



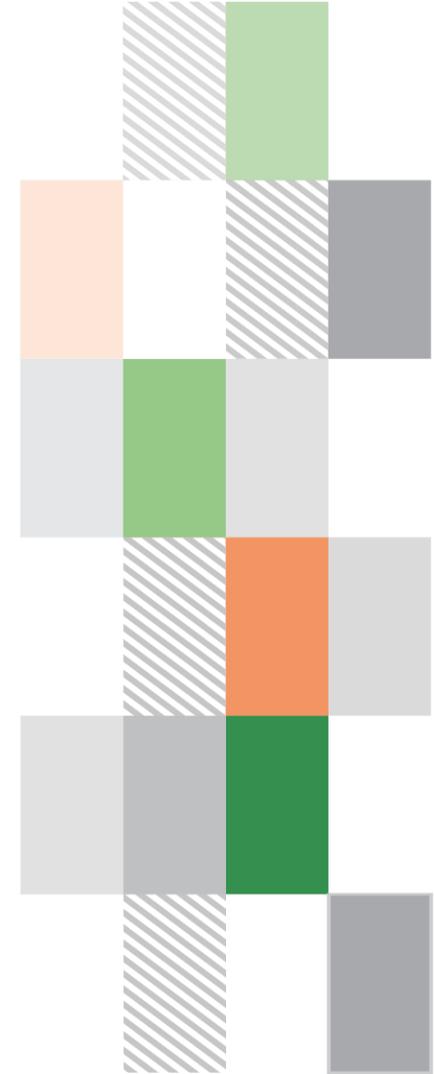
Medical University of Graz

ALLGEMEINE PATHOLOGIE

Univ. FA Dr. Christian Viertler
D&F Institut für Pathologie
Medizinische Universität Graz
christian.viertler@medunigraz.at



Was macht ein Pathologe?

