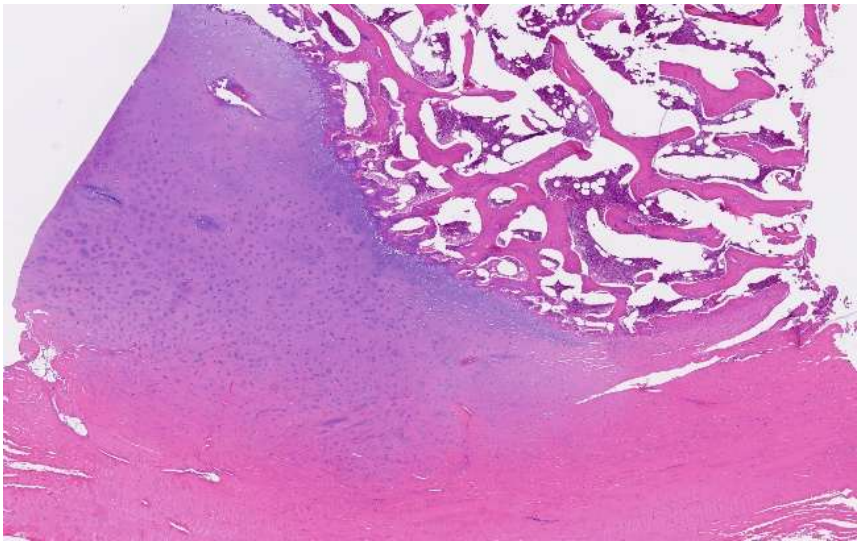
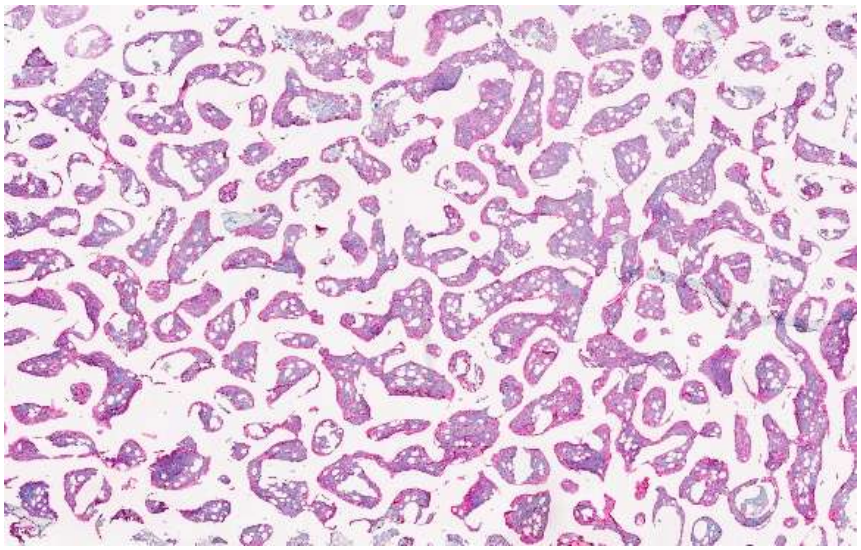
Praxisorientierte Diplomarbeit

Validierung der Entkalkungsmethode von Knochenproben bei Kempf & Pfaltz

Carol Zocchi





Careum AG Bildungszentrum für Gesundheitsberufe,
Höhere Fachschule für biomedizinische Analytik,
Kurs H22, Juni 2025
Kempf und Pfaltz histologische Diagnostik AG

1 Vorwort

Die Entkalkung ist ein zentraler Aspekt bei der Knochenverarbeitung in der Histologie. Ohne diesen Prozess wäre der Knochen zu hart, um diesen zu verarbeiten. Somit könnten keine Gewebsschnitte hergestellt werden, die mikroskopisch befundet werden können. Es gibt viele verschiedene Methoden, um Knochen zu entkalken.
Bei Kempf & Pfaltz werden die Knochen mit einer Kombination aus USEDECALC und USERAPID entkalkt. Diese Methode ermöglicht eine Bearbeitung der Knochen innerhalb eines akzeptablen Zeitraums. Sie ist auch in anderen histologischen Laboren weit verbreitet. Jedoch wurde sie von Kempf & Pfaltz nie im Vergleich mit anderen Methoden erprobt und als die optimale Methode bewiesen. Diese Diplomarbeit dient dazu, dem nachzugehen. Zur standardisierten Validierung der Ergebnisse, wurden zwei wichtige Färbungen genutzt und ausgewertet. Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE-Färbung) für die Morphologie, und die Immunhistochemie-Färbung mit dem MPO-Marker (Myeloperoxidase) für die Immunreaktion.

Für die Hilfe beim Schreiben und Gestalten dieser Diplomarbeit möchte ich mich bei folgenden Personen und Instituten bedanken:
Bei Kempf & Pfaltz, da sie mir die Möglichkeit gaben, diese Diplomarbeit zu schreiben. Meine Praktikumsbetreuerin Daniela Joseph, da sie mich bei jedem Schritt unterstützte und bei Fragen zur Seite stand. Sahika Marszewski, der Laborleitung, für ihre Unterstützung. Der ärztlichen Fachperson Anne-Katrin Zimmermann für das Beurteilen der Schnitte, das Bestätigen des immunhistochemischen Markers und das Auswählen der Krankheiten. Dem Laborteam von Kempf & Pfaltz für die Mithilfe bei den Arbeitsschritten. Dem Schlachthof Zürich für die Bereitstellung der Schweineknochen. Bei meiner Freundin Anna für die Unterstützung mit den Grafiken und das Verbessern der Diplomarbeit. Meinen Freunden für das Gegenlesen des Inhalts. Frau Krayl für die Betreuung meiner Diplomarbeit. Schlussendlich danke ich Eduardo dem Schwein, für die Spende der Knochen.

2 Zusammenfassung

Die zentrale Thematik dieser Diplomarbeit ist die Frage, welchen Einfluss die Säuren USEDECALC und USERAPID auf die Morphologie und die Immunreaktion von Knochen haben. Im Zusammenhang mit der Geschwindigkeit der Entkalkung, des Schwierigkeitsgrads der Verarbeitung und der Qualität des Endproduktes, soll bewiesen werden, dass die bislang genutzte Methode als geeignetste validiert werden kann. Gegebenenfalls soll sie aufzeigen, dass es noch Raum zur Optimierung gäbe.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden Schweineknochen von verschiedenen Lokalisationen verwendet. Knochen vom Kiefer, Beckenkamm und Wirbelsäule wurden gewählt. Für die Entkalkung wurden drei Methoden untersucht. Eine Variante bei der nur USEDECALC verwendet wird, eine bei der nur USERAPID genutzt wird und die bisher verwendete Methode, die Kombination der beiden.
Dafür mussten die Knochen zerkleinert und in Formalin fixiert werden. Nachdem die Fixation vollständig abgeschlossen war, mussten die Proben erneut zerkleinert und den Kassetten zugeordnet werden. Anschliessend konnte die Entkalkung mit den drei Methoden beginnen. Der Entkalkungsgrad wurde regelmässig manuell kontrolliert. Nach der Entkalkung wurden die Säuren von den Proben abgewaschen und zum Entwässern weitergegeben. Nach dem Einbetten konnten die Blöcke geschnitten und gefärbt werden. Von jedem Block wurde eine HE-Färbung und eine Immunhistochemischen-Färbung mit dem Marker MPO durchgeführt. Die Hälfte aller Blöcke wurde zusätzlich mit RDO oberflächenentkalkt, um die Auswirkungen dieser Säure auf das Endresultat zu beobachten. Alle erhaltenen Schnitte wurden von einer ärztlichen Fachperson begutachtet und bewertet. Diese Bewertung diente als Basis der Auswertung. Verschiedene Aspekte wurden in Vergleich gesetzt. Die Dauer der Entkalkung aller Knochenlokalisationen und Entkalkungsmethoden, die Schneidbarkeit der Blöcke sowie die daraus resultierende Morphologie und Immunantwort. Bei der Entkalkungsgeschwindigkeit war sehr klar zu sehen, dass die Standardmethode und die nur USERAPID-Methode, welche beide USERAPID beinhalten, sehr viel schneller beendet waren. Die Morphologie ergab bei allen Methoden sehr ähnliche Ergebnisse. Die Immunantwort war nur bei der Methode, die nur USEDECALC benutzte, am schönsten zu erkennen. RDO hatte bei keiner Auswertung eine klare, negative Auswirkung. Dies wirft die Frage auf, ob aus RDO mehr Nutzen gezogen werden kann, als bisher angewendet wird.

Inhaltsverzeichnis

1 Vorwort I
2 Zusammenfassung II
3 Einleitung 1
4 Theorieteil 4
4.1 Aufbau und Funktion von Knochen 4
4.2 Aussagekraft von Knochenkrankheiten in der Histologie 5
4.2.1 Osteomyelitis 5
4.2.2 Osteonekrose 6
4.2.3 Fibröse Dysplasie 6
4.3 Wichtigkeit der Entkalkung 7
4.4 Wie die Entkalkung am Knochen funktioniert 8
4.4.1 Biochemie der Entkalkung 8
4.4.2 Präanalytische Einflussfaktoren 9
4.4.3 Entkalkung bei Kempf & Pfaltz 10
4.5 Knochen schneiden am Mikrotom 10
4.6 HE-Färbung und Immunhistochemie beim Knochen 11
4.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 11
4.6.2 Immunhistochemische Färbemethode 11
4.6.3 Myeloperoxidase 12
4.7 Säuren und ihr Einfluss auf die HE-Färbung und Immunreaktion 13
4.7.1 USEDECALC 13
4.7.2 USERAPID 13
4.7.3 RDO 13
5 Praxisteil 14
5.1 Planung Durchführung Praxisteil 14
5.2 Durchführung Praxisteil 15
5.2.1 Genutzte Gerätschaften 17
5.3 Ergebnisse 18
5.3.1 Entkalkungszeit der Schweineknochen in Tagen: 18
5.3.2 Schneidbarkeit der Schweineknochen: 19
5.3.3 Qualität der HE-Färbung: 21
5.3.4 Qualität der immunhistochemischen Färbung mit MPO: 22
6 Diskussion 23
6.1 Beantwortung der Fragestellung 23
6.1.1 Vergleich verkürzte Methode und Standardmethode 23
6.1.2 Unterschiede zwischen den Entkalkungsmethoden 24
6.1.3 Unterschiede Knochenlokalisationen 25

7 Reflexion 26
8 Literaturverzeichnis 28
8.1 Abbildungsverzeichnis....29
8.2 Formelverzeichnis....29
8.3 Tabellenverzeichnis....29
9 Persönliche Erklärung und Plagiat....30
10 Anhang 31
10.1 Verwendete KI-Tools 31
10.2 Bilder einiger Objektträger....31
10.3 Protokolle....38
10.3.1 Entkalkungsprotokoll 38
10.3.2 Auswertungsbogen Schneidbarkeit 42
10.3.3 Auswertungsbogen HE-Färbung....50
10.3.4 Auswertungsbogen Immunhistochemie-Färbung....59
10.3.5 Auswertung Entkalkung....68
10.4 Bilder Reagenzienetiketten und Packungsbeilagen als Quellen 71

3 Einleitung

Die histologische Untersuchung von Knochenproben ist ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik in der Histologie. Ihre Bedeutung liegt in den Bereichen der Diagnose von Knochenerkrankungen, Metastasen, Infektionen und Tumoren. Damit der Knochen schneidbar wird, muss er nach der Fixierung mit Säuren entkalkt werden. Ohne die Entkalkung, wäre es fast unmöglich einen Schnitt von Knochen anzufertigen. Somit wäre auch keine genaue Diagnose möglich. Jedoch gibt es verschiedene Säuren und dadurch viele Methoden, um die Entkalkung durchzuführen. Jede Säure hat ihre eigenen Vor- und Nachteile. Diese Faktoren müssen gut bedacht werden, bevor die Entkalkung gestartet werden kann.

Im Privatlabor Kempf & Pfaltz, sowie auch vielen anderen Laboren, wird eine Kombination aus USEDECALC und USERAPID genutzt, um Knochen zu entkalken. Durch die Kombination des schonenden USEDECALC und dem schnellen USERAPID, soll eine optimale Entkalkung erreicht werden. Ob dies tatsächlich der Fall ist, konnte jedoch noch nicht bewiesen werden. Um dem nachzugehen, werden innerhalb dieser Diplomarbeit verschiedene Methoden miteinander verglichen und mit unterschiedlichen Schwerpunkten näher angeschaut.

In diesem Rahmen wurden drei Methoden gewählt:
1. Die Knochenproben werden für fünf Tage ins USEDECALC gelegt. Falls sie noch nicht genügend entkalkt wurden, müssen sie noch so lange wie nötig ins USERAPID gegeben werden. Dies stellt die bisherige Methode dar.
2. Die Proben kommen nur ins USEDECALC, bis die Knochen genügend entkalkt sind. Hier ist Kempf & Pfaltz sich bewusst, dass die Methode sehr langwierig sein wird, die Qualität sollte dafür umso besser sein, da es sich um ein sanftes Entkalkungsmittel handelt. Sie sollte als bestmöglicher Richtwert dienen.
Da sie sehr viel Zeit benötigt, ist sie nicht geeignet für Routineprozeduren. Für Diagnosen, welche ein PCR-Verfahren benötigen, wird sie dennoch angewendet, jedoch kann dann kein schnelles Ergebnis versprochen werden.
3. Die Proben kommen nur ins USERAPID, bis die Knochen genügend entkalkt sind. Diese Methode verspricht sehr schnell zu sein. Jedoch besteht die Besorgnis, da es eine aggressive Säure ist, dass die Qualität der Morphologie und die Immunreaktion zu stark beeinträchtigt werden, sodass sie nicht geeignet ist. Dass diese Aspekte darunter leiden, wurde bei Kempf & Pfaltz noch nicht belegt. Den Literaturen kann aber entnommen werden, dass das starke Entkalkungsmittel Nukleinsäuren zerstört. Durch die Beschädigung der DNA können mit diesem Entkalkungsverfahren keine PCR-Tests an Proben durchgeführt werden, da diese vermutlich negative Ergebnisse ergeben würden.

So kann mit der ersten Fragestellung begonnen werden:
-In welchem Mass kann die verkürzte Methode mit der bisherigen Entkalkungsmethode mithalten, ohne die Morphologie (mit HE-Färbung) oder die Immunhistochemie (mit MPO) zu beschädigen?

Hier soll verglichen werden, ob die verkürzte Methode mit nur USERAPID tatsächlich einen grossen Unterschied in der Morphologie und Immunantwort zur bisherigen Methode verursacht. Da bei der Standardmethode ebenfalls USERAPID genutzt wird, kam die Frage auf, wie viel sich ändern würde, wenn der USEDECALC-Schritt ausgelassen wird. Da der Hauptmerk war, ob von der bisherigen Methode auf die verkürzte gewechselt werden kann, wurde diese Frage nur in Bezug auf die beiden Methoden formuliert.

-Was sind die Unterschiede in Bezug auf die Morphologie und Immunhistochemie von verschieden Entkalkten Knochenschnitten?

Diese Fragestellung bezieht sich nun auf alle Methoden. Im Gegensatz zur ersten Frage, bei der zwei Methoden im direkten Vergleich stehen, werden hier alle Methoden innerhalb der Unterschiede betrachtet. Hierbei wird vor allem die Qualität der Morphologie und Immunhistochemie bewertet, da diese schlussendlich mehr Wertung hat als die Dauer der Entkalkung und die Schneidbarkeit der Knochen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die anderen Faktoren unwichtig sind. Am Ende muss alles im Gleichgewicht sein, damit eine standardisierte Methode als optimal bewertet werden kann.

-Wie verhält sich das Entkalkungsergebnis bei verschiedenen Knochenproben (Kiefer, Wirbelsäule mit Rückenmark und Beckenknochen vom Schwein)?

Die gewählten Knochenlokalisationen sind alle sehr unterschiedliche in ihrem Aufbau und Struktur. Darum werden auch untereinander verschiedene Ergebnisse erwartet. Die Ergebnisse des Kiefers sind hier besonders interessant, da bei Kempf & Pfaltz vor allem Knochen von Kieferproben eingesendet werden. Zwar wäre noch spannend gewesen, die Zähne miteinzubeziehen, da diese ebenfalls regelmässig eingesendet werden. Der Kiefer, welchen wir erhalten haben, hatte keine Zähne darin, darum kann dem hier nicht nachgegangen werden.
Die Wirbelsäule mit Rückenmark ist gerade wegen des Knochenmarks wichtig. Der Knochen an sich hat nicht viele Antigene, die mit Antikörpern gefunden werden können. Darum steht bei der immunhistochemischen Untersuchung der Knochen das Knochenmark im Mittelpunkt. Dort gibt es viele verschiedene Antigene, welche klinisch relevant sind. Besonders beim Rückenmark, so kann die durch die Säure veränderte Immunantwort dort ideal beobachtet werden. Ebenfalls ist hier, wie auch im Kiefer, Spongiosa mit dem Knochenmark zu finden.
Der Beckenkamm dagegen besteht hauptsächlich aus Kompakta. Diese hat eine sehr dichte Struktur. So ist es interessant zu sehen, wie der Entkalkungsprozess, die Verarbeitung und auch das Ergebnis herauskommen, wenn es sich um solches Material handelt. Die Vermutung liegt hier, dass die Entkalkungszeit verlängert wird, da das Entkalkungsmittel nur schwer in das Gewebe eindringen kann. Zusätzlich wird die Schneidbarkeit erschwert, da die Probe trotz Entkalkung noch immer härter ist.

Je nachdem, wie die Ergebnisse aussehen, kann belegt werden, dass die aktuell genutzte Methode die bestmögliche ist. Sie kann dann verifiziert und weiterhin angewendet werden. Wenn jedoch herauskommt, dass eine andere Methode sich in der Routine besser eignen würde, könnte auf diese Methode gewechselt werden, um den Entkalkungsprozess zu optimieren.
Schlussendlich soll die Methode gewählt werden, die eine gute Qualität in der Morphologie mit einer HE-Färbung aufweist, eine klar ersichtliche Immunreaktion beweist, gut schneidbar ist und eine kurze Entkalkungszeit hat.

Zunächst folgt der Theorieteil, in dem grundlegende Themen behandelt werden. Wichtige Punkte zu Knochen, Entkalkung, Bearbeitung von Knochenproben, HE-Färbung, Immunhistochemie inklusive Myeloperoxidase-Marker sowie die verschiedenen Säuren und deren Wirkung, werden aufgezeigt. Diese dienen als Grundlage, um die Diplomarbeit im Ganzen zu verstehen.
Die Auswahl der Literatur beruhte grösstenteils darauf, Informationen zu wählen, die von Firmen und Herstellern breitgestellt wurden. Auch Internetseiten, die von ärztlichen Fachpersonen empfohlen wurden, dienten als Quellen. Darunter sind Texte, die von anderen Laboren oder Organisationen zur Verfügung gestellt wurden. Einige Literaturen stammen auch aus Unterlagen von Kemp & Pfaltz oder Beschreibungen auf Etiketten von Reagenzien, die sich im Labor befanden.

Danach wird beschrieben, wie der praktische Teil durchgeführt werden sollte, und wie dieser tatsächlich verlief. Die genutzten Schweineknochen sollten dabei einen möglichst gleichen Ablauf wie Routine Proben durchlaufen. Es wurde auf Hilfsmittel verzichtet, die vielleicht bessere Ergebnisse liefern könnten, wenn sie in der Routine nicht angewendet werden. Die Ergebnisse sollten möglichst eine alltägliche Aufbereitung widerspiegeln, auch wenn dies negative Auswirkungen haben könnte.

Im Anschluss folgt die Diskussion, in der die Ergebnisse mithilfe von Grafiken aufgezeigt und verglichen werden. Die Fragen, die zuvor beschrieben wurden, werden beantwortet. Zum Schluss folgt die Reflexion. Dort werden Probleme, Erkenntnisse und andere Gedanken aufgezeigt, die während der Erstellung der Diplomarbeit aufkamen.

4 Theorieteil

4.1 Aufbau und Funktion von Knochen

Knochen bilden das Grundgerüst des Körpers. Sie haben eine Stütz- sowie auch eine Schutzfunktion. Mithilfe der Muskeln ermöglichen sie uns die Bewegung. Durch die Funktion der Knochen, müssen diese auch dementsprechend stabil sein, damit sie unser Körpergewicht tragen können und bei äusseren Einwirkungen nicht gleich brechen. Darum gehören Knochen zu einer der härtesten Materialien im Körper.
Neben den bereits genannten Funktionen beteiligen sie sich ebenfalls an der endokrinen Regulation, da sie als Hauptspeicher von Calcium und Phosphaten dienen. Diese können sie bei Bedarf durch Hormone in den Kreislauf abgeben. Im Inneren der Knochen liegt das Knochenmark, welches wieder eine eigene Funktion hat.

Das Knochengewebe ist kein totes, sondern lebendes Material. Es besteht zu etwa 25% aus organischen und zu 55% aus anorganischen Substanzen, die restlichen 20% sind Wasser (Beyer & Irmtraud, 2012).
Wie alle Bestandteile des Körpers bestehen auch Knochen aus Zellen, den sogenannten Osteozyten (Leica Biosystems, o.A.-a). Diese Knochenzellen stellen die organischen Komponenten dar. Zusätzlich produzieren sie die Grundsubstanz. In dieser befinden sich Kollagenfasern, welche zugfest, aber nicht elastisch sind. Die anorganischen Bestandteile bestehen aus einer mineralisierten Matrix, die unter anderem Calciumphosphat und Calciumkarbonat enthält. Die Zusammensetzung dieser Komponenten macht den Knochen druckfest und dennoch zu einem gewissen Grad elastisch (Beyer & Irmtraud, 2012).

Je nach Funktion sind Knochen unterschiedlich aufgebaut, um verschiedene Aufgaben zu erfüllen. Die Kompakta ist durch ihre dichte Struktur, welche auf einer definierten Anordnung von zylindrischen Gebilden, den Osteonen, basiert, sehr hart. Diese kommt vorwiegend an Stellen vor, die viel Gewicht standhalten müssen. Beispiele hierfür sind Röhrenknochen wie der Femur. Sie sind auch im Schädel vertreten, um das empfindliche Gehirn zu schützen. Dagegen ist die Spongiosa ein sehr fein gegliederter Knochen. Sie besteht aus vielen dünnen Bälkchen, den Trabeculae, was dazu führt, dass er viele Hohlräume aufweist. Diese eignen sich als Aufenthaltsbereich für das Knochenmark, welches, durch die Lage im Inneren der Röhrenknochen oder der Wirbel durch die umliegenden Knochenstrukturen gut geschützt wird. Im Knochenmark finden die Hämatopoese und die Leukozytopoese statt (Beyer & Irmtraud, 2012).
Ausserdem helfen die Hohlräume dabei, unsere Knochen etwas leichter zu machen und unser Körpergewicht zu reduzieren.

4.2 Aussagekraft von Knochenkrankheiten in der Histologie

4.2.1 Osteomyelitis

Eine Osteomyelitis ist in Grunde genommen eine Entzündung der Knochen, spezifischer von allen Knochenschichten. Diese Entzündungen können verschiedene Auslöser haben. Generell sind es die Bakterien, die im Mundraum leben (USZ, 2025).
Es können aber auch Mykobakterien oder Pilze sein (MSD Manual, 2024).
Je nach Ausmass der Entzündung kann sich eine Osteomyelitis auch in eine Osteonekrose entwickeln. Osteomyelitis wird in zwei Formen unterschieden, in eine akute und eine chronische. Als chronische Osteomyelitis gilt eine Infektion die länger als vier Wochen andauert.
Jeder Mensch hat physiologisch Bakterien im Mund, welche im Normalfall keine Probleme verursachen. Der Körper kann durch seine Abwehrmechanismen einer Infektion vorbeugen. Wenn dies jedoch nicht gegeben ist, können die Erreger über Zähne oder das Zahnfleisch bis zum Knochen vordringen. Auch können Bakterien die Überhand erlangen, wenn es eine grosse Anzahl von Erregern gibt, diese sehr aggressiv sind oder das Immunsystem geschwächt ist.
Bereits bestehende Krankheiten können eine Infektion begünstigen. Zu typischen Grunderkrankungen gehören Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, Anämie und auch Leukämie. Auch Zahnfleischentzündungen, nicht durchgebrochene Zähne, Brüche im Kieferknochen, welche nicht genügend behandelt worden sind, oder Komplikationen nach einem operativen Eingriff, können zu einer Osteomyelitis führen.
Eine funktionierende Immunabwehr und eine gute Gewebedurchblutung sind wichtig, um eine Infektion zu bekämpfen. Die Gewebedurchblutung spielt hierbei eine grosse Rolle. Bei mangelnder Durchblutung können die Zellen des Immunsystems nur erschwert zum Infektionsbereich gelangen. Zusätzlich können weniger Sauerstoff und Nährstoffe zum Gewebe transportiert werden. Viele Erreger bevorzugen eine sauerstoffarme Umgebung und vermehren sich unter solchen Umständen stärker. Bestimmte Risikofaktoren können dazu beitragen, dass die Gewebedurchblutung verschlechtert wird. Dazu zählen Rauchen, Diabetes mellitus und Knochenkrankheiten (USZ, 2025).

Um eine Diagnose stellen zu können, wird empfohlen, eine Biopsie des Knochengewebes zu entnehmen und dieses näher zu untersuchen. Es ist wichtig, die Art der Veränderung festzustellen, um auszuschliessen, ob es sich um ein Krebsgeschehen handelt (USZ, 2025).
Bei einer Osteomyelitis wird das Knochengewebe geschädigt, indem Leukozyten in den infizierten Bereich wandern, damit sie die Ausbreitung der Erreger verhindern. Sie sondern lytische Enzyme ab, die jedoch nicht nur den Auslöser der Entzündung schädigen, sondern auch zur Auflösung von Knochensubstanz führt. Diese Zerstörung von Gewebe führt auch dazu, dass andere Abschnitte vom Blutstrom nicht mehr erreicht werden, was dann schlussendlich zum Absterben dieses Bereichs, also der Nekrose, führen kann. Diese Zerstörung führt ebenfalls zur Neubildung von Knochengewebe (DocCheck Flexikon, 2025).
Durch diese atypische Knochenstruktur, welche durch den Ab- und Aufbau von Knochengewebe entstanden ist, und der Nachweiss von Bakterien oder anderen Erregern, kann mit der korrekten Färbung die Osteomyelitis diagnostiziert werden. Für die Diagnostik würden sich folgende Färbungen anbieten: Eine HE-Übersichtfärbung, um die Morphologie zu beurteilen, eine von Kossa, um die Veränderung innerhalb der Knochenstruktur zu erkennen, eine Brown Brenn- oder eine Gram-Färbung, um Bakterien darzustellen, Ziehl Neelsen für Mycobacterien und eine PAS-Färbung für den Nachweis von Pilzen.

4.2.2 Osteonekrose

Eine Osteonekrose bezeichnet das Absterben von Knochengewebe. Dies kann aus diversen Gründen entstehen. Am häufigsten sind eine ausgeartete Osteomyelitis, gewisse Medikamente, welche den Knochenaufbau verringern oder auch nach Traumata oder Bestrahlungen am Knochen (USZ, 2025).
Wenn die Blutzufuhr im Knochengewebe nicht mehr gegeben ist, kann es nicht mehr mit Nährstoffen, Sauerstoff oder Mineralstoffen versorgt werden. Es demineralisiert und stirbt schlussendlich ab. Der Knochen wird insgesamt instabiler, sodass noch mehr kleine Frakturen entstehen, bis er komplett zusammenbricht (MVZ Gelenk-Klinik, 2025).
Je nach vermuteter Ursache der Krankheit, muss hier eine Biopsie entnommen werden und wie bei der Osteomyelitis abgeklärt werden, um ein malignes Geschehen auszuschliessen.

