

Zmluva o vzájomnej spolupráci

Zmluvné strany

1. Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, v.v.i.

So sídlom: : Dúbravská cesta 5779/9, Bratislava, PSČ: 845 10
Zastúpená: doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc., riaditeľ
IČO: 31748333
DIČ: SK2020921320
Zapísaná: v registri verejných inštitúcií podľa § 39 zákona č. 243/2017 Z. z. o verejnej
výskumnej inštitúcii a o zmene a doplnení niektorých zákonov
(ďalej len „NIÚ SAV“ alebo „tkanivové zariadenie“)

2. Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou

So sídlom: Želova 2, 829 24 Bratislava 25
Zastúpená: MUDr. Mgr. Michal Palkovič, PhD., MHA, MPH, predseda
IČO: 30 796 482
DIČ: 2021904456
Zriadený: zákonom č. 581/2004 Z. z. o zdravotných poisťovniach, dohľade nad zdravotnou
starostlivosťou a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov

(ďalej len „ÚDZS“)

Preambula

Tkanivové zariadenie má záujem prevádzkovať tkanivové zariadenie, na ktorého prevádzkovanie vydáva povolenie Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky, a to podľa §11, ods.1 písm. d.) zákona č. 578/2004 Z. z. o poskytovateľoch zdravotnej starostlivosti, zdravotníckych pracovníkoch, stavovských organizáciách v zdravotníctve a o zmene a doplnení niektorých zákonov (ďalej len „zákon 578/2004 Z. z.“). Tkanivové zariadenie vykonáva na odobratých tkanivách postmortálnu diagnostiku neurodegeneračných ochorení.

V zmysle § 13a ods.1 písm. d.) zákona 578/2004 Z. z. musí žiadateľ o vydanie povolenia na prevádzkovanie tkanivového zariadenia k žiadosti o vydanie povolenia priložiť aj kópie zmlúv o spolupráci s poskytovateľom zdravotnej starostlivosti alebo Úradom pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou podľa osobitného predpisu.

Preto strany uzatvárajú podľa ustanovenia § 3 zákona č. 317/2016 Z. z. o požiadavkách a postupoch pri odbere a transplantácii ľudského orgánu, ľudského tkaniva a ľudských buniek a o zmene a doplnení niektorých zákonov (transplantačný zákon) v znení neskorších predpisov (ďalej len „transplantačný zákon“) a § 269 ods. 2 Obchodného zákonníka zmluvu o spolupráci (ďalej len „zmluva“) za týchto vzájomne dohodnutých podmienok.

Čl. I Úvodné ustanovenia

1. Tkanivové zariadenie je oprávnené vykonávať prostredníctvom zdravotníckych pracovníkov odbery ľudského tkaniva alebo ľudských buniek od vhodných darcov za účelom prenosu do tela príjemcu alebo na vedeckovýskumné účely na základe povolenia Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky (ďalej len „povolenie“) vydaného po podpise tejto zmluvy, a to len v jeho

rozsahu, za podmienok dodržiavania všetkých platných právnych predpisov súvisiacich s touto činnosťou. O každej zmene, resp. ukončení platnosti povolenia je tkanivové zariadenie povinné písomne informovať ÚDZS bez zbytočného odkladu, najneskôr do 5 pracovných dní. Tkanivové zariadenie je povinné ÚDZS predložiť kópiu vydaného povolenia najneskôr do 5 pracovných dní po nadobudnutí jeho právoplatnosti. Ak tkanivovému zariadeniu nebude vydané povolenie do jedného roka od nadobudnutia platnosti a účinnosti tejto zmluvy, táto zmluva stráca uplynutím tejto doby platnosť a účinnosť.

Čl. II

Predmet zmluvy

1. Predmetom tejto zmluvy je vzájomná spolupráca zmluvných strán pri oznamovaní potenciálnych vhodných darcov a pri odbere ľudských tkanív a buniek centrálného nervového systému (ďalej len „tkanivá a bunky“) od vhodných (mŕtvych) darcov.
2. Táto spolupráca zmluvných strán sa spravuje metodickým usmernením ÚDZS č. 01/01/2015 o odbere tkanív a buniek z mŕtvych darcov na pracoviskách ÚDZS v platnom znení (ďalej len „metodické usmernenie“), z ktorého táto zmluva vychádza. Tkanivové zariadenie uznáva právo ÚDZS regulovať proces a podmienky odberu tkanív a buniek na svojich pracoviskách prostredníctvom metodického usmernenia a v prípade jeho zmien sa zaväzuje tieto zmeny rešpektovať. V prípade zmeny metodického usmernenia zmluvné strany uzatvoria dodatok k tejto zmluve tak, aby zmluva bola v súlade s metodickým usmernením.
3. Miestom plnenia sú Súdnolekárske a patologicko-anatomické pracovisko ÚDZS, Antolská 11, 851 07 Bratislava a Patologicko-anatomické pracovisko ÚDZS, Sasinkova 4, 811 02 Bratislava (ďalej len „pracoviská ÚDZS“)

Čl. III

Postup pri odbere

1. Tkanivové zariadenie písomne oznamuje ÚDZS (vedúcemu lekárovi pracoviska ÚDZS a riaditeľovi Sekcie súdneho lekárstva a patologickej anatómie) kritériá výberu a vylúčenia darcov a každú zmenu týchto kritérií. Výber potenciálnych vhodných darcov vykonáva vedúci lekár pracoviska ÚDZS alebo ním poverený lekár pracoviska ÚDZS.
2. Mŕtvym darcom môže byť len osoba, u ktorej bola podľa zákona určená smrť. Darcom je mŕtva osoba, z ktorej tela sa odoberajú tkanivá a bunky.
3. Odobrať tkanivá a bunky z tela mŕtvych darcov možno iba vtedy, ak osoba počas svojho života neurobila písomné vyhlásenie, že nesúhlasí s odobratím tkanív a buniek po smrti alebo vyhlásenie, že nesúhlasí s vykonaním pitvy podľa § 48 ods. 4 zákona č. 581/2004 Z. z. Za osobu, ktorá nemá plnú spôsobilosť na právne úkony, môže písomné vyhlásenie o nesúhlase s odobratím tkanív a buniek po smrti urobiť počas jej života zákonný zástupca. Z tela mŕtveho darcu, ktorý nie je štátnym občanom Slovenskej republiky, je možné odobrať tkanivá a bunky len s preukázateľným písomným súhlasom blízkej osoby tohto mŕtveho darcu na odber tkanív a buniek.
4. Odber tkanív a buniek sa vykonáva podľa štandardných pracovných postupov, ktoré upravujú postup odberu tkanív a buniek a tvoria prílohu č. 1 tejto zmluvy.
5. Tkanivové zariadenie je povinné prostredníctvom svojho zdravotníckeho pracovníka pred odberom tkanív a buniek z tela mŕtveho darcu:
 - a) overiť totožnosť darcu,
 - b) overiť a dodržať kritériá výberu darcu,
 - c) zhodnotiť výsledky laboratórnych testov darcu, ak sú k dispozícii,
 - d) vyžiadať od Národnej transplantlačnej organizácie písomné potvrdenie, že darca alebo jeho zákonný zástupca nevyjadril počas svojho života nesúhlas s odobratím tkanív a buniek a zistiť v zozname osôb, ktoré počas života odmietli pitvu, či osoba neodmietla za svojho života pitvu,

- e) zaznamenať skutočnosť, ako a kým bol darca vierohodne identifikovaný ÚDZS sa zaväzuje poskytnúť tkanivovému zariadeniu informáciu o tom, či darca neodmietol vykonanie pitvy podľa § 48 ods. 4 zákona č. 581/2004 Z. z. a vydať mu o tejto informácii potvrdenie.
6. ÚDZS poskytne tkanivovému zariadeniu súčinnosť na odber tkanív a buniek na svojom pracovisku len v rozsahu, ktorý neohrozí prevádzku a plnenie zákonných povinností ÚDZS a tak, aby aj ostatné tkanivové zariadenia mali zachované rovnaké možnosti prístupu k vykonávaniu odberov tkanív a buniek
7. ÚDZS bezodkladne oznámi tkanivovému zariadeniu potenciálneho vhodného darcu a následne oznámi tkanivovému zariadeniu požadované informácie o potenciálnom darcovi. Za konečný výber alebo odmietnutie darcu zodpovedá tkanivové zariadenie.
8. Zamestnanci tkanivového zariadenia a iné osoby realizujúce odber v mene tkanivového zariadenia pred každým odberom pri vstupe na pracovisko ÚDZS preukážu svoju totožnosť a zaznamenajú dátum a čas príchodu na pracovisko ÚDZS a čas odchodu z pracoviska ÚDZS v evidenčnej knihe ÚDZS, ktorý potvrdia svojím podpisom
9. Odber tkanív a buniek vykonávajú na pracoviskách ÚDZS zdravotnícki pracovníci tkanivového zariadenia, ktorí tvoria odberový tím tkanivového zariadenia
10. Tkanivové zariadenie je povinné:
- a) na pracovisku ÚDZS dodržiavať predpisy BOZP a ochrany pred požiarom pri prácach, ktoré bude v zmysle tejto zmluvy vykonávať,
 - b) dodržiavať okrem zákonných ustanovení aj ustanovenia osobitných vnútorných —predpisov vydaných ÚDZS, s ktorými bolo oboznámené,
 - c) dodržiavať opatrenia na ochranu pred požiarom na miestach so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru, pri činnostiach spojených so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru (ak ide o manipuláciu s horľavými kvapalinami) v zmysle zákona č. 314/2001 Z. z. o ochrane pred požiarom v znení neskorších predpisov, vyhlášky MV SR č. 121/2002 Z. z. o požiarnej prevencii v znení neskorších predpisov a vyhlášky č. 96/2004 Z. z., ktorou sa ustanovujú zásady protipožiarnej bezpečnosti pri manipulácii a skladovaní horľavých kvapalín, ťažkých vykurovacích olejov a rastlinných a živočíšnych tukov a olejov v znení neskorších predpisov,
 - d) vybaviť svojich zamestnancov všetkými potrebnými osobnými ochrannými pracovnými prostriedkami zodpovedajúcimi ich ohrozeniu pre výkon činnosti uvedenej v predmete zmluvy, ako aj upozorniť svojich zamestnancov na povinnosť ich používania,
 - e) používať pri odbere tkanív a buniek metódy a postupy, ktoré minimalizujú riziko kontaminácie tkanív a buniek zdravotníckym pracovníkom, ktorý by mohol byť nakazený prenosnou chorobou,
 - f) zabezpečiť účasť svojich zamestnancov na vstupnom oboznamovaní BOZP a ochrany pred požiarom, resp. preukázateľne vykonať preškolenie vedúcimi zamestnancami, ktorí sa takéhoto školenia zúčastnili,
 - g) upozorniť vedúceho lekára pracoviska ÚDZS na riziká vyplývajúce z činnosti, ktorú bude v priestoroch a na pracoviskách ÚDZS vykonávať a tieto majú vplyv na činnosť zamestnancov ÚDZS.
11. Tkanivové zariadenie bude mať pracovné prostriedky (nástroje, prístroje, atď.) v požadovanom technickom stave (vrátane predpísaných odborných prehliadok, skúšok a kontrol).
12. Ak tkanivové zariadenie spozoruje nebezpečenstvo, ktoré by mohlo ohroziť zdravie alebo životy osôb alebo spôsobiť prevádzkovú nehodu alebo poruchu technických zariadení, prípadne príznaky takéhoto nebezpečenstva, je povinné ihneď prerušiť prácu, oznámiť to neodkladne určenému zamestnancovi ÚDZS a podľa možnosti upozorniť všetky osoby, ktoré by mohli byť týmto nebezpečenstvom ohrozené. O prerušení prác musí byť vykonaný zápis.
13. Tkanivové zariadenie je plne zodpovedné za prípadné pracovné úrazy vlastných zamestnancov na pracoviskách ÚDZS a za ich registráciu, evidenciu a je povinné plniť ohlasovaciu povinnosť podľa

§ 17 zákona č. 124/2006 Z. z. o bezpečnosti a ochrane zdravia pri práci a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov príslušným štátnym orgánom a vznik takejto udalosti oznámi neodkladne aj ÚDZS (vedúcemu lekárovi pracoviska ÚDZS), s cieľom zabezpečiť objektívne vyšetrovanie.

