen podle ceny může pod krycím sklem krystalizovat.



Obr. A) Tého řez částečně vyschnul před aplikací montovacího média a zamontováním. To způsobilo, že se na některých jádrech zachytily malé vzduchové bubliny, které po zamontování vypadají jako černý pigment.

B) Preparát zamontovaný do nekvalitního montovacího média šest měsíců po zamontování – všimněte si výskytu refraktivních sférických krystalů.

• 10) Speciální barvení

Krok 64: Vědět, co chceme vidět

Krok 65: Používat pozitivní kontrolu

Krok 66: Dodržovat časy barvení

Krok 67: Kontrolovat stabilitu barvicích roztoků

Krok 68: Správně skladovat barvicí roztoky

Krok 69: Přesně dodržovat protokol barvení

Krok 70: Zaznamenávat všechny změny

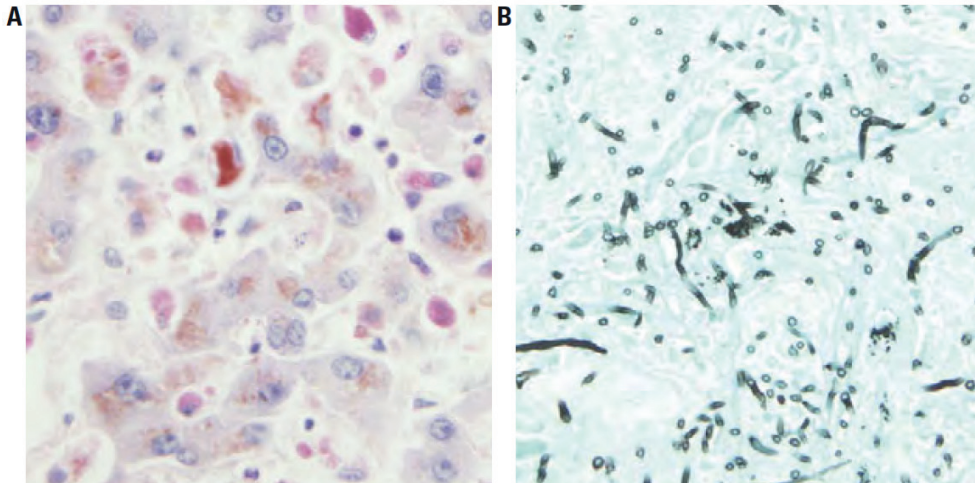
Krok 71: Standardizovat promývací kroky

Krok 72: Pečlivě nastavit mikroskop

• Speciální barvení

• Krok 64: Vědět, co chceme vidět

- ✓ Je třeba znát dobře metody speciálního barvení a vědět, co nám které barvení přinese a které struktury budou znázorněny.
- ✗ „Jen následujeme protokol a nevíme, jaký výsledek barvení bude mít.“



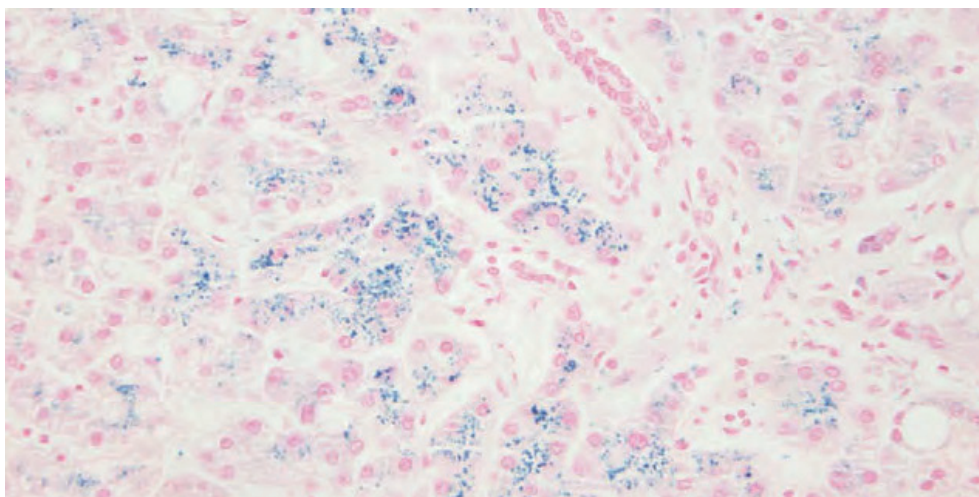
Obr. A) Řez jater barvený na PAS. Lipofuscin a glykogen jsou PAS pozitivní, zatímco zbytky žluči a hemosiderinu jsou PAS negativní a lze pozorovat jejich přirozenou barvu (žlutou a hnědou).

B) Průkaz Aspergilové infekce plic metodou Grocott-Gomori. Vlákna této houby (hyfy) jsou obarveny černě. U kuřáků a obyvatel měst jsou zároveň v plicích přítomna černá rezidua uhlíku.

- **Speciální barvení**

- **Krok 65: Používat pozitivní kontrolu**

- ✓ Vždy používat kontrolní řez, o kterém víme, že obsahuje tkáňovou strukturu, kterou se snažíme prokázat.
- ✗ „Pokud struktura tkáně, kterou hledáme, není po barvení vidět, předpokládáme, že ve vzorku není přítomna.“

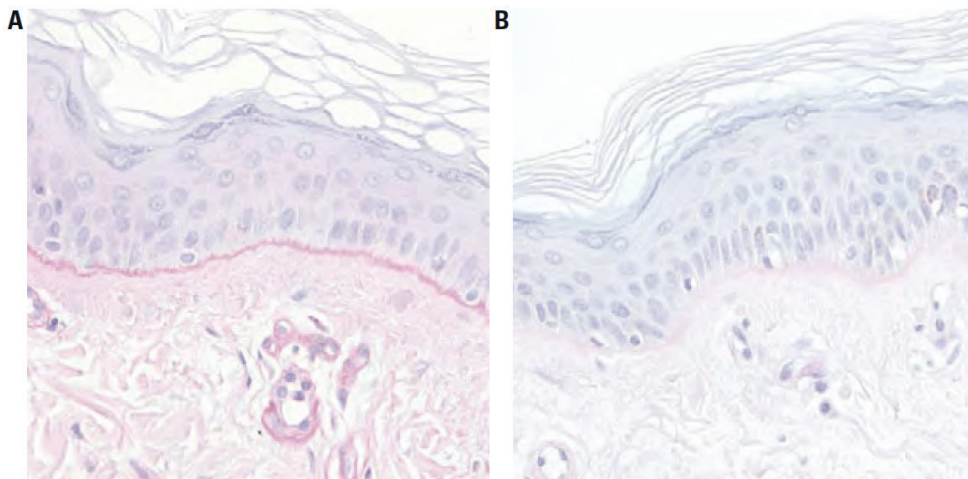


Obr: Řez jater postižených cirhózou, barvených metodou Perl's pro demonstraci železa (modré) v hemosiderinu. Blok je používán jako kontrola reakce na železo.

- Speciální barvení

- Krok 66: Dodržovat časy barvení

- ✓ Dodržovat časy barvení v jednotlivých lázních.
- ✗ Časy inkubací jsou pouze přibližné, což vede k nekonzistentním výsledkům.

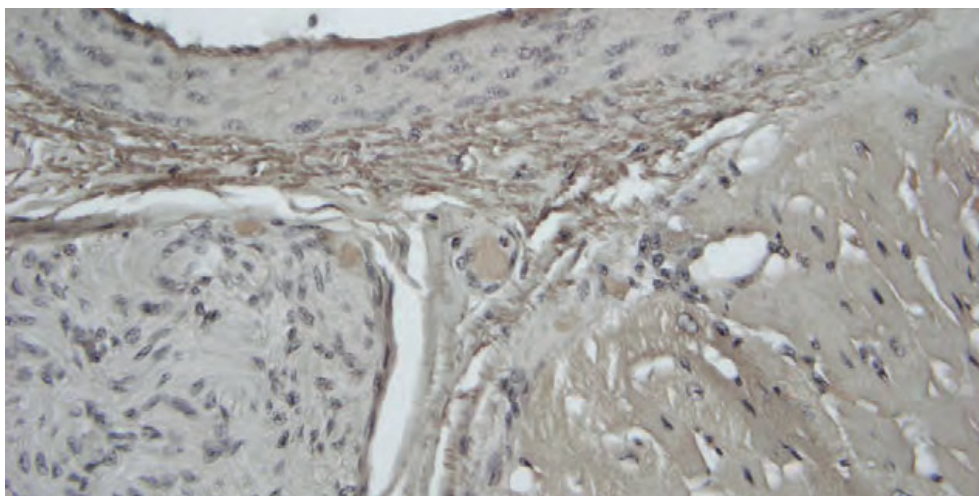


Obr: Dva řezy kůže ze stejného bloku (PAS). Řez A byl správně oxidován v kyselině jodisté po dobu 5 minut. Řez B omylem jen 30 sekund. Výsledkem je slabé zbarvení bazální membrány.

Speciální barvení

● Krok 67: Kontrolovat stabilitu barvicích roztoků

- ✓ Zatímco některé barvicí roztoky se časem příliš nemění, jiné je třeba připravovat těsně před použitím. Výjimkou nejsou ani takové roztoky, které musí nejprve oxidovat (dozrát) a teprve poté mohou být použity.
- ✗ Předpokládáme, že všechny roztoky mají téměř neomezenou životnost.

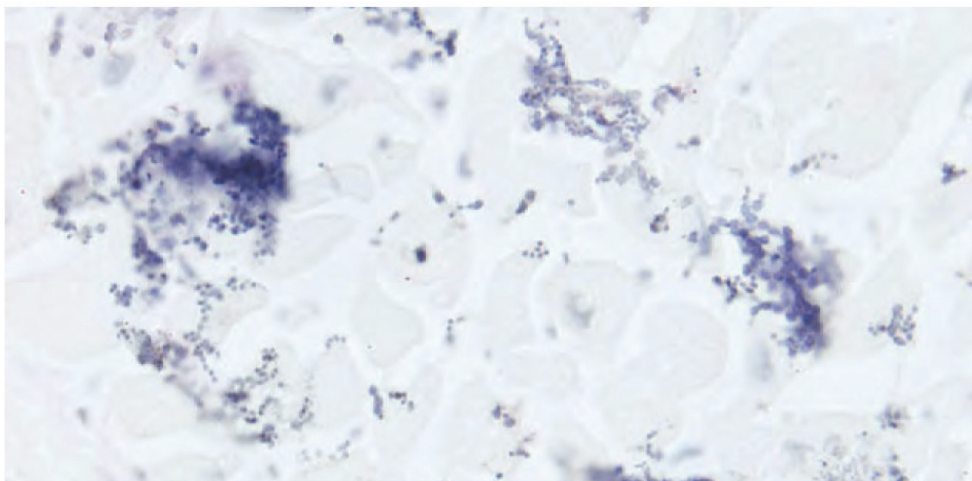


Obr: Špatná kvalita Weigertova hematoxylinu způsobená oxidací – dlouhým skladováním. Všimněte si hnědého zbarvení kolagenu.