4.2.3 Fibröse Dysplasie

Bei einer fibrösen Dysplasie baut der Körper Knochen in einem untypischen Muster auf. Es entstehen Fehlbildungen im Knochengewebe, welche sich als geschwulstartige Ausstülpungen äussern. Diese können zu Bewegungseinschränkungen und auch Schmerzen führen. Die Ursache dieser Krankheit beruht auf einer Mutation. Es handelt sich um eine Schädigung des GNAS-Gens. Diese Mutation hat verschiedene Auswirkungen im Körper. Eine davon ist, dass der Ablauf der Differenzierung von Knochenzellen gestört wird. Dadurch entsteht ein unkontrolliertes Wachstum von Knochengewebe. Die Krankheit ist nicht genetisch vererbbar. Meistens sind Kinder oder junge Erwachsene davon betroffen.
Die Fibröse Dysplasie kann in verschiedenen Formen, Schweregraden und Lokalisationen auftreten. Die meisten Formen sind jedoch asymptomatisch und werden nur zufällig entdeckt. Zur Diagnostik kann unter anderem eine Knochenbiopsie entnommen werden. Da hier die Struktur gestört wird, kann mit einer Übersichtsfärbung, der HE-Färbung, die Bestandteile des Knochens dargestellt werden. Das Bild würde sich als einen wirren und atypischen Aufbau erkenntlich zeigen (DocCheck, 2021).
Da es sich um eine Veränderung des GNAS-Gens handelt, wird meistens mithilfe eines PCR-Verfahren die Mutation nachgewiesen.

4.3 Wichtigkeit der Entkalkung

Eine Grundeigenschaft von Knochen ist es, dass sie sehr hart sind. Diese Eigenschaft ist im Alltag von hoher Wichtigkeit, jedoch wenn es darum geht, einen wenige Mikrometer dicken Schnitt vom Knochen herzustellen, macht genau diese Eigenschaft Probleme. Der Knochen ist durch seine Zusammensetzung nicht sehr flexibel. Wenn dieser ohne Vorbehandlung mit der Klinge eines Mikrotoms geschnitten wird, zerbricht und splittert er leicht. Zusätzlich macht das feste Material die Klinge kaputt. So ist unbehandelter Knochen in diesem Rahmen nicht schneidbar.
Darum ist es wichtig, dem Knochen diese harten Komponenten zu entziehen, damit nur das weichere Material zurückbleibt. Wenn der harte Teil entfernt ist, bleibt die Struktur noch immer ersichtlich. Darum können repräsentative Schnitte angefertigt werden, welche gefärbt und untersucht werden können.
Diesen Prozess wird Entkalkung genannt, da vor allem der Kalk entfernt wird. Jedoch kann auch Demineralisierung dazu gesagt werden, da sich im Grunde auch andere Mineralien lösen. Die Entkalkung ermöglicht auch Knochenmark zu untersuchen und nach Tumoren, Infektionen und anderen Krankheiten zu suchen. Natürlich muss im Zusammenhang mit der Fragestellung abgewogen werden, ob eine Entkalkung Sinnvoll ist. Wenn die Fragestellung zu einer metabolischen Knochenerkrankung besteht und nach einer Veränderung bezüglich der Mineralien gesucht wird, würde eine andere Methode gewählt werden, um eine Untersuchung ohne Entkalkung zu ermöglichen (Leica Biosystems, o.A.-a).
Um zu Entkalken gibt es verschiedene Arten und auch Lösungsmittel, hier wird aber nur die Methode, welche bei Kempf und Pfaltz angewendet wird, beschrieben. Zudem können nicht nur Knochen entkalkt werden, jedoch liegt hier der Fokus auf diesem Probenmaterial und darum werden andere Situationen, bei denen ebenfalls entkalkt wird, aussen vorgelassen.

4.4 Wie die Entkalkung am Knochen funktioniert

4.4.1 Biochemie der Entkalkung

In der Knochenmatrix liegt das Calcium in Form von Hydroxyapatitkristallen ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) vor. Diese sind zwischen den Faserelementen abgelagert. Durch die Entkalkung lösen sich diese Kristalle auf. Dadurch bleibt die Gewebekohäsion erhalten und die Probe gleicht nun einem dichten, fibrösen Bindegewebe (Leica Biosystems, o.J).

Auf biochemischer Ebene ist die Entkalkung ein sehr komplexer Vorgang. Hier wird sie sehr vereinfacht dargestellt. Um diesen Teil simpel zu halten, wird nur die Entkalkung mithilfe von EDTA, auf dem USEDECALC basiert, erklärt.
Zuerst muss verstanden werden, wie die molekulare Struktur von den Stoffen aufgebaut ist.

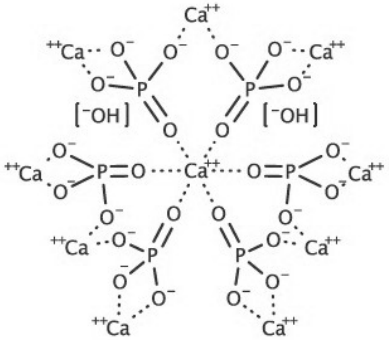


Abbildung 1
Molekulare Struktur von Hydroxyapatit
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
(Quelle: Modifiziert nach EPRUI Biotech Co. Ltd., 2021)

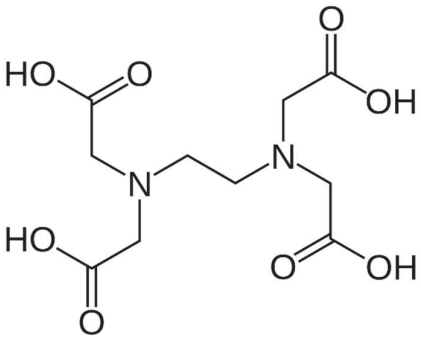


Abbildung 2
Molekulare Struktur von EDTA
$C_{10}H_{16}N_2O_8$
(Quelle: Wikipedia, 2025)

Das Hydroxyapatit ist ein Molekül, bei dem sich Calcium-Ionen, genauer gesagt Ca^{2+}-Ionen, im Zentrum und an den Rändern eines Gitters befinden, wie in Abbildung 1 erkennbar. Im Knochen werden viele dieser Moleküle aneinandergereiht, sodass ein dichtes Netz entsteht. Die oberste Reihe von Atomen im Knochen bestehen ebenfalls aus Calcium-Ionen (Chemie.de, o.A.-a).

Die relevanten Formeln sind die folgenden:

1. $2C_{10}H_{16}N_2O_{8\,(aq)} \rightleftharpoons 2C_{10}H_{12}N_2O_8{}^{4-}{}_{(aq)} + 8H_3O^+$
Formel 1 Deprotonierung von EDTA (Quelle: Chemie.de, o.A.-a)

Die Formel 1 zeigt die Deprotonierung von EDTA (Abbildung 2) in einer wässrigen Lösung. Eine Deprotonierung bedeutet die Abgabe von Protonen, also H^+-Ionen. Das «(aq)» zeigt an, dass es in Wasser gelöst ist. Der Doppelpfeil gibt an, dass die Reaktion in beide Richtungen abläuft. Hier läuft sie jedoch von links nach rechts viel stärker ab.
EDTA ist ein sehr stabiles Molekül. Die OH-Gruppen sind in einer wässrigen Lösung jedoch sehr reaktiv. Darum spaltet es ohne grossen Einfluss die vier H^+-Ionen ab. Die restlichen Atome stammen vom Wasser. Das entstandene H_3O^+ senkt den pH-Wert und macht die Lösung sauer.

2. $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 8H_3O^+ \rightleftharpoons 10Ca^{2+} + 6PO_4^{3-} + 10H_2O$
Formel 2 Demineralisierung Hydroxyapatit (Quelle: Monova, 2011)

Bei Formel 2 wird die Demineralisierung durch die Säure dargestellt. Das Hydroxyapatit reagiert mit dem H_3O^+. Das H_3O^+ aus der Deprotonierung löst Calcium-Ionen aus den Hydroxyapatitkristallen heraus, anfangend mit den äusseren Calcium-Ionen am Knochen. Es bleibt Phosphat als $6PO_4^{3-}$ zurück und es entsteht H_2O, also Wasser.
Bei der Demineralisierung werden auch andere Calcium-Ionen aus anderen Mineralien gelöst, zum Beispiel aus Kalk. Die Summenformel von Kalk ist $CaCO_3$. Darum entstehen bei einer Entkalkung auch Gase, da CO_2 abgespaltet wird. Auch hier läuft die Reaktion in beide Richtungen ab. Also kann das Calcium auch wieder zu Hydroxyapatit reagieren. Die letzte Formel wirkt dem jedoch entgegen (Monova, 2011).

3. $Ca^{2+} + C_{10}H_{12}N_2O_8^{4-}{}_{(aq)} \rightleftharpoons CaC_{10}H_{12}N_2O_8^{2-}{}_{(aq)}$
Formel 3 Komplexbildung (Quelle: Chemie.de, o.A.-b)

Zum Schluss folgt die Komplexbildung (siehe Formel 3). Die Reaktion läuft von links nach rechts stärker ab.
Das deprotonierte EDTA bindet jeweils ein Calcium-Ion. Dieses wird ins Zentrum gesetzt, wie in Abbildung 3 zu sehen.

Da das Calcium in diesem Calcium-EDTA-Komplex gebunden ist, kann es nicht mehr in den Knochen eingelagert werden.
Da jedoch immer nur ein Calcium-Ion gebunden wird, und im Hydroxyapatit viel Calcium eingelagert ist, wird auch dementsprechend viel EDTA benötigt. Die Menge an Säure bestimmt, wie viel H_3O^+ entstehen kann. Je mehr, desto schneller kann die Entkalkung ablaufen (Chemie.de, o.A.-b).

Das Entkalkungsprinzip ist bei USERAPID dasselbe wie bei EDTA. Bei USERAPID kann jedoch mehr H_3O^+ entstehen. Dadurch ist das aggressivere Entkalkungsmittel auch deutlich schneller.

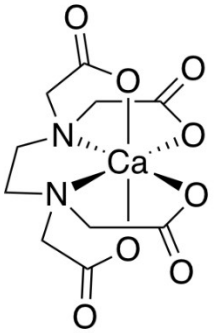


Abbildung 3
Calcium-EDTA-Komplex
$CaC_{10}H_{12}N_2O_8^{2-}$
(Quelle: Chemistry, 2017)

4.4.2 Präanalytische Einflussfaktoren

Bei einer guten Entkalkung spielt die Fixierung eine wichtige Rolle. Wird diese nicht gründlich durchgeführt, kann es zu säureinduzierten Schäden kommen, besonders das Knochenmark leidet darunter. Durchgeführte Färbungen würden ein schlechteres Ergebnis liefern. Deshalb muss bei Knochen eine längere Fixierungszeit eingeplant werden. Um den Fixierungsprozess zu beschleunigen, sollte möglichst alles Weichgewebe und die Haut entfernt, und die Proben so früh wie möglich in kleine Stücke zerteilt werden. So wird mehr Oberfläche für das Fixationsmittel geboten und es kann leichter eindringen. Das Fixiermittel sollte regelmässig ausgewechselt und in ausreichender Menge bereitgestellt werden, da es sich mit der Zeit verbraucht.
Ebenfalls ist wichtig zu wissen, was für eine Knochenart entkalkt wird. Die Spongiosa wird durch ihren schwammigen Aufbau leichter durch Lösungsmittel infiltriert als die dichte Kompakta. Die Entkalkungsgeschwindigkeit kann durch Bewegung ebenfalls gesteigert werden. Darum ist ein Schallwasserbad zu empfehlen, besonders wenn erwärmtes Wasser verwendet wird. Die Wärme kann ebenfalls helfen, jedoch muss darauf geachtet werden, dass die Temperatur nicht zu hoch ist, da dies wieder zu Gewebeschäden führen kann (Leica Biosystems, o.A.-a).

Für einige Fragestellungen muss aufgepasst werden, welches Entkalkungsmittel gewählt wird. Einige Säuren sind sehr aggressiv gegenüber dem Gewebe und können Nukleinsäuren zerstören, die Grundbausteine der DNA. So wären Untersuchungen mit PCR nicht mehr möglich. Bei den Krankheiten, bei denen eine Untersuchung des Erbgutes essenziell ist, sollte deshalb ein schonendes Entkalkungsmittel gewählt werden, auch wenn die Entkalkungszeit wesentlich verlängert wird.

4.4.3 Entkalkung bei Kempf & Pfaltz

Bei Kempf und Pfaltz läuft die Entkalkung so ab, dass das zerkleinerte und von anderem Gewebe befreite Material in eine Kassette gelegt wird. Je nach Fragestellung und den durchzuführenden Untersuchungen muss dann das geeignete Entkalkungsmittel gewählt werden. Die gewählte Säure wird in einen geeigneten Behälter gegeben, in dem dann die Knochenproben eingelegt werden. Der Behälter wird in ein Schallbad platziert, bis die Knochen ausreichend entkalkt sind. Die Säure muss täglich gewechselt und die Proben regelmässig kontrolliert werden. Sobald der Knochen genügend entkalkt ist, wird er mit Leitungswasser gewässert, um die Säure abzuspülen. Anschliessend kann er zur Entwässerung weitergegeben und wie andere Probenmaterialien weiterverarbeitet werden.

4.5 Knochen schneiden am Mikrotom

Das Schneiden von Knochen hat wesentliche Unterschiede zum Schneiden von weichem Gewebe. Auch wenn die Knochen einen Entkalkungsprozess durchlaufen haben, sind sie dennoch schwieriger zu schneiden. Sie haben noch immer eine grössere Chance, um zu zerbrechen oder aus dem Block zu spicken.
Deshalb muss bereits beim Anschneiden mehr Vorsicht geboten werden. So muss am Mikrotom mit einer Schnittdicke von etwa 3 µm -5 µm angeschnitten werden und mit langsameren Handbewegungen gearbeitet werden. Ebenfalls müssen andere Objektträger gewählt werden. Solche mit stärkerer Haftung, da Knochen sonst leicht abschwimmen können. Ein Beispiel wäre Superfrost Plus.
Die Knochen werden mit einer Schnittdicke von 1.5 µm geschnitten und mit 2 µm getrimmt. Sobald die Schnitte aufgezogen wurden, dürfen sie nicht auf der Wärmeplatte gestreckt werden, sondern mit einem Warmwasserbad. Dies ist wichtig, da die spezielle Adhäsion der Superfrost Plus Objektträger durch hohe Temperaturen geschädigt werden kann. Danach können sie wie andere Proben behandelt werden.
Falls beim Schneiden der Knochen, Probleme auftreten, da die Proben doch nicht ausreichend entkalkt wurden, verwendet Kempf & Pfaltz RDO, um die Oberflächen zu entkalken. Dazu wird eine kleine Menge von RDO auf den angeschnittenen Block pipettiert und lässt dies, je nach Grösse der zu entkalkende Stelle, einwirken. Danach kann die Flüssigkeit mit einem Papiertuch abgewischt werden. Nachdem der Block wieder gekühlt wurde, kann ein erneuter Schneideversuch unternommen werden. Falls die Oberflächenentkalkung nicht ausreicht, kann dieser Schritt erneut durchgeführt werden. Kann nach mehrmaligen Oberflächenentkalkungen noch immer kein Schnitt angefertigt werden, muss untersucht werden, ob möglicherweise ein Fremdkörper mit eingegossen wurde, welcher beim Neugiessen entfernt werden muss.

4.6 HE-Färbung und Immunhistochemie beim Knochen

4.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine der wichtigsten Färbungen in der Histologie. Sie wird grundsätzlich immer durchgeführt und wird auch Übersichtsfärbung genannt. Sie besteht aus den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin, daher auch der Name Hämatoxylin-Eosin-Färbung, kurz HE-Färbung. Hämatoxylin färbt die negativ geladenen, also basophilen, Zellbestandteile blau. Demnach wären Zellkerne blau.
Eosin dagegen färbt die basischen oder die positiv geladenen Strukturen rot an. Dazu gehören unter anderem das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern (Lang, 2013).
Dadurch ergibt sich ein guter Kontrast zwischen den Gewebebestandteilen und kann ideal die Morphologie darstellen. Beim Knochen wären das Knochenmark und die Zellkerne blau und das Knochengewebe rot, wie in der Abbildung 4 ersichtlich ist.

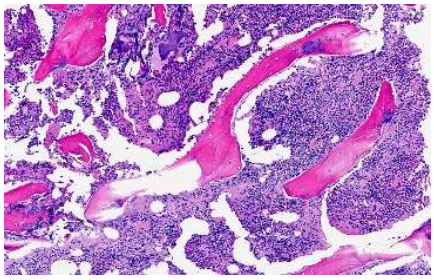


Abbildung 4
K10E 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

4.6.2 Immunhistochemische Färbemethode

Innerhalb dieser Arbeit wurde zur immunhistochemischer Färbung die kompakte Polymer-Methode verwendet. Dies ist eine indirekte Methode. Das bedeutet, dass sie einen primären und einen sekundären Antikörper nutzt. Dabei wird an einem sekundären Antikörper ein kompaktes Polymer aus Peroxidase angehängt.
Der primäre Antiköper, der meist aus Mäusen oder Kaninchen gewonnen wird, bindet an ein gesuchtes menschliches Antigen. Nachdem die nicht gebundenen Antikörper weggewaschen wurden, wird der sekundäre Antikörper pipettiert, der an den Primär-Antikörper bindet. Ein nachfolgender Waschschritt entfernt die überschüssigen Sekundär-Antikörper. Danach folgt das AP-Polymer und zum Schluss das Chromogen (Substrat). Das Enzym des kompakt Polymers setzt dieses Substrat um, wodurch ein farbiger Niederschlag entsteht (Visionbiosystems, o.A.).
In den meisten Fällen äussert sich der Niederschlag als braun oder rot. Diaminobenzidin (DAB) präzipitiert braun, alkalische Phosphortase (AP) erzeugt roten Niederschlag. Bei der Durchführung dieser Arbeit war er rot. Damit die Farbe besser zu erkennen ist, wird noch eine Gegenfärbung durchgeführt. Generell wird dazu Hämatoxylin benutzt, was zu einem blauen Hintergrund führt. Damit sich die blaue Farbe entwickeln kann, muss das Gewebe für einige Minuten in Leitungswasser gebläut werden. Dies hat jedoch keinen negativen Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Komplexe.
Nach der Färbung werden die Schnitte mit der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und können anschliessend eingedeckt werden.

4.6.3 Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase, kurz MPO, ist ein lysosomales Enzym. Es kommt in den Zellen der myeloischen Reihe vor. Vor allem in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und den Vorläufern der Granulozyten. Sie ist in der azurophilen zytoplasmatischen Granula zu finden. MPO ist für die Bekämpfung von Bakterien wichtig. Beim Phagozytieren werden Wasserstoffperoxide freigesetzt. Diese werden durch MPO und andere Bestandteile zu Hypochlorsäure oxidiert. Diese Hypochlorsäure ist das am stärksten wirkende bakterizide Oxidationsmittel, welches neutrophile Granulozyten herstellen können. Sie reagiert mit Proteinen und hat eine toxische Wirkung auf die bakteriellen Zellen (Leica Biosystems, o.A.-b).

Es hat sich gezeigt, dass auch krankhafte Zellen, wie einige Vorläufer-B-Zellen der akuten lymphatischen Leukämie, ebenfalls MPO exprimieren. So kann Anti-MPO in Verbindung mit anderen Markern zur Diagnose von akuten Leukämien dazu gezogen werden (Dako, 2020).

Die Wahl des MPO-Markers in dieser Arbeit stützt sich auf zwei Hauptgründe.
Durch das physiologische Vorkommen von MPO in den myeloischen Zellen ist das Knochenmark, vor allem das Rückenmark, ein Ort, an dem MPO häufig gefunden wird.
In der Immunhistochemie wird der Knochen meist in Bezug auf das Knochenmark untersucht. Somit würde mit Sicherheit eine repräsentative Reaktion beobachtet werden. Dies gilt besonders, da eine Knochenlokalisation, die für die Arbeit verwendet wurde, die Wirbelsäule mit Rückenmark ist (Siehe Abbildung 5).

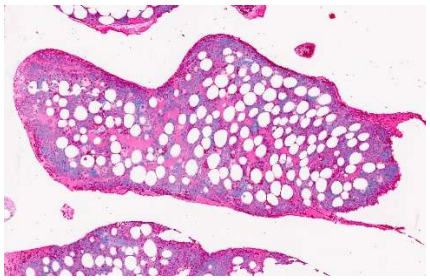


Abbildung 5
R3E 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

Zusätzlich ist der MPO-Marker sehr kosteneffizient. Der Antikörper kann stark verdünnt werden, etwa 1:2000, und gute Ergebnisse liefern. So konnte an teuren Reagenzien eingespart werden, was vorteilhaft war, da eine grosse Anzahl von Objektträger gefärbt werden musste. Dies war sehr attraktiv, da die meisten Antikörper in der Immunhistochemie sehr teuer sind und weniger stark verdünnt werden können.

Bevor mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden kann, muss der Schnitt mit Dewax Solution entparaffiniert werden. Dies ist ein essenzieller Schritt, damit die Lösung ans Gewebe gelangen kann, sonst würde das Wachs alles abblocken. Die Dewax Solution wird dann mit 100-prozentigem Alkohol weggewaschen. Dann müssen die Antigene, die zuvor mit Formalin fixiert und dadurch maskiert wurden, demaskiert werden, damit die Antikörper binden können.
Dies kann durch Enzym oder Hitze mit Citrat- oder EDTA-Puffern erreicht werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden die Quervernetzungen der Antigene mit EDTA und Wärmeplatten aufgebrochen.
Nun kann die Färbung stattfinden. Auch beim Färbeprinzip gibt es verschiedene Methoden. Näher erklärt wird aber nur die hier genutzte.

4.7 Säuren und ihr Einfluss auf die HE-Färbung und Immunreaktion

4.7.1 USEDECALC

Um USEDECALC besser zu verstehen, ist es hilfreich, einige Grundlagen von EDTA zu kennen, da es ein wichtiger Bestandteil ist.
EDTA ist ein beliebtes Entkalkungsmittel für Knochen, da es sehr schonend ist und eine gute Morphologie, immunhistochemische Reaktion sowie DNA-Erhaltung für PCR verspricht. Es gehört zu den Chelatbildnern und wirkt, indem es die Calcium-Ionen von der Oberfläche der Apatitkristalle entfernt und diese dadurch mit der Zeit verkleinert. Jedoch ist EDTA auch sehr langsam (Leica Biosystems, o.A.-a).
Da das Intakt-Halten der Gewebestruktur je nach Fragestellung sehr wichtig ist, aber nicht wochenlang gewartet werden kann, bis eine Probe entkalkt ist, benutz Kempf & Pfaltz USEDECALC.
Dies ist ein TRIS-gepufferter Entkalker auf EDTA-Basis mit einem Arbeitsbereich, der pH-neutral bis basisch ist (Thomas Medical Systems, o.A.). Er besteht aus Tetra-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure 9-11%, Amino-tris(hydroxymethyl)-methan 2.5-3% und Monokaliumphosphat 1-3%. Er ist in den gleichen Massen schonend wie EDTA, aber in der Entkalkungszeit um einiges schneller. Bei korrekter Anwendung kann es ca. 40-75 % schneller wirken (DAN-Pharma GmbH / Laborbedarf DP, o.A.-a).
So kann gesagt werden, dass USEDECALC keine negativen Auswirkungen auf die Morphologie, die Immunreaktion oder den Erhalt von DNA hat.

4.7.2 USERAPID

USERAPID ist ein Entkalker, der verschiedene Säuren enthält. Darunter Salzsäure 8-12.5%, Ameisensäure 0.5-2.5% und Aluminiumchlorid 0.5-2.5% (DAN-Pharma GmbH / Laborbedarf DP, o.A.-b).
Einer der Vorteile ist, dass es eine sehr schnelle Entkalkungszeit verspricht, jedoch auf Kosten der Nukleinsäuren und Antigene, da diese zerstört werden durch die starke Säure. Somit können mehrere Analyseverfahren nicht mehr durchgeführt werden (Brunner, 2015). An der Struktur selbst sollten jedoch keine Schäden entstehen, so sollte die HE-Färbung trotzdem keine Mängel aufweisen. Die Immunhistochemie-Färbung wird aufgrund der Antigenzerstörung nicht mehr empfohlen.

4.7.3 RDO

RDO ist ein weiterer Entkalker mit vielen positiven Eigenschaften. Er kann manche Proben schneller entkalken als USERAPID und ist gleichzeitig schonend zu Morphologie, Nukleinsäuren und Antigenen (Brunner, 2015).
Es wird jedoch nicht empfohlen, Entkalkungen über Nacht durchzuführen, da eine zu lange Aussetzung der Proben an der Säure doch zu Gewebsschäden führen kann. Somit sollte RDO sehr kontrolliert angewendet und regelmässig überprüft werden.
Es ist möglich, RDO mit Leitungswasser zu verdünnen, um eine mildere Wirkung zu erzielen (Apex Engineering Products Corporation, 2023).
Die nähere Zusammensetzung ist nicht bekannt, ausser dass es weniger als 10% Salzsäure beinhaltet. Mehr konnte anhand der vom Hersteller veröffentlichten Informationen nicht herausgefunden werden.
Die Salzsäure ist auch der Grund, warum eine gleichzeitige Fixierung mit Formalin und Entkalkung mit RDO nicht durchgeführt werden sollte, da sonst kanzerogene Substanzen entstehen können (Apex Engineering Products Corporation, o.A.).

5 Praxisteil

5.1 Planung Durchführung Praxisteil

Für die Durchführung des praktischen Teils der Diplomarbeit war geplant, Schweineknochen zu verwenden, da keine menschlichen Knochen genutzt werden konnten. Die Knochenproben, die bei Kempf & Pfaltz eingesendet werden, sind nicht gross genug, um sie zu splitten. Ausserdem sind Knochen von Schweinen leicht erhältlich und denen von Menschen sehr ähnlich.
Dafür wurden im Voraus Knochen von verschiedenen Körperstellen ausgewählt:

-Kieferknochen, da bei Kempf & Pfaltz vor allem Kiefer und Zähne verarbeitet werden.
-Wirbelsäule, weil sich hier das Rückenmark befindet, bei dem die Immunreaktion gut beobachtet werden kann.
-Beckenkamm, da dieser vor allem aus Kompakta besteht, um auch die Struktur dieser Knochenart übersichtlich studieren zu können.

Von jeder Knochenart sollten 30 Proben gefertigt werden, von denen jeweils zehn mit den verschiedenen Entkalkungsmethoden verarbeitet werden konnten. Es wurden drei Entkalkungsmethoden ausgewählt. Ein Teil der Knochen sollte ausschliesslich in USEDECALC, ein anderer nur in USERAPID eingelegt werden. Die restlichen dienen als Kontrollgruppe mit der bisherig genutzten Methode. Vorgesehen war, die Proben für fünf Tage in USEDECALC zu legen und anschliessend noch so lange wie nötig in USERAPID zu entkalken, bis der Knochen bereit war, entwässert zu werden.
Insgesamt waren 90 Proben zur Verarbeitung zu Blöcken eingeplant. Ausserdem war vorgesehen, beim Schneiden die Hälfte der Proben zusätzlich mit RDO zu behandeln. Um den Einfluss der Säuren auf das Material zu untersuchen, sollten alle Blöcke eine HE-Färbung und eine Immunhistochemie-Färbung mit dem Marker MPO erhalten. Dies führte zu insgesamt 180 Objektträgern mit jeweils einem Schnitt. Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, war eine gemeinsame Bewertung mit einer ärztlichen Fachperson vorgesehen. Zum Schluss sollten die Objektträger eingescannt und die Auswertung der Daten durchgeführt werden.