14. Tkanivové zariadenie je plne zodpovedné za zdravotnú spôsobilosť a odbornú spôsobilosť na prácu svojich zamestnancov, ktorú budú vykonávať na pracoviskách ÚDZS v zmysle tejto zmluvy.
15. Tkanivové zariadenie poskytne ÚDZS vyplnený formulár "Zoznam nebezpečných látok tkanivového zariadenia" pre všetky nebezpečné chemické látky, ktoré bude používať v priestoroch ÚDZS a tento poskytovať pravidelne, bez zbytočného odkladu po každej aktualizácii. Tkanivové zariadenie je povinné na požiadanie ÚDZS predložiť karty bezpečnostných údajov k uvedeným látkam.
16. Tkanivové zariadenie uvedie po ukončení prác pracovné miesto do pôvodného stavu tak, ako bolo pred začatím prác.
17. Pre práce na zariadeniach a v priestoroch ÚDZS je zamestnanec tkanivového zariadenia a iná osoba realizujúca odber v mene tkanivového zariadenia povinný:
 - a) dodržiavať čistotu a poriadok na pracovisku ÚDZS,
 - b) dodržiavať zákaz fajčenia na pracoviskách a v priestoroch ÚDZS okrem vyhradených miest na fajčenie,
 - c) dodržiavať zákaz požívania alkoholických nápojov alebo omamných a psychotropných látok a zákaz pracovať pod ich vplyvom v priestoroch a na pracoviskách ÚDZS,
 - d) zdržiavať sa iba na určenom pracovisku a pohybovať sa len v určených priestoroch (rozumie sa aj prístup na určené pracovisko), pre príchod na pracovisko a odchod z pracoviska používať stanovené prístupové komunikácie,
 - e) ukladať materiál, pracovné prostriedky a ostatné veci len na mieste, ktoré písomne určil príslušný vedúci zamestnanec ÚDZS,
 - f) dodržiavať smernice a pokyny ÚDZS pre oblasť ochrany jeho majetku.
18. Tkanivové zariadenie je pri odberoch povinné dodržiavať a zodpovedá za dodržiavanie právnych predpisov vzťahujúcich sa na túto činnosť a za dodržiavanie štandardných pracovných postupov. Pri odberoch sa musia dodržiavať etické princípy zaobchádzania s mŕtvym tak, aby nebola znížená dôstojnosť mŕtveho darcu. Zdravotnícky pracovník tkanivového zariadenia postupuje pri odbere primerane typu darcu a typu darovaného tkaniva alebo buniek a tak, aby zabezpečil ochranu tých vlastností tkanív a buniek, ktoré sa vyžadujú pri ich humánnom použití a súčasne aby minimalizoval riziko mikrobiologickej kontaminácie počas postupu, najmä ak sa tkanivá a bunky nemôžu následne sterilizovať.
19. V čase odberu je výkon pitvy neprípustný. Za odber tkanív a buniek zodpovedá zdravotnícky pracovník tkanivového zariadenia, ktorý vykonáva odber. Odber tkanív a buniek nesmie mať účel pitvy. Odber sa nemôže vykonať v prípade nariadenia súdnej pitvy.
20. Tkanivové zariadenie je povinné zabezpečiť si na vlastné náklady odberové nástroje, prístroje, ochranné pracovné pomôcky a iný spotrebný materiál potrebný k odberu a rekonštrukcii tela. Na odobratie tkanív a buniek musí tkanivové zariadenie použiť vhodné sterilné nástroje a odberové prístroje. ÚDZS neposkytuje tkanivovému zariadeniu ochranné pracovné pomôcky, odberové nástroje, prístroje alebo iný spotrebný materiál, ktorý je potrebný k odberu tkanív a buniek a následnej rekonštrukcii tela darcu. Tkanivové zariadenie je povinné uložiť biologický odpad vzniknutý pri odbere do úradom určeného nepremokavého obalu.
21. Bezprostredne po vykonaní odberu je zdravotnícky pracovník tkanivového zariadenia, ktorý odber vykonal, povinný vykonať rekonštrukciu tela darcu tak, aby sa čo najviac približovalo svojmu pôvodnému anatomickému vzhľadu a aby ani po smrti nebola znížená dôstojnosť mŕtvej osoby. Za rekonštrukciu tela zodpovedá zdravotnícky pracovník tkanivového zariadenia.

22. ÚDZS sprístupní zdravotníckemu pracovníkovi tkanivového zariadenia, ktorý vykonáva odber kompletnú dokumentáciu darcu a na požiadanie umožní vyhotovenie kópií dokumentácie darcu za úhradu nákladov spojených s vyhotovením kópií dokumentácie vo výške podľa Sadzobníka upravujúceho úhradu nákladov za sprístupnenie informácii, zverejneného na web stránke www.udzs-sk.sk. Bezplatne sa poskytujú kópie dokumentov, pri ktorých náklady spojené s vyhotovením kópií neprekročia 5 €. V prípade zmeny cien na základe zmeny reálne vynaložených nákladov na vyhotovenie kópií dokumentácie darcu budú pre zmluvné strany platiť ceny, ktoré ÚDZS oznámi tkanivovému zariadeniu zverejnením nového sadzobníka na svojej web stránke www.udzs-sk.sk.
23. ÚDZS poskytuje tkanivovému zariadeniu súčinnosť pri vykonávaní odberov, dohliada nad výkonom odberov a kontroluje správnosť rekonštrukcie tela. Na požiadanie vedúceho lekára pracoviska ÚDZS alebo ním povereného lekára, ktorý zodpovedá za zhodnotenie správnosti rekonštrukcie tela, je tkanivové zariadenie povinné nesprávne zrekonštruované telo zrekonštruovať v súlade so zmluvou a príslušnými právnymi predpismi. V rámci súčinnosti ÚDZS zabezpečuje priestor na vykonanie odberu bez prítomnosti iných mŕtvych tiel, pripravuje telo mŕtveho darcu na odber, zabezpečuje likvidáciu biologického odpadu.
24. Odbery vykonáva tkanivové zariadenie na pracoviskách ÚDZS v pracovných dňoch v čase od 08:00 do 15:00. V odôvodnených prípadoch na základe písomnej požiadavky s predchádzajúcim písomným súhlasom vedúceho lekára pracoviska ÚDZS možno odber vykonať nad rámec stanovenej doby. Na pracovisku ÚDZS môže súčasne prebiehať len jeden odber tkanív alebo buniek.
25. Tkanivové zariadenie je povinné bezprostredne po vykonaní odberu vyhotoviť na pracovisku ÚDZS Protokol o odbere tkanív/buniek a odovzdať ho poverenému zamestnancovi pracoviska ÚDZS. Vzor protokolu je uvedený v prílohe č. 2 tejto zmluvy. Protokol o odbere tkanív/buniek sa pripojí k pitevnému protokolu.
26. Zdravotnícky pracovník tkanivového zariadenia, ktorý vykonal odber tkanív a buniek je po vykonaní odberu povinný zaslať ÚDZS Správu o odbere ľudského tkaniva alebo ľudských buniek s náležitosťami podľa § 18 ods. 4 transplantáčného zákona v lehote do 60 dní po vykonaní odberu tkanív alebo buniek. Kópiu správy o odbere ľudského tkaniva alebo ľudských buniek pripojí k pitevnému protokolu.
27. Pred odberom tkanív a buniek s výnimkou odberu očných rohoviek od mŕtveho darcu sa vykoná pitva v súlade s § 48 ods. 3 písm. e) zákona č. 581/2004 Z. z. ÚDZS po vyhotovení pitevného protokolu oznámi tkanivovému zariadeniu konečný výsledok pitvy.
28. ÚDZS nie je povinný plniť záväzky podľa tejto zmluvy a to bez vzniku práva tkanivového zariadenia na odstúpenie od tejto zmluvy alebo akéhokoľvek nároku na náhradu škody, vrátane ušlého zisku alebo inej kompenzácie v prípade:
- a) ak nastane okolnosť vylučujúca zodpovednosť v zmysle § 374 Obchodného zákonníka,
 - b) ak tkanivové zariadenie porušuje svoje záväzky vyplývajúce z tejto zmluvy,
 - c) ak konanie tkanivového zariadenia poškodzuje, resp. je spôsobilé poškodiť dobrú povesť ÚDZS alebo iné oprávnené záujmy ÚDZS,
 - d) ak plnenie je možné len za sťažených podmienok,
 - e) aj bez udania dôvodu.

Č. IV

Cena a platobné podmienky

1. Zmluvné strany sa dohodli na cene za súčinnosť ÚDZS poskytnutú podľa tejto zmluvy vo výške ustanovenej v Cenníku výkonov a služieb SLaPA pracovísk ÚDZS (ďalej len „cenník“) platnom v čase vykonania odberu. Aktuálny cenník ÚDZS uverejňuje na svojej web stránke www.udzs-sk.sk a na pracoviskách ÚDZS počas celej doby jeho platnosti. ÚDZS a tkanivové zariadenie sa dohodli,

že ÚDZS na základe prepočtu reálne vynaložených nákladov je oprávnený cenník každoročne upraviť. O zmene cien výkonov a služieb ÚDZS informuje tkanivové zariadenie formou zverejnenia nového cenníka na svojej web stránke www.udzs-sk.sk a na pracoviskách ÚDZS najneskôr jeden mesiac pred nadobudnutím platnosti nového cenníka. ÚDZS a tkanivové zariadenie sa dohodli, že za súčinnosť poskytnutú po nadobudnutí platnosti nového cenníka je ÚDZS oprávnený účtovať tkanivovému zariadeniu úhrady v súlade s novým cenníkom a tkanivové zariadenie sa ich zaväzuje uhradiť.