Speciální barvení

● Krok 68: Správně skladovat barvicí roztoky

- ✓ Roztoky je třeba správně skladovat. Některé potřebují chlad, protože jsou náchylné k plesnivění nebo jsou citlivé na světlo a je nutno je skladovat ve tmě.
- ✗ "Všechny naše barvicí roztoky jsou uloženy na polici nad barvicím stolem. Někdy vidíme v našich řezech zvláštní struktury plné mikroorganismů "

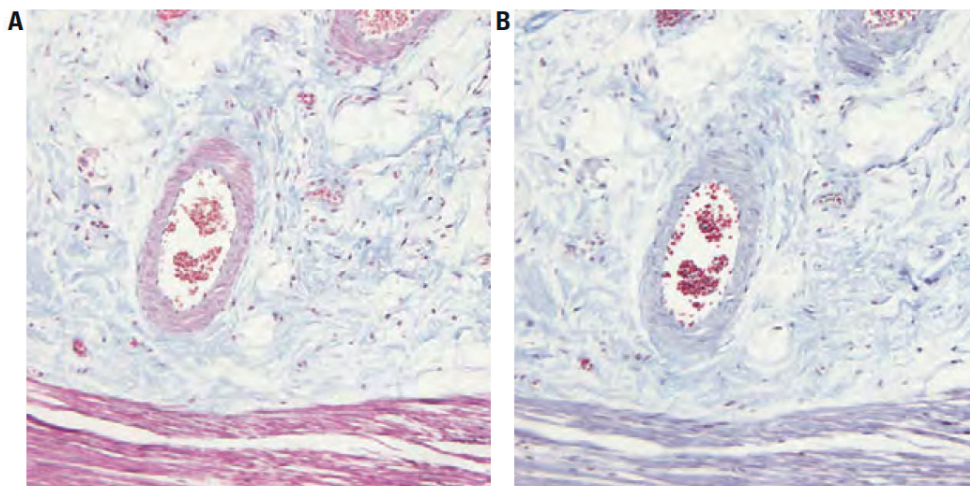


Obr. Řez s patrnými usazeninami mikroorganismů, které vyrostly v barvicím roztoku (v tomto případě hematoxylinu), a po obarvení se uchytily na povrchu řezu.

Speciální barvení

• Krok 69: Přesně dodržovat protokol barvení

- ✓ Přesné dodržování protokolu barvení.
- ✗ Laboranti občas dosahují rozdílných výsledků, i když údajně používají týž protokol.

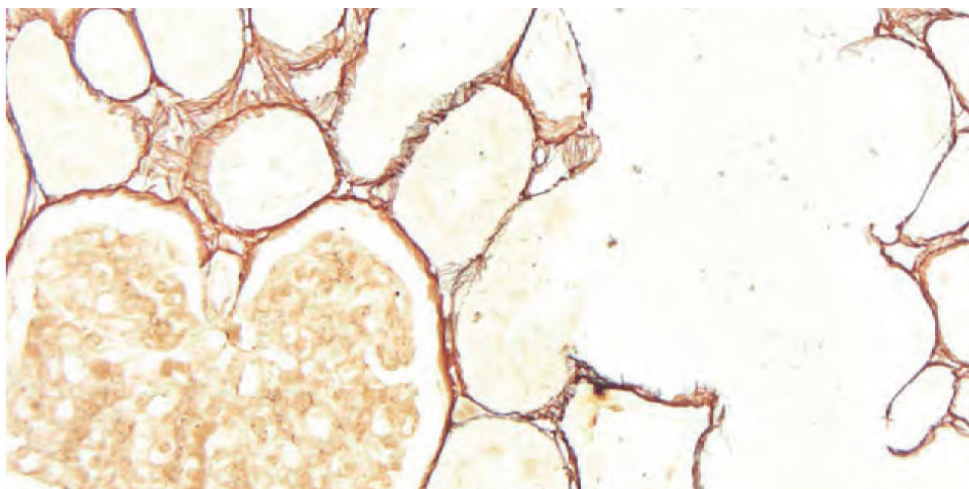


Obr: Tyto řezy střevní submukózy fixované formalinem byly obarveny Massonovým trichromem. V řezu A vidíme správně obarvený hladký sval červenorůžově. Barvení bylo provedeno správně podle protokolu. Pokud je jeden krok vynechán, jako na řezu B, hladký sval se neobarví.

Speciální barvení

• Krok 70: Zaznamenávat všechny změny

- ✓ Vždy je třeba si zaznamenávat výstup z metod, které ten den byly použity.
- ✗ Pokud nejsou výstupy zaznamenány, je obtížné hledat řešení, když nejsou výsledky optimální a záznamy o změnách protokolu chybí.

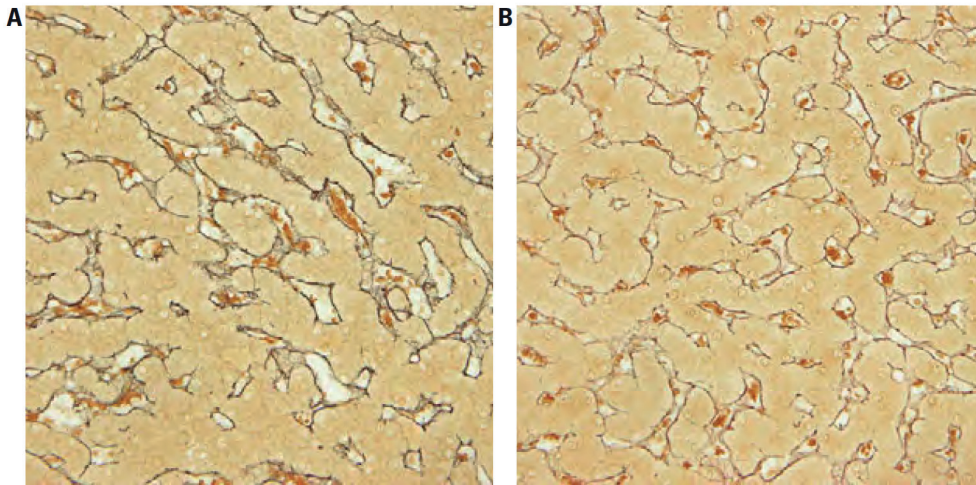


Obr. Řez ledviny v impregnačním barvení na retikulin (Gordon & Sweets). Retikulární vlákna jsou špatně impregnovaná stříbrem a na skle je v pozadí vidět precipitát. Je velmi obtížné určit příčinu podobných problémů, pokud není dodržen přesný protokol metody.

Speciální barvení

● Krok 71: Standardizovat promývací kroky

- ✓ Promývání by mělo být standardizované, aby se zabránilo variabilitě výsledků barvení.
- ✗ Různí laboranti promývají různě. Někteří řezy propírají jemně, jiní silně třesou kyvetou, což má různý vliv na výsledek.

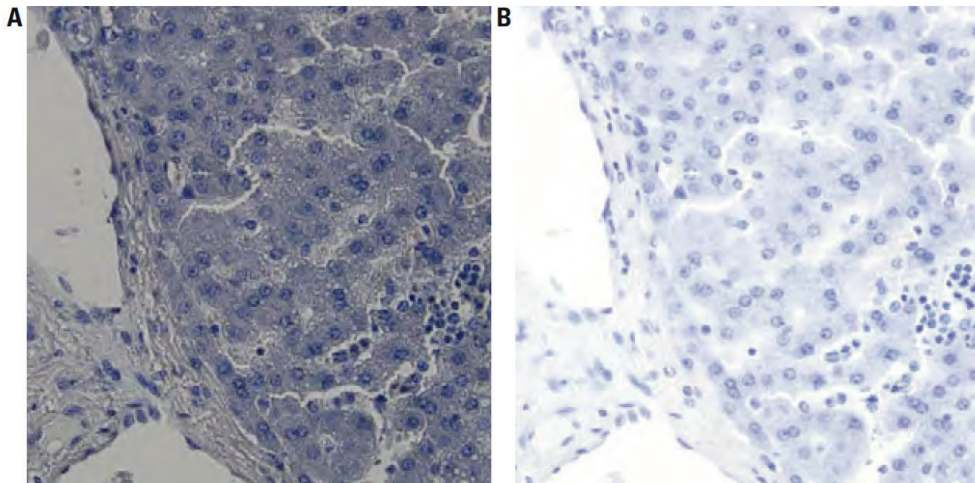


Obr: Dva stejné řezy jater (Gordon & Sweets). V řezu A bylo barvení provedeno podle protokolu. Řez B nebyl dostatečně promýván mezi impregnačním a redukčním krokem.

Speciální barvení

● Krok 72: Pečlivě nastavit mikroskop

- ✓ V klíčových krocích barvení používáme mikroskop. Při pozorování nezakrytých (vlhkých) řezů je však nutno dbát na jeho řádné nastavení, jinak bychom mohli docílit falešně pozitivních výsledků.
- ✗ Úroveň barvení je vždy posuzována pouhým okem.



Obr. A) Mokrý řez (bez krycího skla) zobrazený pod mikroskopem s uzavřenou kondenzorovou clonou. Všimněte si falešného pozadí.

B) Mokrý řez (bez krycího skla), zobrazený pod mikroskopem s otevřenou kondenzovanou clonou.