Geplant war, dass die Knochen nach dem Eintreffen im Labor in Formalin fixiert und anschliessend zu passenden Stücken zerkleinert werden. Danach sollten sie in beschriftete Kassetten gelegt werden. Die Kassetten sollten so bedruckt werden, dass erkennbar war, welcher Knochen sich darin befand, in welchen Säuren er eingelegt wurde sowie eine Zahl von 1-10, um die Knochen innerhalb der gleichen Gruppierung unterscheiden zu können. Ausserdem war mit «g» und «mpo» vermerkt, dass eine HE-Färbung und eine immunhistochemische Färbung geplant waren. Das Benennungsmuster führte zu Kassettenbezeichnungen wie beispielsweise «X18.35 - K1 EU g mpo».

K = Kiefer	R = Rückenmark/Wirbelsäule	B = Beckenkamm
E = EDTA/ USEDECALC	U = USERAPID	EU = EDTA/USEDECALC + USERAPID
X18.35 = Nummer im Testumfeld	g = Grundschnitt, welcher HE gefärbt werden soll	mpo = Marker für die immunhistochemische Färbung

Tabelle 1 Benennungsmuster Kassetten (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Tabelle, Oerlikon)

Es war vorgesehen, dass nach dem Einkapseln der Proben in den Kassetten mit der Entkalkung begonnen werden konnte. Anschliessend sollten die Proben in die respektiven Säuren gelegt und in ein Schallbad gestellt werden. Der Entkalkungsgrad sollte dabei täglich kontrolliert werden. Dazu werden die Knochenproben mit den Fingern palpiert. Dies

läuft so ab, dass die Probe aus der Säure und der Kassette herausgenommen wird und geprüft, wie biegsam der Knochen ist. Wenn er sich nicht biegen lässt, wurde noch nicht genügend entkalkt. Ist der Knochen biegsam, sodass ein merklicher Bogen entstehen kann, ohne dass er bricht, wurde ausreichend entkalkt.
Die Proben sollten anschliessend in ein Wasserbad gestellt werden, um die Säure abzuwaschen, bevor sie wieder ins Formalin überführt wurden. Danach konnten die Proben zur Entwässerung weitergegeben werden. Falls sie noch zu hart waren, müssten sie weiterhin in der Säure eingelegt bleiben und im Schallbad verbleiben.
Zur Nachverfolgung des Entkalkungsverlaufs war das Führen eines Entkalkungsprotokoll vorgesehen. Darin sollte dokumentiert werden, wann mit der Entkalkung begonnen wurde, welche Probe in welcher Säure lag, wie der Entkalkungsgrad an jedem Tag war, wann die EU-Proben von USEDECALC zu USERAPID überführt wurden und wann sie ausreichend entkalkt waren. Falls zusätzliche Beobachtungen auftraten, konnten weitere Notizen ergänzt werden.
Nach dem Entwässern mussten die Proben zu Blöcken gegossen und geschnitten werden. Auch hierzu sollte ein Protokoll geführt werden, um die Schneidbarkeit zu beurteilen.
Sobald alle Schnitte gemacht und im Ofen getrocknet waren, sollten sie gleichzeitig mit frischer Farblösung HE-gefärbt werden. Danach konnte die immunhistochemische Färbung erfolgen. Nach Abschluss der Färbung sollten die Objektträger vom Scan-Team eingescannt und durch die ärztlichen Fachperson beurteilt werden. Zum Schluss waren die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse vorgesehen.
In einem Journal sollten sämtliche Arbeitsschritte dokumentiert werden.

5.2 Durchführung Praxisteil

Die Schweineknochen wurden vom Schlachthof Zürich bereitgestellt. Die Proben sollten zur Fixierung in Formalin eingelegt werden. Jedoch mussten sie zuerst zerkleinert werden, da sie für die Gefässe zu gross waren. Zusätzlich kann das Fixiermittel so besser bis in das Innere des Gewebes eindringen. Nachdem sie kleiner geschnitten wurden, konnten alle Proben für eine Arbeitswoche ins Fixiermittel eingelegt werden, bei der täglich das Formalin ausgewechselt wurde. Währenddessen wurden die 90 nötigen Kassetten gedruckt und bereitgestellt. Diese konnten, wie im Kapitel 5.1 beschrieben, beschriftet werden (siehe Tabelle 1).
Als die Proben ausreichend fixiert waren, konnten sie für die Kassetten zersägt werden. Dafür musste noch das restliche weiche Gewebe vom Knochen abgetrennt werden. Dies konnte von Hand, mit einer Pinzette und einer Klinge durchgeführt werden. An manchen Stellen konnten Fett, Muskeln und Haut nicht vollständig entfernt werden, dies betraf jedoch nur vereinzelte Fälle mit nur noch wenig Weichgewebe. Danach konnten die Knochen mit einer kleinen Handsäge passend gesägt werden. Die Proben wurden vorzu der richtigen Kassette zugeordnet, verschlossen und dann zurück ins Formalin gelegt, bis alles für die Entkalkung bereit war. Das Kleinsägen dauerte etwa drei Tage.
Anschliessend konnten sie in die jeweiligen Säuren gelegt werden. Die Kassetten, die mit «E» oder «EU» beschriftetet waren, wurden in ein Gefäss mit USEDECALC gelegt. Insgesamt waren es zu Beginn 60 Kassetten. Die 30 Kassetten, welche mit «U» gekennzeichnet waren, wurden in das USERAPID gelegt. Die mit «EU» beschrifteten Kassetten wurden nach fünf Tagen im USEDECALC, oder früher, wenn sie schneller entkalkt waren, noch so lange wie nötig mit USERAPID behandelt. Als letzter Schritt musste der Deckel nur leicht zugeschraubt werden, da bei der Entkalkung Gase entstehen, welche entweichen können müssen.
Die Gefässe mit den Proben wurden dann in ein Schallbad gestellt, welches durchgehend lief, ausser von Samstagabend bis Montagmorgen. Über 19 Tage musste täglich der Entkalkungsgrad aller Proben überprüft und die Säure ausgetauscht werden, ausgenommen sonntags. Dies benötigte jeden Tag viel Zeit.
Sobald die Proben genügend entkalkt wurden, mussten sie in ein Wasserbad mit Leitungswasser gelegt werden. Dieser Schritt dient dem Abwaschen der Säure, damit diese

nicht ins Formalin verschleppt wird. Danach konnten sie zum Entwässern weitergegeben werden. Dieser Prozess lief über Nacht ab, sodass am nächsten Tag weitergearbeitet werden konnte. Es fiel auch auf, dass die Grösse der Probe eine Rolle bei der Geschwindigkeit der Entkalkung spielt. Deshalb wurde beschlossen, die Proben vor der Weitergabe zum Entwässern auszumessen, um diesen Faktor in der Schlussbewertung zu berücksichtigen.
Die Proben wurden nach und nach in Paraffin ausgegossen und zur Seite gelegt, bis alle gleichzeitig geschnitten werden konnten.
Während des Schneidens der Blöcke wurde zu jedem Block ein Protokoll über die Schneidbarkeit geführt. Für die Schnitte sollten zwei Grundschnitte auf Superfrost Plus angefertigt werden. Im Gegensatz zu gewöhnlichen Schnitten, durften sie nicht auf der Heizplatte gestreckt werden, sondern in einem Heisswasserbad. Auch durfte kein Kryospray benutzt werden, da dieses die immunhistochemische Färbung stören würde. Um erkennen zu können, welcher zusätzliche Effekt RDO auf die säurebehandelten Blöcke hat, wurde die eine Hälfte mit RDO behandelt und die andere nicht. Innerhalb der Knochenart und der verwendeten Säuren waren jeweils fünf der Zehnergruppen betroffen. Beispielsweise wurden von den zehn «KEU» auf fünf noch RDO aufgetragen. Das Auswahlverfahren lief so ab, dass innerhalb der Gruppe alle Blöcke angeschnitten wurden. Es wurde abgeschätzt, mit welchen Blöcken es möglich sein wird, schöne Schnitte zu erhalten, ohne RDO zu verwenden. Nachdem die fünf Blöcke gefunden und geschnitten wurden, konnten die anderen fünf Blöcke für 30 Minuten, oder wenn nötig mehr, mit RDO behandelt und anschliessend ebenfalls geschnitten werden. Die Schnitte wurden dann im Ofen getrocknet und zur Seite gelegt. Um die Färbung bestmöglich untereinander vergleichen zu können, wurden alle Schnitte zur gleichen Zeit gefärbt, da sich die Färbung von Tag zu Tag leicht verändert.
Blöcke, aus denen beim Schneiden Material herausbrach, wurden erneut gegossen und später wieder geschnitten.
Nachdem alle 180 Schnitte bereit waren, wurden die dafür vorgesehenen Objektträger zunächst HE gefärbt, als die Farblösungen frisch aufgesetzt wurden. Die gefärbten Schnitte wurden von einer ärztlichen Fachperson mithilfe eines Auswertungsbogens beurteilt und kontrolliert, ob der vorgesehene immunhistochemischer Marker MPO hier tatsächlich geeignet wäre. Nachdem bestätigt wurde, dass sich MPO als repräsentativer Marker beweisen würde, wurden die restlichen Objektträger immunhistochemisch gefärbt. Einige Objektträger wurden jedoch nach der Färbung im Wasser vergessen. Sie wurden über Nacht von Freitag auf Samstag stehen gelassen. Als sie wieder mit der Alkoholreihe dehydriert werden sollten, schwammen alle Schnitte im Wasser ab. Somit mussten von den betroffenen Blöcken neue Schnitte angefertigt werden. Dies wurde von einer erfahrenen Mitarbeiterin übernommen. Diese wurden noch am gleichen Tag erneut immunhistochemisch gefärbt und verkürzt im Wasser gebläut und wieder normal mit der Alkoholreihe aufgezogen. Die Schnitte vom Beckenkamm schwammen zum grossen Teil wieder ab, da das Gewebe hier zu kompakt ist und weniger gut auf Superfrost Plus haftet. Für diese Knochenart wären spezielle Objektträger, nämlich Superfrost Plus Gold, nötig gewesen. Da diese in der Routine nicht verwendet werden, wurde darauf verzichtet, um einen normalen Ablauf widerzuspiegeln.
Es blieben jedoch gewisse Rückstände zurück, die ausreichten, um sie teilweise beurteilbar zu machen. Auch diese Erkenntnisse wurden in dem Auswertungsprotokoll festgehalten.
Die Schnitte wurden dann alle gescannt, um eine digitale Version zu erhalten. Von einigen Scans wurden Fotos gemacht, um sie anschliessend in die Diplomarbeit einfügen zu können.
Zum Schluss wurden alle gesammelten Informationen verarbeitet, um eine Auswertung der Entkalkung mit den Endergebnissen zu erstellen. Dazu wurden verschiedene Faktoren berücksichtigt. Bei der Entscheidung des Entkalkungsmittel ist das Endergebnis sehr wichtig, jedoch muss auch die benötigte Zeit und der Aufwand der Verarbeitung in Betracht gezogen werden. Zusätzlich kann die Fragestellung ebenfalls gewisse Kriterien bestimmen.

Das Journal, in dem die Arbeitsschritte protokolliert wurde, kann auf Nachfrage eingesehen werden. Ausgewählte Scans der Ergebnisse sind im Anhang zu finden.

5.2.1 Genutzte Gerätschaften

Hier ist noch eine Auflistung der Gerätschaften, die innerhalb der Bearbeitung der Proben verwendet wurden, sowie deren Zweck:

- Ultraschallbad Ultrasonic Decalcifying Automat USE 33 von Medite:
  Knochen schneller entkalken
- Entwässerungsautomaten Donatello Series 3 von Diapath und HistoCore PELORIS 3 von Leica Biosystems:
  Entwässern des Knochengewebes
- Paraffin-Ausgiessstation TES Valida von Medite:
  Ausgiessen der Knochenblöcke
- Mikrotom Epredia HM 355S von Thermo Scientific:
  Schneiden der Knochenblöcke
- Objektträger-Schnelltrockner TDO Sahara von Medite:
  Trocknen der Objektträger mit Knochenschnitten vor dem Färben
- Färbeautomat und Glaseindeckautomat Tissue-Tek Prisma® Plus & Tissue-Tek® GlasTM g2 von Sakura:
  HE-Färben der Knochenschnitte und anschliessendes Eindecken mit Deckgläsern
- IHC-und ISH-Färbeplattform BOND-PRIME von Leica Biosystem:
  Immunhistochemie-Färbung mit MPO der Knochenschnitte
- Mikroskop-Objektträger Scanner NanoZoomer S360 von Hamamatsu:
  Scannen der fertigen Knochenschnitten

5.3 Ergebnisse

Anhand der gesammelten Daten der Protokolle konnten nun die Ergebnisse ausgewertet werden. Alle Protokolle sind im Anhang zu finden.
Noch einmal zur Nomenklatur: «K1-10» stehen für die Kieferproben, «B1-10» für die Beckenkammknochen und «R1-10» für die Wirbelsäule mit dem Rückenmark. «E» sind die Proben die ausschliesslich im USEDECALC entkalkt wurden, «U» für, die im USERAPID eingelegt wurden, und «EU» für die Kombination aus beiden, welche die Kontrollgruppe aus der bisherigen Methode darstellt.

5.3.1 Entkalkungszeit der Schweineknochen in Tagen:

Wie in der Abbildung 6 gut zu erkennen ist, benötigten die Proben im USEDECALC mit einer durchschnittlichen Entkalkungszeit von 4.9 (K), 14.9 (B) und 9.6 (R) Tagen am längsten.
Wie im Entkalkungsprotokoll, welches sich im Anhang befindet, vernehmbar, betrug die längste Zeit für die Entkalkung 19 Tage bei einer Beckenkammprobe. Es gab jedoch auch Kieferproben, welche nur zwei Tage benötigten.
Die Kombination aus USEDECALC und USERAPID liegt in der Mitte der Dauer. Diese benötigten im Durchschnitt 5.1 (K), 6.8 (B) und 6.3 (R) Tage. Die längste Dauer wurde bei einem Beckenkammknochen mit neun Tagen verzeichnet, die kürzeste bei einem Kieferknochen mit drei Tagen. Hier kann bei der Kieferspalte eine unerwartete Entwicklung erkannt werden. Die EU-Proben brauchten länger als die E-Proben. Dies lag jedoch daran, dass die EU-Proben fünf Tage im USEDECALC sein sollten und anschliessend so lange im USERAPID wie nötig. Einige EU-Proben waren jedoch bereits vor dem Ablauf dieser fünf USEDECALC-Tagen fertig entkalkt. Sie mussten jedoch mindestens einen Tag im USERAPID liegen, da sie der EU-Gruppe zugeteilt wurden. Andernfalls hätte der Vergleich der Morphologie und Immunreaktion nicht wie geplant durchgeführt werden können. Somit gab es einen zusätzlichen Tag für alle, die vorher fertig entkalkt waren.
Die kürzeste Zeit brauchten die Proben, die mit USERAPID entkalkt wurden. Dort lagen die durchschnittlichen Entkalkungszeiten bei 1.5 (K), 2.5 (B) und 1.9 (R) Tagen. Die längste Entkalkungszeit betrug drei Tagen, die kürzeste nur einen Tag.
Auch bei der Knochenart ist ein sehr starkes Muster erkennbar. Der Beckenkamm benötigte am meisten Zeit, dann die Wirbelsäule und der Kiefer war am schnellsten entkalkt.

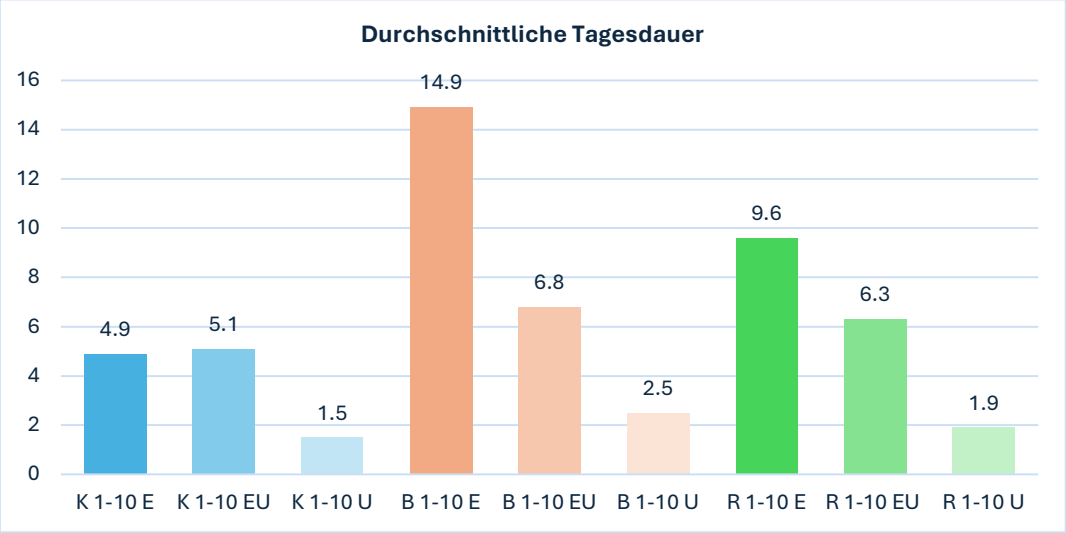


Abbildung 6 Durchschnittliche Tagesdauer der Entkalkung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon)

5.3.2 Schneidbarkeit der Schweineknochen:

In den Grafiken zeigen die Balken innerhalb der Gruppierung, wie einfach oder schwer es war, einen Schnitt mit den entkalkten Blöcken herzustellen. Jeder Block konnte mit einem Wert zwischen – und +++ bewertet werden.

– = Kein Schnitt konnte gemacht werden.
+ = Es war schwierig, aber möglich.
++ = Mit etwas Geduld konnte ein Schnitt gemacht werden.
+++ = ein Schnitt zu erhalten, war sehr leicht.

Um dies grafisch darzustellen zu können, wurde ein Punktesystem erstellt. Jedes «+» konnte mit einem Punkt gleichgesetzt werden. So ergab «–» null Punkte, «+++» hingegen drei Punkte. Insgesamt konnten innerhalb der Gruppe 30 Punkte vergeben werden. Der gesamte Balken zeigt 30 Punkte, der grüne Abschnitt wie viele Punkte erreicht wurden und der Orangene wie viele nicht gegeben werden konnten. Da die Hälfte der Proben mit RDO behandelt wurde, verteilten sich die 30 Punkte auf die beiden Gruppen. Somit konnten pro Gruppe 15 Punkte erreicht werden. Von allen Blöcken konnten mindestens zwei Schnitte gefertigt werden, so mussten nie null Punkte vergeben werden.

Die Grafik zeigt ein unregelmässiges Bild bei der Schneidbarkeit der Blöcke (Siehe Abbildung 7). Es scheint, als hätten die Kieferproben generell am schlechtesten abgeschnitten. Die Wirbelsäule war etwas einfacher zu schneiden als der Beckenkamm. Innerhalb der verschiedenen Säuren lässt sich hier jedoch kein klares Bild erkennen. Bei gewissen Probengruppen ist eine Methode die bessere, bei einer anderen aber die schlechtere Variante. Auch die Auswertung bezüglich RDO hat ein durchmischtes Ergebnis gegeben. Teils haben behandelte Proben mehr Punkte als die Gegengruppe ohne Behandlung, jedoch ist auch das Gegenteil zu beobachten.

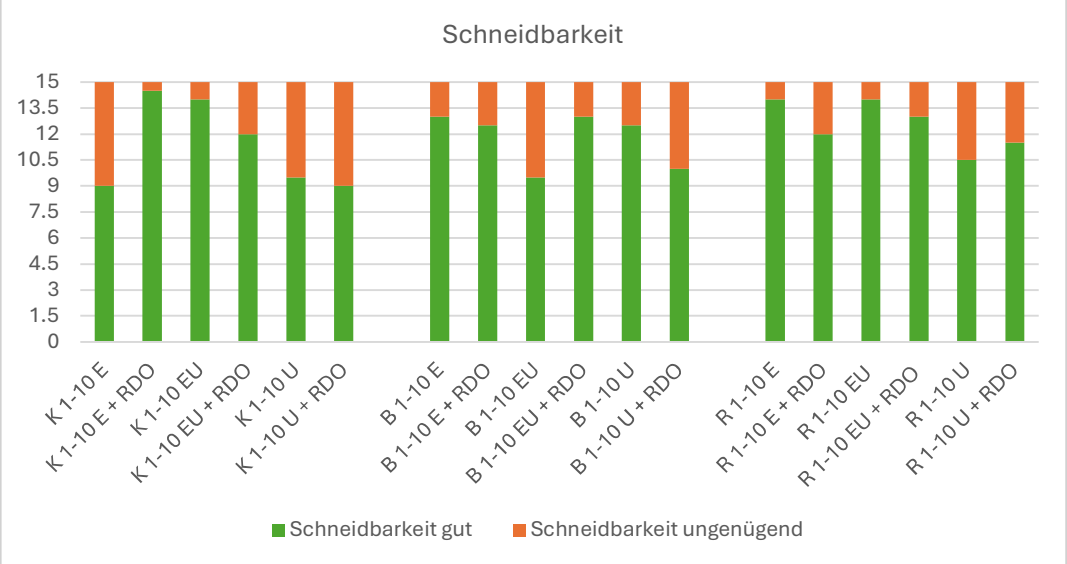


Abbildung 7 Bewertung Schneidbarkeit (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon)

Werden die Gesamtpunktzahlen innerhalb der Säuren und der Säuren mit RDO zusammengerechnet, so ergibt sich die in Abbildung 8 dargestellte Grafik. Die Auswertung würde demnach ergeben, dass die Proben, welche mit USEDECALC entkalkt und zusätzlich mit RDO behandelt wurden, am einfachsten zu schneiden waren. Am schwersten zu schneiden waren die Proben, die in USERAPID eingelegt und zusätzlich mit RDO Oberflächenentkalkt wurden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass es mögliche Faktoren gab, die das Ergebnis zu einem gewissen Grad beeinflusst haben könnten. Diese werden in der Diskussion näher beschrieben.

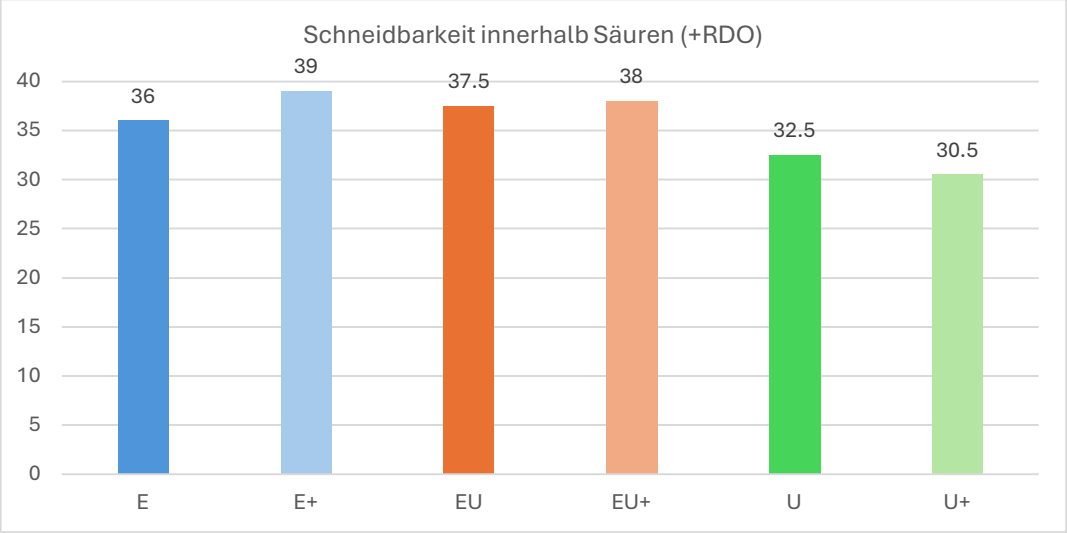


Abbildung 8 Bewertung Schneidbarkeit innerhalb der Säuren (+RDO) (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon)

5.3.3 Qualität der HE-Färbung:

Auch hier wurde das Punktesystem angewendet, bei dem ein «+» einem Punkt entspricht. Anders als bei der Schneidbarkeit gab es hier jedoch Proben, die nicht beurteilt werden konnten oder die gefehlt haben. Da diese Lücken nicht auf die Entkalkung zurückzuführen sind, wurde die Bewertung angepasst. Die fehlenden Daten wurden ausgegraut, damit sie keinen Einfluss auf das Gesamtergebnis der Entkalkung haben (siehe Abbildung 9). Die fehlenden Informationen waren auf die Physiologie der Knochen oder eine schlechte Schnittqualität zurückzuführen. Schnitte, die kein Knochenmark enthielten, konnten in diesem Bereich ebenfalls nicht bewertet werden, da die HE-Färbung dieses anders anfärbt als Kompakta. Dies war vor allem bei den Beckenkammschnitten der Fall. Deshalb gibt es dort auch regelmässig graue Zonen. Dort war die mögliche Gesamtpunktzahl innerhalb der Knochengruppe grundsätzlich nur 20 Punkte.
Auch bei den anderen Knochenschnitten, die zu dick ausfielen, konnten ebenfalls im Bereich des Knochenmarks nicht beurteilt werden. Daher wurden diese Punkte von der Gesamtpunktzahl abgezogen.
Bei allen Entkalkungsmethoden lassen sich Gruppen erkennen, die sehr gut, aber auch weniger gut bewertet wurden. Da dieses durchmischte Muster bei den Entkalkungsmethoden gleichermassen auftrat, scheint die Wahl der Säure keinen grossen Einfluss auf das HE-Färbeergebnis zu haben.

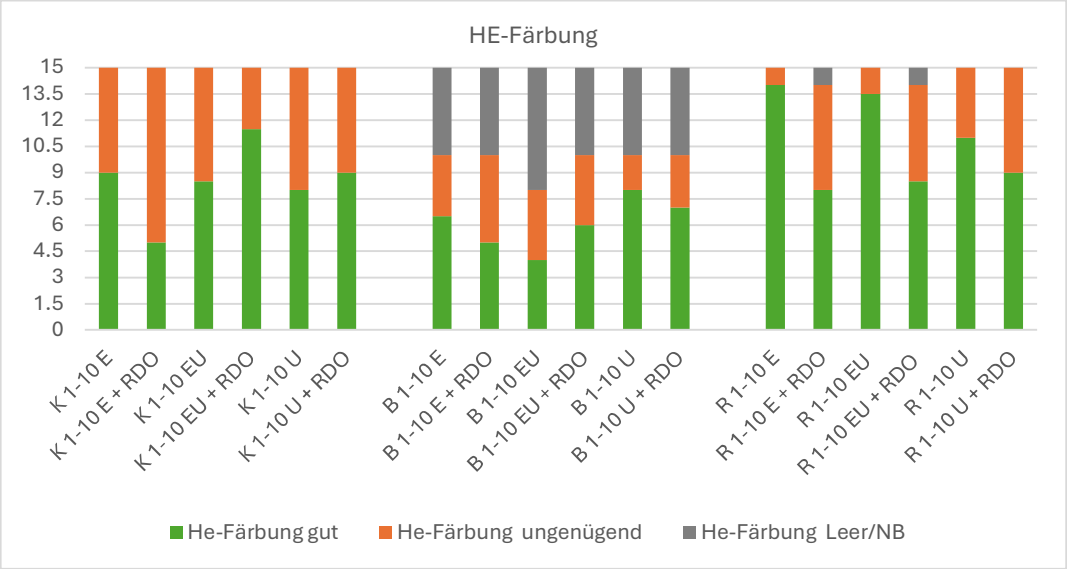


Abbildung 9 Bewertung HE-Färbung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon)

5.3.4 Qualität der immunhistochemischen Färbung mit MPO:

Hier wurde erneut das Punktesystem genutzt, bei dem ein «+» einen Punkt ergab. Auffallend ist jedoch, dass der gesamte Beckenkamm-Abschnitt gänzlich ausgegraut wurde. Dies beruht darauf, dass die Schnitte an dieser Stelle alle abgeschwommen sind. Zwar gab es manche Rückstände der Schnitte, jedoch hatten diese Bereiche kein Knochenmark. Allgemein hat der Beckenkamm nur Kompakta und kaum Spongiosa, wodurch auch wenig, bis kein Knochenmark vorhanden ist. Somit war es von Anfang an unwahrscheinlich, dies hier beurteilen zu können.
Im Allgemeinen kann aber erkannt werden, dass Proben, die mit USERAPID entkalkt wurden, schlechter abschnitten. Dies ist bei der Wirbelsäule mit dem Rückenmark besonders auffallend. Dies gilt sowohl für die Standartmethode als auch für die Methode, bei der nur USERAPID genutzt wurde (Abbildung 10 und Abbildung 11 zum Vergleich).