2. Pracovisko ÚDZS, na ktorom sa odber uskutočnil na základe vyúčtovania vedúceho lekára pracoviska ÚDZS alebo ním povereného lekára vystaví faktúru za kalendárny štvrťrok a do 14 dní po uplynutí kalendárneho štvrťroka ju zašle tkanivovému zariadeniu.
3. Tkanivové zariadenie je povinné dohodnutú cenu uhrádzať na základe vystavenej faktúry v lehote splatnosti 30 kalendárnych dní odo dňa doručenia faktúry.

ČL. V

Osobitné ustanovenia

1. Zmluvné strany sú povinné zachovávať mlčanlivosť o všetkých skutočnostiach, údajoch a informáciách, o ktorých sa dozvedeli a ktoré im boli poskytnuté v súvislosti s plnením predmetu zmluvy a súčasne sa zaväzujú, že nepoužijú informácie získané pri plnení tejto zmluvy na iný účel, než je špecifikovaný v tejto zmluve, a to aj po ukončení platnosti a účinnosti zmluvy.
2. V prípade, ak pre riadne plnenie tejto zmluvy je nevyhnutné, aby tkanivové zariadenie v mene ÚDZS spracúvalo osobné údaje, ktoré ÚDZS spracúva ako prevádzkovateľ, zaväzuje sa tkanivové zariadenie tieto spracúvať výlučne za podmienok stanovených platnou a účinnou legislatívou Slovenskej republiky a Európskej únie pre oblasť osobných údajov, t. j. na základe osobitného právneho titulu (zmluvy s ÚDZS, prípadne ak je to možné v súlade s danou legislatívou na základe poverenia ÚDZS, resp. iného obdobného právneho úkonu), v ktorom ÚDZS stanoví predovšetkým predmet a dobu spracúvania osobných údajov, povahu a účel ich spracúvania, zoznam a rozsah osobných údajov, kategórie dotknutých osôb a povinnosti a práva prevádzkovateľa, ako aj ďalšie podmienky stanovené platnou a účinnou legislatívou Slovenskej republiky Európskej únie pre oblasť ochrany osobných údajov.
3. Zmluvné strany sa zaväzujú, že upovedomia druhú zmluvnú stranu o porušení povinnosti mlčanlivosti bez zbytočného odkladu potom, ako sa o takomto porušení dozvedeli.
4. Zmluvné strany si vzájomne oznámia kontaktné osoby pre účely plnenia záväzkov v zmysle tejto zmluvy bez zbytočného odkladu po nadobudnutí účinnosti tejto zmluvy.

ČL. VI

Záverečné ustanovenia

1. Zmluva sa uzatvára na dobu neurčitú.
2. Zmluva nadobúda platnosť dňom podpisu oprávnenými zástupcami oboch zmluvných strán a účinnosť dňom nasledujúcim po dni jej zverejnenia v Centrálnom registri zmlúv.
3. Zmluva zaniká:
 - a) písomnou dohodou zmluvných strán,
 - b) písomnou výpoveďou ktorejkoľvek zmluvnej strany aj bez udania dôvodu. Výpovedná doba je dva mesiace a začína plynúť prvým dňom mesiaca nasledujúceho po mesiaci, v ktorom bola písomná výpoveď doručená druhej zmluvnej strane,
 - c) odstúpením od zmluvy zo strany ÚDZS. ÚDZS je oprávnený od zmluvy odstúpiť v prípade, že tkanivové zariadenie nedodržiava právne predpisy alebo podmienky tejto zmluvy, a to aj po predchádzajúcom písomnom upozornení a poskytnutí dodatočnej lehoty v dĺžke minimálne pätnásť (15) pracovných dní na nápravu,

- d) odstúpením od zmluvy zo strany tkanivového zariadenia. Tkanivové zariadenie je oprávnené od zmluvy odstúpiť v prípade, že ÚDZS nedodríava právne predpisy alebo podmienky tejto zmluvy, a to aj po predchádzajúcom písomnom upozornení a poskytnutí dodatočnej lehoty v dĺžke minimálne pätnásť (15) pracovných dní na nápravu,
- e) okamžitým odstúpením od zmluvy zo strany ÚDZS v prípade podstatného porušenia zmluvy. Za podstatné porušenie zmluvy sa považuje porušenie záväzkov tkanivového zariadenia v zmysle čl. III ods. 5, 10, 12, 17, 18 a čl. V ods. 1, 2 a 3 tejto zmluvy
4. V prípade, že niektoré ustanovenia zmluvy sú alebo sa z akéhokoľvek dôvodu stanú neplatné, neúčinné alebo nevynútiteľné, nemá to a ani nebude mať za následok neplatnosť, neúčinnosť alebo nevynútiteľnosť ostatných ustanovení zmluvy. Zmluvné strany sú povinné v dobrej viere rokovať, aby bolo neplatné, neúčinné alebo nevynútiteľné ustanovenie písomne nahradené iným ustanovením, ktorého vecný obsah bude zhodný alebo čo najviac podobný ustanoveniu, ktoré je nahradzované, pričom účel a zmysel zmluvy musí byť zachovaný. Do doby, kým takáto zmluva nebude uzavretá, rovnako však aj pre prípad, že k nej nedôjde vôbec, sa na uhradenie neplatného, neúčinného alebo nevynútiteľného ustanovenia použijú iné ustanovenia zmluvy a ak také nie sú, potom príslušné ustanovenia právnych predpisov, a to vždy také ustanovenia, ktoré zodpovedajú kritériám podľa predchádzajúcej vety.
5. V prípade zániku zmluvy, nárok na úhradu ceny podľa čl. IV zmluvy za poskytnutú spoluprácu do dňa zániku zmluvy zostáva zachovaný
6. Neoddeliteľnou súčasťou tejto zmluvy je: Príloha č. 1 - Štandardné pracovné postupy Príloha č. 2 - Protokol o odbere tkanív/buniiek
7. Meniť alebo dopĺňať ustanovenia tejto zmluvy je možné iba formou písomných dodatkov, podpísaných zmluvnými stranami.
8. Zmluva je vyhotovená v štyroch rovnopisoch, každý s právnou silou originálu, z ktorých každá zmluvná strana obdrží dva.
9. Zmluvné strany vyhlasujú, že táto zmluva nebola uzavretá v tiesni ani za nápadne nevýhodných podmienok pre niektorú zo zmluvných strán. Súčasne zmluvné strany zhodne vyhlasujú, že sa s touto zmluvou dôkladne oboznámili, jej obsahu porozumeli, v celom rozsahu s ňou súhlasia a prostredníctvom svojich zástupcov ju podpísali na znak toho, že je určitá, zrozumiteľná a že zodpovedá ich slobodnej a vážnej vôli.
10. Písomnosti v zmysle tejto zmluvy doručované poštou sa považujú za doručené prevzatím alebo odmietnutím prevzatia zásielky, a v prípade neprevzatia písomnosti uloženej u doručovateľa sa písomnosti považujú za doručené okamihom vrátenia zásielky odosielateľovi. V prípade, ak zásielku nemožno na adrese podľa tohto bodu doručiť z dôvodu „Adresát neznámy“, považuje sa zásielka za doručenú dňom jej vrátenia odosielateľovi. Písomnosti doručované elektronickými prostriedkami sa považujú za doručené okamihom potvrdenia adresáta o prijatí.

V Bratislave, dňa 31/6/2024

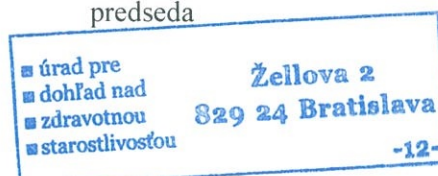
V Bratislave, dňa 10. 06. 2024

doc. MUDr. Norbert Žilka, DrSc.,



7

MUDr. Mgr. Michal Palkovič, PhD., MHA, MPH,
predseda



Číslo výtlačku:.....

SOP-M-001

IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
Vypracoval:	Mgr. MVDr. Tomáš Smolek, PhD. pracovník výskumu a vývoja		
Schválil:	doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc. riadiťel		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBenIE Kód: SOP-M-001	Strana: 2 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

OBSAH

1. Úvod	3
1.1 Cieľ	3
1.2 Podstata farbenia	3
1.3 Účel	3
1.4 Zaškolenie	3
1.5 Definície	3
1.6 Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:	3
1.7 Zodpovednosť	4
1.8 Materiál a prístrojové vybavenie	4
2. Príprava roztokov a reagensí:	5
2.1 Roztoky a chemikálie použité v tejto procedúre:	5
2.2 Príprava roztokov	5
3. Pracovný postup	6
3.1 Problémy ktoré môžu nastať počas procedúry	9
3.2 Vyhodnotenie výsledkov:	10
4. Súvisiace dokumenty	10
5. Zoznam príloh	10

1. Úvod

1.1 Ciel'

Tento štandardný pracovný postup (skratka SOP z angl. „standard operating procedure“) popisuje postup imunohistochemického farbenia používaného na diagnostiku neurodegeneratívnych ochorení.

1.2 Podstata farbenia

Podstatou skúšky je väzba primárnej protilátky na patologicky zmenený proteín na základe afinity a jeho označenie v nervovom tkanive. Pri pozitívnej diagnostike dosiahneme zafarbenie typických patologických štruktúr charakteristických pre jednotlivé neurologické ochorenia.

1.3 Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

1.4 Zaškolenie

Vedúci oddelenia je zodpovedný za riadne zaškolenie všetkých pracovníkov organizácie.

1.5 Definície

MPW: mili power water

1.6 Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:

S chemikáliami používanými počas práce podľa protokolu sa musí pracovať bezpečne a s vedomím o ich charaktere a účinku. Potrebné sú laboratórne rukavice, ochranné okuliare a vhodný laboratórny odev.

Peroxid vodíka (30%)(napr. Sigma Aldrich, 216763-500ML-D)

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití.

H318 - Spôsobuje vážne poškodenie očí.

Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre

Kyselina mravčia 98%(napr. Sigma Aldrich, 33015-1L)

H226-horľavina, prchavá látka

H302- po prehltnutí dráždivá

H314- poškodzuje oči a leptá pokožku

H331- toxické výpary

Bezpečnostné upozornenia:

P210- zamedziť kontakt s otvoreným ohňom, teplom, horúcimi povrchmi

P280-nosiť bezpečnostný odev pri práci, okuliare, rukavice

P303 + P361 + P353-po kontakte s pokožkou, okamžite miesto opláchnuť pod tečúcou vodou

P304 + P340-po vdýchnutí vyveďte postihnutého na čerstvý vzduch a umožnite mu pohodlne dýchať

P310- vyhľadať lekársku pomoc

P305 + P351 + P338-po kontakte s očami, vyplachovať pod tečúcou vodou

P403 + P233uskladňovať v dobre uzatvorenej nádobe a vetranom priestore

Etanol 96% (napr. Centralchem, L-00274 -1L)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití

H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-M-001	Strana: 4 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite
P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

Xylén čistý (napr. Centralchem, L-00395)

H226 - Horľavá kvapalina a pary
H312 - Škodlivý pri kontakte s pokožkou
H315 - Dráždi kožu
H332 - Škodlivý pri vdýchnutí

Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre

Izopropylalkohol čistý (napr. Centralchem L-00301)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary.
H319 - Spôsobuje vážne podráždenie očí.
H336 - Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty.