- **11) Imunohistochemie (IHC)**

Krok 73: Používat vysoce kvalitní řezy

Krok 74: Zajistit optimální fixaci

Krok 75: Zamezit problémům s přilnavostí řezů

Krok 76: Optimalizovat odstraňování parafínu a používání činidel

Krok 77: Vyhnut se koncentračním gradientům

Krok 78: Pečlivě vybírat protilátku

Krok 79: Číst návody k protilátkám

Krok 80: Optimalizovat odmaskovací metody

Krok 81: Brát v úvahu křížovou reaktivitu protilátek

Krok 82: Blokovat endogenní peroxidázy

Krok 83: Předcházet falešnému barvení pozadí

Krok 84: Používat vhodný detekční systém

Krok 85: Standardizovat promývání

Krok 86: Optimalizovat dobarvení jader

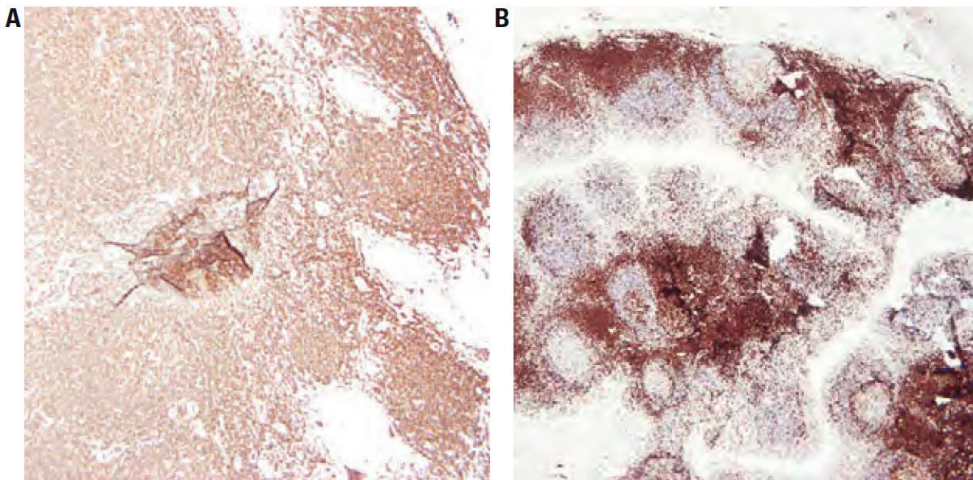
Krok 87: Používat vhodnou kontrolu

Krok 88: Výsledky vyhodnocovat opatrně

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 73: Používat vysoce kvalitní řezy

- ✓ Pro IHC jsou používány tenké rovné, správně vysušené řezy. Skla jsou buď nabitá, nebo potahovaná (silanizovaná).
- ✗ Špatně natažené řezy se barví nerovnoměrně s variabilně obarveným pozadím.



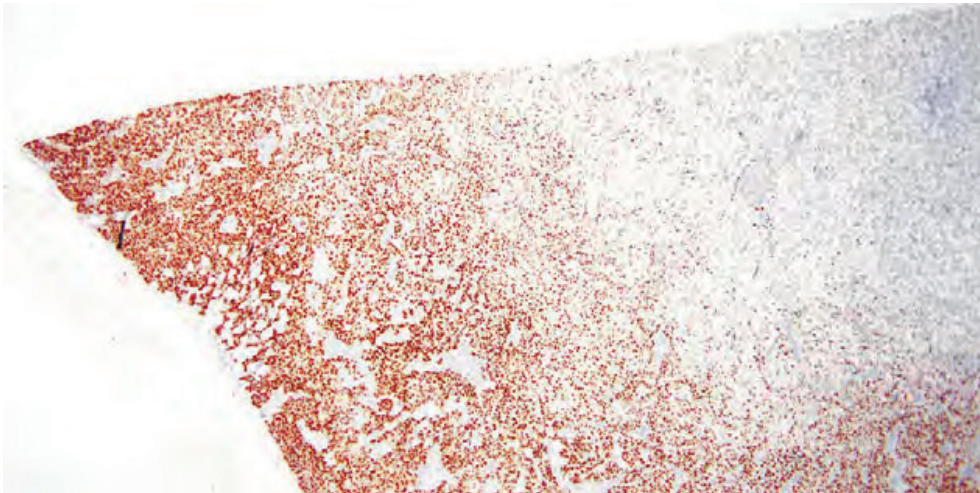
Obr. A) Bublina, která vznikla pod řezem při napínání na sklo, způsobila oddělení části tkáně od skla a její přebarvení (tonsila, CD45).

B) Nekvalitní řez, který nebyl rovný a správně vysušený. Části řezu jsou potrhane a poplavané (tonsila, CD3).

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 74: Zajistit optimální fixaci

- ✓ Kvalitní fixace za použití známých a konzistentních podmínek (druh fixativa, pH, teplota, čas) vede k nejlepším výsledkům. Vzorky by měly být před zpracováním zkontrolovány, aby se zjistilo, zda je potřeba další fixace nebo nikoliv.
- ✗ Nekonzistentní podmínky fixace mají za následek nedofixované či naopak přefixované tkáně. To vede k variabilitě výsledků a problémům spojeným s hledáním řešení.

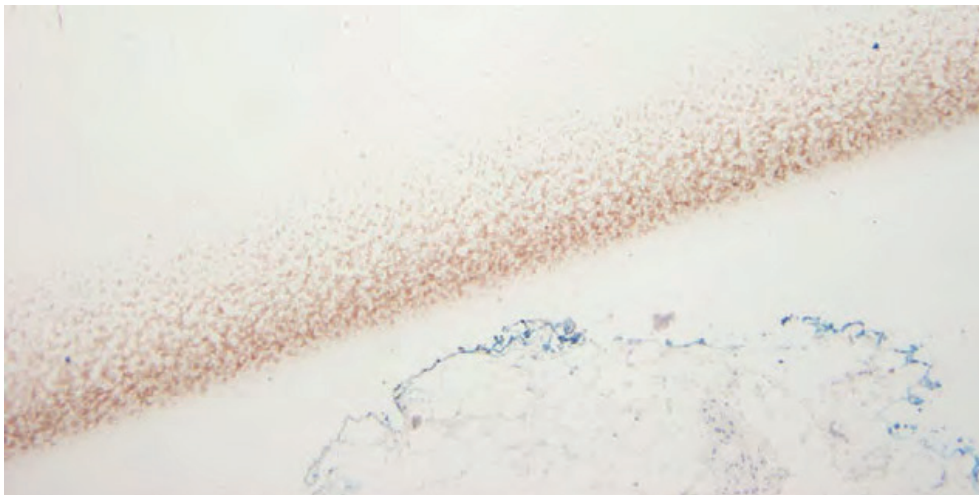


Obr: Nestejnoměrná fixace (zónová fixace) způsobila nestejněrné barvení (tumor mammy, ER).

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 75: Zamezit problémům s přilnavostí řezů

- ✓ Při napínání řezů v lázni se vyvarujeme použití adheziv na proteinové bázi (různá lepidla, škrob nebo želatina).
- ✗ Taková adheziva mohou zablokovat povrch nabitého podložního sklíčka a zapříčinit špatnou přilnavost řezu. Následně mohou způsobit i zadržování IHC činidel pod nadzvednutými částmi tkáně. Výsledkem toho je nerovnoměrné barvení.

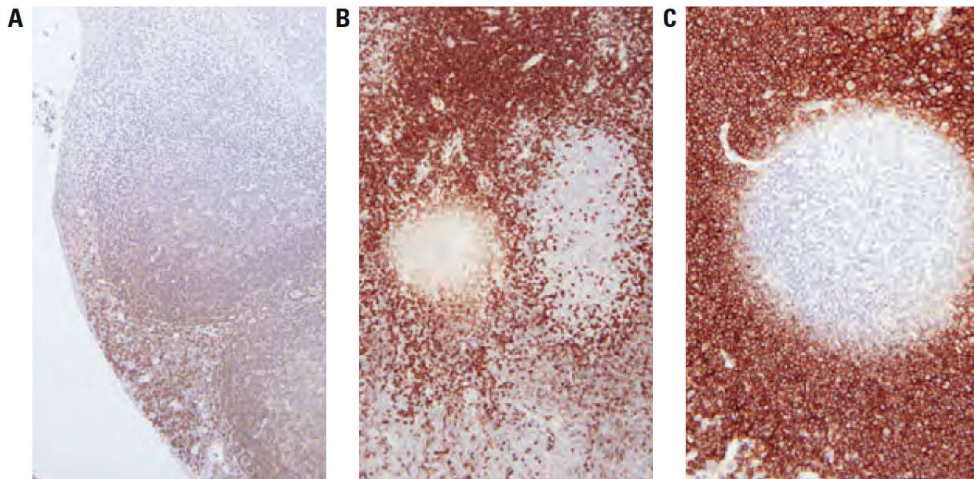


Obr: Ke tkáni těsně přiléhající silná vrstva adheziva na bázi proteinu, která se nespecificky obarvila (mamma, PR).

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 76: Optimalizovat odstraňování parafínu a používání činidel

- ✓ Pro dosažení konzistentních výsledků je třeba optimalizovat deparafinaci a hydrataci řezů a dávkování a rovnoměrnou distribuci činidel po povrchu tkáně.
- ✗ Neúplné odstranění parafínu může vést ke vzniku špatně zbarvených oblastí v řezech.



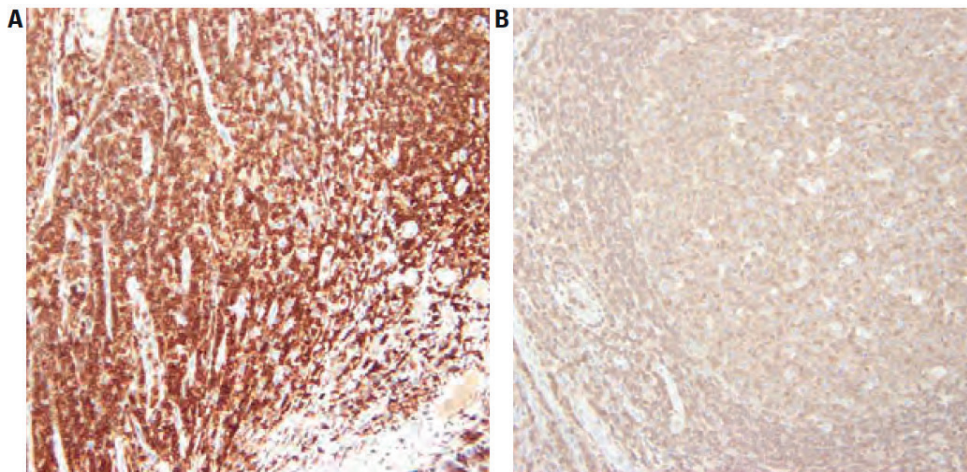
Obr:

- A) Slabý reagenční tok způsobil nestejně zbarvení (tonsila, CD45).
B) Zbytkový parafín v řezu způsobil neobarvenou oblast (tonsila, CD5).
C) Bublina v primární protilátce způsobila nestejně zbarvení (tonsila, CD20).