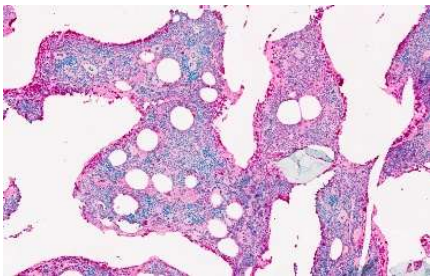


Abbildung 10
R10E 7x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

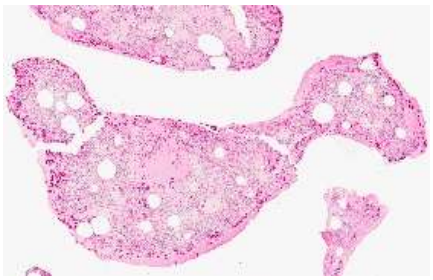


Abbildung 11
R1U 7x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

Wenn alles in den Augenschein genommen wird, hat RDO keinen grossartig negativen Einfluss auf die Immunantwort gehabt. Bei den «K1-10U» Proben könnte es diesen Anschein haben, jedoch könnte die Differenz auf anderen Faktoren beruhen. Gerade bei der Wirbelsäule, bei der die meisten Immunreaktionen vorhanden waren, scheinen die Proben mit RDO gleichauf zu sein, wie die Proben ohne, wie in Abbildung 12 ersichtlich.

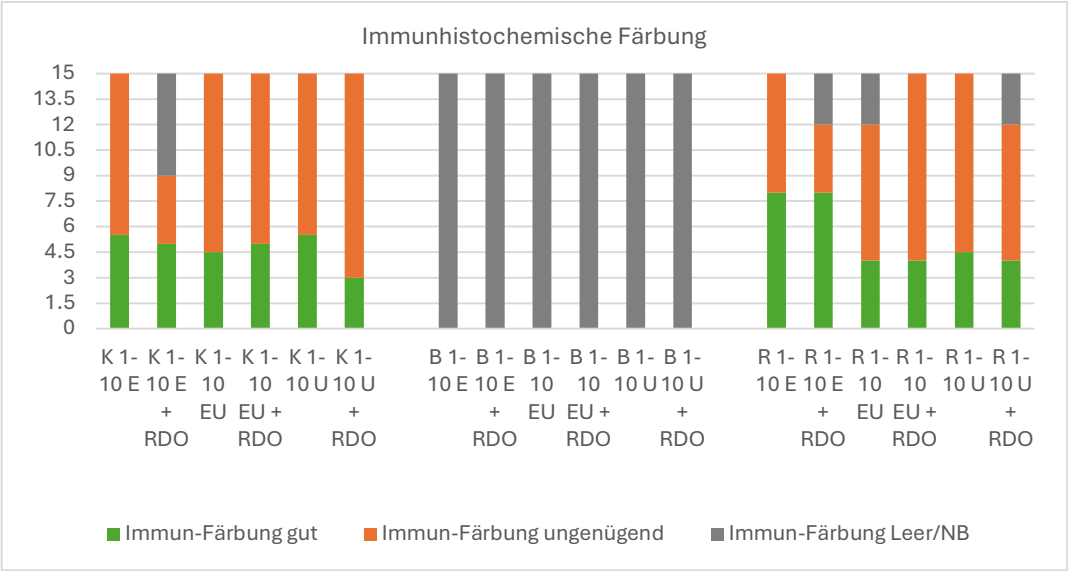


Abbildung 12 Bewertung Immunhistochemie-Färbung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon)

6 Diskussion

6.1 Beantwortung der Fragestellung

Mit den Ergebnissen, die von der praktischen Arbeit gezogen wurden, können nun die Fragen beantwortet werden. Diese Fragen stellen die Basis dieser Arbeit dar.

Hier sind noch einmal die getesteten Methoden:
1. Die Knochenproben werden für fünf Tage ins USEDECALC gelegt. Falls sie noch nicht genügend entkalkt wurden, müssen sie noch so lange wie nötig ins USERAPID gegeben werden. Dies stellt die bisherige Methode dar.
2. Die Proben kommen nur ins USEDECALC, bis die Knochen genügend entkalkt sind.
3. Die Proben kommen nur ins USERAPID, bis die Knochen genügend entkalkt sind.

6.1.1 Vergleich verkürzte Methode und Standardmethode

-In welchem Mass kann die verkürzte Methode mit der bisherigen Entkalkungsmethode mithalten, ohne die Morphologie (mit HE-Färbung) oder die Immunhistochemie (mit MPO) zu beschädigen?

Die Methode, bei der nur USERAPID statt der Kombination aus USEDECALC und USERAPID verwendet wird, kann durchaus mit der zuvor genutzten Methode mithalten. Bei beiden Kriterien, wie die Morphologie bei HE-Färbung aussieht und wie gut die Immunreaktion stattfinden kann, konnte die USERAPID Methode ähnliche Ergebnisse wie die Standardmethode aufweisen (Abbildung 13 und Abbildung 14 zum Vergleich der HE-Färbung). Bei der Morphologie gab es einige, die etwas schlechter abschnitten, so könnte gesagt werden, dass kleine Schäden an der Struktur stattgefunden haben könnten. Aber auch solche, die sich als besser herausstellten, wurden beobachtet. Somit kann keine definitive Aussage getroffen werden. Andere Faktoren, wie die Schneidbarkeit, könnten diese Diskrepanzen verursacht haben. Für minimale Mängel kann die schnelle Entkalkung jedoch in Kauf genommen werden.

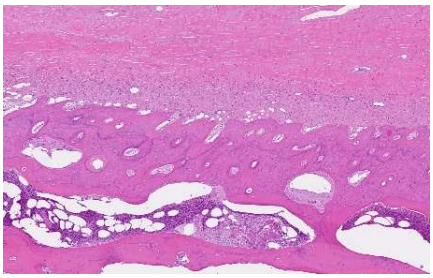


Abbildung 13
K1EU 5x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

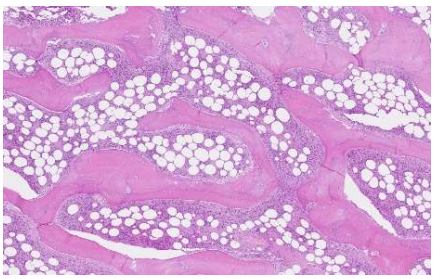


Abbildung 14
K8U 5x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

Dass die verkürzte Methode ähnliche Ergebnisse liefern kann wie die bisherige, bedeutet nicht, dass jeder Knochen nun mit USERAPID entkalkt werden kann. Denn auch die bisher genutzte Methode ist für Proben, die ein immunhistochemisches Verfahren oder eine Abklärung mittels PCR benötigen, nicht geeignet. Proben mit solchen Voraussetzungen müssen daher mit USEDECALC entkalkt werden. RDO darf dennoch als Hilfsmittel genutzt werden.

Solange die Probe mit USERAPID entkalkt werden darf, da keine immunhistochemische Reaktion oder PCR benötigt wird, kann sie auch direkt mit der schnelleren Methode entkalkt werden und denn USEDECALC Schritt umgehen.
Es sollte jedoch überdacht werden, Proben, die noch einen immunhistochemischen Nachweis benötigen, weiterhin mit der bisherigen Methode zu entkalken. In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind ähnliche Ergebnisse mit den beiden Entkalkungsmethoden zu sehen, wobei beide abgeschwächte Immunreaktionen aufweisen.

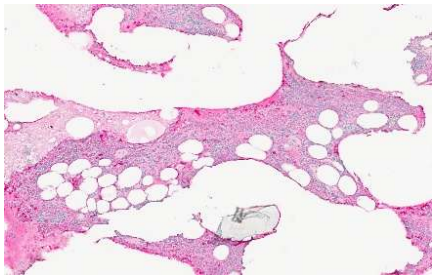


Abbildung 15
K1EU 5x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

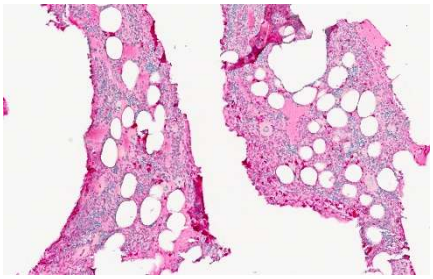


Abbildung 16
K4U 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

6.1.2 Unterschiede zwischen den Entkalkungsmethoden

-Was sind die Unterschiede in Bezug auf die Morphologie und Immunhistochemie von verschieden Entkalkten Knochenschnitten?

Innerhalb der Morphologie führten alle Entkalkungsmethoden zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Entgegen allen Erwartungen stellte sich die Methode, bei der nur USEDECALC verwendet wurde, nicht als die klare beste Option heraus. Die Methoden, die USERAPID zum Teil oder vollständig brauchten, lieferten durchaus gute Ergebnisse.
Andere Faktoren, wie die Schnittqualität, spielten eine grössere Rolle als die Wahl des Entkalkungsmittels. Die Schneidbarkeit ist wichtig, da sie zur Schnittqualität beiträgt. Bei der Auswertung gab es jedoch viele Faktoren, die diese beeinflusst haben könnten.
Es gab verschiedene Personen, die die Proben geschnitten haben. Je nach Erfahrung im Knochenschneiden, hatten sie ein unterschiedliches Empfinden darüber, wie gut oder schwer das Schneiden verlief. Auch das Auswahlverfahren, welche Blöcke mit RDO behandelt werden sollen, könnte RDO in ein negatives Licht rücken. Auf die schwereren bis fast unschneidbaren Blöcke wurde RDO aufgetragen. Natürlich wird die Schneidbarkeit einfacher Blöcke durch RDO nicht negativ beeinflusst. In der Routine wird RDO nur für herausfordernde Proben genutzt, weshalb auch hier das gleiche System angewendet wurde.
Somit lässt sich sagen, dass das Entkalkungsmittel keinen klaren Einfluss auf die Qualität der Morphologie hat, und es bei der Auswertung viele andere Einflussfaktoren gab.

Bei der Immunantwort gibt es dagegen grosse Unterschiede. Die Methode, welche nur USEDECALC verwendete, war deutlich besser. Die anderen, die beide USERAPID nutzten, waren gleichermassen schlecht. Das heisst, auch wenn Proben nur kurz in USERAPID verbleiben, richtet es genügend Schaden bei den Antigenen an, dass die Immunantwort merklich abnimmt.
Bei der Auswertung kann es bei manchen Proben den Anschein haben, dass RDO einen negativen Einfluss auf die Immunreaktion gehabt haben könnte. Dort spielen wahrscheinlich andere Faktoren eine Rolle. Ein möglicher Grund könnte sein, dass bei solchen Proben, weniger Knochenmark vorhanden war. Dies könnte wiederum damit zusammenhängen, in welcher Reihenfolge die Proben abgesägt wurden. Die «U» Proben waren eher nahe am

Rand, weshalb die schlechtere Immunreaktion unabhängig von RDO passiert sein könnte. Auch wenn bei den USERAPID Proben ohnehin schon schlechtere Ergebnisse erwartet wurden.

Zusätzlich kann noch erwähnt werden, dass die Grösse der Probe einen Einfluss auf die Entkalkungszeit hatte. Je kleiner die Probe war, desto schneller war sie entkalkt. Dies war bei allen Methoden der Fall. Dies kann bei «Auswertung Entkalkung» im Anhang erkannt werden. Bei kleineren Proben gelangt das Entkalkungsmittel leichter zum Zentrum der Probe, da sie ein geringeres Volumen haben.

6.1.3 Unterschiede Knochenlokalisationen

-Wie verhält sich das Entkalkungsergebnis bei verschiedenen Knochenproben (Kiefer, Wirbelsäule mit Rückenmark und Beckenknochen vom Schwein)?

Die Kieferknochen waren bei allen Entkalkungsmethoden am schnellsten. Danach folgten die Wirbelsäule und der Beckenkamm, die deutlich länger benötigten.
Dieses Bild zeigte sich bereits, als die Knochenproben klein gesägt wurden. Die Knochen, die sich am schwersten schneiden liessen, benötigten auch die meisten Zeit für die Entkalkung. Dies lässt sich durch den Aufbau der Knochen erklären. Der Beckenkamm besteht hauptsächlich aus Kompakta. Diese ist sehr dicht, wodurch das Entkalkungsmittel sie nur schwer durchdringen kann. Die Wirbelsäule war eher porös, sodass das Entkalkungsmittel eine grössere Oberfläche hatte, um in den Knochen einzudringen. Der Kiefer besteht aus Kompakta sowie auch Spongiosa.
Den Daten nach ist der Kiefer am schwierigsten zu schneiden und die Wirbelsäule am einfachsten. USEDECALC ergab eine bessere Schneidbarkeit für alle Lokalisationen, USERAPID eine eher schlechtere. Dies könnte jedoch auf vielen Faktoren ausserhalb der Entkalkungsmethode beruhen, welche oben schon genannt wurden.
Bei der Morphologie durch die HE-Färbung kann festgehalten werden, auch wenn kein Knochenmark angefärbt werden konnte, dass die Kompakta des Beckenknochens gut dargestellt werden konnte. Die Wirbelsäule lieferte im Allgemeinen gute Ergebnisse. Der Kiefer hatte zwar vermehrt schlechte Exemplare, aber dennoch genügend Gute, sodass die Qualität im Allgemeinen immer noch in Ordnung war.
Eine immunhistochemische Färbung war beim Beckenknochen kaum möglich. Beim Kiefer konnte eine Immunreaktion nachgewiesen werden, doch bei der Wirbelsäule mit dem Knochenmark war sie am besten zu erkennen. Dies war besonders der Fall, wenn nur USEDECALC zur Entkalkung genutzt wurde.
Zur Veranschaulichung des Vergleichs der Morphologie der verschiedenen Knochenlokalisationen sind hier Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt. Die Knochenbestandteile können gut in Spongiosa und Kompakta unterschieden werden.

Abbildung 17
K6EU 6x Vergrösserung
(Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

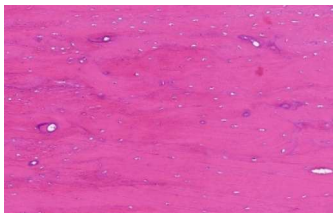


Abbildung 18
B7EU 6x Vergrösserung
(Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

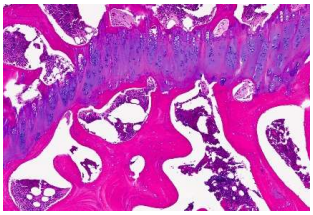


Abbildung 19
R8EU 4x Vergrösserung
(Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)

7 Reflexion

Die Erarbeitung dieser Diplomarbeit verlief relativ gut, war aber auch mit viel Stress verbunden. Der praktische Teil konnte zeitgemäss abgeschlossen werden. Ich habe regelmässig an dem schriftlichen Teil gearbeitet und investierte viel meiner Freizeit dafür, so konnte die Diplomarbeit doch noch vorzeitig beendet werden.
Die Arbeitsschritte wurden allgemein unterschätzt und es wurde an den zur Verfügung gestellten Tagen, zu wenig Zeit eingeplant. So musste ich einige Male Überstunden machen. Aufgrund der vielen Arbeit in der Routine, musste die Zeit, die für die Diplomarbeit vorgesehen war, gekürzt werden. Dadurch war auch der tägliche Stress höher und mir blieb am Abend kaum Energie übrig, um viel an der Arbeit zu schreiben.

Schon schnell zeigte sich eine der ersten Hürden beim praktischen Teil. Da bei Kempf & Pfalz häufig Kieferknochen und Zähne eingesendet werden, wollten wir dementsprechend auch Kiefer und Zähne entkalken. Als wir die Proben erhielten, zeigte sich jedoch, dass sich im Kiefer keine Zähne befanden. Das Schwein war wahrscheinlich noch zu jung, um bleibende Zähne (Erwachsenenzähne) zu haben. Somit musste dies in der Disposition noch angepasst werden.

Das Sägen der Knochen stellte eines der nächsten grösseren Probleme dar. Der Kiefer konnte mithilfe eines Teammitglieds und einer Handsäge passend gesägt werden. Bei der Wirbelsäule und dem Beckenkamm hatten wir hingegen keinen Erfolg. Diese Knochen mussten in einer Werkstatt mit einer Tischfräse zerkleinert werden. So waren sie vorerst klein genug, um fixiert zu werden. Doch als ich die Knochen klein genug sägen musste, damit sie in die Kassetten passten, kam wieder das gleiche Problem auf. Es gab keine geeignete Vorrichtung, um die Knochen so klein zu schneiden, so musste viel improvisiert werden.
Ich musste erneut die Handsäge verwenden. Um einen guten Winkel damit zu erhalten, legte ich die Knochen auf einen Plastikbehälter.
Da es sich bei der Handsäge nicht um eine Knochensäge handelte, war die Arbeit anstrengender. Zuerst zerkleinerte ich den Kiefer, dann den Beckenkamm und schlussendlich die Wirbelsäule mit dem Knochenmark. Die Wirbelsäule zeigte sich als relativ einfach zu sägen, da sie eher porös war. Der Kiefer brauchte wieder etwas mehr Geduld. Am meisten Zeit und Kraft kostete jedoch der Beckenknochen, da dieser sehr massiv war.
Zudem musste beim Sägen darauf geachtet werden, wo das Sägeblatt angesetzt wird. Wenn bei Weichgewebeproben ein Schnitt gemacht wird, verlagert sich das Gewebe zur Seite. Beim Knochen wird das Material hingegen gänzlich pulverisiert. Dieser Verlust musste einberechnet werden, damit das gesagte Stück nicht zu dünn ausfiel. Der zu verlierende Bereich musste gut gewählt werden, damit kein wichtiger Teil vernichtet wurde. Wenn das Sägeblatt aus dem bisher gesägten Spalt herausgefädelt werden sollte, um es neu ansetzen zu können, musste aufgepasst werden. Der Knochen spickte dann vermehrt ab.

Durch die grosse Anzahl an Kassetten, die anfangs in das USEDECLAC gelegt werden mussten, war es etwas schwierig, die Proben vollständig mit Säure zu bedecken. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem ein Glasdeckel daraufgelegt wurde, der die Kassetten beschwerte und sie somit wieder ins USEDECALC herunterdrückte. Als einige Proben aus dem USEDECALC entfernt werden konnten, da sie genügend entkalkt waren oder in das USERAPID überführt wurden, konnte der Glasdeckel weggelassen werden.
Auch das tägliche Kontrollieren des Entkalkungsgrads der 90 Proben dauerte mehrere Stunden. Dieser Prozess wurde dadurch erschwert, dass dafür kein eigener Arbeitsplatz zur Verfügung stand. So musste ich während der Kontrolle einige Male den Arbeitsort wechseln, um für die Routine Platz zu machen. Mit dem Formalin zu arbeiten war auch sehr unangenehm, da es im Rachen und in den Augen brannte.

Die 90 Blöcke zu schneiden, war sehr arbeitsintensiv, da das Anschneiden besonders zeitaufwändig war. Manche Arten von Knochen waren leichter zu schneiden als andere. Das Schneiden des Kiefers war nicht besonders einfach, aber da keiner aus dem Block herausspickte, war der gesamte Prozess etwas angenehmer. Die Wirbelsäule war sehr porös und brach deshalb mehrmals aus dem Block. Der Beckenkamm war massiv, was das Schneiden erschwerte, und löste sich auch einige Male heraus.

Als ich erfuhr, dass die immunhistochemischen Schnitte im Wasser vergessen worden waren und dadurch abgeschwommen waren, wurde ich etwas nervös. Ich machte mir Sorgen, dass ich alle Blöcke neu schneiden müsste. Dieser Gedanke war frustrierend, denn die ersten Schnitte hatten mich bereits viel Arbeit gekostet. Zum einen hatte ich wenig Erfahrung mit Knochenschneiden, zum anderen war das Mikrotom, mit dem die meisten Blöcke geschnitten wurden, eines der schlechteren. Ich war sehr erleichtert, als meine Praktikumsbetreuerin mir mitteilte, dass sie die Blöcke neu schneiden würde und wir die immunhistochemischen Färbung noch am gleichen Tag wiederholen konnten. Als die Schnitte erneut abschwammen, war ich nicht mehr so besorgt darüber, da wir inzwischen wussten, dass der Beckenkamm nicht viel Knochenmark hatte und somit kein grosses Potenzial für eine starke Immunreaktion besass. Dadurch lernte ich auch, dass Knochenproben, welche hauptsächlich aus Kompakta bestehen, Superfrost Plus Gold benötigen.

Gegen Ende des praktischen Teils ist ein Schnitt verloren gegangen. Da die Objektträger jedoch bereits mehrfach herumgegeben wurden, kann nicht genau gesagt werden, an welcher Stelle dieser verschwand und wo er sich nun befinden könnte.

Die Auswertung zeigte auch, dass die Qualität der Schlussergebnisse von vielen anderen Faktoren beeinflusst wird als nur von der Wahl des Entkalkungsmittels. So kann leider nicht nur die Entkalkung allein bewertet werden. Durch die grosse Anzahl Proben konnte diesem Problem hoffentlich entgegengewirkt werden.

Die Auswertung übersichtlich darzustellen, war schwieriger als erwartet. Zuerst versuchte ich, alle Daten in einer Grafik darzustellen. Es waren aber zu viele verschiedene Daten, sodass die Grafik nicht übersichtlich war. Als ich die Daten in verschiedene kleinere Grafiken runterbrach, wurde alles viel verständlicher.
Das Finden von geeigneten Quellen gestaltete sich anfangs ebenfalls schwierig. Doch nach einigen guten Tipps von Mitarbeitenden liessen sich passende finden.
Die Erarbeitung der Biochemie zur Entkalkung war sehr spannend und half, viele Aspekte nachvollziehen zu können.

Aus allen Schritten und Hürden konnten aber viele Erfahrungen und Wissen gewonnen werden, welche auf dem weiteren Weg genutzt werden können. Auch innerhalb des Labors können die Informationen angenommen und umgesetzt werden.

Im Verlauf der Arbeit kam die Frage auf, warum RDO nicht als alleiniges Entkalkungsmittel genutzt wird. Die Herstellerfirma verspricht viele Vorteile und auch innerhalb dieser Arbeit schien RDO keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben. Anscheinend ist die Entkalkungsmethode mit RDO noch in keinem Labor etabliert. Dies weiter zu untersuchen würde hier den Rahmen sprengen, darum wird zu einem anderen Zeitpunkt in diesem Bereich mehr nachgeforscht.

8 Literaturverzeichnis

Apex Engineering Products Corporation: *RDO, RAPID DECALCIFIER*, o.A., Dokument im Anhang
Apex Engineering Products Corporation: *RDO Rapid Decalcifier.* 2023, https://www.rdodecal.com/products/rdo-rapid-decalcifier/, Zugriff am: 29.04.2025
Beyer & Irmtraud: *Natura. Biologie im Grundlagenfach an Maturitätsschulen*. Klett und Balmer Verlag Zug, 2012, 1. Aufl., S. 266
Brunner: *Vergleich der beiden Knochenentkalker RDO und USERAPID*. 2015, https://www.medi.ch/arbeiten/Brunner_Vignia_Poster.pdf, Zugriff am: 27.04.2025
Chemie.de: *Hydroxylapatit*. o.A.-a, https://www.chemie.de/lexikon/Hydroxylapatit.html, Zugriff am: 31.05.2025
Chemie.de: *Komplexchemie*. o.A.-b, https://www.chemie.de/lexikon/Komplexchemie.html#Chelatkomplexe_und_Z.C3.A4hnigkeit, Zugriff am: 01.06.2025
Dako: *Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase.* 2020, Dokument im Anhang, Seite 3-4
DAN-Pharma GmbH / Laborbedarf DP: *USEDECALC*. o.A.-a, Dokument im Anhang
DAN-Pharma GmbH / Laborbedarf DP: *USERAPID.* o.A.-b, Dokument im Anhang
DocCheck Flexikon: *Fibröse Dysplasie*. 2021, https://flexikon.doccheck.com/de/Fibr%C3%B6se_Dysplasie, Zugriff am: 09.05.2025
DocCheck Flexikon: *Osteomyelitis*. 2024, https://flexikon.doccheck.com/de/Osteomyelitis, Zugriff am: 30.04.2025
Lang: *Histotechnik*. *Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag, 2013, 2. Aufl., S. 200 + 203
Leica Biosystems: *Eine Einführung in die Entkalkung*. o.A.-a, https://www.leicabiosystems.com/de-ch/knowledge-pathway/an-introduction-to-decalcification/, Zugriff am: 13.04.2025
Leica Biosystems: *Myeloperoxidase.* o.A.-b, https://shop.leicabiosystems.com/de/ihc-ish/ihc-primary-antibodies/pid-myeloperoxidase?srsltid=AfmBOorKOOfSUNKJp1Gt9iZ5sJHDVqj3ta_nuiSyN_MOZrCvIDKb_dFR, Zugriff am: 16.04.2025
Monova: *Effekte unterschiedlicher Konzentrationen einer kalziumhaltigen Salzhydratschmelze auf das erosive Potential säurehaltiger Getränke.* 2011, https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/5409/file/MonovDiss.pdf, Zugriff am: 01.06.2025
MSD Manual: *Osteomyelitis*. 2024, https://www.msdmanuals.com/de/profi/erkrankungen-des-rheumatischen-formenkreises-und-des-bewegungsapparats/infektionen-der-gelenke-und-knochen/osteomyelitis, Zugriff am: 30.04.2025
MVZ Gelenk-Klinik: *Osteonekrose*. 2025., https://gelenk-klinik.de/orthopaedie-glossar/osteonekrose-knochennekrose.html, Zugriff am: 01.05.2025
Thomas Medical Systems: *Entkalkungslösung für Knochen USEDECALC*. o.A., https://neu.thomas-medical.at/produkt/entkalkungsloesung-fuer-knochen-usedecal/, Zugriff am: 27.04.2025
USZ: *Osteomyelitis und medikamentenassoziierte Osteonekrosen (MRONJ) von Ober- und Unterkiefer.* 2025, https://www.usz.ch/krankheit/mronj/, Zugriff am: 29.04.2025
Visionbiosystems: *Kompaktes Polymer*. o.A., Unveröffentlichte Unterlagen