Bezpečnostné upozornenia

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite.
P261 - Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
P305+351+338 - PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

Triton-X100 (napr. Sigma Aldrich, T9284-500ML)

H302 Škodlivý po požití.
H315 Dráždi kožu.
H318 Spôsobuje vážne poškodenie očí.
H410 Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

Bezpečnostné upozornenia:

P280 Noste ochranné okuliare/ ochranu tváre.
P301 + P312 + P330 PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/ lekára. Vypláchnite ústa.
P305 + P351 + P338 + P310 PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Okamžite volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára

1.7 Zodpovednosť

Vedenie TZ je zodpovedné za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

1.8 Materiál a prístrojové vybavenie

Sklenené vaničky
Kovové stojany
Histologický tlakový hrniec Retriever 2100 (APTUM, #R2100EU)
PAP pen (Sigma, Z377821-1EA)
Cover glasses (mariefeld)
Microscope slides Histobond S+ (Marienfeld, 0810501)
Automaticke pipety (Pipetman, Gilson)
Termostat (Binder, #BD115)
Vortex (Ika vortex genius 3)
Magnetické miešadlo
Váhy (napr. KERN-PLJ)
Sklenené kadičky

Sklenené odmerné valce (napr. 892/18)
Anatomické pinzety (napr. 2688.1)
Stereolupa (Nikon, SMZ645)
Pipetové špičky (napr. Eppendorf, 10µl, 300µl and 1000µl)
Polypropylénové centrifugačné skúmavky 15 a 50ml (napr. Sarstedt, #62.554.502 – 15ml, #62.547.254 – 50ml)
Mikroskúmavky polypropylénové, objem 1,5 ml a 2 ml (napr. Sarstedt, #72.690.001)
Bottle-Top filter, 500 ml objem (napr. Millipore, 595-4520)
Laboratórne rukavice (napr. Vasco Sensitive, Braun)
pH indikátory (Merck, 1.09532.0001)

2. **Príprava roztokov a reagensii:**

2.1 **Roztoky a chemikálie použité v tejto procedúre:**

Entellan (napr. Merck, 1079610)

-montovacie médium

VECTASTAIN Elite ABC Kit, (napr. Vector lab.)

-kit so sekundárnymi protilátkami špecifickými pre jednotlivé druhy zvierat (myš, potkan, koza)

Metylénová zelená (napr. Vector lab. H-3402)

-, „ready to use“ pre zafarbenie bunkových jadier.

Antigen unmasking roztok (napr. Vektor lab., H3300)

-na prípravu citrátového roztoku podľa tabuľky (

Tabuľka č. 3 - Riedenie citrátového pufru)

1M Tris-HCl roztok (napr. AXON Neuroscience R&D Services.)

50mM Tris-HCl roztok

20x PBS roztok (napr. AXON Neuroscience. R&D Services)

1x PBS roztok

Aptum section block (napr. Aptum, RAP0471500)

VIP peroxidase substrate kit (napr. Vector lab. SK-4600)

xylén čistý (napr. Mikrochem)

isopropylalkohol čistý (napr. Mikrochem)

30% peroxid vodíka (napr. Sigma Aldrich)

96,5 % Etanol (napr. Mikrochem)

70 % Etanol (napr. Mikrochem)

98% kyselina mravčia (napr. Sigma Aldrich) – upozornenie – roztok nerecyklujeme

2.2 **Príprava roztokov**

1M Tris-HCl roztok:

- pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom podľa zloženia v tabuľke č. 1

Tabuľka č.1 - 1 M Tris-HCl roztok zloženie:

Chemikália	Množstvo na 1L
Tris base	121,1g
Milli-Q voda	800 ml
HCl	podľa pH

50mM Tris-HCl

- 50mM roztok pripravíme zmiešaním 50ml 1M Tris-HCl roztoku s 950ml Milli-Q-vody v 1L fľaši

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBNIE Kód: SOP-M-001	Strana: 6 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

50mM Tris-HCl + 0,2% Triton-X 100

- roztok pripravíme zmiešaním 50ml z 1M Tris-HCl roztoku s 950 ml Mili- Q- vody v 1L fľaši a pridaním 2ml Triton-X 100. Miešame na magnetickom miešadle, kým sa triton-X 100 nerozpustí.

20x PBS roztok

- prípravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom podľa zloženia v tabuľke č. 2

Tabuľka č.2 - 20x PBS roztok zloženie:

Chemikália	Množstvo na 1L
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	58 g
KCl	4 g
NaCl (napr. Sigma)	160 g

1x PBS roztok:

- 1 x PBS sa pripraví zmiešaním 50 ml 20x PBS pufru s 950 ml Milli-Q vody v 1L fľaši. Roztok je stabilný pri laboratórnej teplote 5 dní

70 % Etanol:

- do odmerného valca s objemom 500 ml zmiešaj 210ml 96% Etanolu s 90 ml Milli-Q vody.

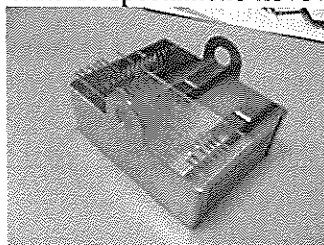
1% peroxid vodíka

- prípravíme podľa tabuľky:

Reagent	Množstvo (400 ml)
30% peroxid vodíka	13,4 ml
50mM Tris- HCl	386,6 ml

3. Pracovný postup

Vzorky sú pripravené podľa protokolu SOP-V-004 a označené na sklíčkach ID číselnými kódmi vzoriek aby nedošlo k zámene tkaniva. Na sklíčka je možné napísať aj doplňujúce informácie. Takto pripravené preparáty je potrebné umiestniť do špeciálneho kovového stojanu podľa (Obrázok 1).



Obrázok 1

- Deparafinizácia tkaniva- sklíčka s tkanivom sú umiestnené do roztokov s rozpúšťadlami, ktoré postupne odstraňujú parafrín z tkaniva.
Umiestni pripravený stojan so sklíčkami do sklenených nádobiek s látkami podľa nasledujúcej postupnosti:
 - 5 min xylén čistý

- 5 min xylén čistý
 - 5 min isopropylalkohol čistý
 - 5 min 96,5 % etanol
 - 5 min 70 % etanol
 - 5 min MPW
2. Chemické opracovanie tkaniva- stojan so sklíčkami ponor do 98% kyseliny mravečej na 1 min. *(Je potrebné si odsledovať správanie tkaniva na sklíčku, ak by sa tkanivo začalo odliepať od podložného sklíčka, je nutné tkanivo vybrať z kyseliny skôr a časovú zmenu zaznamenať v protokole z farbenia.)*
 3. Bezprostredne prepláchni 2x v MPW a následne vzorky prelož 2x do roztoku 50mM Tris-HCl, obe prepláchnutia po dobu 5 min. v sklenených nádobách na to určených.
 4. Tepelné opracovanie tkaniva na sklíčku - v histologickom tlakovom hrnci Retriever 2100 sa autoklavujú pri teplote 121°C po dobu 20min. Po skončení cyklu sa odporúča ponechať nádobu uzatvorenú najmenej 2h. Vzorky sú uložené do špeciálnych stojanov dodávaných k prístroju Retriever 2100 a v roztoku citrátového roztoku nariadeného podľa tabuľky (Stojan napln nariadeným roztokom citrátového pufru a naskladaj do stojanu prepláchnuté sklíčka (obrázok 3). Následne bezpečne uzavri tlakový hrniec podľa manuálu.
 5. Tabuľka č. 3 - Riedenie citrátového pufru) na zníženie pH roztoku. Stojan napln nariadeným roztokom citrátového pufru a naskladaj do stojanu prepláchnuté sklíčka (obrázok 3). Následne bezpečne uzavri tlakový hrniec podľa manuálu.

Tabuľka č. 3 - Riedenie citrátového pufru

Reagent	Množstvo
Antigen unmasking	656µl
Destilovaná voda	70ml



Obrázok 2



Obrázok 3



Obrázok 4

6. Premývanie v roztoku 50mM Tris-HCl – premiestni sklíčka opäť do špeciálneho kovového stojanu a premývaj sklíčka 2x v roztoku po dobu 5 min.
7. Blokovanie endogénnej peroxidázy- endogénnu peroxidázu blokujeme pomocou 1% roztoku peroxidu vodíka zmiešaného s roztokom 50mM Tris-HCl podľa nasledujúcej tabuľky:

Reagent	Množstvo (400 ml)
30% peroxid vodíka	13,4 ml
50mM Tris-HCl	386,6 ml

Premiestni stojan so sklíčkami do roztoku 1% peroxidu na dobu 25 min.

8. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl + 0.2 % Triton X-100 – premiestni stojan so sklíčkami 2x do roztoku 50 mM Tris-HCl + 0.2 % Triton X-100, oba na dobu 5min.
9. Blokovanie nešpecifického signálu- blokujeme pomocou Aptum Sekcion block po dobu 10min. Postupne vyberaj sklíčko po sklíčku zo stojanu a na každé tkanivo napipetuj množstvo 200- 500µl blokovacieho média (podľa veľkosti tkaniva) a umiestňuj sklíčka na rovnú podložku. Postupuj rýchlo, blokovanie na každom tkanive nesmie presiahnuť čas 10 min.

10. Aplikácia primárnej protilátky- primárnu protilátku vyberáme podľa typu diagnózy, typy primárnych protilátok sú v prílohe č. 1. Primárna protilátka je rozriedená v 1x PBS podľa stanoveného riedenia a aplikovaná postupným pipetovaním množstva 200-500 500µl (podľa veľkosti tkaniva) jednotlivo na každé tkanivo rovnako ako blokovacie médium. Sklíčka s aplikovanou protilátkou poukladaj do inkubačného boxu tak, aby sa nachádzali nad navlhčenou utierkou (viď obrázok 5), ktorá zabezpečí vlhkejšie prostredie počas dlhej inkubácie. Protilátku inkubuj po dobu 12-20h pri teplote 4°C.
11. V tomto bode je ukončený prvý deň.



Obrázok 5

12. Nasledujúci deň začína premývaním v roztoku 50 mM Tris-HCl s 0.2 % Triton X-100 - stojan so sklíčkami umiestni 2x do roztoku 50 mM Tris-HCl s 0.2 % Triton X-100, oba po dobu 5 min.
13. Aplikácia sekundárnej protilátky z VECTASTAIN Elite ABC Kitu - sekundárna protilátka je rozriedená v 1x PBS (pozri príkladovú tabuľku riedenia) a aplikovaná je na každý rez na sklíčku zvlášť, rovnakým spôsobom ako blokovacie médium a primárna protilátka. Sekundárnu protilátku inkubuj po dobu 1h v inkubačnom boxe (môže byť použitý rovnaký box ako na inkubáciu primárnej protilátky).

Riedenie sekundárnej protilátky z kitu: otvor fľašku so sekundárnou protilátkou a napipetuj požadované množstvo podľa riedenia (50:10 000) znázornené v príkladovej tabuľke do 1x PBS pufra. Za pomoci vortexu premiešaj a nechaj reagovať pri izbovej teplote 20 min.