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 77: Vyhnout se koncentračním gradientům

- ✓ Koncentračnímu gradientu se lze vyhnout správnou aplikací reagensů na sklo..
- ✗ „Občas pozorujeme, že jeden konec řezu je obarven více než druhý.“



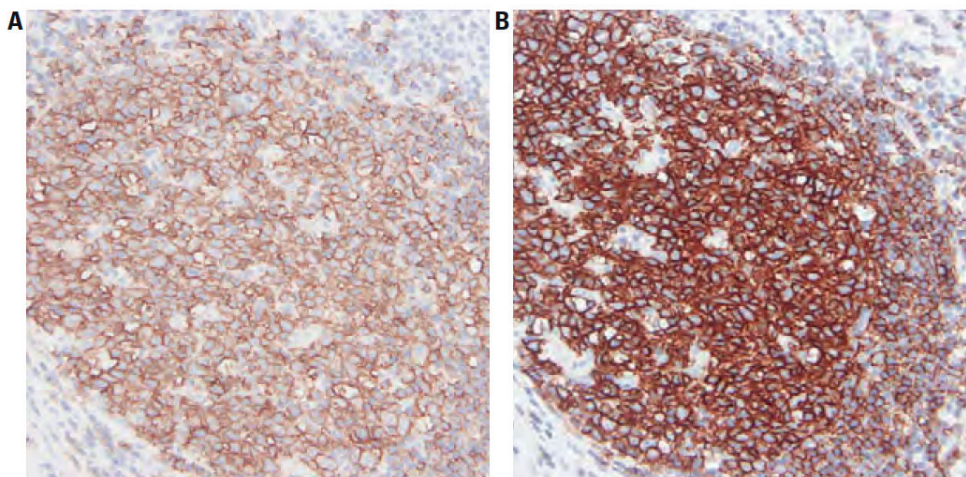
Obr: A a B jsou mikrofotografie pořízené z opačných konců stejného sklíčka. Jeden konec (A) ukazuje velmi silné zbarvení, zatímco druhý konec (B) zbarvení velmi slabé. Je to extrémní příklad koncentračního gradientu vytvořeného při barvení. (tonsila, CD45).

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 78: Pečlivě vybírat protilátku

✓ Při výběru protilátky klademe důraz zejména na citlivost a specifitu. Protilátky nabízené různými dodavateli pod různými názvy mohou pocházet z téhož zdroje. Při hodnocení protilátky je nutno použít název klonu.

✗ „Zajímá nás pouze cena produktu.“

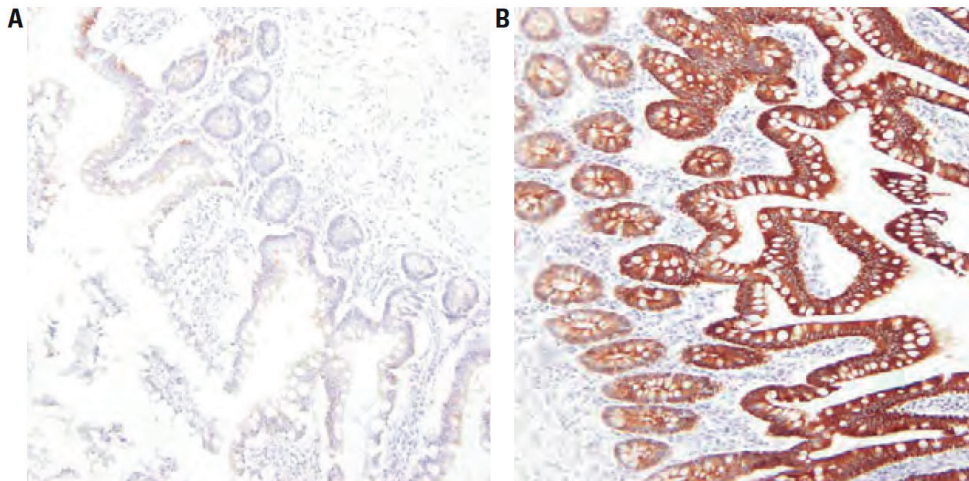


Obr: Tyto řezy lidské tonsily z jednoho bloku byly barveny na průkaz znaku CD20 proti B lymfocytům za použití monoklonálních protilátek od různých výrobců. V obou případech byl použit doporučený postup i optimalizované ředění. Rozdíl ve výsledné kvalitě zbarvení je zřejmý.

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 79: Číst návody k protilátkám

- ✓ Návod by měl být přiložen k protilátce nebo by měl být volně ke stažení na internetu. V tomto dokumentu by měla být uvedena základní metodika k použití protilátky. Se zakoupením nové šarže protilátky by se měla provádět kontrola případných změn.
- ✗ „Nemáme přístup k návodům od protilátek.“

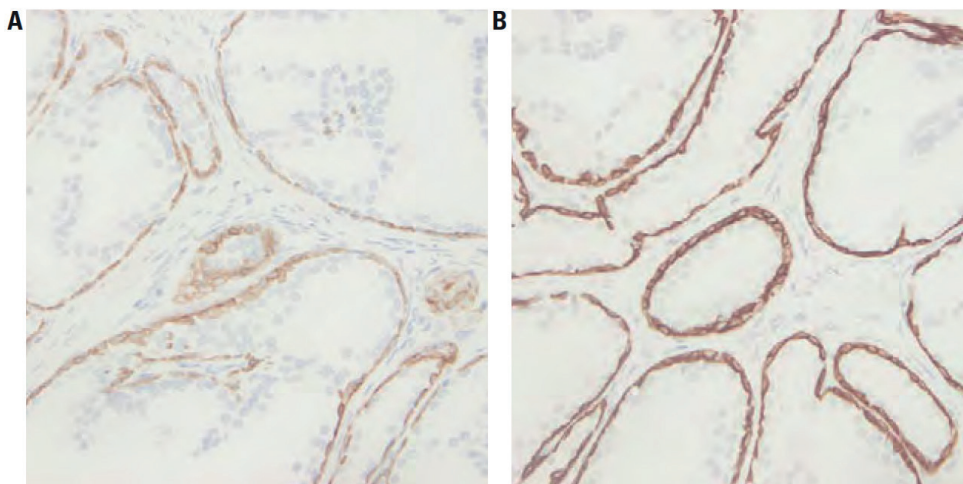


Obr. Tyto řezy tenkého střeva byly barveny protilátkou proti cytokeratinu AE1/AE3. Pro každý řez byly použity různé podmínky odmaskování epitopu. Řez A vykazuje nepříjemně slabé zbarvení, zatímco řez B má správně silnou pozitivitu v povrchovém epitelu.

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 80: Optimalizovat odmaskovací metody

- ✓ Pro jednotlivé protilátky jsou stanoveny vhodné podmínky pro odmaskování epitopu (pH, pufry, teplota, čas, tlak).
- ✗ „Předpokládáme, že existuje univerzální HIER metoda a pro všechny primární protilátky používáme tutéž odmaskovací metodu.“

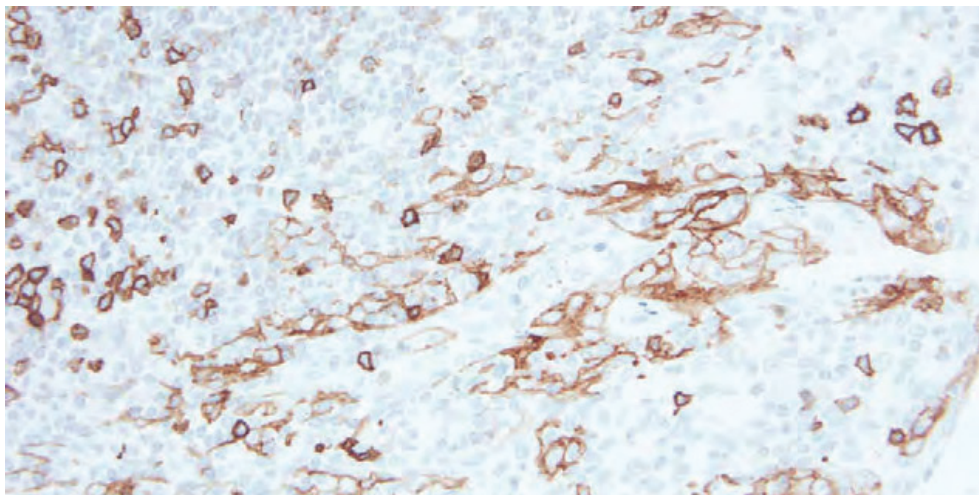


Obr: Řezy prostaty obarvené na cytokeratin HMW, klon 34 β E12. Řez A ukazuje slabé zbarvení, zatímco řez B má zbarvení silnější a ostřejší. Jediný rozdíl byl v použití odmaskovací metody.

Imunohistochemie (IHC)

- **Krok 81: Brát v úvahu křížovou reaktivitu protilátek**

- ✓ Bereme v úvahu možné problémy způsobené křížovou reaktivitou protilátek (přečteme si specifikační list).
- ✗ Nesnažíme se vysvětlit, proč při barvení došlo k neočekávané pozitivní reakci ve strukturách, které by pozitivní být neměly.

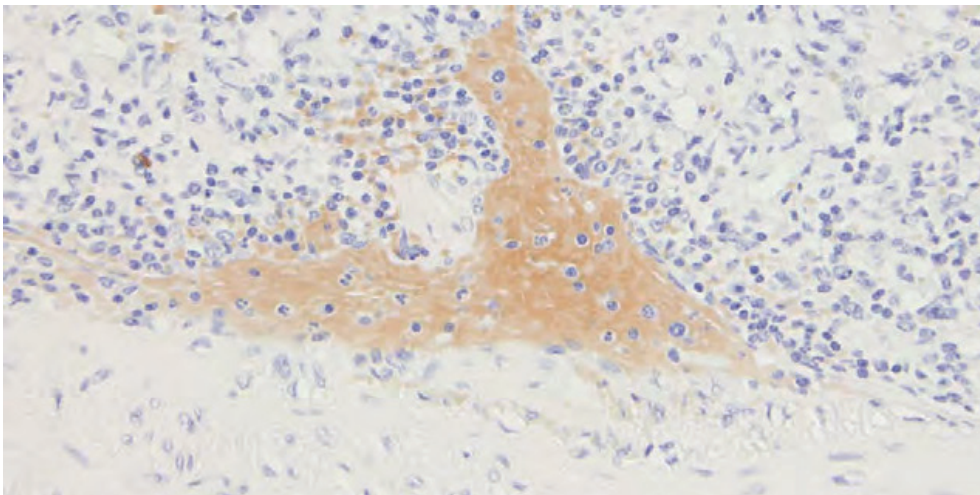


Obr: Patrová tonsila – baze krypt – obarveny CD5 lymfocyty, značí zejména T-buňky. Tento konkrétní klon (4C7) křížově reaguje s epiteliálními buňkami krypt.

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 82: Blokovat endogenní peroxidázy

- ✓ U detekčních systémů využívajících křenovou peroxidázu je třeba blokovat endogenní peroxidázu, aby nedošlo k falešně pozitivní reakci tkáně.
- ✗ Nespecifické barvení lze často pozorovat v erythrocytech, granulocytech, monocytech a ve svalech a je způsobeno nekompletním blokováním endogenní peroxidázy.