8.1 Abbildungsverzeichnis

Titelbild oben K5EU 2x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)
Titelbild unten R10E 4x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)
Abbildung 1 Molekulare Struktur von Hydroxyapatit $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (Quelle: Modifiziert nach EPRUI Biotech Co. Ltd., 2021)..... 8
Abbildung 2 Molekulare Struktur von EDTA $C_{10}H_{16}N_2O_8$. (Quelle: Wikipedia, 2025)..... 8
Abbildung 3 Calcium-EDTA-Komplex $CaC_{10}H_{12}N_2O_8^{2-}$ (Quelle: Chemistry, 2017) 9
Abbildung 4 K10E 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon).....121
Abbildung 5 R3E 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon).....112
Abbildung 6 Durchschnittliche Tagesdauer der Entkalkung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon) 18
Abbildung 7 Bewertung Schneidbarkeit (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon).....19
Abbildung 8 Bewertung Schneidbarkeit innerhalb der Säuren (+RDO) (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon) 20
Abbildung 9 Bewertung HE-Färbung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon) 21
Abbildung 10 R10E 7x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon).....22
Abbildung 11 R1U 7x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon).....22
Abbildung 12 Bewertung Immunfhistochemie-Färbung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Grafik, Oerlikon) 22
Abbildung 13 K1EU 5x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)……...23
Abbildung 14 K8U 5x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)..……..23
Abbildung 15 K1EU 5x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)..……..24
Abbildung 16 K4U 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)..……..24
Abbildung 17 K6EU 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)...……25
Abbildung 18 B7EU 6x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)……..25
Abbildung 19 R8EU 4x Vergrösserung (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon)……..25

8.2 Formelverzeichnis

Formel 1 Deprotonierung von EDTA (Quelle: Chemie.de, o.A.-a) 8
Formel 2 Demineralisierung Hydroxyapatit (Quelle: Monova, 2011)..... 9
Formel 3 Komplexbildung (Quelle: Chemie.de, o.A.-b) 9

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Benennungsmuster Kassetten (Quelle: Zocchi, 2025, Selbsterstellte Tabelle, Oerlikon).....14

9 Persönliche Erklärung und Plagiat

„Ich bestätige, die vorliegende Diplomarbeit mit dem

Thementitel: Validierung der Entkalkungsmethode von Knochenproben bei Kempf & Pfaltz
selbständig 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.“

Vorname: Carol
Name: Zocchi
Kurs: BMA H22

Ort / Datum / elektronische Unterschrift

Schlieren, 22.06.2025 C. Zocchi

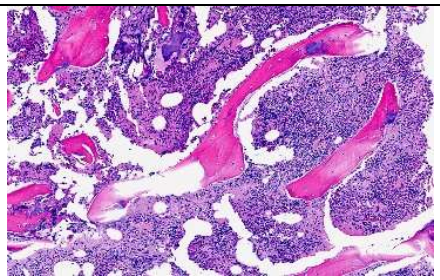
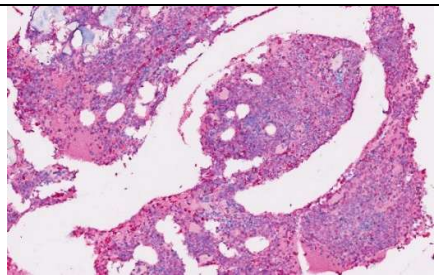
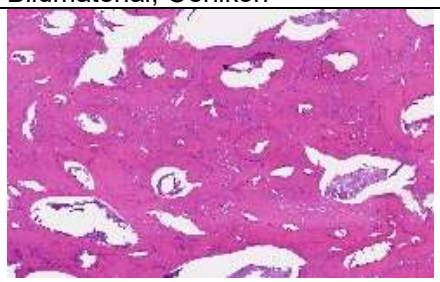
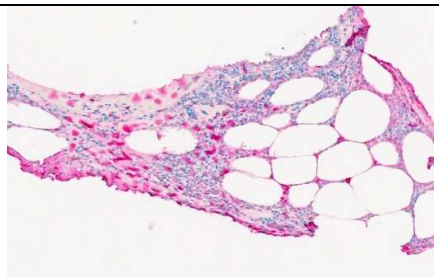
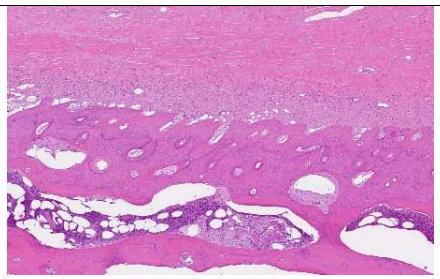
10 Anhang

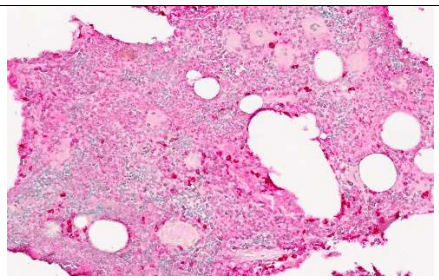
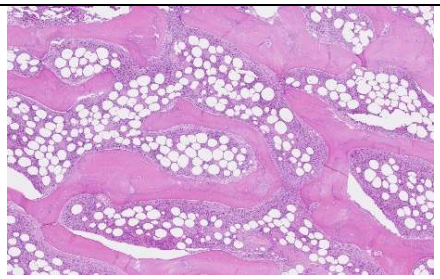
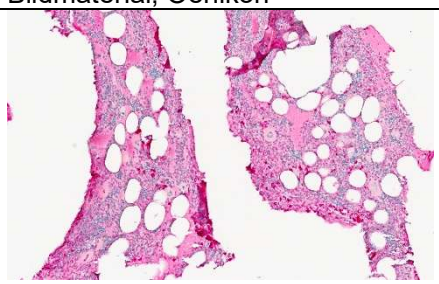
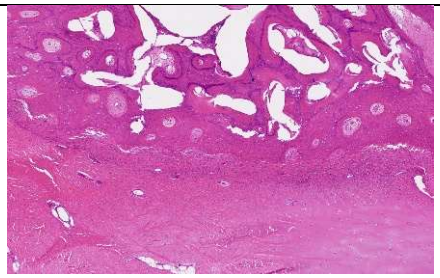
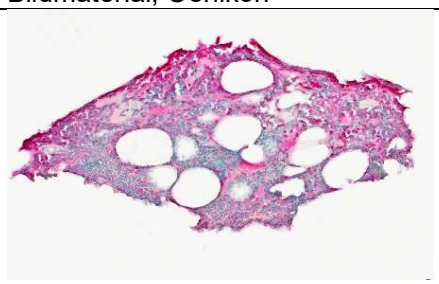
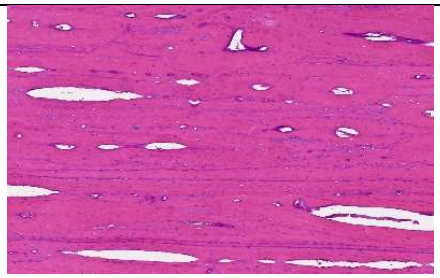
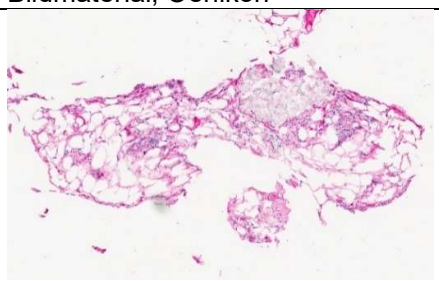
10.1 Verwendete KI-Tools

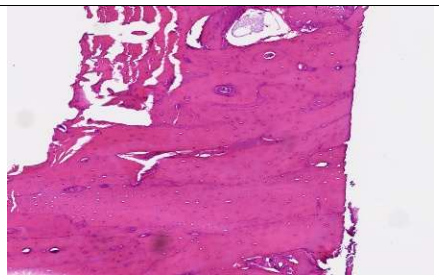
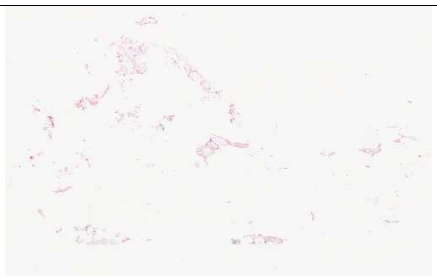
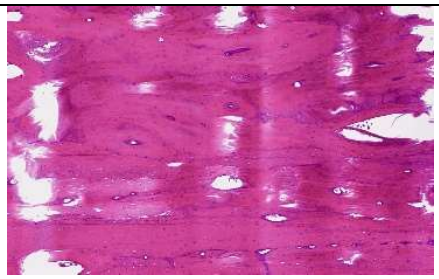
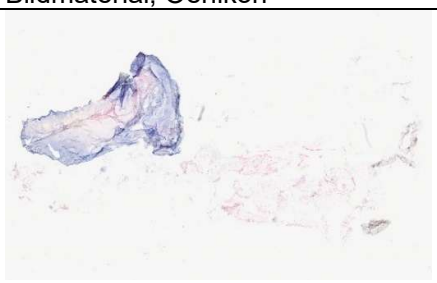
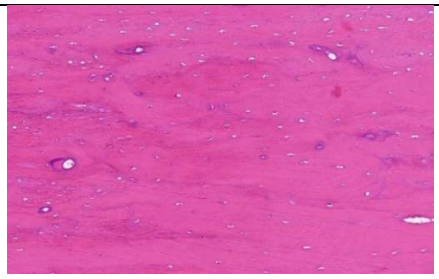
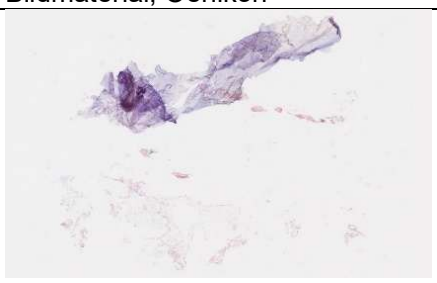
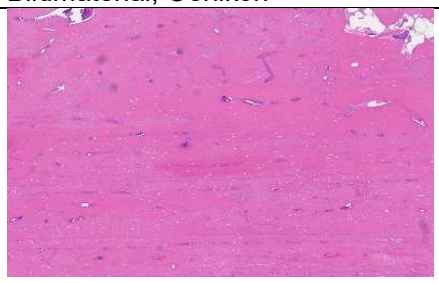
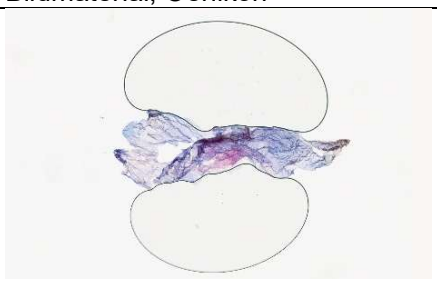
KI-Instrument	Verwendung	Betroffenes Kapitel in der Diplomarbeit
DeepL	Überprüfung der Rechtschreibung und Verbesserung des Schreibstils	Gesamte Diplomarbeit
ChatGPT	Überprüfung der Rechtschreibung und Einhaltung der Vorgaben	Gesamte Diplomarbeit

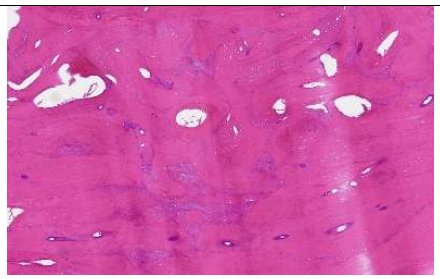
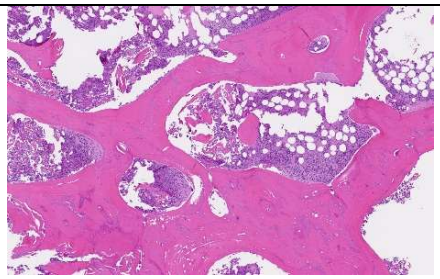
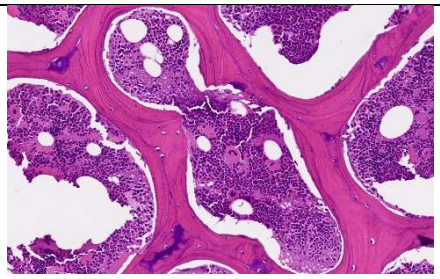
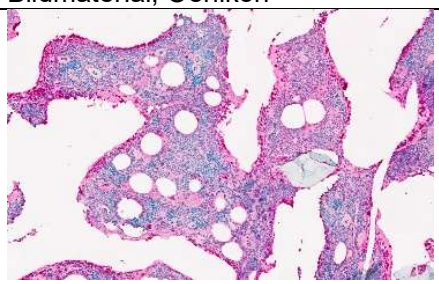
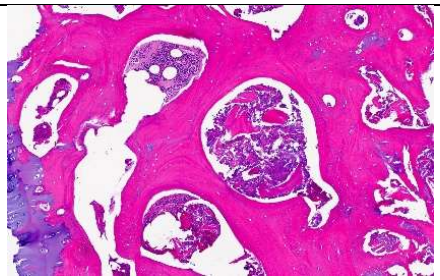
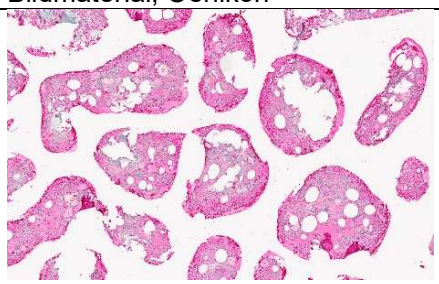
10.2 Bilder einiger Objektträger

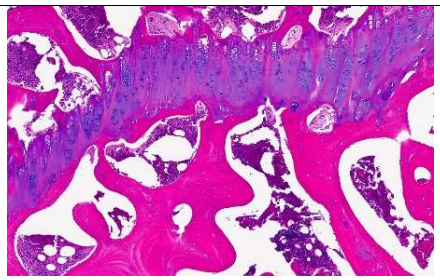
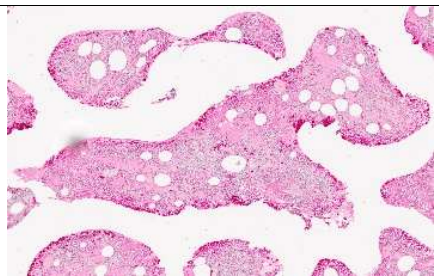
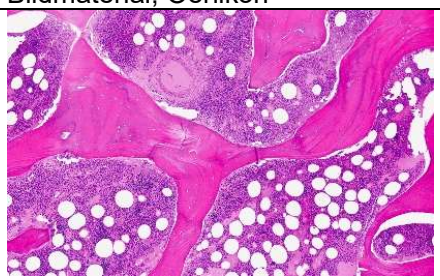
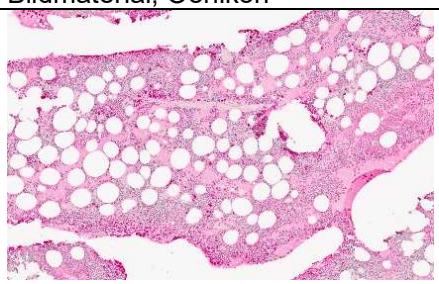
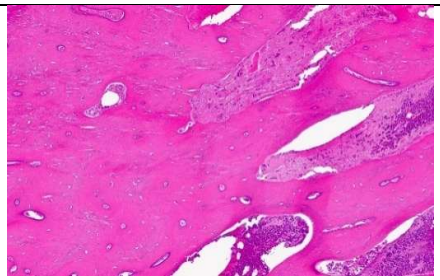
Weitere Scans können auf Anfrage bei der IT-Abteilung oder bei der Praktikumsbetreuerin von Kempf & Pfaltz eingesehen werden.

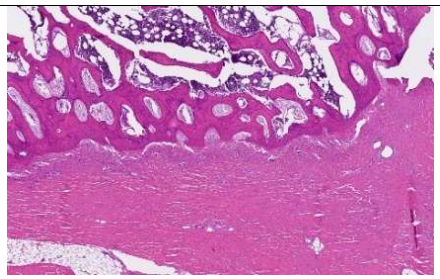
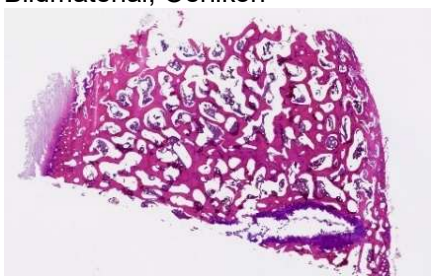
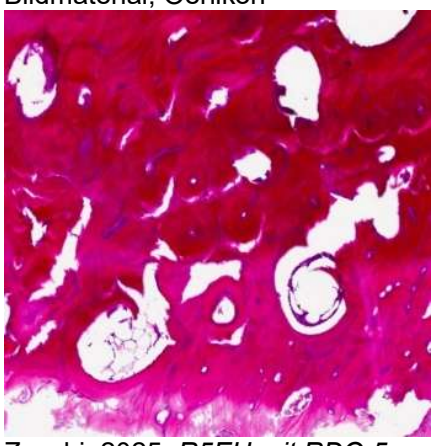
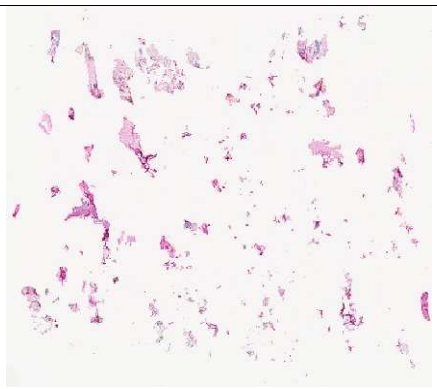
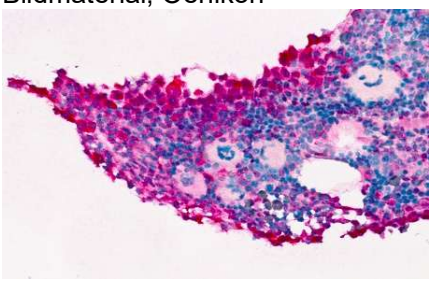
Probengruppe	HE-Färbung	Immunhistochemische Färbung mit MPO-Marker
KE	 Zocchi: 2025, *K10E 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *K10E 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
KE mit RDO	 Zocchi: 2025, *K6E 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *K5E 7x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
KEU	 Zocchi: 2025, *K1EU 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	Zocchi: 2025, *K1EU 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

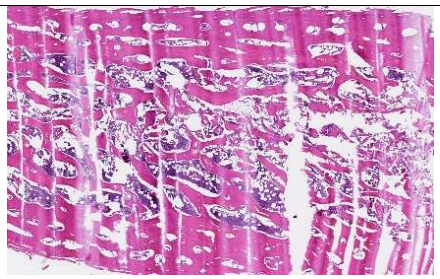
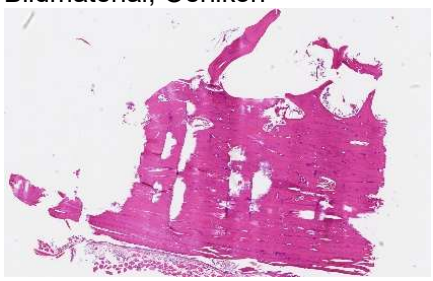
KEU mit RDO	 Zocchi: 2025, *K6EU 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *K5EU 7x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
KU	 Zocchi: 2025, *K8U 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *K4U 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
KU mit RDO	 Zocchi: 2025, *K7U 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *K5U 8x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
BE	 Zocchi: 2025, *B9E 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *B6E 4x Vergrösserung, einziger Schnitt mit Reaktion.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

BE mit RDO	 Zocchi: 2025, *B5E 4x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *B1E 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
BEU	 Zocchi: 2025, *B4EU 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *B3EU 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
BEU mit RDO	 Zocchi: 2025, *B7EU 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *B2EU 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
BU	 Zocchi: 2025, *B3U 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *B7U 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

BU mit RDO	 Zocchi: 2025, *B6U 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *B5U 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
RE	 Zocchi: 2025, *R4E 4x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *R3E 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
RE mit RDO	 Zocchi: 2025, *R10E 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *R10E 7x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
REU	 Zocchi: 2025, *R6EU 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *R10EU 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

REU mit RDO	 Zocchi: 2025, *R8EU 4x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *R7EU 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
RU	 Zocchi: 2025, *R3U 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *R3U 6x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon
RU mit RDO	 Zocchi: 2025, *R2U 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *R1U 7x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

Diverse	 Zocchi: 2025, *K1E mit RDO 4x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon  Zocchi: 2025, *R1E mit RDO 4x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon  Zocchi: 2025, *R5EU mit RDO 5x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon	 Zocchi: 2025, *K6E mit RDO 2x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon  Zocchi: 2025, *R10E mit RDO 20x Vergrösserung, Immunantwort.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

Artefakte	 Zocchi: 2025, *K9E ohne RDO 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon  Zocchi: 2025, *B10E ohne RDO 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon Zocchi: 2025, *B10EU ohne RDO 1x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon Zocchi: 2025, *B10U mit RDO 2x Vergrösserung.* Selbsterstelltes Bildmaterial, Oerlikon

10.3 Protokolle

10.3.1 Entkalkungsprotokoll

Entkalkungsprotokoll

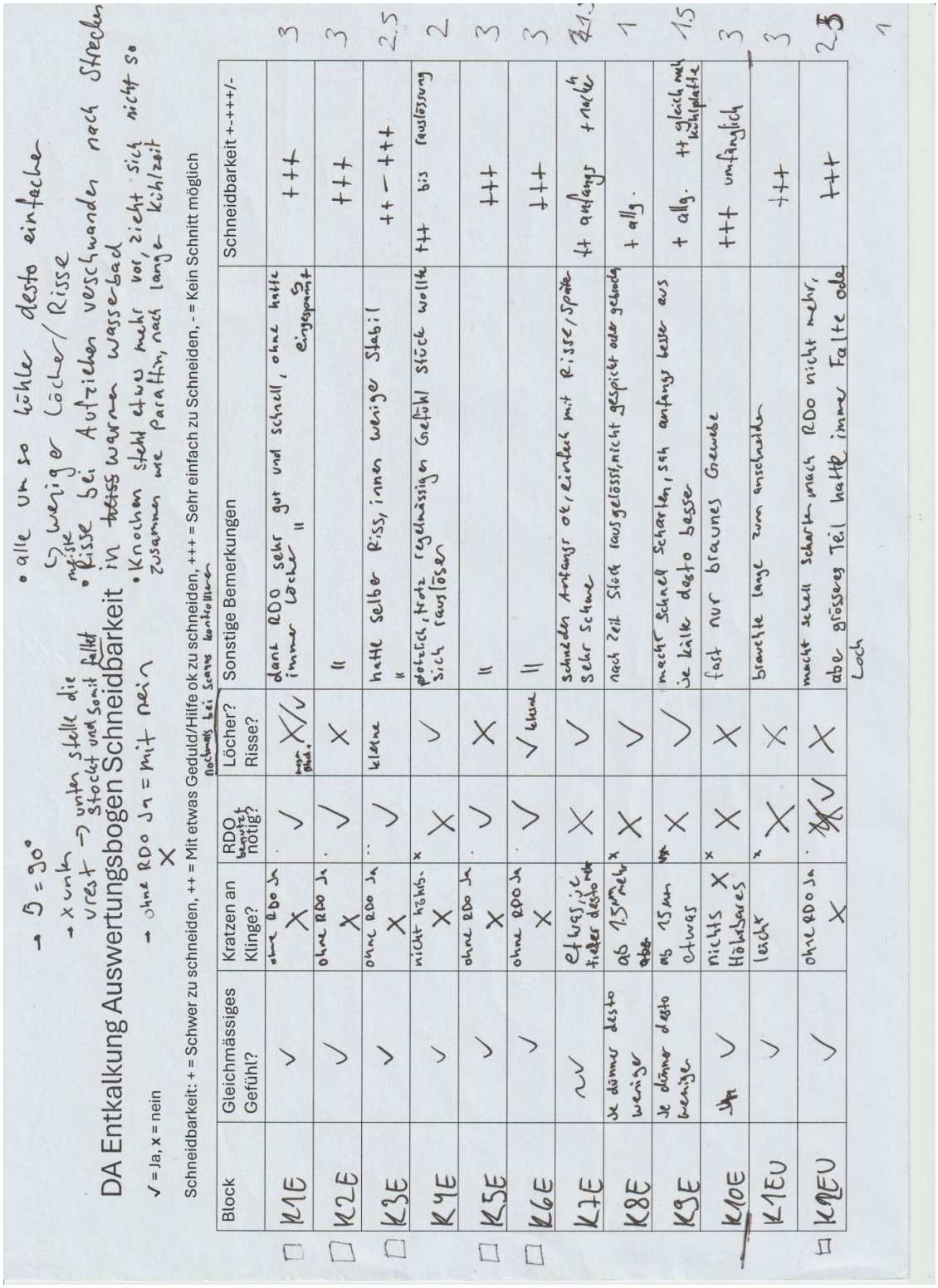
Probennummer	Entkalkungsmittel	Einlege Datum	Entkalkungsgrad - = Kaum Veränderung, + = etwas weicher, ++ = ziemlich weich, +++ = ausreichend weich Gebrochen, von EDTA zu UR, Schallbad nicht gelaufen, fertig entkalkt, Sonntag nicht kontrolliert												
Kiefer	E=EDTA, U=Use Rapid	nach	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d
K1E	EDTA	26.2.25	+	+++												
K2E	EDTA	26.2.25	+	+	+		++	++	+++							
K3E	EDTA	26.2.25	+	++	++		++	+++								
K4E	EDTA	26.2.25	++	+++												
K5E	EDTA	26.2.25	-	-	+		++	++	+++							
K6E	EDTA	26.2.25	-	-	+		+	++	+++							
K7E	EDTA	26.2.25	+	+	++		++	+++								
K8E	EDTA	26.2.25	++	+++												
K9E	EDTA	26.2.25	-	+	++		+++									
K10E	EDTA	26.2.25	+	+	++		+++									
K1EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	+++	+++											
K2EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	+++	+++											
K3EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	+++	+++											
K4EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	++	++		++	+++								
K5EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	++	++		+++	+++								
K6EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	++	++		++	++	+++							
K7EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	++	+++		+++									
K8EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	+	++		+++	+++								
K9EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	+	++		+++	+++								
K10EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	+	++		++	+++								
K1U	Use Rapid	26.2.25	+++													
K2U	Use Rapid	26.2.25	+++													
K3U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
K4U	Use Rapid	26.2.25	+++													
K5U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
K6U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
K7U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
K8U	Use Rapid	26.2.25	+++													
K9U	Use Rapid	26.2.25	+++													
K10U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												

Probennummer	Entkalkungsmittel	Einlege Datum	Entkalkungsgrad - = Keine Veränderung, + = etwas weicher, ++ = ziemlich weich, +++ = genügend weich Gebrochen, von EDTA zu UR, X Schallbad, fertig entkalkt, Sonntag nicht kontrolliert + X Schallbad												
Beckenkamm	E=EDTA, U=Use Rapid	nach	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d
B1E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	+		+	++	++
B2E	EDTA	26.2.25	-	-	-		-	+	+	+	+	+		++	+++	
B3E	EDTA	26.2.25	-	-	-		-	+	+	++	++	++		++	+++	
B4E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	+		+	+	+
B5E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	+		+	++	++
B6E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	+		+	++	++
B7E	EDTA	26.2.25	-	-	+		++	++	+++							
B8E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	++		+++		
B9E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	+		+	++	++
B10E	EDTA	26.2.25	-	-	-		+	+	+	+	+	+		+	++	++
B1EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		-	++	+++							
B2EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		-	++	+++							
B3EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	+++								
B4EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	+++								
B5EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		-	+++								
B6EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	++	++	++	+++					
B7EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	+++								
B8EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	+++								
B9EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		-	++	++	+++						
B10EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	++	+++							
B1U	Use Rapid	26.2.25	+	+++												
B2U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
B3U	Use Rapid	26.2.25	+	++	+++											
B4U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
B5U	Use Rapid	26.2.25	+	++	+++											
B6U	Use Rapid	26.2.25	+	++	+++											
B7U	Use Rapid	26.2.25	+	++	+++											
B8U	Use Rapid	26.2.25	+	+++												
B9U	Use Rapid	26.2.25	+	+++												
B10U	Use Rapid	26.2.25	+	++	+++											