Tabuľka riedení sekundárnej protilátky z ABC kitu - príklad:

Reagent	1x PBS (5 ml)
sekundár	25 µl

14. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl + 0.2 % Triton X-100.- umiestni sklíčka do špeciálneho stojanu a stojan so sklíčkami umiestni 2x do roztoku 50 mM Tris-HCl s 0.2 % Triton X-100, oba po dobu 5 min.
15. AB-komplex kit- VECTASTAIN Elite ABC Kit, pozostáva z dvoch aktívnych zložiek-avidínu a biotínu, ktoré sú spolu nariedené do 1x PBS podľa návodu, ktorý je uvedený v kite (pozri príkladovú tabuľku riedenia). Aplikácia nariedeného roztoku je rovnaká ako pri sekundárnej protilátke. Inkubuj po dobu 1h.

Riedenie ABC kitu: otvor fľašku s reagentom A resp. B a napipetuj požadované množstvo z oboch reagentov podľa riedenia (100:5000) znázornené v príkladovej tabuľke do 1x PBS pufra. Za pomoci vortexu premiešaj a nechaj reagovať pri izbovej teplote 20 min.

Tabuľka riedení ABC kitu:

Reagent	1x PBS (5 ml)	1x PBS (10 ml)
A	100µl	200µl
B	100µl	200µl

16. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl- premiestni sklíčka opäť do špeciálneho kovového stojanu a premývaj sklíčka 2x v roztoku po dobu 5 min.
17. Vyvolávanie signálu systémom VIP peroxidase substrate kit – pomocou peroxidázového kitu nariadeného v 1x PBS podľa predpísaného riedenia uvedeného v príkladovej tabuľke nariadime roztok do falkóny obalenej v alobale, aby roztok ostal chránený pred svetlom. Do falkóny naber požadované množstvo roztoku 1x PBS, ktoré je závislé od počtu sklíčok s tkanivami. Následne kvapkaj postupne reagenty, pričom postupuj od reagentu 1 až 3 a hydrogen peroxid je posledný. Po každom reagente roztok premiešaj za pomoci vortexu.

Tabuľka riedení - príklad:

Reagent	1x PBS (5ml)	1x PBS (10ml)
1	3 kvapky	6 kvapiek
2	3 kvapky	6 kvapiek
3	3 kvapky	6 kvapiek
hydrogen peroxid	3 kvapky	6 kvapiek

Signál následne detegujeme pod stereolupou (stereomikroskopom) a dobu, počas ktorej sa tkanivo zafarbí, je nutné zaznačiť do protokolu z farbenia. Postupne napipetuj množstvo 200-500µl (podľa veľkosti tkaniva) VIP roztoku na tkanivo pod stereolupou (stereomikroskopom) a nechaj reagovať kým sa zreteľne nezafarbia štruktúry charakteristické pre ten daný typ protilátky, ktorá bola na tkanive inkubovaná. Postupuj jednotlivu sklíčku po sklíčku. Zafarbené tkanivá na sklíčkach po vyvolaní umiestňuj do stojanu v roztoku 50 mM Tris-HCl na zastavenie vyvolávacieho procesu.

18. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl 2x po 10min.- stojan so sklíčkami umiestni do roztoku 50 mM Tris-HCl po dobu 10 min.
19. Premývanie v MPW - stojan so sklíčkami umiestni do MPW na dobu 5 min.
20. Podfarbovanie bunkových jadier pomocou metylénovej zelenej- metylénová zelená musí byť nahriata na teplotu min. 55°C a viac v termostate. Po dosiahnutí potrebnej teploty, vlož do nádoby stojan so sklíčkami a umiestni nádobu naspäť do termostatu s nastavenou teplotou. Po 5 min. skontroluj kvalitu zafarbenia. V prípade, že požadované štruktúry sú dobre viditeľné, ukonči proces farbenia. V opačnom prípade pokračuj vo farbení až pokiaľ nie je tkanivo dostatočne zafarbené do zelena. Po zafarbení sklíčka vyber a preplachuj v destilovanej vode, kým voda nebude číra.
21. Proces dehydratácie tkaniva- prebieha v nasledujúcich rozpúšťadlách v presne stanovenom poradí.
 - 5 min 70 % etanol
 - 5 min 96,5 % etanol
 - 5 min isopropylalkohol
 - 5 min xylén
 - 5 min xylén
22. Proces montovania - tkanivo na sklíčku zalej montovacím médiom a prikry krycím sklíčkom dostatočne dlhým podľa veľkosti tkaniva tak, aby sa pod krycím sklíčkom nevytvorili vzduchové bubliny a aby žiadna časť tkaniva nevyschla.

3.1 Problémy ktoré môžu nastať počas procedúry

Počas farbenia môže dôjsť k niekoľkým nedostatkom.

Následujúce body sú kritické pre správne vykonanie tejto procedúry:

- dodržanie správnej teploty (121°C) v histologickom tlakovom hrnci - potrebná teplota na opracovanie väzbových miest pre antigén.
- *správne nariadenie protilátok podľa špecifického riedenia*- pri podriadení koncentrácie dosiahneme veľmi slabý alebo žiadny signál

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBenIE Kód: SOP-M-001	Strana: 10 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

- **správne nariadenie ABC kitu** - podriadenie roztoku má za následok slabý alebo žiadny signál.
- **správne použitie sekundárnej protilátky podľa pôvodu primárnej protilátky**- pri zámene sekundárnej protilátky (myšacia, zajačia a opačne) nedôjde k naviazaniu sekundárnej na primárnu protilátku.
- **správne nariadenie Tris-HCl + 0,2% triton-X100** - na dosiahnutie dostatočnej permeabilizácie bunkových membrán
- **správne nariadený roztok H_2O_2** – na dostatočné vyblokovanie endogénnej peroxidázy. Roztok je potrebné nariediť vždy čerstvý.

Najčastejšie sa vyskytujú nasledovné problémy:

1. Popraskané tkanivo na sklíčku:

Príčina: tkanivo je až príliš presušené. Príliš suchý rez nedrží na podložnom sklíčku a popraskanie sa počas farbenia zväčšuje. Poškodenie tkaniva je viditeľné po opracovaní 98% kyselinou mravčou v bode 2 tohto postupu.

Riešenie: znížiť teplotu dosušovania rezov, skrátiť čas sušenia, zopakovať prípravu sklíčka.

2. Rezy schádzajú zo sklíčka:

Príčina: tkanivo bolo nedostatočne narovnané. Zvlnené tkanivo sa nedostatočne uchyťí a neskôr sa počas farbenia postupne odlepuje. Nedostatočné uchytenie tkaniva je viditeľné po opracovaní 98% kyselinou mravčou v bode 2 tohto postupu.

Riešenie: predĺžime čas narovnávaného rezu na vodnej hladine a začneme nové farbenie.

3. Na pozitívnej vzorke nie je pozorovaný signál:

Príčina: došlo k chybe počas farbenia a nedodržania kritických kontrolných bodov.

Riešenie: opätovne je potrebné skontrolovať kompatibilitu primárnej a sekundárnej protilátky a dátum expirácie kitov. Zopakujeme farbenie.

4. Slabé kontrastné farbenie jadier buniek s metylénovou zelenou:

Príčina: metylénová zelená bola nedostatočne ohriata na teplotu vyššiu ako 55°C alebo prekročila svoju životnosť.

Riešenie: Vymeniť za novú a zahriať ho na požadovanú teplotu.

5. Silné nešpecifické farbenie:

Príčina: spôsobené drastickým chemickým alebo tepelným opracovaním tkaniva, alebo nedostatočným vyblokováním endogénnej peroxidázy.

Riešenie: skontrolovať kvalitu tkaniva a pripraviť nový roztok peroxidu. Farbenie zopakujeme na novom tkanive.

3.2 Vyhodnotenie výsledkov:

Kvalitatívne posúdenie farbenia vykonávame pod mikroskopom. Vyhodnotenie obrazu zapíšeme do protokolu o farbení - formulára F1-SOP-M-001 (príloha č. 2). Protokol skontroluje vedúci pracoviska a potvrdí svojím podpisom.

4. Súvisiace dokumenty

- <http://www.aplum-bio.com>
- <http://www.ihcworld.com>
- knihy o danej problematike
- F1-SOP-M-001 - Protokol o farbení
- SOP-V-004- Príprava a krájanie v parafíne zaliatých vzoriek

5. Zoznam príloh

1. Zoznam protilátok používaných na diagnostiku
2. F1-SOP-M-001 – protokol z imunohistochemického farbenia

Príloha č. 1

Zoznam protilátok používaných na diagnostiku

Protilátka	Epitop protilátky	Riedenie
AT8	viaže sa na fosforylované epitopy TAU proteínu vytvárajúce PHF čím označuje NFT's v mozgovom tkanive ktoré sa vyskytujú u pacientov s Alzheimerovou chorobou.	1:1000
β -amyloid (clon 4G8)	viaže sa na zvyšky aminokyselín 17-24 proteínu β -amyloid. Hromadenie proteínu a vytváranie depozitov je charakteristické pre Alzheimerovu chorobu a Downov syndróm	1:500
α -synuclein (clon 4D6)	protilátka sa viaže na proteín α -synuclein, ktorý vytvára štruktúru tzv Lewieho teliesok v bunke a je charakteristický pre Parkinsonovu chorobu	1:500
Anti-p62 (Lck ligand)	protilátka sa viaže na T- lymfocytárny proteín lck nachádzajúci sa v cytoplazme buniek	1:500
Anti-phospho TDP-43 (pSer.409/410)	protilátka sa viaže na celý nukleárny ribonukleoproteín ktorý je súčasťou ubiquitin- pozitívnych a tau-negatívnych inklúzií charakteristických pre FTDP-U a ALS	1:1000
Anti- FUS	označuje patologický FUS proteín, ktorý sa nachádza v cytosole neurónov a glií.	1:100

Referencie:

Alafuzoff I, Ince PG, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bell J, Bodi I, Bogdanovic N, Bugiani O, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Ironside JW, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Parkkinen L, Patsouris E, Roggendorf W, Rozemuller A, Stadelmann-Nessler C, Streichenberger N, Thal DR, Kretschmar H. Staging/typing of Lewy body related alpha-synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol.* 2009 Jun;117(6):635-52.

Alafuzoff I, Thal DR, Arzberger T, Bogdanovic N, Al-Sarraj S, Bodi I, Boluda S, Bugiani O, Duyckaerts C, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Graeber M, Hortobagyi T, Höftberger R, Ince P, Ironside JW, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Nilsson T, Parchi P, Patsouris E, Pikkarainen M, Revesz T, Rozemuller A, Seilhean D, Schulz-Schaeffer W, Streichenberger N, Wharton SB, Kretschmar H. Assessment of beta-amyloid deposits in human brain: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol.* 2009 Mar;117(3):309-20.

Alafuzoff I, Gelpi E, Al-Sarraj S, Arzberger T, Attems J, Bodi I, Bogdanovic N, Budka H, Bugiani O, Englund E, Ferrer I, Gentleman S, Giaccone G, Graeber MB, Hortobagyi T, Höftberger R, Ironside JW, Jellinger K, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Rozemuller A, Seilhean D, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretschmar H. The need to unify neuropathological assessments of vascular alterations in the ageing brain: multicentre survey by the BrainNet Europe consortium. *Exp Gerontol.* 2012 Nov;47(11):825-33.