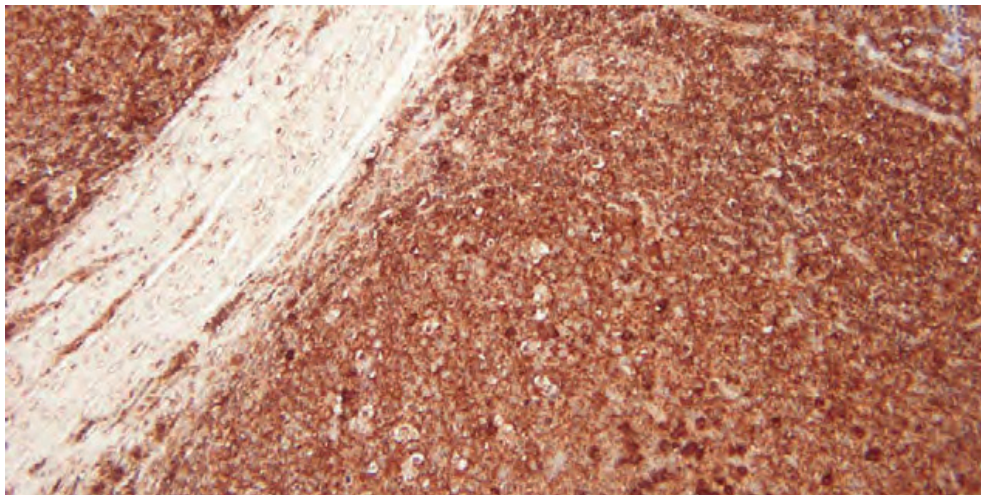
Obr: Slezina s typickým, nespecifickým zbarvením erythrocytů kvůli nedokonalé blokaci aktivity endogenní peroxidázy. V tomto případě endogenní peroxidáza erythrocytů, reagovala s DAB chromogenem.

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 83: Předcházet falešnému barvení pozadí

✓ Vždy je používán adekvátní Protein-Blok.

✗ Nespecifické zbarvení pozadí je občas přítomno kvůli nedostatečnému blokování proteinů.

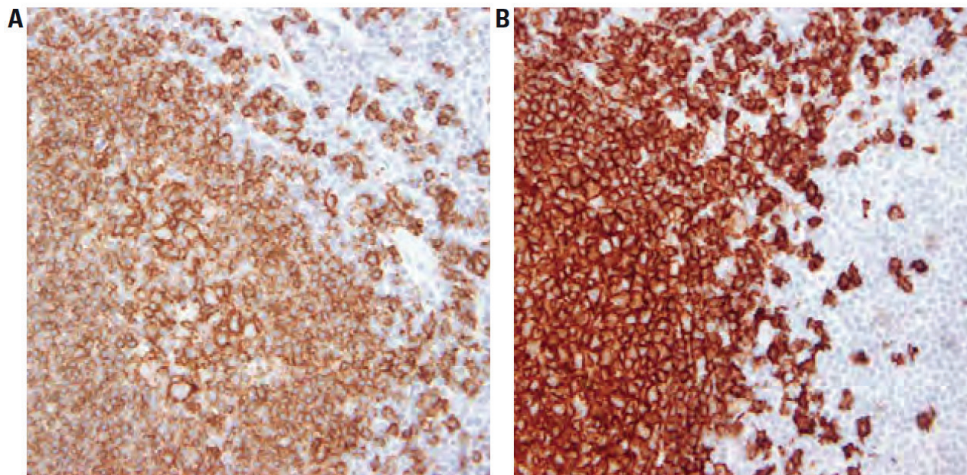


Obr: Běžná tonsila obarvená protilátkou proti lehkému řetězci kappa. Velké nespecifické barvení pozadí vzniklo v důsledku neefektivního blokování proteinů.

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 84: Používat vhodný detekční systém

- ✓ Vhodný detekční systém zajistí přesné specifické barvení s odpovídající citlivostí.
- ✗ „Používáme jeden detekční systém už dlouhou dobu a nemáme důvod jej měnit. Některá barvení jsou slabá nebo neostrá, ale s tím už počítáme.“

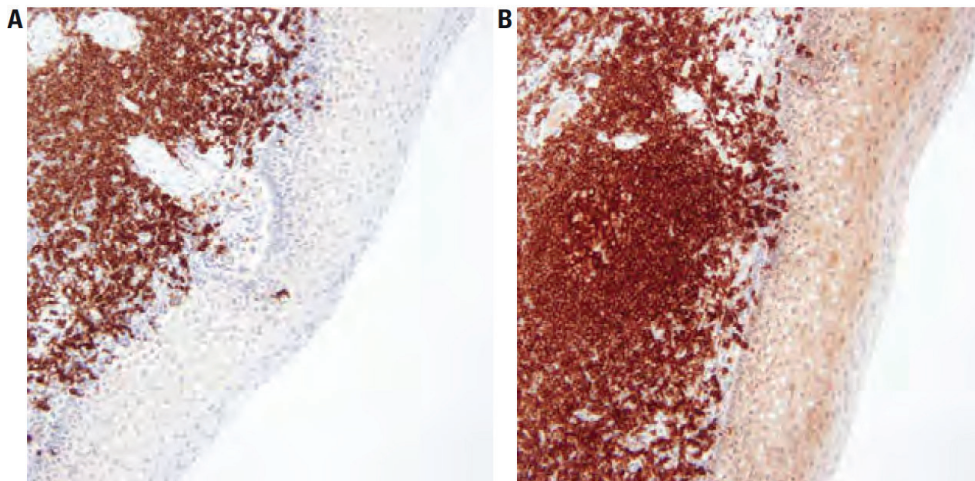


Obr: Řezy A a B jsou ze stejného vzorku, ale byly obarveny různými detekčními systémy. Povšimněte si odlišností v intenzitě a přesnosti zbarvení. (tonsila, CD20).

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 85: Standardizovat promývání

- ✓ Konzistentních výsledků je dosaženo, pokud jsou dodrženy podmínky promývání mezi jednotlivými kroky (čas, objem pufru a intenzita promývání).
- ✗ Pokud jsou výsledky velmi variabilní v rámci jednoho barvicího cyklu se stejnou protilátkou i mezi cykly prováděnými v různých dnech, může to být způsobeno různými promývacími technikami, které používají různí laboranti.

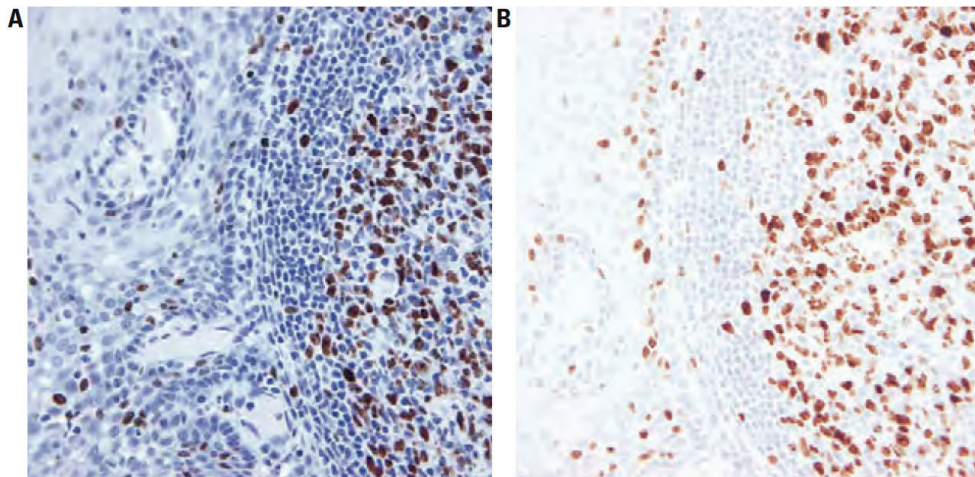


Obr: Řezy A a B jsou ze stejného vzorku a byly obarveny manuálně za použití stejných reagensů. Všimněte si rozdílů v úrovni zbarvení pozadí ve stratifikovaném epitelu. To je způsobeno pravděpodobně různou účinností promývání jednotlivých skel. (tonsila, CD20).

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 86: Optimalizovat dobarvení jader

- ✓ Síla jaderného barvení je nastavena tak, aby nedocházelo k zastínění slabého pozitivního (specifického) barvení. Dobarvení by mělo poskytnout nejlepší možný kontrast mezi chromogenem a pozadím tkáně. Pro každý použitý chromogen se zvolí vhodná metoda dobarvení (hematoxylin, jadrová červeň, methylzeleň apod.).
- ✗ Jádra jsou někdy přebarvena a intenzivní barvení může způsobit překrytí slabého specifického signálu.

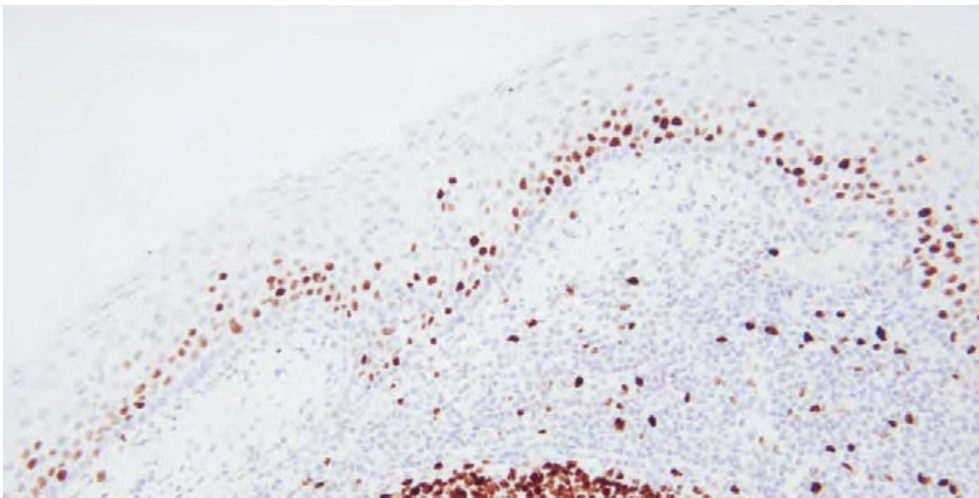


Obr: Tonsila zbarvená na Ki67, buněčný znak proliferujících buněk. Oba řezy jsou ze stejného bloku a ukazují různou úroveň dobarvení jader hematoxylinem. Řez A ukazuje barvení, které je příliš silné a které může skrýt slabou pozitivní reakci. Řez B ukazuje lepší variantu.

Imunohistochemie (IHC)

● Krok 87: Používat vhodnou kontrolu

- ✓ Použití vhodných pozitivních a negativních kontrol vede ke kvalitnímu ověření výsledků barvení. Vnitřní pozitivní a negativní kontroly jsou také důležité a nabízejí výtečný způsob, jak zajistit kvalitu v IHC.
- ✗ "Provádíme kontroly, pouze když se zdá, že naše metoda nefunguje. Kdybychom je udělali na každém skle, stálo by to moc peněz a stejně by se na ně nikdo nedíval."