Probennummer	Entkalkungsmittel	Einlege Datum	Entkalkungsgrad - = Keine Veränderung, + = etwas weicher, ++ = ziemlich weich, +++ = genügend weich Gebrochen, von EDTA zu UR, Schaltbad nicht gelaufen, fertig entkalkt, Sonntag nicht kontrolliert												
Rückenmark/WS	E=EDTA, U=Use Rapid	nach	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d
R1E	EDTA	26.2.25	-	-	-		-	+	+	+	+	+		+	+	++
R2E	EDTA	26.2.25	-	+	+		+	+	+	+	+	+		++	++	++
R3E	EDTA	26.2.25	-	+	+		+	+	++	++	+++					
R4E	EDTA	26.2.25	-	++	++		+++									
R5E	EDTA	26.2.25	-	-	+		+	++	+++							
R6E	EDTA	26.2.25	-	+	+		+	+	+	+	+	+		++	++	++
R7E	EDTA	26.2.25	-	+	++		++	+++								
R8E	EDTA	26.2.25	+	++	++		++	++	++	++	++	++		+++		
R9E	EDTA	26.2.25	+	++	++		+++									
R10E	EDTA	26.2.25	+	++	++		+++									
R1EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	+		+	+++								
R2EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	+	+		++	+++								
R3EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	+++								
R4EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	+	+		++	+++								
R5EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	++	+++							
R6EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	+	++		+++	+++								
R7EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		-	+	+++							
R8EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		++	+++								
R9EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	-	-	-		+	++	+++							
R10EU	EDTA + Use Rapid	26.2.25	+	++	++		+++	+++								
R1U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
R2U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
R3U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
R4U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
R5U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
R6U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												
R7U	Use Rapid	26.2.25	+	+++												
R8U	Use Rapid	26.2.25	+	+++												
R9U	Use Rapid	26.2.25	+++													
R10U	Use Rapid	26.2.25	++	+++												

Probennummer	Entkalkungsmittel	Einlege Datum	Entkalkungsgrad - = Keine Veränderung, + = etwas weicher, ++ = ziemlich weich, +++ = ausreichend weich Gebrochen, von EDTA zu UR, Schallbad Vorabend aus, fertig entkalkt, Sonntag nicht kontrolliert											
RM/BK	E=EDTA, U=Use Rapid	nach	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	22d	23d	24d	25d	26d	27d
R1E	EDTA		++	+++											
R2E	EDTA		+++												
R6E	EDTA		++	+++											
B1E	EDTA		++	++	++		+++								
B4E	EDTA		++	++	++		+++								
B5E	EDTA		++	++	+++										
B6E	EDTA		++	++	+++										
B9E	EDTA		++	++	+++										
B10E	EDTA		+++												

10.3.2 Auswertungsbogen Schneidbarkeit



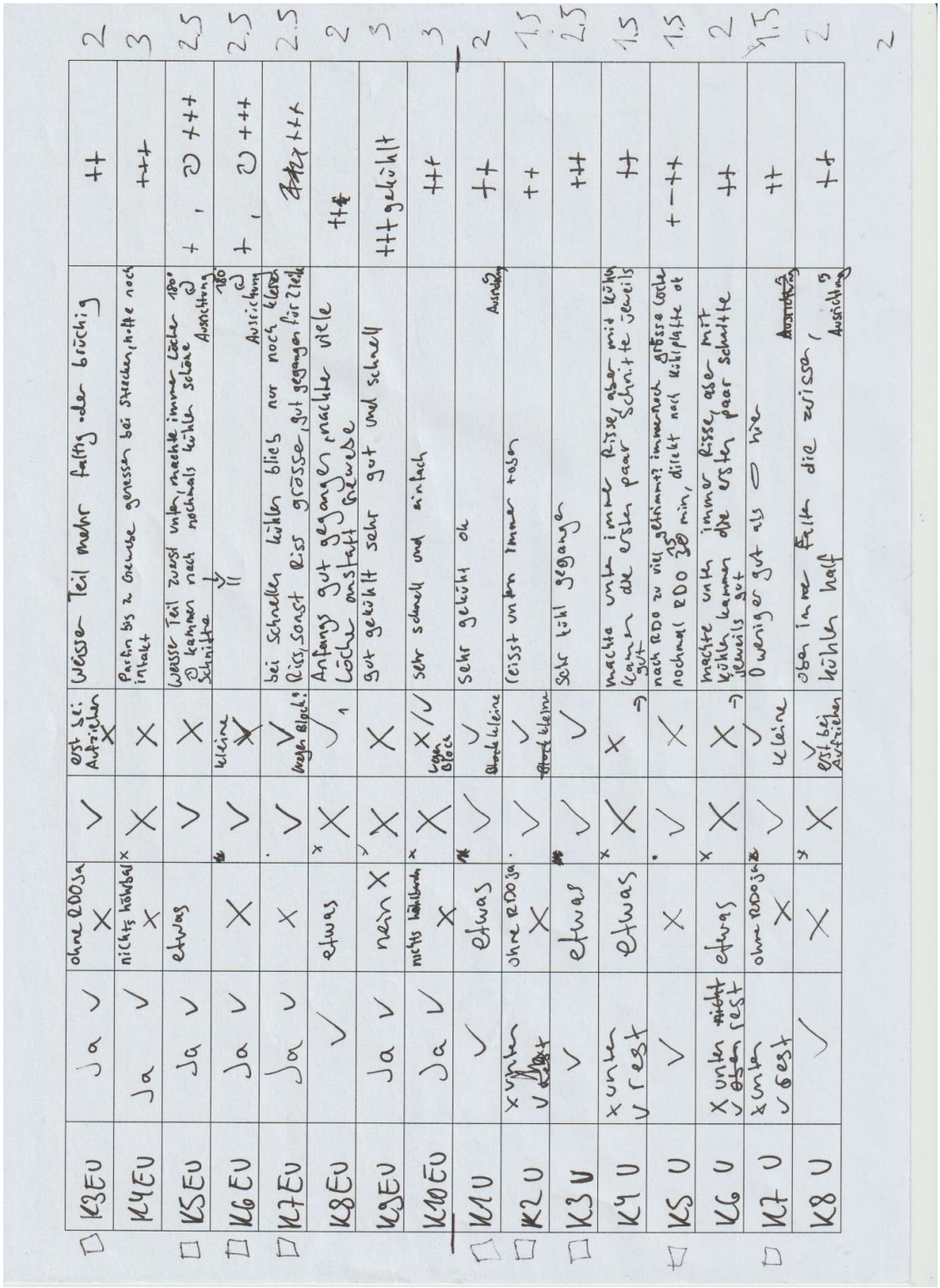
→ 5 = 90°
→ x unten
vorst → unten stelle die Stoccht und somit fällt
• alle um so kühler desto einfacher
schneidiger
• Risse bei Auftrichen verschwanden nach Strecken

DA Entkalkung Auswertungsbogen Schneidbarkeit in heiss warmen wasserbad

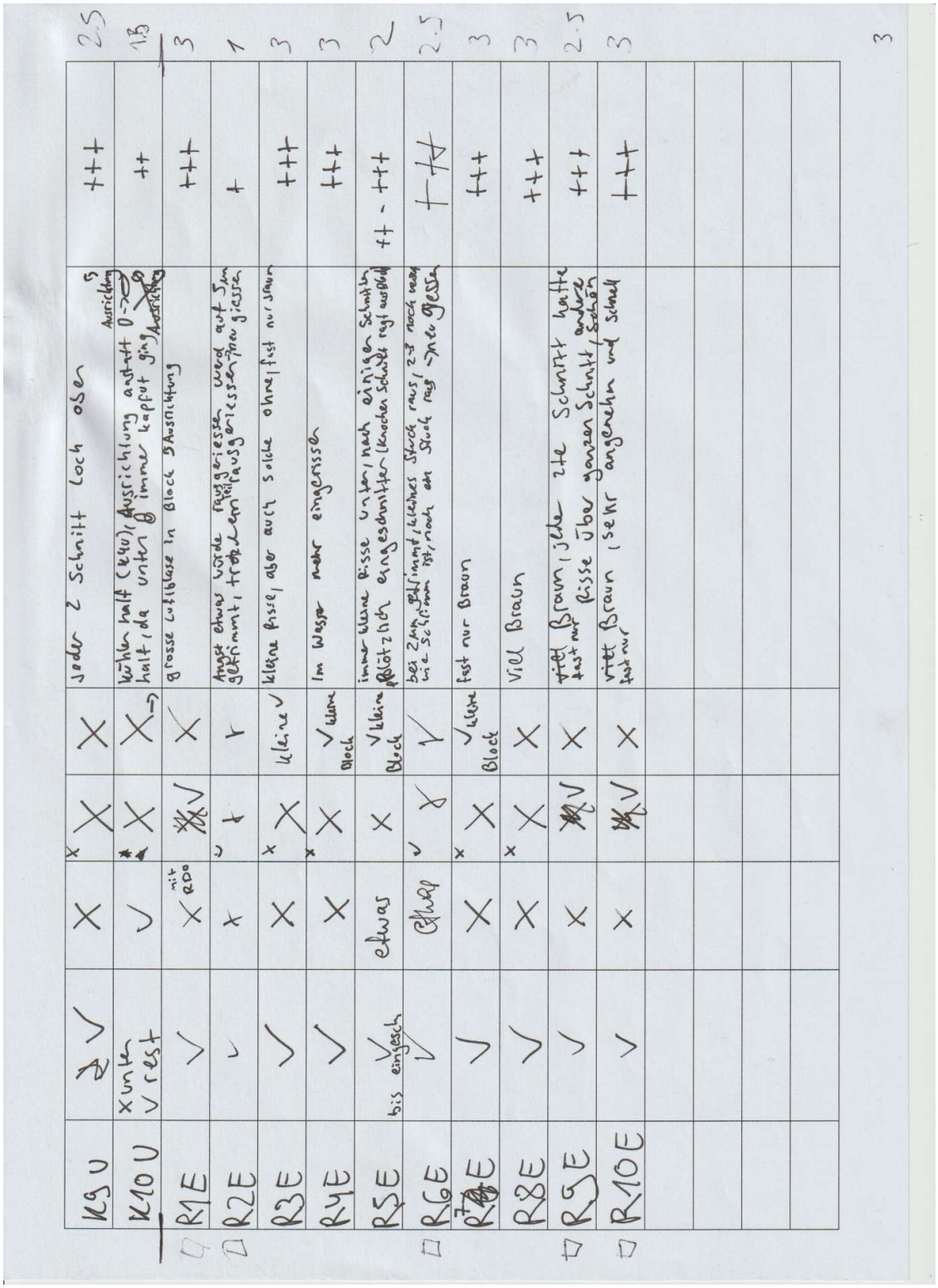
✓ = Ja, x = nein
→ ohne RDO Ja = mit nein
X
• Knochen steht etwas mehr vor, zieht sich nicht so zusammen wie paraffin, nach langer Kühlzeit

Schneidbarkeit: + = Schwer zu schneiden, ++ = Mit etwas Geduld/Hilfe ok zu schneiden, +++ = Sehr einfach zu Schneiden, - = Kein Schnitt möglich

Block	Gleichmässiges Gefühl?	Kratzen an Klinge?	RDO benutzt nötig?	Löcher? Risse?	Sonstige Bemerkungen	Schneidbarkeit +-+++/-	
K1E	✓	ohne RDO Ja X	✓	kaum Risse X/✓	dank RDO sehr gut und schnell, ohne hatte immer Löcher " eingespannt	+++	3
K2E	✓	ohne RDO Ja X	✓	X	"	+++	3
K3E	✓	ohne RDO Ja X	✓	kleine	hatte selber Riss, innen weniger Stabil "	++ - +++	2.5
K4E	✓	nicht nötig x X	X	✓	plötzlich, trotz regelmässigen Gefühl Stück wollte sich rauslösen	+++ bis auslösung	2
K5E	✓	ohne RDO Ja X	✓	X	"	+++	3
K6E	✓	ohne RDO Ja X	✓	✓ keine	"	+++	3
K7E	~✓	eh egal, je tiefer desto mehr	X	✓	schneiden Anfangs oft, einfach mit Risse/Späne sehr Schwer	++ anfangs +nicht	2.5
K8E	je dünner desto weniger	ab 15 mehr x	X	✓	nach Zeit Stoff rausgelöst, nicht gespickt oder gekocht	+ allg.	1
K9E	je dünner desto weniger	ab 15 nun x Etwas	X	✓	macht schnell Schwarten, geh anfangs besser aus je kälter desto besser	+ allg. ++ gleich mit Kühlplatte	1.5
K10E	✓	nichts x Hölzernes	X	X	fast nur braunes Gewebe	+++ unfänglich	3
K1EU	✓	leicht x	X	X	brauchte lange zum anschneiden	+++	3
K2EU	✓	ohne RDO Ja X	✓ X	X	macht schnell Schwarten nach RDO nicht mehr, aber grösseres Teil hatte immer Falte oder Loch	+++	2.5



K3EU	Ja ✓	ohne EDOja X	✓	erst bei Aufziehen X	Wasser Teil mehr faltig oder brüchig	++	2
K4EU	Ja ✓	nichts hörbar X	X	X	Partin bis z Grenze gewesen bei Strecken, hatte noch Inhalt	+++	3
K5EU	Ja ✓	etwas	✓	X	Wasser Teil zuerst unten, machte immer Löcher 180° ② kammen nach nochmals kühler setzen Schnitte Ausrichtung	+ , ② +++	2.5
K6EU	Ja ✓	X	✓	kleine X	11 180 Ausrichtung ②	+ , ② +++	2.5
K7EU	Ja ✓	X	✓	✓ mehr Blasen!	bei Schneiden kühlen blieb nur noch kleben Riss, sonst Riss grösser, gut gegangen für Zeit	+++	2.5
K8EU	✓	etwas	X	✓	Anfangs gut gegangen machte viele Löcher anschliessend Grösse	++	2
K9EU	Ja ✓	nein X	X	X	gut gekühlt sehr gut und schnell	+++ gekühlt	3
K10EU	Ja ✓	nichts hörbar X	X	X/✓ wegen Block	sehr schnell und einfach	+++	3
K11U	✓	etwas	✓	✓ Block kleine	sehr gekühlt ok Ausrichtung	++	2
K2U	x unten ✓ rest	ohne EDO ja X	✓	✓ Block kleine	reisst unten immer raus	++	1.5
K3U	✓	etwas	✓	✓	sehr kühl gegangen	+++	2.5
K4U	x unten ✓ rest	etwas	X	X → gut	machte unten immer Risse, aber mit kühlen Kammen die ersten paar Schnitte jeweils	++	1.5
K5U	✓	X	✓	X	nach EDO zu viel gekämmt immer grösse Locher nochmal EDO 3Std min, direkt nach Kühlplatte ok	+ — ++	1.5
K6U	X unten nicht ✓ oben rest	etwas	X	X →	machte unten immer Risse, aber mit kühlen kammen alle ersten paar Schnitte jeweils gut	++	2
K7U	X unten ✓ rest	ohne EDO ja X	✓	✓ kleine	0 weniger gut als 6 hier Ausrichtung	++	1.5
K8U	✓	X	X	✓ erst bei Aufziehen	oben immer Risse die reissen, kühlen half Ausrichtung	++	2



K9 U	✓	X	X	X	jeder 2 Schnitt Loch oder Ausrichtung 5	+++	2.5
K10 U	X unten V rest	✓	X	X→	Mittlen halt (KEW), Ausrichtung anhaut 0-> halt, da unten immer kapput ging Ausrichtung	++	1.5
R1E	✓	X mit RDO	X	✓	grosse Luftblase in Block 5 Ausrichtung	+++	3
R2E	✓	✓	✓	✓	Angst etwas wurde rausgerissen und auf Sim gekommt, trotzdem rausgerissen/an gerissen	+	1
R3E	✓	X	X	kleine ✓	kleine Risse, aber auch solche ohne fast nur Staub	+++	3
R4E	✓	X	X	✓ kleine Block	Im Wasser mehr eingerissen	+++	3
R5E	bis ✓ eingetrocknet	etwas	X	✓ kleine Block	immer kleine Risse unten, nach einigen Schnitten plötzlich eingesammelt (Knochen Schicht rauf ausgebildet)	++ - +++	2
R6E	✓	etwas	✓	✓	bei 2mm Gefrierung kleines Stück raus, 2-3 noch mal in 4-5 mm ist noch ein Stück rausgerissen	+/+	2.5
R7E	✓	X	X	✓ kleine Block	fast nur Braun	+++	3
R8E	✓	X	X	X	Viel Braun	+++	3
R9E	✓	X	✓	X	viel Braun, jede 2te Schnitt hatte fast nur Risse über ganzen Schnitt anderen Schaden	+++	2.5
R10E	✓	X	✓	X	viel Braun, sehr angenehm und schnell fast nur	+++	3

ja, x = nein
+ = schwer zu schneiden, ++ = mit etwas Geduld/Hilfe ok, +++ = sehr einfach, − = kein Schnitt möglich

	Block	Gleichmässiges Gefühl?	Kratzen am Messer?	RDO benutzt?	Löcher? Risse?	Sonstige Bemerkungen	Schneidbarkeit + − +++ / −
☐	R1 EU	~~gleichmässig~~ ~~Schneidkante~~ N/A	leicht	ja	kl. Löcher	gerade als Knochen erreicht fast kompletter Stück raus (Zahn) vorsichtig Anschneiden-Stücken 5	+++ 2.5
	R2 EU	Ja	leicht	Nein	kleine Löcher	Vorsichtig Anschneiden	++ 3
	R3 EU	gleichmässig schneidbar	kratzt leicht	Nein	kleine Löcher	Vorsichtig Anschneiden 2	+++ 3
	R4 EU	X Stelle	leicht	X	V		++ 2
☐	R5 EU	eher ✓	Reißerisch	V	V	hatte fast immer noch Löcher/Risse musste 2-3 erste schnitte nach kP sein	+ 1.5
	R6 EU	V	leicht	X	kleine		+++ 3
☐	R7 EU	V	RDO X	V	bei Anfang	fast nur Braun	+++ 3
☐	R8 EU	V	RDO X	V	X	hatte noch kleine Löcher	++ 3
☐	R9 EU	V	ca. X	V	kleine	extrem einfach nach RDO	+++ 3
☐	R10 EU	V	X	X	X	fast nur braun	+++ 3

4

V=ja, X=nein

+=schwer zu schneiden, ++= mit etwas Geduld / Hilfe ok, +++=sehr einfach, -=kein Schnitt möglich

	Block	Gleichmässiges Gefühl?	Kratzen an Klinge?	RDO benutzt?	Locker? Risse?	Sonstige Bemerkungen	Schneidbarkeit +- +++/-	
☐	R1 U	Ja	Nein	Ja	Nein		+++ (nach RDo)	3
☐	R2 U	eher Ja	Nein	Ja	Kleine	Nur Gissen etwas rausgespickt	+++ (nach RDo)	2.5
	R3 U	Ja	Nein	Nein	Kleine		++	2
☐	R4 U	Nein	Ja	Ja	Ja	~~nur Gissen etwas rausgespickt~~	++	1.52
☐	R5 U	X	✓	✓	✓	nur Gissen etwas rausgespickt.	++	1.5
	R6 U	eher Ja	Nein	Nein	Kleine		++	2
	R7 U	etwas	Nein	Nein	Ja		++	2
☐	R8 U	Nein	Nein	Ja,	Nein		+++ (nach RDo)	2.5
	R9 U	Ja	Ja	Nein	Kleine		++	2
	R10 U	Ja	Nein	Nein	Kleine		++/+++	2.5

5

+ = schwer zu schneiden, ++ = mit etwas Geduld/Hilfe ok, +++ = sehr einfach, - = kein Schnitt möglich

	Block	Gleichmässiges Gefühl?	Kratzen an Klinge?	RDO benutzt?	Löcher? Risse?	Sonstige Bemerkungen	Schneidbarkeit +- +++/-	
□	B1 E	✓	X	✓	✓	sehr kleine Löcher	~~+++~~ +++	3
□	B2 E	✓	nach RDO X	✓	✓	rausgespielt	+ mit RDO ++	2
	B3 E	✓	X	X	✓		++	2
	B4 E	✓	X	X	✓		++	2,5
□	B5 E	✓	X	✓	X		+++	3
	B6 E	✓	X	X	X		++	2
□	B7 E	✓	X	✓	X		+++	3
□	B8 E	✓	X	✓	✓	rausgespielt, kleine Risse	+ / ++	1,5
	B9 E	✓	✓	X	X	wenig kratziges Gefühl beim Schneiden (war aber okay)	+++	3
	B10 E	✓	X	X	✓	winzig kleine Löcher	+++	3

6

V = ja, X = nein
+ = schwer zu schneiden, ++ = mit etwas Geduld/Hilfe ok, +++ = sehr einfach, - = kein Schnitt möglich

Block	Gleichmässiges Gefühl?	Kratzen an Klinge?	RDO benutzt?	Löcher? Risse?	Sonstige Bemerkungen	Schneidbarkeit +- +++ /-	
B1 EU	✓	✓	X	✓		++	2
B2 EU	✓	X	✓	✓		++	2
B3 EU	✓	✓	X	X		+++	2.5
B4 EU	✓	✓	X	✓		++	2
B5 EU	✓	X	✓	X		+++	3
B6 EU	X	✓	X	✓		+	1
B7 EU	✓	X	✓	X		+++	3
B8 EU	✓	X	✓	X	in Mitte Proben	+++	3
B9 EU	✓	X	✓	✓	bleibend viele Löcher / Risse mitte paraffin	++	2
B10 EU	✓	✓	X	✓		++	2

DA Entkalkung Auswertungsbogen Schneidbarkeit

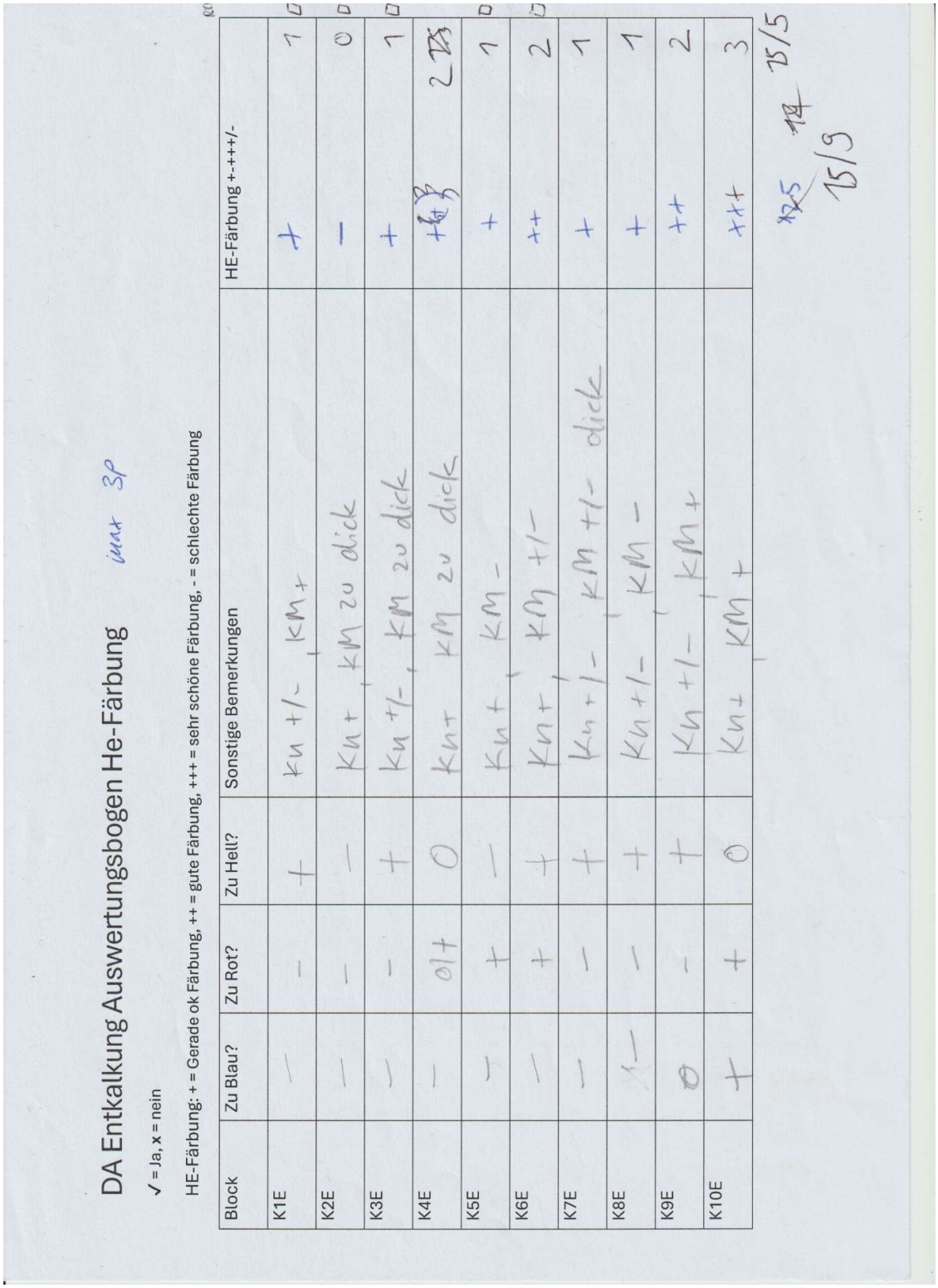
✓ = Ja, x = nein

Schneidbarkeit: + = Schwer zu schneiden, ++ = Mit etwas Geduld/Hilfe ok zu schneiden, +++ = Sehr einfach zu Schneiden, - = Kein Schnitt möglich

Block	Gleichmässiges Gefühl?	Kratzen an Klinge?	RDO benutzt nötig?	Löcher? Risse?	Sonstige Bemerkungen	Schneidbarkeit +-+++/-	
B1 U	x	✓	x	✓ in Gewebe	hat noch Gewebe, ville Löcher und Risse selten ohne	++	1.5
B2 U	x, 2 Stellen die immer stocken nach RDO ok	x mit RDO	✓	x	immer noch nach RDO viele Löcher/Risse	+	2
B3 U	✓	x	x	x	etwas Gewebe dabei	+++	3
B4 U	stockte immer x wieder	x	x	✓	hatte immer viele Löcher noch Gewebe?	++	2
B5 U	✓	✓	✓	✓	Sehr vorsichtig Anschneiden, macht immer Löcher	+	1.5
B6 U	✓	x mit RDO	✓	✓	vorsichtig Anschneiden, macht immer Löcher	+	1.5
B7 U	✓	x	x	x	Bei Arztzeiten manchmal zerrissen	+++	3
B8 U	✓	x	x	x ✓	~~immer noch~~	+++	3
B9 U	✓	ja	✓	x	kleines Stück rausgelässt, ohne Vorwarnung nicht gespürt, neu giessen	+++	2.5
B10 U	✓	ja	ja	ja	kleines Stück rausgesprungen → neu giessen vorsichtig Anschneiden keine Probleme	++	2.5