Kovacs GG, Rozemuller AJ, van Swieten JC, Gelpi E, Majtenyi K, Al-Sarraj S, Troakes C, Bodi I, King A, Hortobagyi T, Esiri MM, Ansorge O, Giaccone G, Ferrer I, Arzberger T, Bogdanovic N, Nilsson T, Leisser I, Alafuzoff I, Ironside JW, Kretschmar H, Budka H. Neuropathology of the hippocampus in FTLD-Tau with Pick bodies: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Feb;39(2):166-78.

Alafuzoff I, Pikkarainen M, Neumann M, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Bugiani O, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Graeber MB, Hortobagyi T, Ince PG, Ironside JW, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Nilsson T, Parchi P, Patsouris E, Revesz T, Roggendorf W, Rozemuller A, Seilhean D, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretzschmar H. Neuropathological assessments of the pathology in frontotemporal lobar degeneration with TDP43-positive inclusions: an inter-laboratory study by the BrainNet Europe consortium. J Neural Transm (Vienna). 2015 Jul;122(7):957-72

Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Braak H, Bugiani O, Del-Tredici K, Ferrer I, Gelpi E, Giaccone G, Graeber MB, Ince P, Kamphorst W, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Larionov S, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Seilhean D, Tagliavini F, Stadelmann C, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretzschmar H. Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the Brain Net Europe Consortium. BrainPathol. 2008;18(4):484-96.

Alafuzoff I, Pikkarainen M, Arzberger T, Thal DR, Al-Sarraj S, Bell J, Bodi I, Budka H, Capetillo-Zarate E, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Stadelmann C, Streichenberger N, Tagliavini F, Kretzschmar H. Inter-laboratory comparison of neuropathological assessments of beta-amyloid protein: a study of the BrainNet Europe consortium. Acta Neuropathol. 2008;115(5):533-46.

Alafuzoff I, Parkkinen L, Al-Sarraj S, Arzberger T, Bell J, Bodi I, Bogdanovic N, Budka H, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Kamphorst W, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Larionov S, Meyronet D, Monoranu C, Morris J, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Seilhean D, Streichenberger N, Thal DR, Kretzschmar H; BrainNet Europe Consortium. Assessment of alpha-synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium. J Neuropathol Exp Neurol. 2008 Feb;67(2):125-43.

	Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-M-001		Strana: 1 / 1 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

Príloha č. 2 – formulár F1-SOP-M-001 – Protokol z imunohistochemického farbenia

PROTOKOL Z IMUNOHISTOCHEMICKÉHO FARBENIA

Dátum:	
Metóda:	
Metódu vykonal:	

Testované tkanivo:

ID číslo pacienta:	
--------------------	--

Testované oblasti:

oblasť	*	oblasť	*	oblasť	*	oblasť	*
1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	

*označ križikom

Použité primárne protilátky:

Primárna protilátka	*	číslo šarže	Použité sekundárne protilátky:	*	číslo šarže
AT8			VECTASTAIN Elite ABC Kit HUMAN		
β -amyloid (clon 4G8)			VECTASTAIN Elite ABC Kit MOUSE		
α -synuclein (clon 4D6)			VECTASTAIN Elite ABC Kit RABBIT		
Anti-p62 (Lck ligand)			Poznámky:		
Anti.phospho TDP-43 (pSer.409/410)					
Anti- FUS					
*označ križikom					

Použité roztoky:

Roztok	*	číslo šarže	Poznámky:
Antigen unmasking roztok			
1M Tris-HCl roztok			
50mM Tris-HCl roztok			
50mM Tris-HCl + 0,2% Triton-X 100			
20x PBS roztok			
1x PBS roztok			
Aptum section block			
70 % Etanol			
1% peroxid vodíka			
*označ križikom			

Použitý VIP peroxidázový kit:

Typ kitu	číslo šarže	Poznámky:
VIP peroxidase substrate kit		

Výsledky:

Protokol z imunohistochemického farbenia

Poznámky:

Doba vyvolávania signálu:

Záver:

Schválil:

Číslo výtlačku:.....

SOP-M-002

HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
Vypracoval:	Mgr. MVDr. Tomáš Smolek, PhD. pracovník výskumu a vývoja		
Schválil:	doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc. riaditeľ		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-M-002	Strana: 2 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

OBSAH

1. Úvod	3
1.1 Cieľ	3
1.2 Podstata skúšky	3
1.3 Účel	3
1.4 Zaškolenie	3
1.5 Definície	3
1.6 Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:	3
1.7 Zodpovednosť	4
1.8 Materiál a prístrojové vybavenie	4
2. Pufre a chemikálie použité v tejto procedúre:	4
3. Pracovný postup	5
3.1 Vyhodnotenie výsledkov:	6
4. Súvisiace dokumenty	6
5. Zoznam príloh	6

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-M-002	Strana: 3 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

1. Úvod

1.1 Cieľ

Tento štandardný pracovný postup (skratka SOP z angl. „standard operating procedure“) popisuje postup histochemického farbenia používaného v rutínnej praxi pri diagnostike neurodegeneračných ochorení.

1.2 Podstata skúšky

Podstatou farbenia je väzba dvoch zložiek (hematoxylínu a eosínu) na špecifické oblasti v bunke. Konkrétne sa na zásaditú cytoplazmu viaže eosín a kyslé jadro bunky zase naviaže hematoxylín. Takýmto zafarbením dosiahneme kontrast medzi jednotlivými štruktúrami čím sa zreteľne vykreslí povrch tkaniva.

1.3 Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

1.4 Zaškolenie

Vedúci oddelenia je zodpovedný za riadne zaškolenie všetkých pracovníkov organizácie.

1.5 Definície

MPW: mili power water

1.6 Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:

S chemikáliami používanými počas práce podľa protokolu sa musí pracovať bezpečne a s vedomím o ich charaktere a účinku. Potrebné sú laboratórne rukavice, ochranné okuliare a vhodný laboratórny odev.

Kyselina octová (napr. Centralchem, L-00713)

H226 - Horľavá kvapalina a pary.

H314 - Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.

Bezpečnostné upozornenia

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

P310 - Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.

Etanol 96% (Centralchem, L-00274 -1L)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití

H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčiť

P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

Xylén čistý (Centralchem, L-00395)

H226 - Horľavá kvapalina a pary

H312 - Škodlivý pri kontakte s pokožkou

H315 - Dráždi kožu

H332 - Škodlivý pri vdýchnutí

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-M-002	Strana: 4 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

Izopropylalkohol čistý (napr. Centralchem L-00301)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary.

H319 - Spôsobuje vážne podráždenie očí.

H336 - Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty.

Bezpečnostné upozornenia

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite.

P261 - Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.

P305+351+338 - PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

1.7 Zodpovednosť

Bc Patrícia Karkušová je zodpovedný za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

1.8 Materiál a prístrojové vybavenie

Sklenené vaničky

Kovové stojany

Cover glasses (marienfeld)

Microscope slides Histobond S+ (Marienfeld, 0810501)

Vortex (Ika vortex genius 3)

Magnetické miešadlo

Sklenené kadičky

Váhy (napr. Kern PLJ)

Sklenené odmerné valce

Anatomické pinzety

Laboratórne rukavice (napr. Vasco Sensitive, Braun)

2. Pufre a chemikálie použité v tejto procedúre:

Entelan (napr. Merck Merck 1.07961.0500)

-montovacie médium

Xylén (napr. Centralchem, L-00395)

-zmes izomérov

Etanol (96%)(napr. Centralchem, L-00274 -1L)

-dodávaný ako 96%.

Mayersov hematoxylín (napr. Dako):

-,ready to use“ bez ďalšieho nariedovania.

Eosin Y roztok (napr. Sigma aldrich):

je pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom. Zloženie roztoku je uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Eosin Y roztok

Reagent	Množstvo
Eosin Y	1g
Milli-Q-voda	100ml

Phloxine B roztok:

je pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom. Zloženie roztoku je uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Phloxine B roztok - zloženie

Reagent	Množstvo
Phloxine B	1g
Milli-Q-voda	100ml

Eosin- Phloxine B pracovný roztok:

Zmiešaj v dostatočne veľkej sklenenej kadičke množstvá roztokov podľa tabuľky (Tabuľka 3 Eosin-Phloxine pracovný roztok).

Tabuľka 3 Eosin-Phloxine pracovný roztok

Reagent	Množstvo
Eosin Y roztok	100ml
Phloxine B roztok	10ml
Etanol (96%)	780ml
Kyselina octová	4ml

3. Pracovný postup

1. Deparafinizácia tkaniva- sklíčka s tkanivom sú umiestnené do roztokov s rozpúšťadlami, ktoré postupne odstránia parafín z tkaniva.
Postup: umiestni pripravený stojan so sklíčkami do sklenených nádobiek s látkami podľa nasledujúcej postupnosti:
 - 5 min xylén čistý
 - 5 min xylén čistý
 - 5 min isopropylalkohol čistý
 - 5 min 96,5 % etanol
 - 5 min 70 % etanol
 - 5 min MPW
1. vzorky rýchlo premy v Milli-Q-vode.
2. zafarbenie jadier - ponor vzorky do Mayersovho hematoxylínu na 6-18 min podľa odporúčania výrobcu.
3. nechaj vzorky vymývať pod teplou tečúcou vodou po dobu 10 min.
4. rýchlo premy v Milli-Q-vode.
5. 10x ponor do 96% etanolu.
6. zafarbenie cytoplazmy-ponor vzorky do eosin –phloxinB pracovného roztoku na 3 minúty
7. ponor vzorky do 96% etanolu na 3 min.

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-M-002	Strana: 6 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

2. Proces dehydratácie tkaniva- prebieha v nasledujúcich rozpúšťadlách v presne stanovenom poradí.

- 5 min 70 % etanol
- 5 min 96,5 % etanol
- 5 min isopropylalkohol
- 5 min xylén
- 5 min xylén

8. Montovanie tkaniva po zafarbení- tkanivo na sklíčku zalejeme montovacím médiom a prikryjeme krycím sklíčkom dostatočne dlhým podľa veľkosti tkaniva tak, aby sa pod krycím sklíčkom nevytvorili vzduchové bubliny a aby žiadna časť tkaniva nevyschla.

3.1 Vyhodnotenie výsledkov:

Preparáty pozorujeme pod mikroskopom a podľa vopred určeného zámeru sa snažíme identifikovať špecifické patologické zmeny na tkanive .