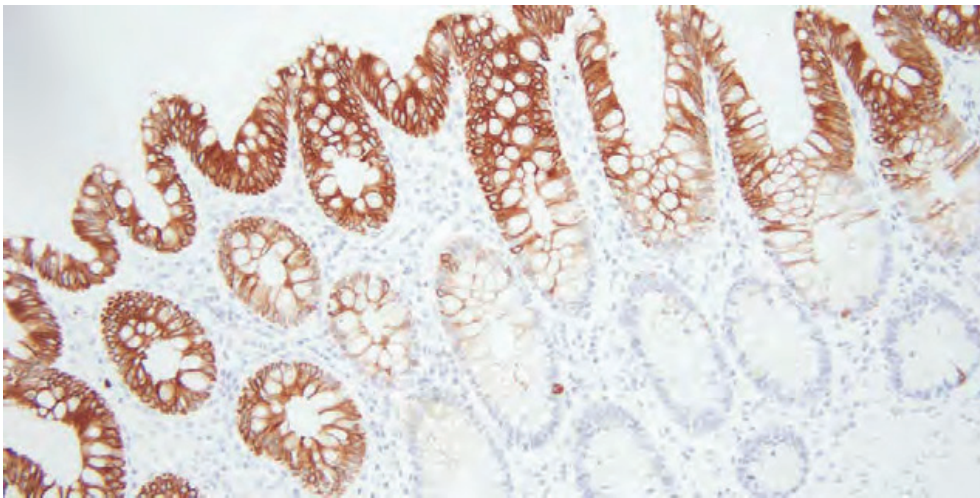


Obr: Tonsila barvená na Ki67. Toto byla negativní kontrola a jádra by se neměla barvit. Na tento řez bylo namísto negativní kontroly chybně aplikována primární protilátka.

Imunohistochemie (IHC)

• Krok 88: Výsledky vyhodnocovat opatrně

- ✓ Je nám dobře známo, co a kde máme hledat při vyhodnocování výsledků barvení vzorků i kontrol.
- ✗ Spokojíme se s tvrzením, že uspokojivý výsledek barvení je takový, kde je cokoliv jakkoliv obarveno.



Obr: Střevo barvené na AE1/AE3. Pozorujeme neočekávaně slabé zbarvení epitelu krypt. Při bližším zkoumání bylo zjištěno, že byla špatně použita primární protilátka proti CK20.

• **12) In situ hybridizace (ISH)**

Krok 89: Používat vysoce kvalitní řezy

Krok 90: Zajistit optimální fixaci

Krok 91: Zamezit problémům s přilnavostí řezů

Krok 92: Optimalizovat odstraňování parafínu a dávkování činidel

Krok 93: Pečlivě vybírat hybridizační sondu

Krok 94: Číst návody k sondám

Krok 95: Optimalizovat pretreatment

Krok 96: Šetrně zacházet se vzorky

Krok 97: Používat vhodný detekční systém

Krok 98: Zamezit vypařování činidel

Krok 99: Standardizovat promývání

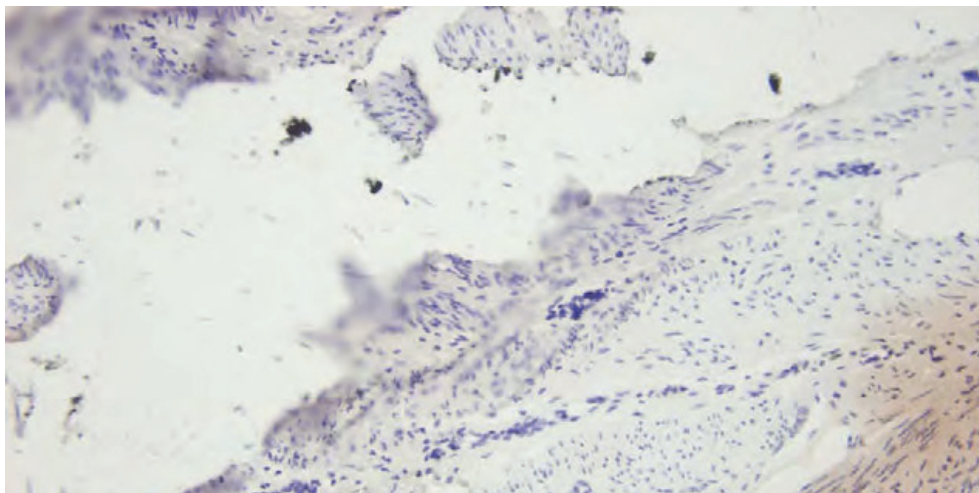
Krok 100: Používat vhodnou kontrolu

Krok 101: Výsledky vyhodnocovat opatrně

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 89: Používat vysoce kvalitní řezy

- ✓ Používáme tenké rovné řezy, které byly řádně vysušeny. Pro ISH experimenty upřednostňujeme pozitivně nabitá sklíčka.
- ✗ Špatně přilnavé řezy se barví nerovnoměrně s variabilně obarveným pozadím.

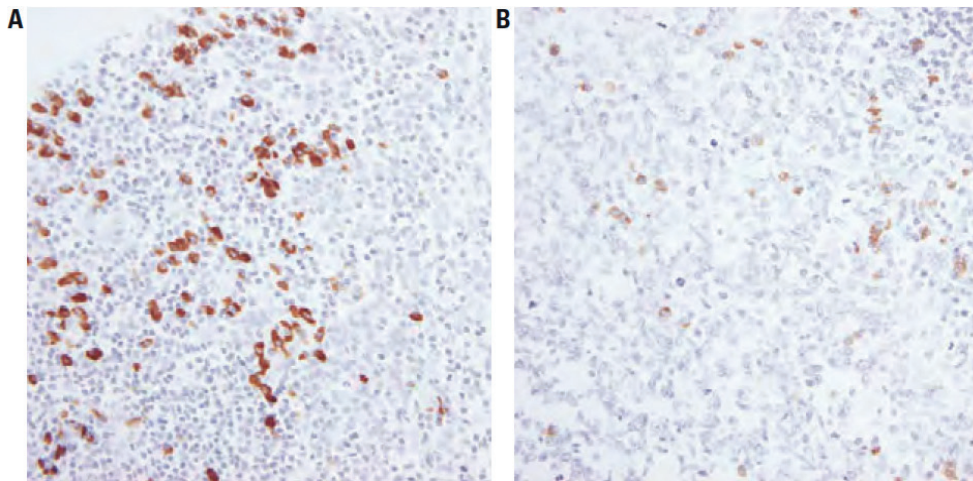


Obr: Tento nekvalitní řez demonstruje plavání tkáně a zbarvení pozadí (HPV).

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 90: Zajistit optimální fixaci

- ✓ Kvalitní fixace za použití známých a konzistentních podmínek (druh fixativa, pH, teplota, čas) vede k nejlepším výsledkům.
- ✗ Nekonzistentní podmínky fixace mají za následek nedofixované či naopak přefixované tkáně. To vede k variabilitě výsledků a problémům spojeným s hledáním řešení.



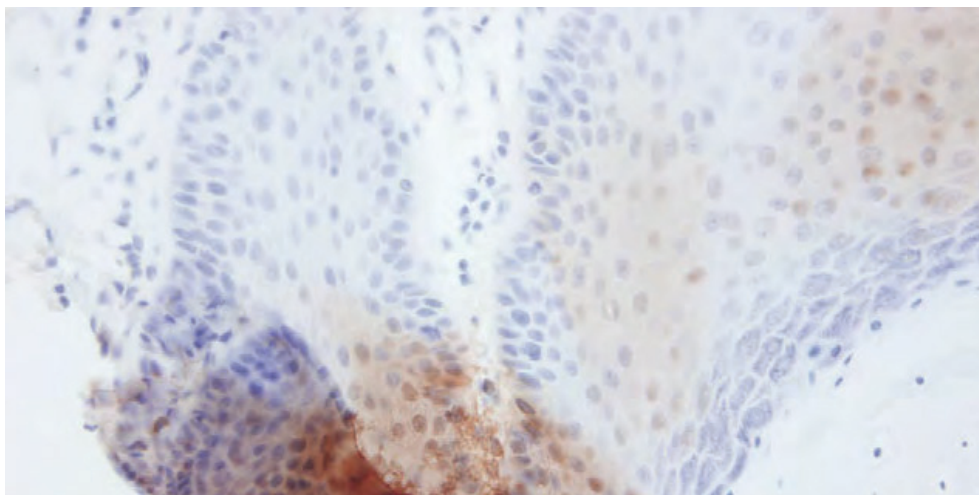
Obr. A) ISH pro detekci mRNA lehkých řetězců kappa na dobře fixované tonsile ukazuje ostrou, silnou reakci.

B) ISH pro detekci mRNA lehkých řetězců kappa na nedostatečně fixované tonsile ukazuje slabou reakci.

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 91: Zamezit problémům s přilnavostí řezů

- ✓ Při napínání řezů v lázni se vyvarujeme použití adheziv na proteinové bázi (různá lepidla, škrob nebo želatina).
- ✗ Taková adheziva mohou zablockovat povrch nabitého podložního sklíčka a zapříčinit špatnou přilnavost řezu. Následně mohou způsobit i zadržování ISH činidel pod nadzvednutými částmi tkáně. Výsledkem toho je nerovnoměrné barvení.

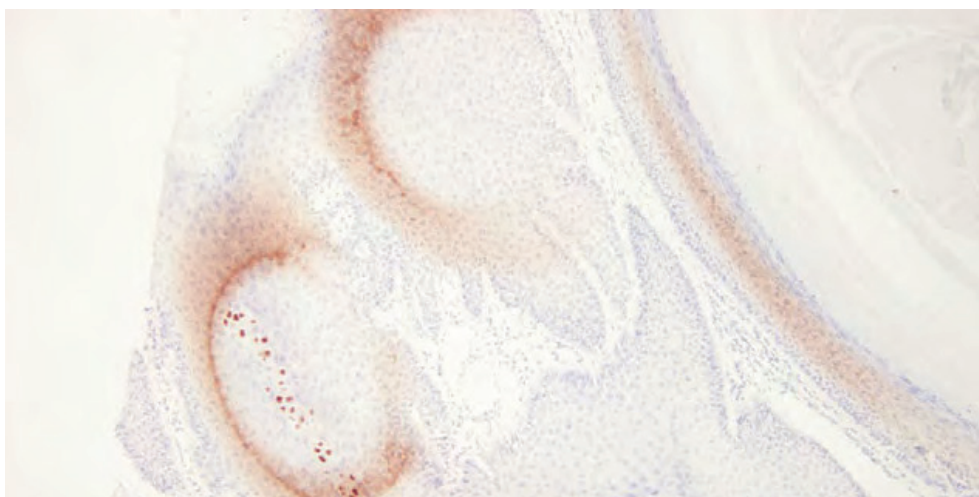


Obr: Nedostatečná adheze řezu a záhyby způsobily nestejněné zbarvení (HPV).