8

10.3.3 Auswertungsbogen HE-Färbung



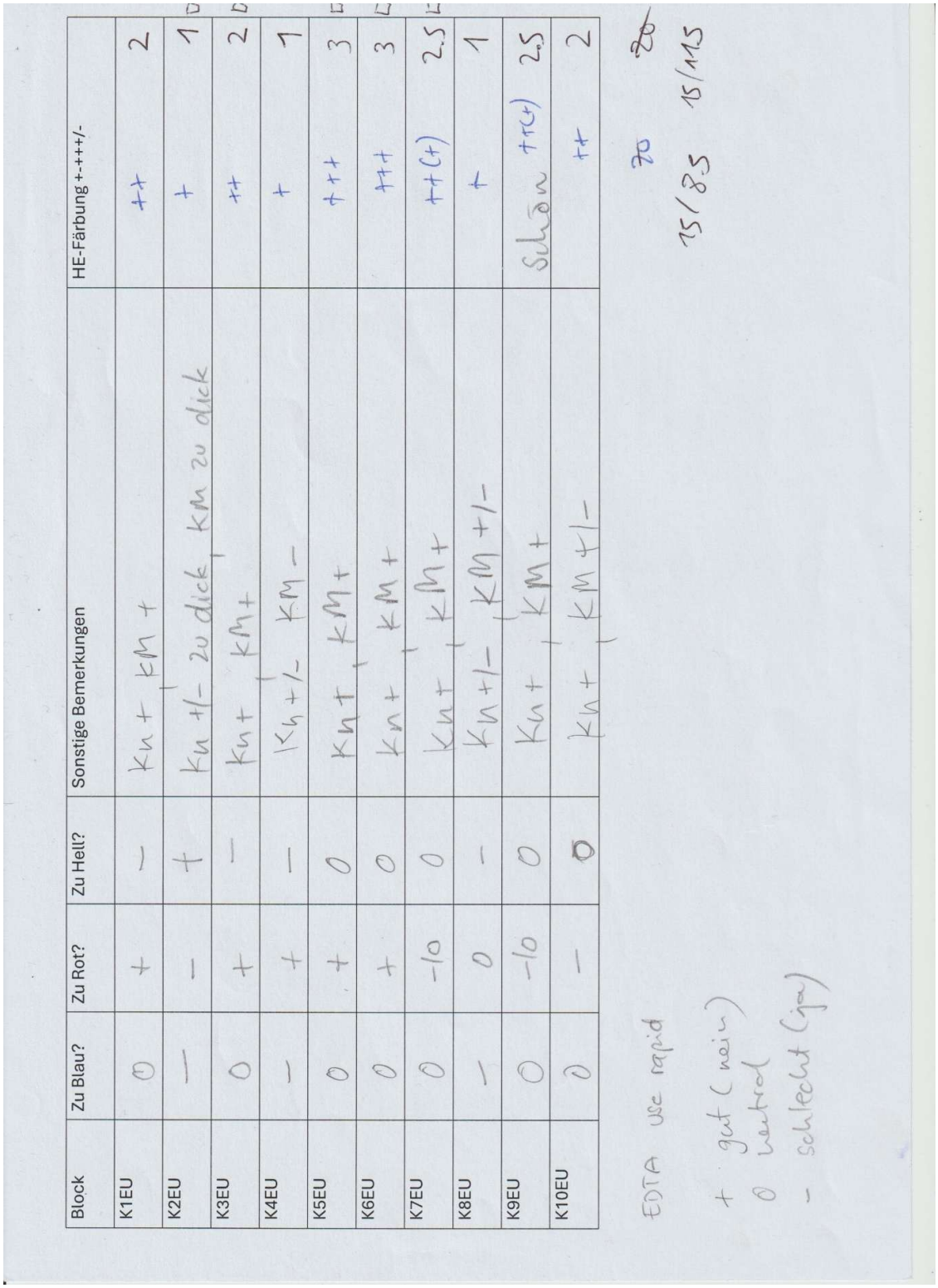
DA Entkalkung Auswertungsbogen He-Färbung inst SP

✓ = Ja, x = nein

HE-Färbung: + = Gerade ok Färbung, ++ = gute Färbung, +++ = sehr schöne Färbung, - = schlechte Färbung

Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-+++/-
K1E	-	-	+	Kn +/- KM+	+
K2E	-	-	-	Kn+ KM zu dick	-
K3E	-	-	+	Kn +/- KM zu dick	+
K4E	-	o/+	0	Kn+ KM zu dick	+/-
K5E	-	+	-	Kn+ KM-	+
K6E	-	+	+	Kn+ KM +/-	++
K7E	-	-	+	Kn +/- KM +/- dicke	+
K8E	+/-	-	+	Kn +/- KM -	+
K9E	0	-	+	Kn +/- KM+	++
K10E	+	+	0	Kn+ KM+	+++

15/5 18 15/5
15/3

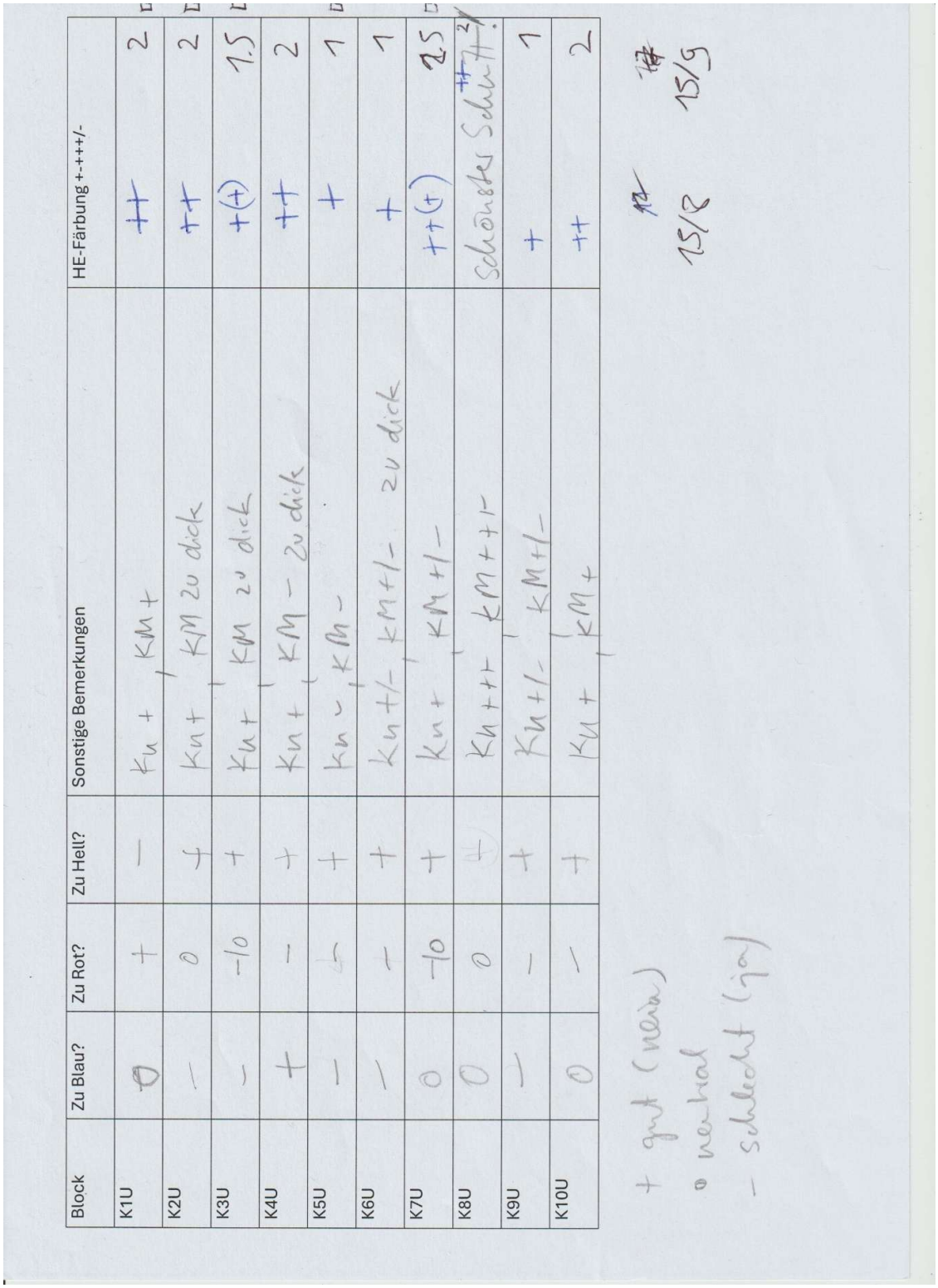


Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-++/-
K1EU	0	+	-	Kn + KM +	++ 2
K2EU	-	-	+	Kn +/- zu dick, KM zu dick	+ 1
K3EU	0	+	-	Kn + KM +	++ 2
K4EU	-	+	-	Kn +/- KM -	+ 1
K5EU	0	+	0	Knt KM +	+++ 3
K6EU	0	+	0	Kn + KM +	+++ 3
K7EU	0	-10	0	Kn + KM +	++(+) 2.5
K8EU	-	0	-	Kn +/- KM +/-	+ 1
K9EU	0	-10	0	Kn + KM +	Schön +++(+) 2.5
K10EU	0	-	0	Kn + KM +/-	++ 2

EDTA use rapid

+ gut (nein)
0 neutral
- schlecht (ja)

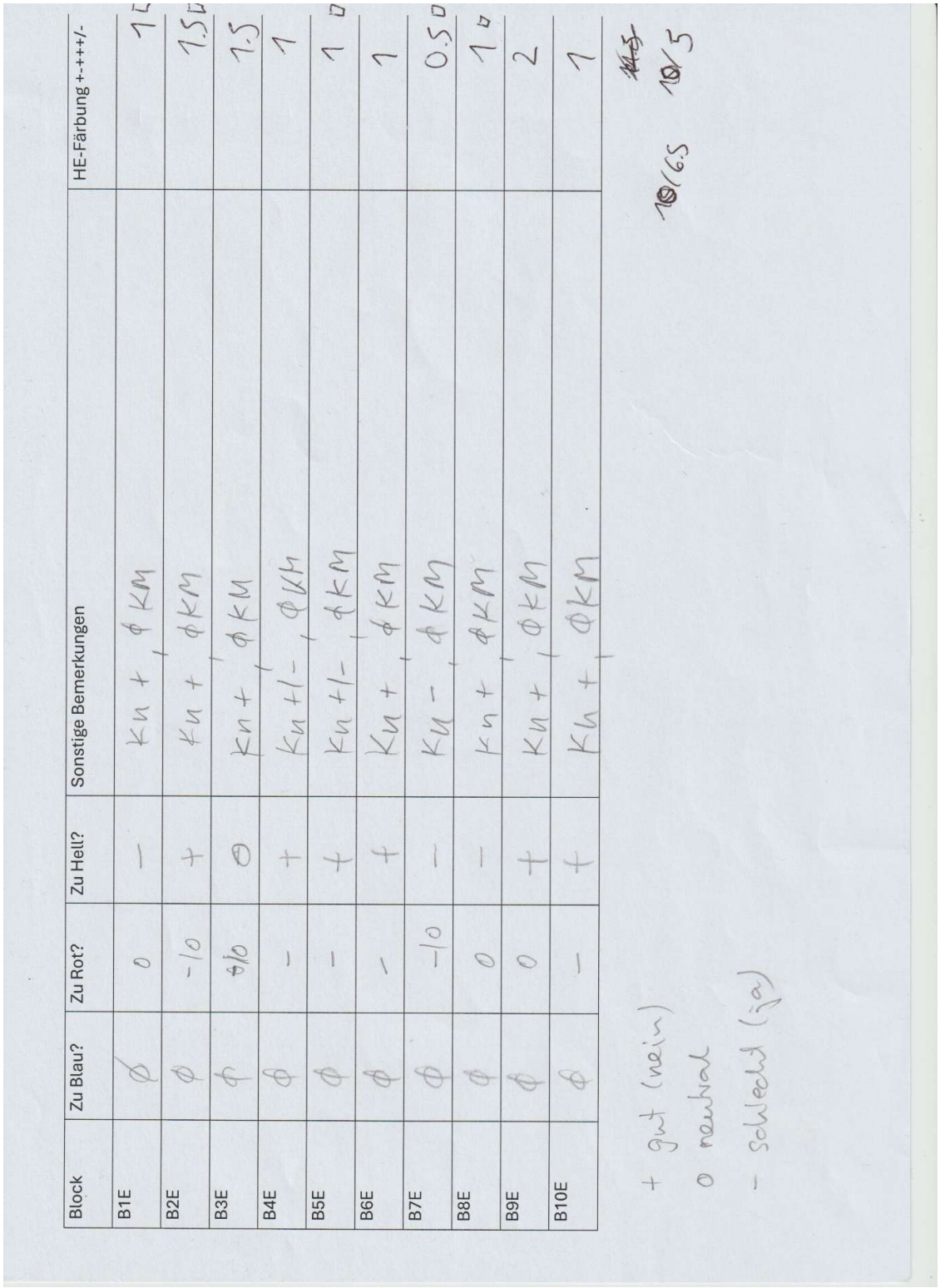
20
15/85 15/115



Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-++/-
K1U	0	+	-	Kn +, KM +	++ 2
K2U	-	0	+	Kn +, KM zu dick	++ 2
K3U	-	-/0	+	Kn +, KM zu dick	+(+) 1.5
K4U	+	-	+	Kn +, KM - zu dick	++ 2
K5U	-	-	+	Kn -, KM -	+ 1
K6U	-	-	+	Kn +/-, KM +/- zu dick	+ 1
K7U	0	-/0	+	Kn +, KM +/-	++(+) 2.5
K8U	0	0	+	Kn +++, KM +++	Schwacher Schnitt!!
K9U	-	-	+	Kn +/-, KM +/-	+ 1
K10U	0	-	+	Kn +, KM +	++ 2

+ gut (weiss)
0 neutral
- schlecht (gelb)

15/8 15/9



Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-++/-
B1E	∅	0	–	Kn +, ∅KM	1
B2E	∅	-10	+	Kn +, ∅KM	1.5
B3E	∅	∅0	0	Kn +, ∅KM	1.5
B4E	∅	–	+	Kn +/–, ∅KM	1
B5E	∅	–	+	Kn +/–, ∅KM	1
B6E	∅	–	+	Kn +, ∅KM	1
B7E	∅	-10	–	Kn –, ∅KM	0.5
B8E	∅	0	–	Kn +, ∅KM	1
B9E	∅	0	+	Kn +, ∅KM	2
B10E	∅	–	+	Kn +, ∅KM	1

+ gut (nein)
0 neutral
– schlecht (ja)

~~1.5~~ 1/6.5 1/5

Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-+++/-
B1EU	ϕ	–	+	Kn +/–, ϕKM	1
B2EU	ϕ	–	+	Kn +/–, ϕKM	1□
B3EU	ϕ	–	+	Kn +/–, ϕKM	1
B4EU	ϕ	–	+	Kn –, ϕKM	1
B5EU	ϕ	–	+	Kn +, ϕKM	1□
B6EU	leer	leer	leer	leer	–
B7EU	ϕ	+	+	Kn +, ϕKM	2□
B8EU	ϕ	–	+	Kn +/–, ϕKM	1□
B9EU	ϕ	–	+	Kn +, ϕKM	1□
B10EU	ϕ	–	+	Kn +/–, ϕKM	1

+ gut (rein)
ϕ neutral
– schlecht (ja)

~~8~~ 4 ~~10~~ 10/6

max 2P

+ - ++

Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-+++/-
B1U	∅	–	+	Kn +/–, ∅ KM	+ 1
B2U	∅	–	+	Kn +/–, ∅ KM, Fett	+ 1 □
B3U	∅	+	+	Kn +, ∅ KM	++ 2
B4U	∅	+	+	Kn +, ∅ KM	++ 2
B5U	∅	0	+	Kn +, ∅ KM	++ 2 □
B6U	∅	0	+	Kn +, ∅ KM	++ 2 □
B7U	∅	0/+	+	Kn +, ∅ KM	++ 2
B8U	∅	0	–	Kn +, ∅ KM	+ 1
B9U	∅	0	–	Kn +/– (wenig) ∅ KM	+ 1 □
B10U	∅	–	+	Kn +/–, ∅ KM	+ 1 □

+ gut (nein)
0 neutral
– schlecht (ja)

∅: kein KM

~~9/15~~
~~10/8~~ 10/7

Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-+++/-
R1E	–	–	+	KM dicke	++ 1□
R2E	–	–	+	Kn –, KM +	1□
R3E	0/+	0/+	+	Kn +, KM +	3
R4E	0	+	0	Kn +, KM +	3
R5E	–	+	+	Kn +, KM +	2
R6E	ØKM	0/+	–/0	Kn +/–, ØKM	1.5□
R7E	0	+	0	Kn +/–, KM +	3
R8E	0	+	0	Kn +/–, KM +	3
R9E	–/0	–/0	+	Kn +, KM +/–	2□
R10E	–/0	0/+	0	Kn +, KM +	2.5□

+ gut (kein)
0 mittel
– schlecht (ja)

29/22
15/14 14/8

Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-++/-
R1EU	~~0~~ KM (-)	ok (+)	0	Zerrupft, Kn gequetscht + rausgelöst	- 2
R2EU	dick (-)	Streifen (0)	0	Knochen +, KM +	2
R3EU	-/0	0	0	Kn +/-, KM +/-	2.5
R4EU	0	0	+	Kn +, KM +/-	3
R5EU	-	-	-	Kn -, KM -	0
R6EU	0	+	0	Kn +, KM -	3
R7EU	-/0	+	-	Kn +, KM -	1.5
R8EU	-/0	+	0	Kn +/-, KM -	2.5
R9EU	-/0	+	+	Kn +, KM +/-	2.5
R10EU	0	+	0	Kn +/-, KM -	3

+ gut (rein)
0 neutral
- schlecht (ja)

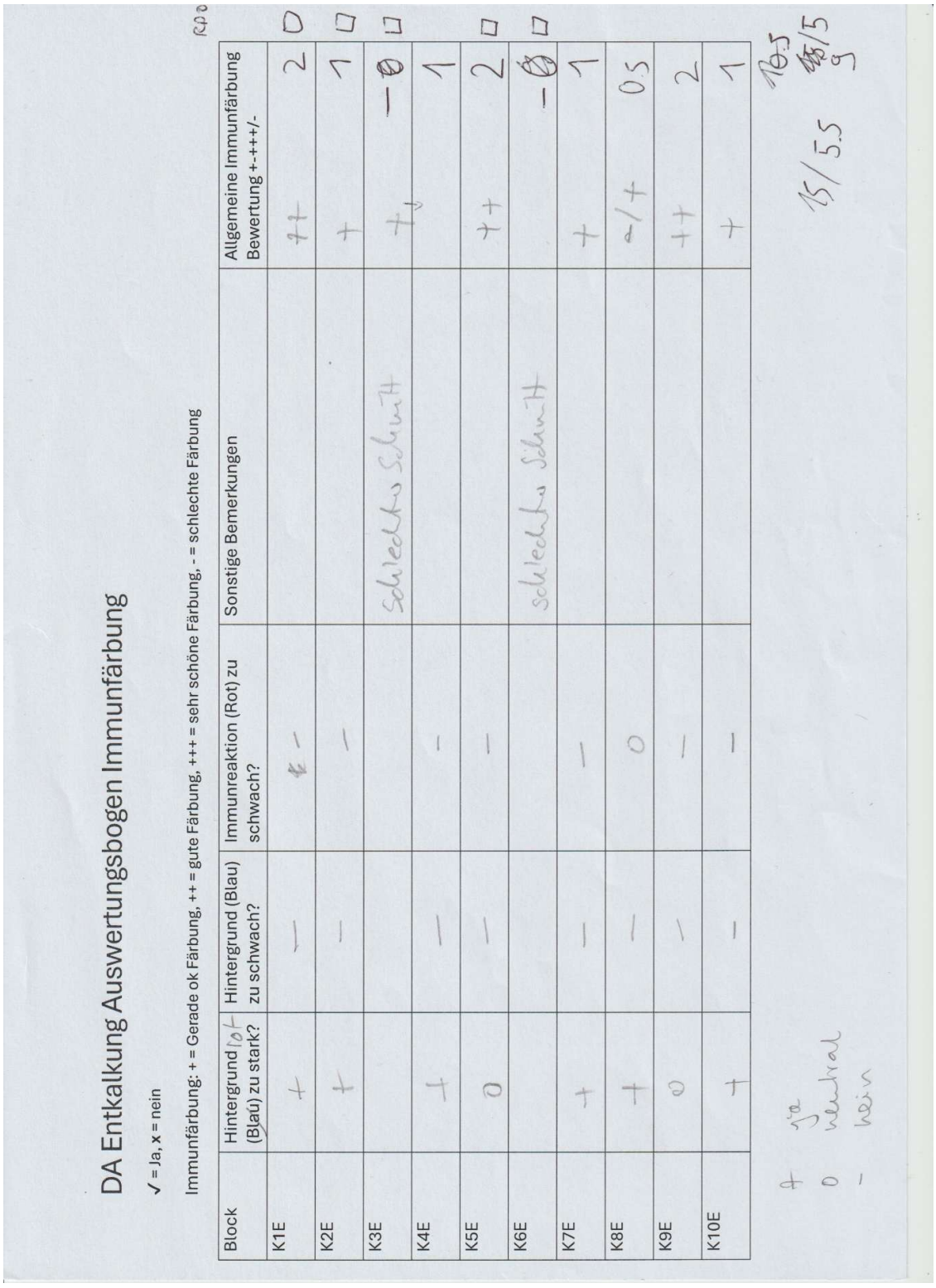
~~23~~ / ~~32~~
15/13.5 14/8.5

Block	Zu Blau?	Zu Rot?	Zu Hell?	Sonstige Bemerkungen	HE-Färbung +-+++/-
R1U	+	+	—	Knochen schön, KM überverdaut	+ 20
R2U	o/+	+	—	Kn+, KM+/—	20
R3U	o	+	o	Kn+, KM+/—	3
R4U	o	-/o	o	Kn+, KM—	2.50
R5U	—	—	+	Kn—, KM—	10
R6U	o	—	o	Kn+, KM—	2
R7U	o	-/o	—	Kn+, KM—	1.5
R8U	o	-/o	—	Kn+, KM—	1.50
R9U	o	-/o	—	Kn+, KM+/—	1.5
R10U	o	+	o	Kn+/—, KM—	3

+ gut (nein)
o neutral
— schlecht (ja)

15/11 15/9

10.3.4 Auswertungsbogen Immunhistochemie-Färbung



DA Entkalkung Auswertungsbogen Immunfärbung

✓ = Ja, x = nein

Immunfärbung: + = Gerade ok Färbung, ++ = gute Färbung, +++ = sehr schöne Färbung, - = schlechte Färbung

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-+++/-
K1E	+	—	+/-		++ 2
K2E	+	—	—		+ 1
K3E				Schlechte Schnitt	+/- -0
K4E	+	—	-		1
K5E	0	—	—		++ 2
K6E				schlechte Schnitt	-0
K7E	+	—	—		+ 1
K8E	+	—	0		+/+ 0.5
K9E	0	—	—		++ 2
K10E	+	—	—		+ 1

+ ja
0 neutral
- nein

10.5
15/5.5 15/5

rot

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-++/-	
K1EU	+	-	-		+	1
K2EU	+	0	-		+	1
K3EU	+	0	-		+	1
K4EU	0	0	0/+		-/+	0.5
K5EU	+	0	-		+	1
K6EU	+	0	-		+	1
K7EU	+	0	-		+	1
K8EU	+	0	-		+	1
K9EU	+	0	-		+	1
K10EU	+	0	-		+	1

15/4.5 15/5

+ ja
0 neutral
- nein

Block	Hintergrund rot (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-++/-
K1U	+	+	0		-/+ 0.5 □
K2U	+	+	0		-/+ 0.5 □
K3U	-	0	+		-/+ 0.5 □
K4U	+	#0/-	-		++ 2
K5U	-	+	-		+ 1 □
K6U	+	0/+	-		+ 1
K7U	+	+	0		-/+ 0.5 □
K8U	+	0	-		+ 1
K9U	+	0	-		+ 1
K10U	+	+	0/+		-/+ 0.5

+ ja
0 neutral
- nein

15/3 15/3.5 ~~15~~

rot

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-++/-
B1E				leer	-
B2E				leer	-
B3E	+	0	+	Fett	0
B4E				leer	-
B5E				leer	-
B6E	+	0	0		+
B7E				Fett	-
B8E	+	0	+		0
B9E				leer	-
B10E	+	0	+		0

+ ja
0 mehrfach
- kein

Block	Hintergrund rot (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-+++/-
B1EU				ø KM	-
B2EU	+	+	+	ø KM, m. Fett	ø -
B3EU	+	+	+	ø KM, m. Fett	ø -
B4EU	+	+	+	Fett	ø -
B5EU				leer	-
B6EU	+	+		m. Fett	ø -
B7EU	+	+		m. Fett	ø -
B8EU				ø KM	-
B9EU	+	+		m. Fett	ø -
B10EU	+	+		m. Fett	ø -

+ ja
0 neutral
- nein

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-++/-
B1U				ØKM	-
B2U				ØKM	-
B3U				ØKM	-
B4U	-	+		kaum Fett ØKM	-
B5U	0	+		kaum Fett ØKM	-
B6U				ØKM	-
B7U				ØKM	-
B8U				leer	-
B9U				leer	-
B10U	+	0		kaum Fett	-

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-+++/-	
R1E	+	–	–		++	2
R2E	+	–	–		++	2
R3E	+	–	–		++	2
R4E	+	–	–		++	2
R5E	+	–	–		++	2
R6E				Schnitt fehlt	+	–
R7E	+	+	–		+	1
R8E	+	+	–		+	1
R9E	+	–	–		++	2
R10E	+	–	–		++	2

~~27~~ ~~46~~
15/8 12/8

+ ja
0 neutral
– nein

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-++/--
R1EU x	+	+	+		+ 0
R2EU				leer	-
R3EU	+	0	0		+
R4EU	+	0/+	-		+
R5EU x	+	+	-		+
R6EU	+	+	-		+
R7EU	+	+	-		+
R8EU	+	+	-		+
R9EU	+	+	-		+
R10EU	+	0/+	-		+

+ ja
0 manchmal
- nein

2 fehlen noch

12/4

15/4

Block	Hintergrund (Blau) zu stark?	Hintergrund (Blau) zu schwach?	Immunreaktion (Rot) zu schwach?	Sonstige Bemerkungen	Allgemeine Immunfärbung Bewertung +-++/-	
R1U	+	+	-		+	1
R2U	+	+	-		+	1
R3U	+	+	-		+	1
R4U	+	+	-		+	1
R5U	x			kein Fett	-	
R6U	+	+	-		+	1
R7U	+	+	-		+	1
R8U	+	+	-		+	1
R9U	+	+	-		+	1
R10U	+	+	-		-/+	0.5

x Fett rod

15/4.5 12/4

+ ja
0 neutral
- nein

10.3.5 Auswertung Entkalkung

Auswertung der Entkalkung in Bezug auf Zeit, Schneidbarkeit, Morphologie und Immunhistochemie

Kiefer

Block (+RDO)	Zeit (d)	Bewertung Schneidbarkeit	Bewertung Morphologie (HE)	Bewertung Immunhistochemie (MPO)	Grösse L x B x H = V
K1E +RDO	2	+++	+	++	14 x 7 x 4
K2E +RDO	7	+++	-	+	7 x 5 x 4
K3E +RDO	6	++-+++	+		10 x 7 x2
K4E	2	+++	++	+	6 x 6 x 1
K5E +RDO	7	+++	+	++	7 x 4 x 4
K6E +RDO	7	+++	++		9 x 5 x 4
K7E	6	+-++	+	+	11 x 6 x 4
K8E	2	+	+	--+	12 x 8 x 1
K9E	5	+-++	++	++	12 x 6 x3
K10E	5	+++	+++	+	9 x 5 x 4
K1EU	3	+++	++	+	9 x 6 x 2
K2EU +RDO	3	+++	+	+	15 x 5 x 3
K3EU +RDO	3	++	++	+	12 x 7 x 4
K4EU	6	+++	+	--+	9 x 5 x 3
K5EU +RDO	6	++-+++	+++	+	9 x 5 x 4
K6EU +RDO	7	++-+++	+++	+	8 x 5 x 4
K7EU +RDO	5	++-+++	++-+++	+	16 x 7 x 3
K8EU	6	++	+	+	9 x 6 x 3
K9EU	6	+++	++-+++/schöner Schnitt	+	10 x 4 x 3
K10EU	6	+++	++	+	9 x 5 x 4
K1U +RDO	1	++	++	--+	10 x 7 x 2
K2U +RDO	1	+-++	++	--+	8 x 8 x 1
K3U +RDO	2	++-+++	+-++	--+	8 x 8 x 2
K4U	1	+-++	++	++	9 x 4 x 4
K5U +RDO	2	+-++	+	+	8 x 6 x 5
K6U	2	++	+	+	13 x 6 x 5
K7U +RDO	2	+-++	++-+++	--+	17 x 7 x 5
K8U	1	++	++/schönster Schnitt	+	11 x 7 x 2
K9U	1	++-+++	+	+	12 x 6 x 2
K10U	2	+-++	++	--+	13 x 6 x 4