4. Súvisiace dokumenty

- <http://www.aptum-bio.com>
- <http://www.ihcworld.com>
- F1-SOP-M-002- Protokol o výsledku

5. Zoznam príloh

1. F1-SOP-M-002 – protokol z histochemického farbenia

Príloha č. 1 - F1-SOP-M-002 – protokol z histochemického farbenia

PROTOKOL Z HISTOCHEMICKÉHO FARBENIA

Dátum:

Metóda:

Metódu vykonal:

Testované tkanivo:

ID číslo pacienta:

Testované oblasti:

oblasť	*	oblasť	*	oblasť	*	oblasť	*
1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	

*označ križikom

Použité roztoky:

Roztok	*	číslo šarže	Poznámky:
70 % Etanol			
Mayersov hematoxylín			
Eosin- Phloxine B pracovný roztok			
Phloxine B roztok			
Eosin Y roztok			
*označ križikom			

Výsledky:

Poznámky:

Doba vyvolávania signálu:

Záver:

Schválil:

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: ZMRAZOVANIE TKANIVA Kód: SOP-V-003	Strana: 1 / 4 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

Výtlačok č.:

SOP-V-003

ZMRAZOVANIE TKANIVA

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
Vypracoval:	Mgr. MVDr. Tomáš Smolek, PhD. pracovník výskumu a vývoja		
Schválil:	doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc. riaditeľ		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: ZMRAZOVANIE TKANIVA Kód: SOP-V-003	Strana: 2 / 4 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

OBSAH

1. Úvod	3
1.1. Cieľ	3
1.2. Účel	3
1.3. Zaškolenie	3
1.4. Zodpovednosť	3
1.5. Kritické body	3
2. Pracovný postup	3
2.1. Chemikálie používané v tejto procedúre	3
2.2. Materiál a prístrojové vybavenie	3
2.3. Postup	3
2.3.1. Balenie, zmrazovanie a skladovanie vzoriek	4
2.3.2. Výskyt problémov počas zmrazovania	4
3. História dokumentu	4
4. Súvisiace dokumenty	4

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: ZMRAZOVANIE TKANIVA Kód: SOP-V-003	Strana: 3 / 4 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

1. Úvod

1.1. Cieľ

Tento štandardný pracovný postup (skratka SOP z angl. „standard operating procedure“) popisuje postup prípravy parafínových preparátov určených k diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.

1.2. Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

1.3. Zaškolenie

Autor SOP je zodpovedný za riadne zaškolenie všetkých pracovníkov.

1.4. Zodpovednosť

Vedúci štúdie je zodpovedný za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

1.5. Kritické body

nasledujúce body sú kritické pre správne vykonanie procedúry:

- dostatočné množstvo suchého ľadu

2. Pracovný postup

2.1. Chemikálie používané v tejto procedúre

Suchý ľad

- stlačené CO₂ vo forme drte s teplotou -80°C (pracovať v ochranných rukaviciach a odev)

2.2. Materiál a prístrojové vybavenie

- skalpel (napr. Roth, CE25.1)
- polystyrénové krabice
- ochranné rukavice pre prácu so suchým ľadom
- hliníková fólia
- plastové sáčky 6x8 cm (napr. Fisher,2105.0012)
- suchý ľad

2.3. Postup

Po prijatí a rozdelení mozgového tkaniva na pravú a ľavú hemisféru podľa protokolu SOP-V-001, spracujeme pravú hemisféru nasledovne:

Celú hemisféru rozkrájame na požadovaných 16 oblastí podľa publikácie Alafuzoff a kol., 2008:

1. Frontálna kôra
2. Temporálna kôra
3. Opaskový závit

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: ZMRAZOVANIE TKANIVA Kód: SOP-V-003	Strana: 4 / 4 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

4. Parietálna kôra
5. Pre- a post-centrálny závit
6. Okcipitálna kôra
7. Hipokampus – predná časť
8. Hipokampus – zadná časť
9. Predný bazálny mozog
10. Striatum
11. Talamus
12. Stredný mozog
13. Varolov most
14. Predĺžená miecha
15. Mozoček (vermis)
16. Mozoček

+ prípadné ďalšie oblasti potrebné pre dodatočné vyšetrenie

2.3.1. Balenie, zmrazovanie a skladovanie vzoriek

Jednotlivé oblasti urýchlene vkladáme do plastového vrečka s ID kódom vzorky pod ktorým bude vzorka evidovaná aj v databáze podľa protokolu SOP-V-002. Plastové vrečká so vzorkami následne balíme do hliníkovej fólie tiež označenej kódom. Takto zabalené vzorky sa uložia do suchého ľadu na približne 2h. Kódy vzoriek sú na plastových vrečkách a hliníkových fóliách napísané, alebo nalepené tak, aby boli čitateľné a neodstrániteľné. Po 2h sa vzorky premiestnia do mraziaceho zariadenia na -80°C. Vzorky je dôležité uskladniť v označených boxoch a následne zaznamenať v databáze podľa SOP-V-002. Keďže sa jedná o hlbokozmrazené konzervovanie vzoriek maximálna doba skladovania za takýchto podmienok je neobmedzená a vzorky sa skladujú až do doby použitia. Teplota hlbokomraziacich boxov sa zaznamenáva do prislúchajúcej prístrojovej knihy.

2.3.2. Výskyt problémov počas zmrazovania

Počas zmrazovania by nemalo dôjsť k žiadnym problémom. Dôležité je zabezpečiť dostatočné množstvo suchého ľadu k uskutočneniu protokolu.

3. História dokumentu

verzia	od	do	zmena
1.			
2.			

4. Súvisiace dokumenty

- SOP-P-006- Mraziace zariadenie- obsluha a prevádzka
- SOP-V-001 - Príjem, evidencia a manipulácia s biologickým materiálom (mozgové tkanivo).
- SOP-V-002 - Vedenie databázy a evidencia biologického materiálu (mozgové tkanivo).
- Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Braak H et al. (2008) Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. Brain Pathol 18(4):484–496.

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 1 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

Číslo výtlačku:.....

SOP-V-004

PRÍPRAVA A KRÁJANIE PARAFÍNOVÝCH BLOČKOV

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
Vypracoval:	Mgr. MVDr. Tomáš Smolek, PhD. pracovník výskumu a vývoja		
Schválil:	doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc. riaditeľ		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 2 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

OBSAH

1. Úvod	3
1.1. Cieľ	3
1.2. Účel	3
1.3. Zaškolenie	3
1.4. Definície	3
1.5. Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:	3
1.6. Zodpovednosť:	4
2. Materiál a prístrojové vybavenie:	4
2.1. Zoznam materiálu:	4
2.2. Roztoky a reagenty	4
Chemikálie používané v tejto procedúre	4
3. Postup	5
3.1. Delenie mozgového tkaniva:	5
3.2. Presycovanie	5
3.3. Zalievanie parafínom	7
3.4. Problémy počas presycovania a zalievania tkaniva	7
3.5. Krájanie parafínových vzoriek	8
3.6. Výskyt problémov počas krájania	8
3.7. Kritické body	9
3.8. Súvisiace dokumenty	9

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 3 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

1. Úvod

1.1. Cieľ

Tento štandardný pracovný postup (skratka SOP z angl. „standard operating procedure“) popisuje postup prípravy parafrínových preparátov určených k diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.

1.2. Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

1.3. Zaškolenie

Bc. Patrícia Karkušová je zodpovedná za riadne zaškolenie všetkých pracovníkov.

1.4. Definície

1.5. Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:

Niekoľko chemikálií vyskytujúcich sa v tomto SOP musia byť používané s opatrnosťou zodpovedajúcou ich charakteru. Preto treba používať laboratórne rukavice, vhodný laboratórny odev a laboratórne okuliare.

Xylén (Centralchem, L-00395)

H226 - Horľavá kvapalina a pary

H312 - Škodlivý pri kontakte s pokožkou

H315 - Dráždi kožu

H332 - Škodlivý pri vdýchnutí

Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre

Etanol Absolútny (Centralchem, L-00793)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití

H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite

P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

Etanol 96% (Centralchem, L-00274 -1L)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití

H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 4 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

1.6. Zodpovednosť:

Bc. Patrícia Karkušová je zodpovedná za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

2. Materiál a prístrojové vybavenie:

2.1. Zoznam materiálu:

Leica ASP 6025
Leica HistoCore Arcadia H,C
Leica Leica RM2255
Paraplast X-tra (napr. Leica, 39603002)
pinzety (napr. e-medical, 2688.1)
skalpel (napr. Roth, CE25.1)
plastové košíky (napr. Jet Cassette II)
malé PVC vrecká

2.2. Roztoky a reagenty

Chemikálie používané v tejto procedúre

Etanol (50%) (napr. Centralchem)

- množstvo potrebného alkoholu je dané počtom košíkov so vzorkami.

Tabuľka - príklad riedenia:

Etanol	Objem 1L
Etanol (96%)	500 ml
Milli-Q-voda	500 ml

Etanol (70%)(napr. Centralchem)

- množstvo potrebného alkoholu je dané počtom košíkov so vzorkami.

Tabuľka - príklad riedenia:

Etanol	Objem 1L
Etanol (96%)	700 ml
Milli-Q-voda	300 ml

Etanol (96%)(napr. Centralchem)

- dodávaný ako 96%

Etanol Absolútny

- dodávaný ako absolútny

Paraformaldehyd 4%

- prípravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom

Xylén čistý (napr. Centralchem)

- neriedený, dodávaný v požadovanej koncentrácii a zložení

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 5 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

Paraplast X-tra (napr. Leica)

- zmes parafrínov s teplotou topenia 52°C

3. Postup

3.1. Delenie mozgového tkaniva:

Po prijatí a rozdelení mozgového tkaniva na pravú a ľavú hemisféru podľa protokolu SOP-V-1, spracujeme ľavú hemisféru nasledovne:

Ľavú hemisféru vyberieme z nádoby s 4% paraformaldehydrom a v digestore celú hemisféru rozkrájame na vzorky pozostávajúce zo 16 základných oblastí (Alafuzoff a kol., 2008):

1. Frontálna kôra
2. Temporálna kôra
3. Opaskový závit
4. Parietálna kôra
5. Pre- a post-centrálny závit
6. Okcipitálna kôra
7. Hipokampus – predná časť
8. Hipokampus – zadná časť
9. Predný bazálny mozog
10. Striatum
11. Talamus
12. Stredný mozog
13. Varolov most
14. Predĺžená miecha
15. Mozoček (vermis)
16. Mozoček

+ prípadné ďalšie oblasti potrebné pre dodatočné vyšetrenie

3.2. Príprava vzoriek na presycovanie

Jednotlivé vzorky by nemali presahovať veľkosť 1 cm² a po odkrojení ich vkladáme do plastových košíkov Jet Cassette II. Každý jeden košík so vzorkou označíme príslušným ID kódom tej danej vzorky pod ktorým je evidovaná v databáze podľa SOP-V-002 a vložíme ho do nádoby s čistou vodou. Po rozkrájaní celej hemisféry, vzorky v nádobe premývame v čistej vode min. 24h. Nádoba je počas tejto doby umiestnená v chladničke pri teplote +4 - +8 °C.

3.3. Presycovanie

Proces presycovania začína dehydratáciou tkaniva tzn. tkanivo sa dostatočne odvodní aby mohlo vstrebať maximálne množstvo parafrínu. Využívame na to prístroj/zariadenie autotechnicon (Leica ASP6025, SOP-P-005, Obrázok 1 presycovací automat). Program určený na presycovanie mozgového tkaniva trvá 24h.