In situ hybridizace (ISH)

- Krok 92: Optimalizovat odstraňování parafínu a dávkování činidel

- ✓ Pro dosažení konzistentních výsledků je třeba optimalizovat deparafinaci a hydrataci řezů a dávkování a rovnoměrnou distribuci činidel po povrchu tkáně.
- ✗ Neúplné odstranění parafínu může vést ke vzniku špatně zbarvených oblastí v řezech. Také bubliny, které se utvoří na povrchu tkáně při odmaskování nebo při aplikaci činidel na tkáň, mohou způsobit problémy.



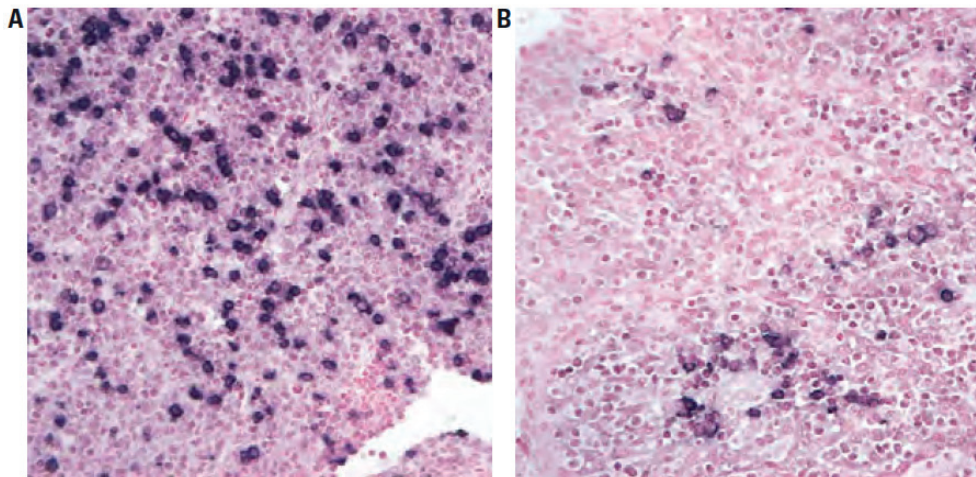
Obr. Bubliny, které se vytvořily během odmaskování při 95oC způsobily nestejně zbarvení (HPV).

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 93: Pečlivě vybírat hybridizační sondu

✓ Při výběru hybridizační sondy klademe důraz zejména na citlivost a specifitu.

✗ „Zajímá nás pouze cena produktu“

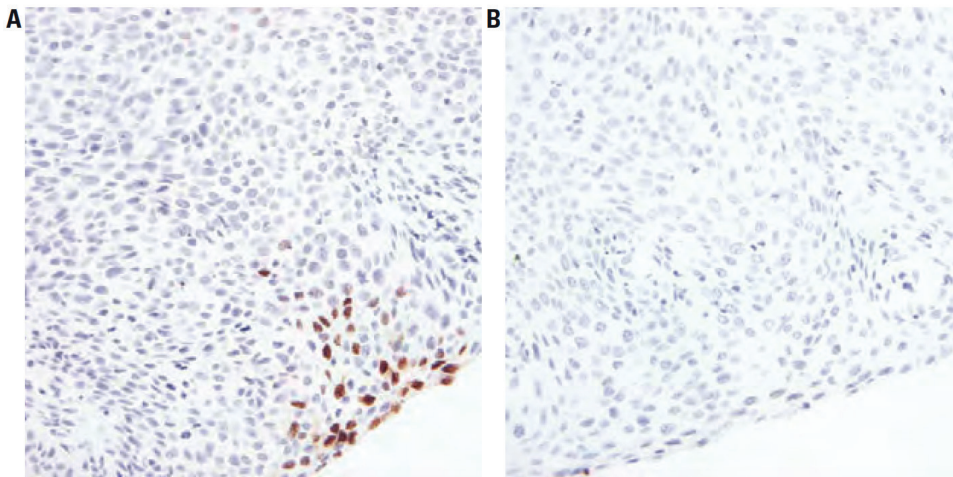


Obr: Stejně řezy tonsily byly hybridizovány dvěma různými sondami proti mRNA kappa lehkému řetězci za použití chromogenu BCIP/NBT. Řez A ukazuje silný signál, zatímco u řezu B je signál slabý a je obarveno i méně buněk.

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 94: Číst návody k sondám

- ✓ Návod by měl být přiložen k sondě nebo by měl být volně ke stažení na internetu. Z návodu se dozvíte základní metodiku, která je pro tu kterou sondu nejvhodnější. Pečlivě zkontrolujte teplotu a čas hybridizace, které povedou k maximální specifické vazbě sondy.
- ✗ „Nemáme přístup k návodům od sond, používáme jen jednu jedinou metodu.“

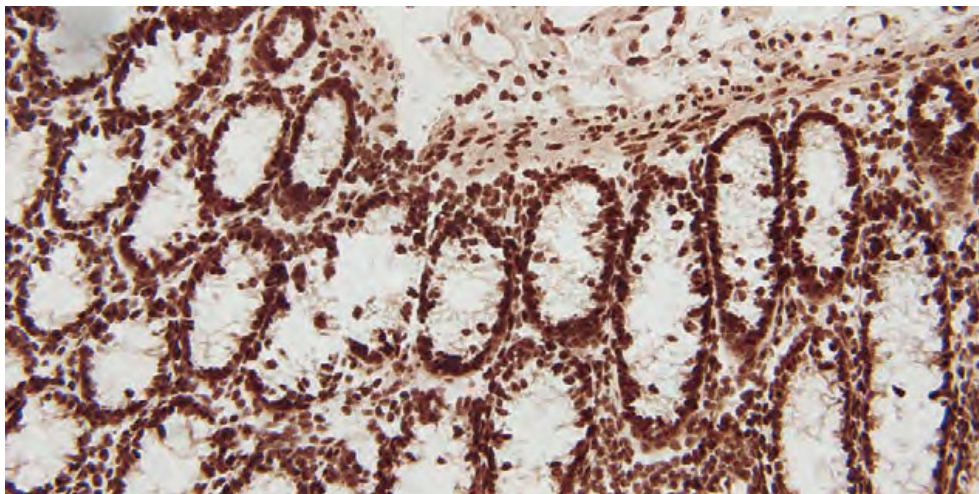


Obr: Oba řezy kondylomu byly hybridizovány na HPV pomocí identické DNA sondy, ale při různých hybridizačních podmínkách. Řez A ukazuje silné zbarvení, zatímco u řezu B je zbarvení nedostatečné.

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 95: Optimalizovat pretreatment

- ✓ Pro jednotlivé sondy jsou stanoveny vhodné podmínky pro pretreatment (pH, pufr, enzym, teplota, čas). Ty závisí zejména na fixaci a typu tkáně.
- ✗ Použití stejného enzymového pretreatmentu pro všechny sondy, může vést k chybným výsledkům.

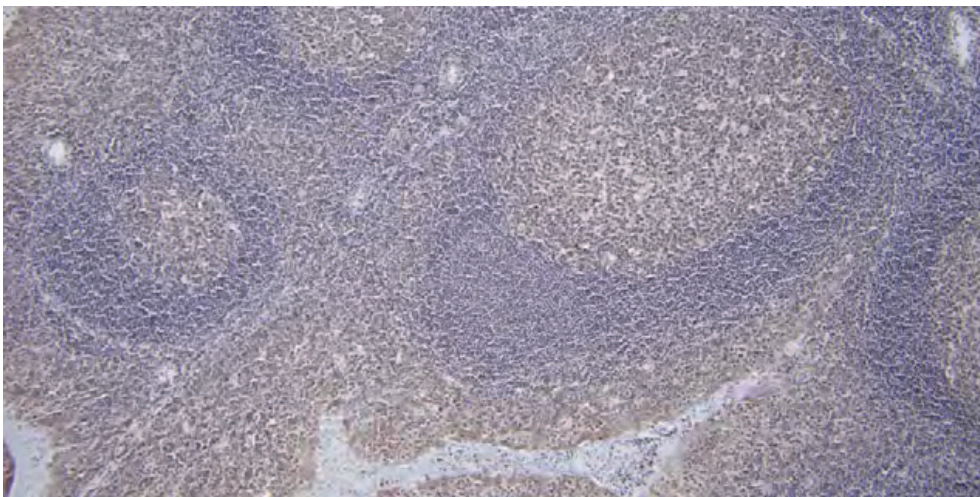


Obr: Tento řez střeva byl hybridizován s pozitivní kontrolní sondou Poly d(T). Na řezu je vidět nadměrné trávení enzymem proteinasou K. Všimněte si ztráty cytoplazmatické struktury v žlazovém epitelu a nadměrného barvení pozadí.

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 96: Šetrně zacházet se vzorky

- ✓ Šetrné zacházení s tkáněmi a rychlá fixace omezí ztrátu RNA působením endogenních RNáz.
- ✗ Nesprávná manipulace se vzorky tkáně a opožděná fixace prohlubuje ztrátu RNA působením endogenních RNáz.

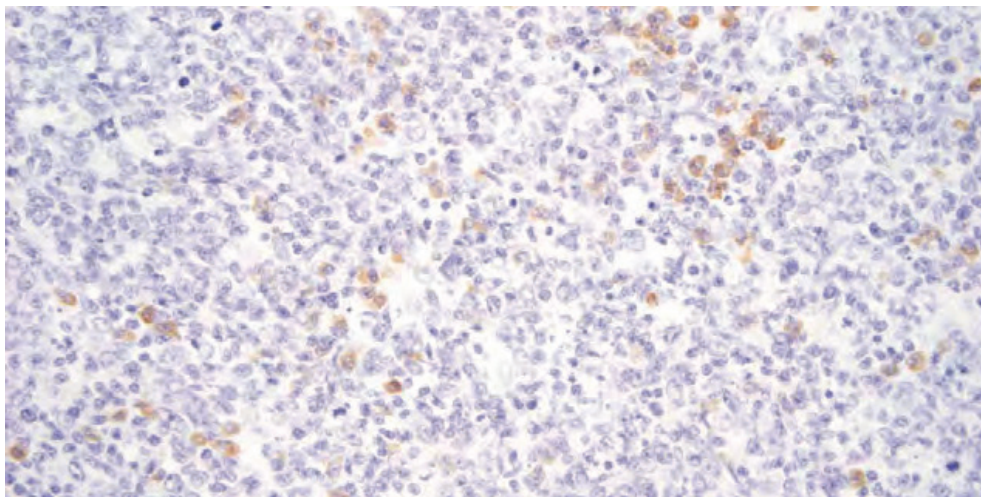


Obr: Slabé zbarvení kvůli degradaci jaderné RNA RNázami. Tonsila hybridizovaná s pozitivní kontrolní sondou Poly d(T).