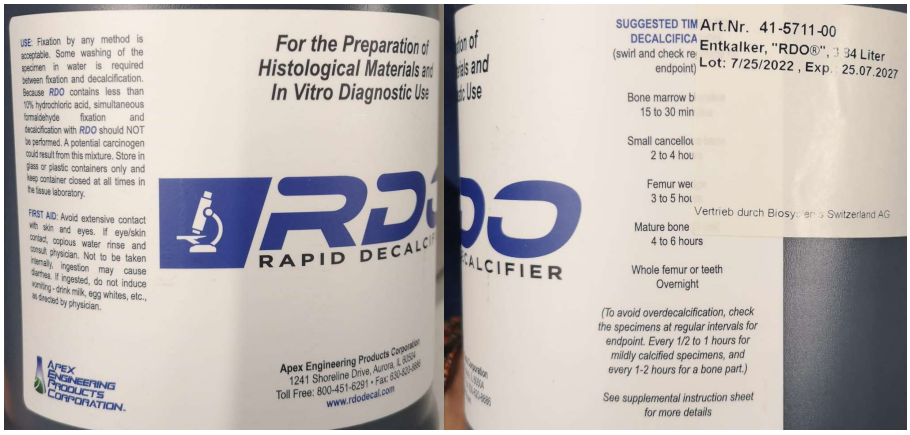
Beckenkamm

Block (+RDO)	Zeit (d)	Bewertung Schneidbarkeit	Bewertung Morphologie (HE) (max. ++)	Bewertung Immunhistochemie (MPO)	Grösse L x B x H = V
B1E +RDO	19	+++	+		14 x 3 x 3
B2E +RDO	13	++	+-++		13 x 2 x 2
B3E	13	++	+-++	-	11 x 3 x 3
B4E	19	+++	+		7 x 3 x 3
B5E +RDO	17	+++	+		10 x 4 x 2
B6E	27	++	+	+	10 x 4 x 2
B7E +RDO	7	+++	--+		7 x 4 x 1
B8E +RDO	12	+-++	+	-	8 x 5 x 2
B9E	17	+++	++		9 x 5 x 3
B10E	15	+++	+	-	8 x 4 x 2
B1EU	7	++	+		14 x 4 x 3
B2EU +RDO	7	++	+		13 x 4 x 3
B3EU	6	++-+++	+		12 x 4 x 2
B4EU	6	++	+		11 x 5 x 2
B5EU +RDO	6	+++	+		11 x 4 x 2
B6EU	9	+	Leer		9 x 5 x 3
B7EU +RDO	6	+++	++		8 x 6 x 1
B8EU +RDO	6	+++	+		9 x 8 x 2
B9EU +RDO	8	++	+		10 x 5 x 3
B10EU	7	++	+		7 x 4 x 2
B1U	2	+-++	+		14 x 6 x 4
B2U +RDO	2	++	+		13 x 4 x 2
B3U	3	+++	++		7 x 5 x 3
B4U	2	++	++		12 x 6 x 1
B5U +RDO	3	+-++	++		11 x 6 x 3
B6U +RDO	3	+-++	++		10 x 7 x 4
B7U	3	+++	++		10 x 5 x 4
B8U	2	+++	+		11 x 1 x 2
B9U +RDO	2	++-+++	+		11x 4 x 1
B10U +RDO	3	++-+++	+		10 x 10 x 4 Loch - 8 x 1 x 4 Loch

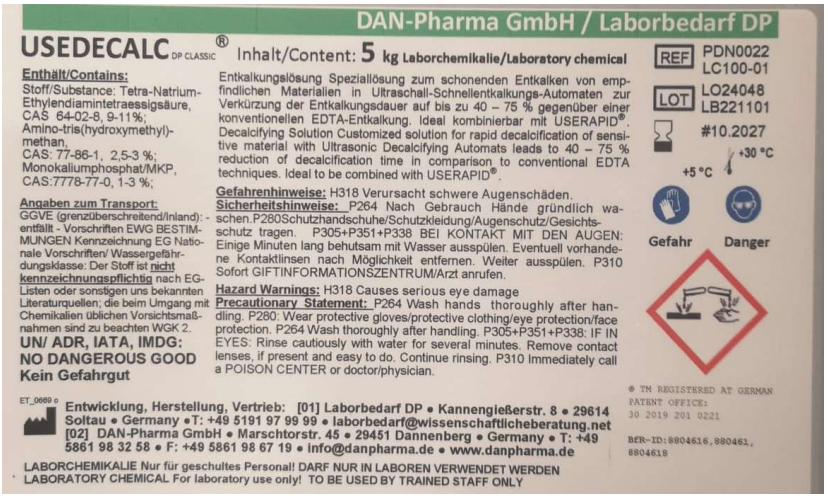
Knochenmark/Wirbelsäule

Block (+RDO)	Zeit (d)	Bewertung Schneidbarkeit	Bewertung Morphologie (HE)	Bewertung Immunhistochemie (MPO)	Grösse L x B x H = V
R1E +RDO	16	+++	+	++	10 x 6 x 3
R2E +RDO	15	+	+	++	14 x 6 x 3
R3E	9	+++	+++	++	8 x 6 x 4
R4E	5	+++	+++	++	15 x 7 x 4
R5E	7	++	++	++	7 x 7 x 3
R6E +RDO	16	++-+++	+-++	Fehlt	14 x 3 x 3
R7E	6	+++	+++	+	15 x 7 x 4
R8E	12	+++	+++	+	11 x 6 x 4
R9E +RDO	5	++-+++	++	++	15 x 9 x 4
R10E +RDO	5	+++	++-+++	++	18 x 9 x 3
R1EU +RDO	6	++-+++	++	-	6 x 6 x 1
R2EU	6	+++	++	Leer	7 x 5 x2
R3EU	6	+++	++-+++	+	9 x 7 x 4
R4EU	6	++	+++	+	15 x 6 x 3
R5EU +RDO	7	+-++	-	+	7 x 7 x 3
R6EU	6	+++	+++	+	14 x 2 x 2
R7EU +RDO	7	+++	+-++	+	9 x 7 x 4
R8EU +RDO	6	+++	++-+++	+	8 x 6 x 2
R9EU +RDO	7	+++	++-+++	+	10 x 6 x 4
R10EU	6	+++	+++	+	9 x 6 x 3
R1U +RDO	2	+++	++	+	15 x 4 x 4
R2U +RDO	2	++-+++	++	+	15 x 6 x 3
R3U	2	++	+++	+	14 x 8 x 4
R4U +RDO	2	++	++-+++	+	16 x 8 x 5
R5U +RDO	2	+-++	+		12 x 13 x 2
R6U	2	++	++	+	14 x 5 x 2
R7U	2	++	+-++	+	11 x 9 x 2
R8U +RDO	2	++-+++	+-++	+	10 x 9 x 3
R9U	1	++	+-++	+	15 x 8 x 1
R10U	2	++-+++	+++	--+	10 x 8 x 4

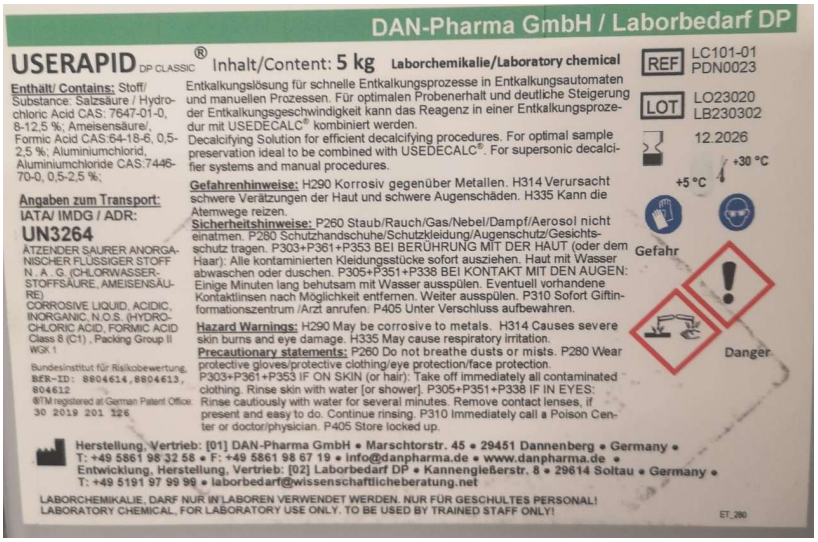
10.4 Bilder Reagenzienetiketten und Packungsbeilagen als Quellen



Apex Engineering Products Corporation: *RDO, RAPID DECALCIFIER*, o.A.



DAN-Pharma GmbH / Laborbedarf DP: *USEDECALC*. o.A.-a



DAN-Pharma GmbH / Laborbedarf DP: *USERAPID*. o.A.-b

Dako

CE

Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase

Code A0398

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase is intended for use in immunohistochemistry (IHC). The antibody labels myeloperoxidase-expressing cells in normal and neoplastic tissues and is a useful aid for the classification of acute myeloid leukemia (1). Differential classification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.

Summary and explanation

Myeloperoxidase (MPO) is composed of two 55-60 kDa subunits and two 10-15 kDa subunits (2). It is a major constituent of the azurophilic granules of neutrophil granulocytes and is also found in the lysosomes of monocytes. In vivo, MPO catalyzes the formation of antimicrobial oxidizing and halogenating agents, e.g. hypochlorous acid from hydrogen peroxide and chloride ions (1, 3). MPO is an important marker for myeloid cells, from the promyelocyte stage and to the mature forms (1). Sensitive IHC visualization methods, combined with efficient epitope unmasking techniques, have revealed that some precursor B-cell acute lymphoblastic leukemias also express MPO, making it very important to use anti-MPO together with other antibodies in the classification of acute leukemias (2, 4).

Refer to *Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure; Materials Required, Not Supplied; Storage; Specimen Preparation; Staining Procedure; Quality Control; Troubleshooting; Interpretation of Staining; General Limitations.

Reagent provided

Purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum provided in liquid form. In 0.1 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN_3.

Protein concentration: See label on vial.

The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.

Immunogen

Myeloperoxidase isolated from human polymorphonuclear leucocytes.

Specificity

The antibody reacts with human myeloperoxidase.

In crossed immunoelectrophoresis using 12.5 µL antibody per cm^2 gel area against 2 µL myeloperoxidase only one precipitate corresponding to myeloperoxidase appears. Staining: Specific staining for peroxidase. With 2 µL of human plasma, no precipitate appears. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

In formalin-fixed, paraffin-embedded human tonsil, and when using a sensitive streptavidin-biotin-based visualization system, the antibody as expected labels only rare neutrophil granulocytes.

Precautions

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected results are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with proteinase K or heat-induced epitope retrieval is recommended. Optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, Code S1700, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure.

Staining procedure

These are guidelines only. Optimal conditions may vary depending on specimen type and preparation method, and should be validated individually by each laboratory. The performance of this antibody should be established by the user when utilized with other manual staining systems or automated platforms.

Dilution: Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase, Code A0398, may be used at a dilution range of 1:300-1:600 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval Solution, Code S1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. The recommended negative control is Dako Rabbit Immunoglobulin Fraction, Code X0903, diluted to the same protein concentration as the primary antibody. Unless the stability in the actual test system has been established, it is recommended to dilute the product immediately before use or dilute in Dako Antibody Diluent, Code S0809.

Visualization: Dako EnVision+/HRP kits, e.g. Code K4009, are recommended. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

Quality control: Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens.

Staining interpretation

Cells labeled by the antibody display a usually granular staining confined to the cytoplasm.

Performance characteristics

Normal tissues: The antibody strongly labels myeloid cells at all stages of maturation. Cells of monocytic derivation reveal variable reactivity and are typically weakly labeled or nonreactive. Erythroid precursors, megakaryocytes, lymphoid cells, plasma cells, dendritic reticulum cells, mast cells and blood vessels are not labeled. Occasional histiocytes are labeled, some possibly due to phagocytosed material (1).

Abnormal tissues: Anti-myeloperoxidase labels myeloblasts and immature myeloid cells of acute myelogenous leukemia, progranulocytic leukemia, monomyelocytic leukemia, erythroleukemia and myeloblastoma (1). This antibody does not label cells of lymphoblastic lymphoma or leukemia, chronic lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, non-Hodgkin's lymphoma or T- or B-cell type, Hodgkin's disease (1). In a study of 77 acute leukemias, the antibody was shown to label 46/48 (96%) acute M0-M5 myeloid leukemias (AML). The two negative cases were 2/7 acute monoblastic leukaemias (M5). In precursor B-cell acute lymphoblastic leukemias (ALL), 3/18 (17%) were labeled. In 2 of these 3 cases a subpopulation of only weakly positive cells was found compared to the generally strong staining observed in most AML cases. In T-cell ALL, none of 6 cases were labeled. In mixed lineage leukemias previously immunophenotyped as mixed myeloid and precursor B cell type, 4/5 (80%) were labeled with the antibody (5). In another study evaluating the frequency MPO expression in adult ALL, 19/82 (23%) cases were labeled by the antibody. The labeled cases were all precursor B cell ALL, and 47% had an additional expression of at least one other myeloid-associated antigen (4).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour une utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase est destiné à être utilisé en immunohistochimie (IHC). L'anticorps marque les cellules exprimant la myélopéroxydase dans les tissus sains et néoplasiques et est un outil utile pour la classification des leucémies myéloïdes aiguës (1). La classification différentielle est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques.

Résumé et explication

La myélopéroxydase (MPO) se compose de deux sous-unités de 55-60 kDa et de deux sous-unités de 10-15 kDa (2). C'est l'un des principaux composants des granules azurophiles des granulocytes neutrophiles et elle est également présente dans les lysosomes des monocytes. In vivo, la MPO catalyse la formation d'agents antimicrobiens d'oxydation et d'halogénation, par exemple l'acide hypochloreux provenant du peroxyde d'hydrogène et des ions chlorure (1, 3). La MPO est un marqueur important des cellules myéloïdes, du stade promyélocytaire aux formes matures (1). Des méthodes de visualisation immunocytochimiques sensibles, associées à des techniques de démasquage d'épitope efficaces, ont révélé que certaines des leucémies aiguës lymphoblastiques à lymphocytes B précurseurs expriment également la MPO, ce qui implique qu'il est très important d'utiliser l'anti-MPO avec d'autres anticorps dans la classification des leucémies aiguës (2, 4).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du kit de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.

Réactifs fournis

Fraction d'immunoglobuline purifiée à partir d'un antisérum de lapin et fournie sous forme liquide. Dans 0,1 mol/L de NaCl, 15 mmol/L de NaN_3.

Concentration en protéines : Voir l'étiquette sur le flacon.

La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.

Immunogène

Myélopéroxydase isolée à partir de leucocytes polymorphonucléaires humains.

Spécificité

L'anticorps réagit à la myélopéroxydase humaine.

Lors d'une immunoélectrophorèse croisée, un seul précipité correspondant à la myélopéroxydase apparaît lorsque 12,5 µL d'anticorps par cm^2 de gel sont testés contre 2 µL de myélopéroxydase. Coloration : Coloration spécifique à la peroxydase. Avec 2 µL de plasma humain, aucun précipité n'apparaît. Coloration : Coomassie Brilliant Blue.

Dans l'amygdale humaine fixée au formol et incluse en paraffine, et lors de l'utilisation d'un système de visualisation sensible à base de streptavidine-biotine, l'anticorps ne marque que quelques rares granulocytes neutrophiles, comme attendus.

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si des résultats inattendus sont observés, qui ne peuvent être expliqués par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons

Coupes en paraffine : L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. Le prétraitement des tissus par la protéinase K ou avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est recommandé. Des résultats optimaux sont obtenus avec le produit Dako Target Retrieval Solution, réf. S1700, dans un tampon citrate à 10 mmol/L à pH 6,0 ou dans un tampon Tris à 10 mmol/L, EDTA à 1 mmol/L, à pH 9,0. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante.

Procédure de coloration

Il ne s'agit là que de conseils. Les conditions optimales peuvent varier en fonction du type de prélèvement et de la méthode de préparation, et doivent être validées individuellement par chaque laboratoire. Les performances de cet anticorps doivent être établies par l'utilisateur lorsqu'il est utilisé avec d'autres systèmes de coloration manuelle ou plates-formes automatisées.

Dilution : La Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase, réf. A0398, peut être utilisée à une gamme de dilution de 1:300 à 1:600 lorsqu'il est appliqué sur des coupes d'amygdale humaine fixées au formol et incluses en paraffine, en utilisant une restauration d'épitope induite par la chaleur de 20 minutes dans la solution Dako Target Retrieval solution, réf. S1700, et une incubation de 30 minutes avec l'anticorps primaire à température ambiante. Le contrôle négatif recommandé est le produit Dako Rabbit Immunoglobulin Fraction, réf. X0903, dilué à la même concentration en protéines que l'anticorps primaire. À moins que la stabilité du système de test en cours ait été établie, il est recommandé de diluer le produit immédiatement avant utilisation ou de le diluer dans le produit Dako Antibody Diluent, réf. S0809.

Visualisation : Il est recommandé d'utiliser les kits Dako EnVision+/HRP, réf. K4009. Suivre la procédure incluse dans le kit de visualisation sélectionnée.

Contrôle de qualité : Les tissus de contrôle positifs et négatifs, ainsi que le réactif de contrôle négatif, doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients.

Interprétation de la coloration Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration habituellement granulaire limitée au cytoplasme.

Performance

Tissus sains : L'anticorps marque fortement les cellules myéloïdes à tous les stades de maturation. Les cellules de dérivation monocytaire présentent une réactivité variable et sont typiquement faiblement marquées ou non réactives. Les précurseurs érythroïdes, les mégacaryocytes, les cellules lymphoïdes, les cellules plasmatiques, les cellules réticulaires dendritiques, les mastocytes et les vaisseaux sanguins ne sont pas marqués. Quelques histiocytes sont marqués, certains probablement à cause de matériel ayant été phagocyté (1).

Tissus anormaux : L'anti-myélopéroxydase marque les myéloblastes et les cellules myéloïdes immatures des leucémies myélogènes aiguës, des leucémies progranulocytaires, des leucémies myélomonocytaires, des érythroleucémies et des myéloblastomes (1). Cet anticorps ne marque pas les cellules de lymphomes ou de leucémies lymphoblastiques, de leucémies lymphocytaires chroniques, de leucémies à cellules chevelues, de lymphomes non hodgkiniens à lymphocytes T ou B, ou de la maladie de Hodgkin (1). Dans le cadre d'une étude menée sur 77 leucémies aiguës, l'anticorps a présenté un marquage de 46 leucémies myéloïdes (LMA) M0-M5 aiguës sur 48 (96%). Les deux cas négatifs étaient 2 cas sur 7 de leucémies monoblastiques aiguës (M5). Concernant les leucémies aiguës lymphoblastiques de lymphocytes B à précurseurs (LAL), 3 sur 18 (17%) ont été marquées. Dans 2 des 3 cas une sous-population de cellules positives faibles uniquement a été observée par rapport à la coloration généralement forte observée dans la plupart des cas de LMA. Parmi les lymphocytes T de LAL, aucun des 6 cas n'a été marqué. Concernant les leucémies de lignée mixte dont l'immunophénotype avait précédemment été déterminé comme étant de type lymphocytes B précurseur et myéloïdes mixtes, 4 sur 5 (80%) ont été marqués par l'anticorps (5). Dans une autre étude évaluant la fréquence de l'expression de la MPO chez les adultes LAL, 19 sur 82 (23%) des cas ont été marqués par l'anticorps. Le cas marqués étaient tous des lymphocytes B précurseurs LAL, et 47% étaient associées à une expression supplémentaire d'au moins un autre antigène associé au myéloïde (4).

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) bestimmt. Dieser Antikörper markiert Myeloperoxidase-exprimierende Zellen sowohl in gesunden als auch in neoplastischen Geweben und unterstützt die Klassifizierung von akuter myeloider Leukämie (1). Die Differenzialklassifikation wird durch die Ergebnisse eines Antikörper-Panels unterstützt. Die klinische Auswertung einer eintretenden oder ausbleibenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden. Dieser Antikörper kommt nach der Primärdiagnose des Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.

Zusammenfassung und Erklärung

Myeloperoxidase (MPO) besteht aus zwei 55-60-kDa-Untereinheiten und zwei 10-15-kDa-Untereinheiten (2). Sie ist ein Hauptbestandteil der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten und liegt zudem in den Lysosomen von Monozyten vor. In vivo katalysiert MPO die Bildung antimikrobieller oxydierender und halogenisierender Substanzen, z. B. Hypochlorsäure aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen (1, 3). MPO ist ein wichtiger Marker für myeloide Zellen, angefangen von der Promyelozyten-Phase bis hin zu reifen Formen (1). Empfindliche IHC-Visualisierungsmethoden in Kombination mit effizienten Verfahren zur Epitopdemaskierung haben gezeigt, dass einige Vorläufer-B-Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie ebenfalls MPO exprimieren. Dadurch wird es sehr wichtig, bei der Bewertung von akuten Leukämien Anti-MPO zusammen mit anderen Antikörpern zu verwenden (2, 4).

Folgende Angaben bitte den *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: Verfahrensprinzipien, Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, Lagerung, Gewebevorbereitung, Färbeverfahren, Qualitätskontrolle, Fehlerbehandlung, Auswertung der Färbung, Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gereinigte Kaninchenantiserum-Immunglobulinfraktion in flüssiger Form. In 0.1 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN_3.

Protein-Konzentration: Siehe Behälteretikett.

Die Proteinkonzentration kann zwischen Chargen abweichen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer jeder Charge wird mit dem einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.

Immunogen

Aus humanen polymorphonuklearen Leukozyten isolierte Myeloperoxidase.

Spezifität

Dieser Antikörper reagiert mit menschlicher Myeloperoxidase.

Bei der gekreuzten Immunelektrophorese unter Verwendung von 12.5 µL Antikörper pro cm^2 Gelfläche gegen 2 µL Myeloperoxidase tritt nur ein einziges der Myeloperoxidase entsprechendes Präzipitat auf. Färbung: Spezifische Färbung für Peroxidase. Mit 2 µL menschlichem Plasma tritt kein Präzipitat auf. Färbung: Coomassie Brilliantblau.

In formalinfixierten, paraffineingebetteten menschlichem Mandelgewebe und bei Verwendung eines empfindlichen Visualisierungssystems auf Streptavidin-Biotin-Basis markiert der Antikörper erwartungsgemäß nur seltene neutrophile Granulozyten.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2-8 °C lagern. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Ergebnisse beobachtet werden, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden können, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Gewebevorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, formalinfixierten Gewebeschnitten verwendet werden. Die Vorbehandlung des Gewebes durch Proteinase K oder hitzeinduzierte Epitopdemaskierung wird empfohlen. Optimale Resultate werden mit Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6.0, oder 10 mmol/L Tris-Puffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, erzielt. Während der Gewebevorbehandlung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Färbeverfahren

Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Bedingungen können je nach Gewebetyp und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Leistung dieses Antikörpers sollte vom Benutzer bei einem Einsatz mit anderen manuellen Färbesystemen oder automatisierten Systemen ermittelt werden.

Verdünnung: Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase, Code-Nr. A0398, kann auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten von menschlichem Mandelgewebe bei einer hitzeinduzierten Epitopdemaskierung von 20 Minuten in Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, und einer 30-minütigen Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur in einem Verdünnungsbereich

zwischen 1:300 und 1:600 verwendet werden. Als Negativkontrolle wird Dako Rabbit Immunoglobulin Fraction, Code-Nr. X0903, empfohlen, das auf dieselbe Proteinkonzentration wie der Primärantikörper zu verdünnen ist. Falls die Stabilität im verwendeten Testsystem noch nicht ermittelt worden ist, wird empfohlen, das Produkt unmittelbar vor Verwendung bzw. mit Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809, zu verdünnen.

Detektionssystem: Dako EnVision+/HRP Kits (z. B. Code-Nr. K4009) werden empfohlen. Das für das ausgewählte Detektionssystem beschriebene Verfahren befolgen.

Qualitätskontrolle: Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativ-Kontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden.

Auswertung der Färbung

Vom Antikörper markierte Zellen weisen eine meist granuläre, auf das Zytoplasma beschränkte Färbung auf.

Leistungseigenschaften

Normalgewebe: Der Antikörper führt bei myeloiden Zellen in allen Phasen der Reifung zu einer starken Färbung. Zellen monozytischer Abstammung weisen eine variable Reaktivität auf und sind in der Regel schwach markiert oder nichtreaktiv. Erythroide Vorläufer, Megakaryozyten, lymphoide Zellen, Plasmazellen, dendritische Retikulumzellen, Mastzellen oder Blutgefäße werden nicht markiert. Gelegentlich werden Histiozyten markiert, einige möglicherweise aufgrund von phagozytiertem Material (1).

Anormale Gewebe: Anti-Myeloperoxidase markiert Myeloblasten und unreife myeloide Zellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML), akuter Promyelozytenleukämie, monomyelozytärer Leukämie, Erythroleukämie und Myeloblastom (1). Dieser Antikörper markiert keine Zellen bei lymphoblastischen Lymphomen oder Leukämien, chronischer lymphozytischer Leukämie, Haarzellen-Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphomen der T- oder B-Klasse und Morbus Hodgkin (1). In einer Studie an 77 akuten Leukämien markierte der Antikörper 46/48 (96%) akuten myeloischen Leukämien vom Typ M0-M5 (AML). Die beiden negativen Fälle waren 2/7 akuten monoblastischen Leukämien (M5). Bei Vorläufer-B-Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) wurden 3/18 (17%) markiert. In 2 dieser 3 Fälle wurde eine Subpopulation nur schwach positiver Zellen beobachtet, im Vergleich zur meist starken Färbung in den meisten AML-Fällen. Bei T-Zell-ALL wurde keiner dieser 6 Fälle markiert. Bei Leukämien gemischter Linien, die bislang den Immun-Phänotypen der gemischten Myeloid- und Vorläufer-B-Zelltypen zugewiesen wurden, wurden 4/5 (80%) durch den Antikörper markiert (5). In einer anderen Studie, in der die Häufigkeit der MPO-Expression in ALL bei Erwachsenen untersucht wurde, wurden 19/82 (23%) der Fälle durch den Antikörper markiert. Die markierten Fälle waren durchgängig Vorläufer-B-Zell-ALL, und 47% wiesen eine weitere Expression von mindestens einem anderen mit Myeloiden assoziierten Antigen auf (4).

References / Bibliographie / Literaturnachweise

1. Pinkus GS, Pinkus JI. Myeloperoxidase: A specific marker for myeloid cells in paraffin sections. Mod Pathol 1991; 4:733
2. Kimura S, Ikeda-Saito M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. Proteins 1988;3:113-20.
3. Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. J Mol Med 1998;76:676-81.
4. Arber DA, Snyder DS, Fine M, Dagis A, Niland J, Slovak ML. Myeloperoxidase immunoreactivity in adult acute lymphoblastic leukemia. Am J Clin Pathol 2001;116:25-33.
5. Arber DA, Jenkins KA. Paraffin section immunophenotyping of acute leukemias in bone marrow specimens. Am J Clin Pathol 1996;106:462-8.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	2 °C – 8 °C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft		

Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

Revision / Révision / Revision 2020.11

Dako: *Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase*, 2020