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALÍATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 6 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:



Obrázok 1 Presycovací automat

Premyté vzorky v košíkoch vyber a vlož ich do 50% etanolu nariedeného podľa tabuľky na 30 min.

Etanol	Objem 1L
Etanol (96%)	500 ml
Milli-Q-voda	500 ml

Takto pripravené vzorky v košíkoch naskladáme do kovového stojanu, ktorý slúži na usporiadanie a polohovanie vzoriek v odvodňovacom automate. Stojan umiestnime do odvodňovacieho automatu.



Obrázok 2 Plastové košíčky na tkanivo



Obrázok 3 Kovový stojan na plastové košíčky

Na dostatočnú dehydratáciu ľudského mozgového tkaniva a jeho následné presýtenie parafrínom používame postup:

Krok	Reagenty	Čas	Teplota	Tlak
1	70 % ethanol	2,30 h	37°C	-
2	96 % ethanol	1 h	37°C	-
3	96 % ethanol	2 h	37°C	-
4	absolute ethanol	1 h	37°C	-
5	absolute ethanol	1,30 h	37°C	-
6	absolute ethanol	2 h	37°C	-
7	xylene	1 h	37°C	-
8	xylene	1 h	37°C	-
9	xylene	2 h	37°C	-
10	Histowax I (Paraplast X-tra)	2 h	56°C	vákuum
11	Histowax II. (Paraplast X-tra)	3 h	56°C	vákuum
12	Histowax III (Paraplast X-tra)	5 h	56°C	vákuum

Po ukončení procesu vzorky vyber a vlož do vopred nahriatej parafrínovej zalievacky (Leica HistoCore Arcadia H, SOP-P-004).

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 7 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

3.4. Zalievanie parafínom

Pred procesom zalievania skontroluj množstvo parafínu v prístrojovej zbernej nádobe (kritický bod).

Proces zalievania prebieha rýchlo v parafínovom prístroji (Leica HistoCore Arcadia H). V zbernej nádobe tkanivo nesmie začať schnúť (*Obrázok 4 zberná nádoba parafínového automatu*). Tkanivo vyber z plastového košíčka a jeho vrchnú pohyblivú krytku odstráň. Do formovacej plastovej nádobky nalej na dno parafín (*Obrázok 5 plnenie tvarovacích misiek*) v takom množstve, aby bolo dno celé zaliate. Parafín nechaj chvíľku tuhnúť (do 5 sekúnd) a následne na čiastočne zatuhnutý parafín umiestni tkanivo v požadovanej polohe (*Obrázok 6 polohovanie mozgového tkaniva*). Zvyšok vzorky zalej parafínom tak, aby žiadna časť nevyčnievala. Zaliatu vzorku prikry tou časťou plastového košíčka, na ktorej je označenie vzorky (*Obrázok 7 zalievanie vzorky parafínom doplna*). Časť s označením musí byť na formovacej nádobe prilepená parafínom tak, aby odtiaľ neodpadla a nedošlo k zámene vzoriek. Takto zaliatu vzorku umiestni na chladiaci panel kde parafín zatuhne.



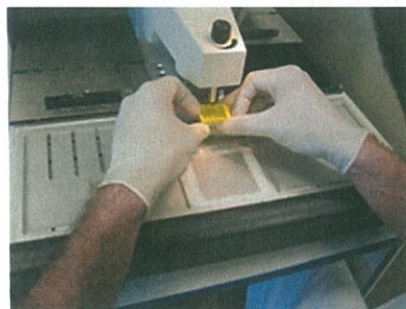
Obrázok 4 zberná nádoba parafínového automatu



Obrázok 5 plnenie tvarovacích misiek



Obrázok 6 polohovanie mozgového tkaniva



Obrázok 7 zalievanie vzorky parafínom do plna

3.5. Problémy počas presycovania a zalievania tkaniva

Počas presycovania môže dôjsť k výpadku prúdu a prístroj sa vypne. Prístroj je nastavený tak, že vzorky ostanú v reagente v ktorom sa nachádzali pred vypnutím prístroja. Ak sa vzorky nevyberú po výpadku elektriny a nepremiestnia do nasledujúceho reagentu v priebehu 2h, budú znehodnotené a celý proces je potrebné zopakovať nanovo s novými vzorkami.

Počas zalievania môžu vo vzorke vzniknúť bubliny ktoré je potrebné odstrániť alebo opätovne zaliť vzorku bez bublín. Dôležité je sledovať množstvo parafínu v zbernej nádobe a podľa potreby ho dopĺňať. Ak počas zalievania vyčerpáme celý roztopený parafín, trvá dlhší čas, kým sa nový rozpustí a počas tejto doby nám vzorky môžu začať schnúť a tvrdnúť.

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 8 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

3.6. Balenie a skladovanie vzoriek konzervovaných vo forme parafínových bločkov

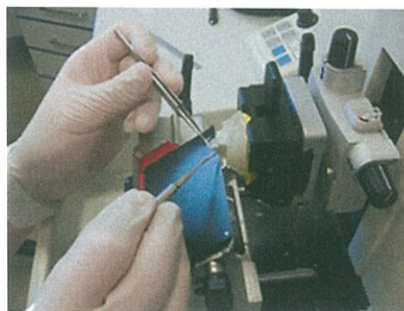
Zatuhnutá vzorka sa opatrne vyberie zo zalievacej formičky. Následne sa vzorka umiestni do samostatného malého uzatvárateľného PVC vrečka, na ktorom je čitateľne napísané/nalepené ID kód vzorky, kód pacienta a zabalené vzorky sa umiestnia do zakladača/boxu pre vzorky v miestnosti určenej na skladovanie vzoriek. Vzorky konzervované vo forme parafínových bločkov sú skladované na izbovej teplote. Teplota v skladovacej miestnosti sa nezaznamenáva, nakoľko parafínové bločky sú stabilné až do teploty 50 °C. Maximálna doba skladovania za takýchto podmienok nie je zatiaľ podľa dostupnej literatúry obmedzená.

3.7. Krájanie parafínových vzoriek

Na skrajovanie zafixovanej vzorky používame mikrotóm (Leica RM2255, SOP-P-002). Vzorku upevníme na posuvný stolček (*Obrázok 8 mikrotóm*). Polohovanie vzorky rob podľa tvaru a požadovanej oblasti, ktorú na vzorke chceš skrajovať. Takto pripravenú vzorku najskôr uprav a odstráň nepotrebný parafín čiastočným skrojením povrchovej vrstvy, kým sa nepriblížiš k samotnému tkanivu. Hrúbku rezu tkaniva nastav na 7 µm. Vzorku následne krájaj automaticky podľa nastaveného programu. Odkrojený plátok premiestni pomocou nástrojov (*Obrázok 9 proces krájania*) na hladinu studenej destilovanej vody. Odtiaľ ho pomocou podložného sklíčka prenes na hladinu ohriatej vody (42-48°C) (*Obrázok 11 ohriata voda*). Na hladine ohriatej vody sa tkanivo začne pomaly narovnávať. Počkaj, kým nie je celý rez vyrovnaný.



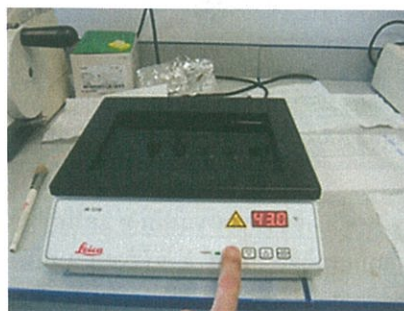
Obrázok 8 mikrotóm



Obrázok 9 proces krájania



Obrázok 10 krájanie



Obrázok 11 ohriata voda

3.8. Výskyt problémov počas krájania

- Počas skrajovania môže dôjsť k chybe prístroja a prístroj nebude dodržiavať zadané parametre (napr. hrúbka rezu, rýchlosť skrajovania, a iné...). V takomto prípade je nutné prestať krájať, prístroj vypnúť a poruchu je nutné nahlásiť a zapísať do prístrojovej knihy/zošita.
- V závislosti od typu tkaniva sa tkanivo môže začať vlniť, alebo sa zle vyrovnáva. V takomto prípade je potrebné vyskúšať rôzne teploty vodného kúpeľa, alebo častejšie meniť žiletku v prístroji.

Prvá slovenská mozgová banka, Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava	
Tkanivové zariadenie	
Štandardný pracovný postup: PRÍPRAVA A KRÁJANIE V PARAFÍNE ZALIATYCH VZORIEK Kód: SOP-V-004	Strana: 9 / 9 Číslo vydania: 1 Dátum vydania:

3.9. Kritické body

nasledujúce body sú kritické pre správne vykonanie procedúry:

- dostatočné množstvá reagentov v prístroji Leica ASP 6025. Skontroluj pred každým zapnutím prístroja.
- dostatočné množstvo parafínu X-tra v prístroji Leica HistoCore Arcadia H. Skontroluj pred každým zapnutím prístroja.

4. História dokumentu

verzia	od	do	zmena
1.			
2.			

5. Súvisiace dokumenty

- Prístrojový manuál Leica RM2255
- Prístrojová kniha k Leica RM2255
- SOP-P-005-odvodňovací automat-obsluha a prevádzka
- SOP-P-004-parafínová zalievacia- obsluha a prevádzka
- SOP-P-002-mikrotóm- obsluha a prevádzka
- SOP-V-001 - Prijem, evidencia a manipulácia s biologickým materiálom (mozgové tkanivo)
- SOP-V-002- Vedenie databázy a evidencia biologického materiálu (mozgové tkanivo)
- Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Braak H et al. (2008) Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. Brain Pathol 18(4):484–496.

PROTOKOL O ODOBERE TKANÍV Z TELA MŔTVEHO DARCU

Miesto odberu: _____
 Dátum odberu: _____
 Čas začiatku odberu: _____ Čas ukončenia odberu: _____
 Číslo pitevného protokolu: _____

Meno a priezvisko darcu

Rodné číslo darcu:

Identifikácia darcu:

Názov tkanivového zariadenia:

Výber darcu uskutočnil: (meno a priezvisko)

Darca spĺňa kritéria: **áno / nie***

Podpis:

Zoznam odobratých tkanív/buniek:

Mená členov odberového tímu tkanivového zariadenia:

Meno a priezvisko	Podpis

Vedúci pracovník odberového tímu riadi odberový tím po odbornej a manažérskej stránke, je zodpovedný za odoberanie a testovanie zo strany tkanivového zariadenia a je zodpovedný za rekonštrukciu tela darcu.

Vedúci pracovník odberového tímu (meno, priezvisko / podpis):

Zamestnanec/zamestnanci úradu poskytujúci súčinnosť(meno, priezvisko / podpis):

.....
Pacient za života

odmietol / neodmietol pitvu*

Vedúci lekár pracoviska úradu, alebo ním určený lekár je zodpovedný za výber darcu a zhodnotenie správnosti rekonštrukcie tela darcu, ako aj overenie prítomnosti darcu v registri úradu, či osoba neodmietla za svojho života pitvu.

Meno a priezvisko vedúceho lekára SLaPA pracoviska alebo ním určeného lekára úradu:

.....

.....

(pečiatka a podpis)