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 97: Používat vhodný detekční systém

- ✓ Vhodně zvolený, citlivý detekční a vizualizační systém s optimálními inkubačními kroky zajistí přesné specifické barvení s odpovídající citlivostí
- ✗ Nedostatečná citlivost detekčního a vizualizačního systému může vést k velmi slabému nebo dokonce negativnímu barvení, a to i přesto, že je sonda vázána na cíl.

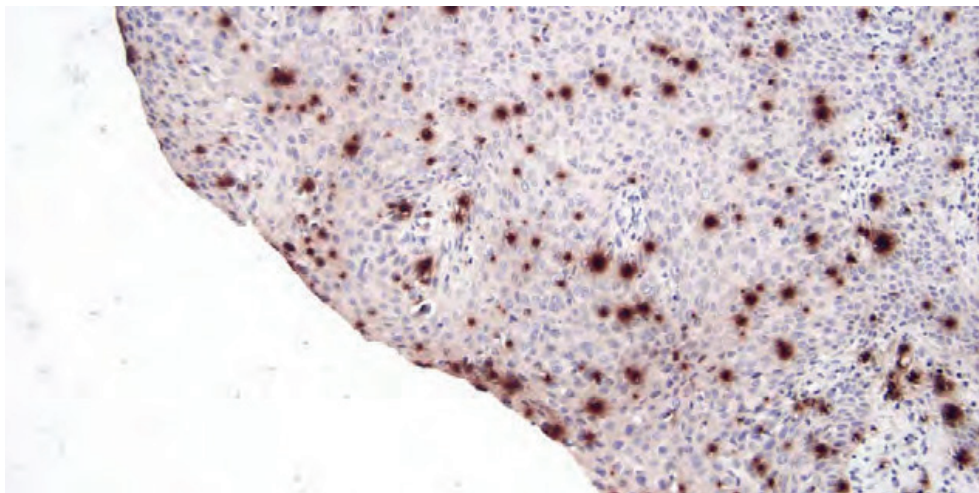


Obr: Slabé zbarvení v tomto řezu je způsobeno nedostatečnou citlivostí detekčního systému. ISH lehkého řetězce lambda s použitím nepolymerního detekčního systému.

In situ hybridizace (ISH)

• Krok 98: Zamezit vypařování činidel

- ✓ Použití správné techniky zabráňující odpařování sondy je zásadní pro správný průběh hybridizace. Dlouhé inkubační časy s sebou nesou riziko vyschnutí reagentie na řezu.
- ✗ Pokud sonda nebo jiná činidla během inkubace vyschnou (obvykle na okrajích řezu), projeví se to jako výrazné nespecifické zbarvení.

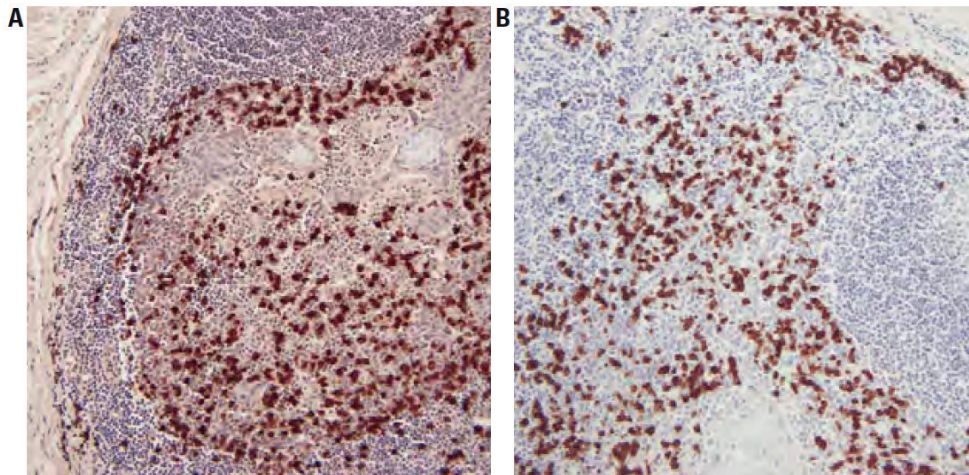


Obr: Tento řez tonsily hybridizovaný sondou pro lehký řetězec kappa během post-hybridizačního promývání formamidovým pufrům vyschnul, což způsobilo nekonzistentní, nespecifické zbarvení.

In situ hybridizace (ISH)

● Krok 99: Standardizovat promývání

- ✓ Konzistentních výsledků je dosaženo, pokud jsou dodrženy podmínky promývání mezi jednotlivými kroky (čas, objem pufru a intenzita promývání).
- ✗ Pokud jsou výsledky velmi variabilní v rámci jednoho barvicího cyklu se stejnou sondou i mezi cykly prováděnými v různých dnech, může to být způsobeno různými promývacími technikami, které používají různí laboranti.

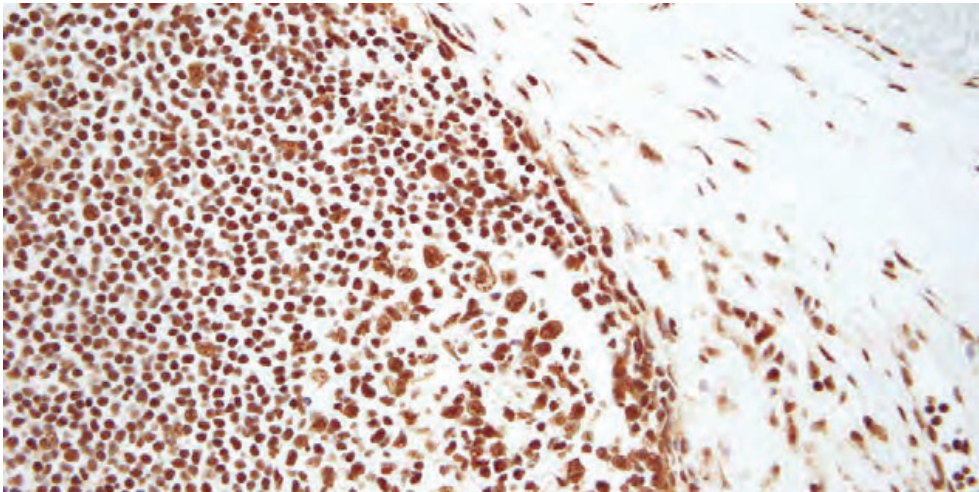


Obr: Stejně řezy tonsily byly hybridizovány dvěma různými sondami proti mRNA kappu lehkému řetězci. Řez A vykazuje silné nespecifické pozadí, zatímco u řezu B bylo promývání provedeno správně a pozadí se neobarvilo.

In situ hybridizace (ISH)

● Krok 100: Používat vhodnou kontrolu

- ✓ Použití vhodných kontrol vede ke kvalitnímu ověření výsledků barvení. To zahrnuje použití pozitivní kontrolní tkáně a negativní kontrolou by měla být nespecifická sonda.
- ✗ "Provádíme kontroly, pouze když se zdá, že naše metoda nefunguje. Kdybychom je udělali na každém skle, stálo by to moc peněz a stejně by se na ně nikdo nedíval."

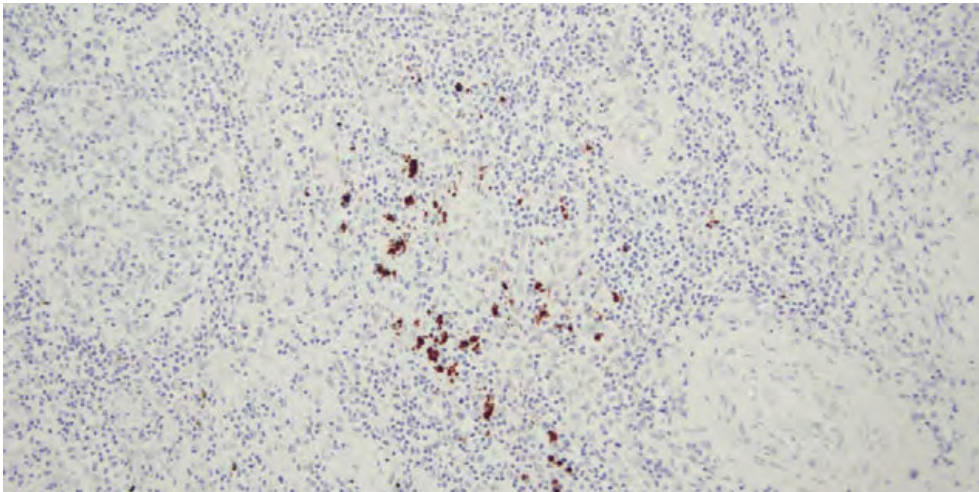


Obr. Řez tonsily hybridizované pozitivní kontrolní sondou Poly d(T). Přesné zbarvení indikuje, že tkáň je dobře fixovaná a úseky RNA budou dobře uchovány.

In situ hybridizace (ISH)

● Krok 101: Výsledky vyhodnocovat opatrně

- ✓ Je nám dobře známo, co a kde máme hledat při vyhodnocování výsledků barvení vzorků i kontrol. Každý, kdo se zabývá ISH, by měl mít alespoň základní povědomí o technice a umět nalézt pozitivní barvení.
- ✗ Spokojíme se s tvrzením, že uspokojivý výsledek barvení je takový, kde je cokoliv jakkoliv obarveno.



Obr: Toto je negativní kontrola. Řez tonsily prošel všemi kroky ISH, ale bez aplikace sondy. Na obrázku je vidět hemosiderin, který má přirozeně hnědou barvu, kterou navíc zintenzivňuje navázaný DAB. V tomto případě se o pozitivní barvení nejedná.



- V případě potřeby nás kontaktujte.

- Mgr. Zuzana Manhartová
zmanhartova@baria.cz
+ 420 735 177 202



- www.baria.cz

Sídlo firmy:
BARIA s.r.o.
Jižní 393
252 44
Psáry - Dolní Jirčany

Kancelář (objednávky):
BARIA s.r.o.
Víteňská 1764/158
148 00, Praha 4
info@baria.cz

IČ: 266 979 04
DIČ: CZ26697904
tel: +420 244 911 228
fax: +420 323 550 123
web: www.baria.cz