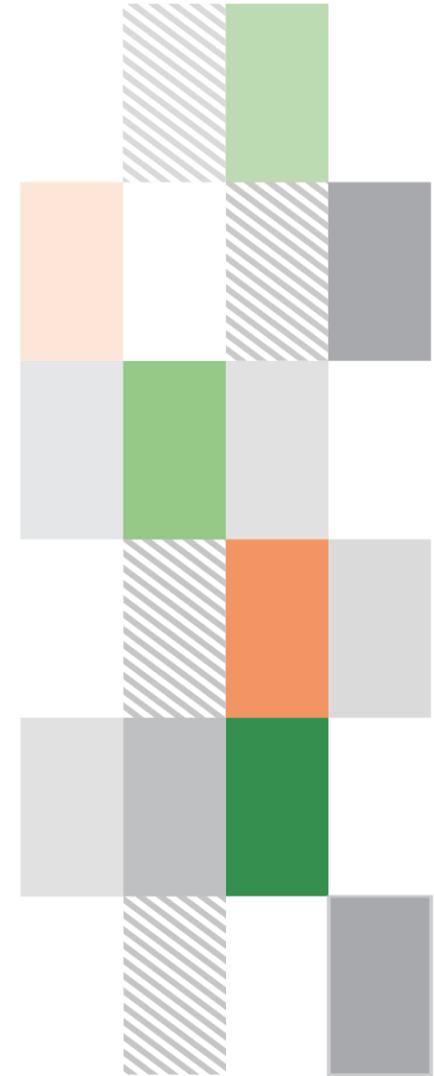


Pathologie

Pathos = Leiden

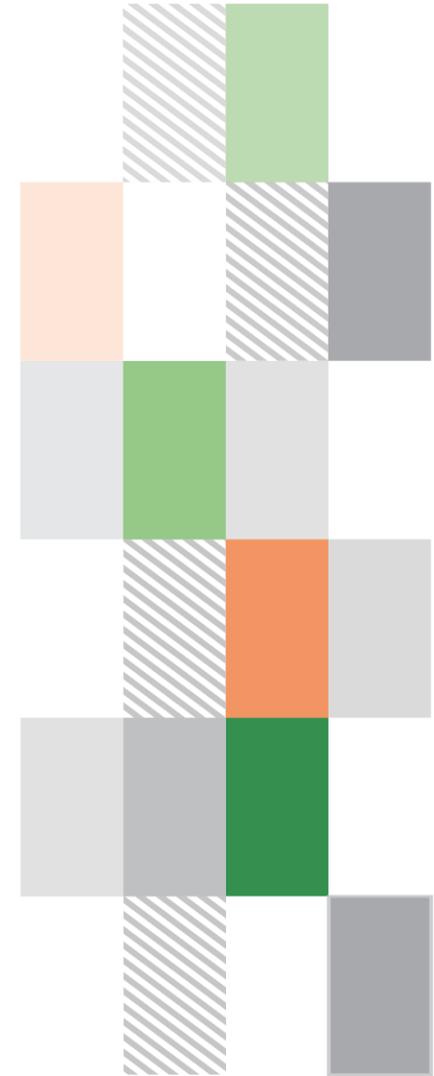
Logos = Lehre

= Krankheitslehre



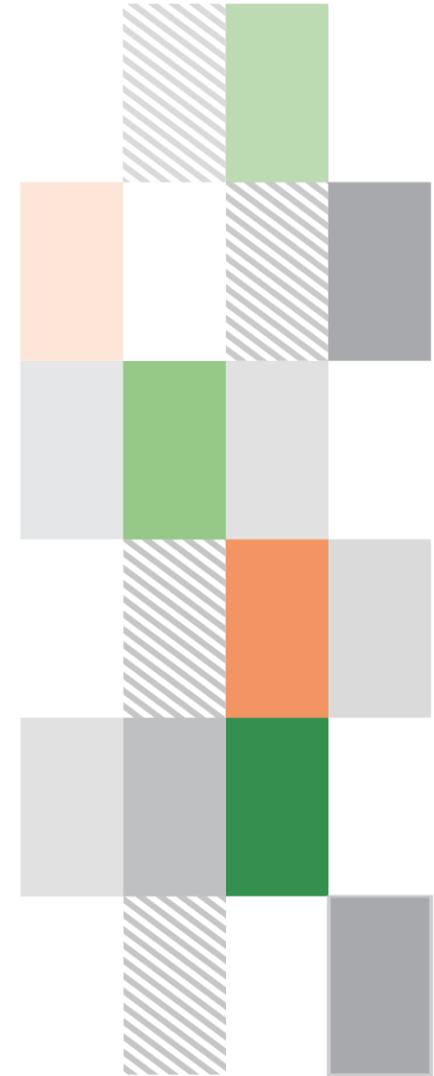
Pathologie

- ▶ **Allgemeine Pathologie:**
 - ▶ Grundprinzipien der Krankheitsursachen und der Reaktionsmechanismen des Organismus
- ▶ **Klinische Pathologie:**
 - ▶ Organspezifische Erkrankungen und Befunde
- ▶ **Molekulare Pathologie:**
 - ▶ Analyse von Biomolekülen aus Gewebe und Körperflüssigkeiten (Diagnose, Risikostratifikation, Therapieoptionen)

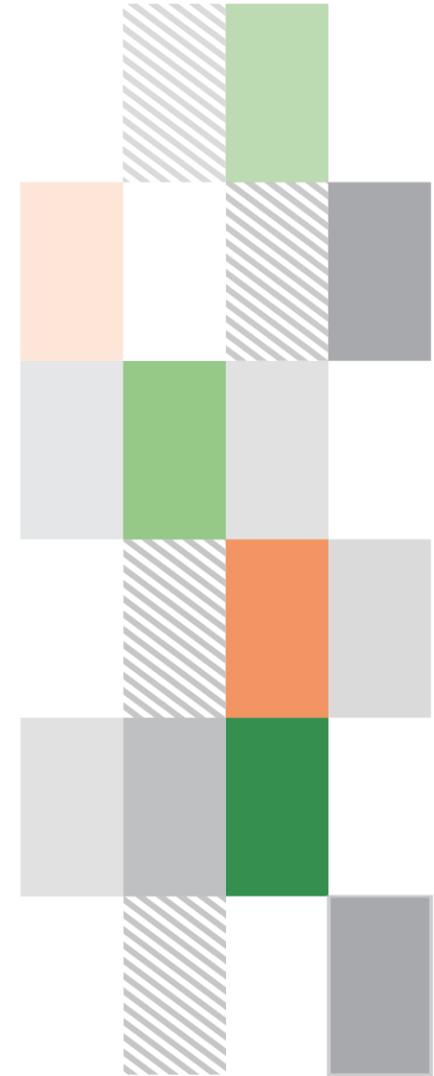


Was ist eine Krankheit?

- ▶ WHO -Definition von Gesundheit:
 - ▶ Gesundheit ist der Zustand völligen körperlichen, seelischen und sozialen Wohlbefindens.
 - ▶ Krankheit ist eine Störung der Gesundheit.



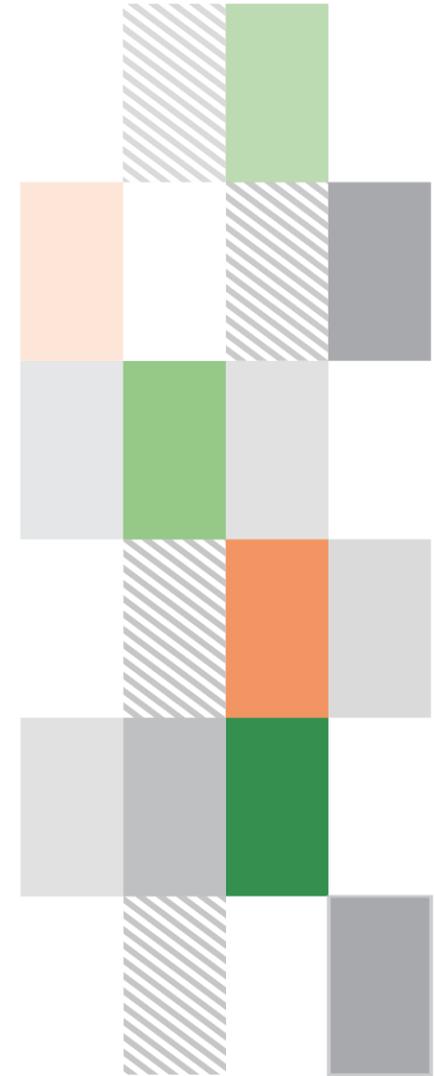
Was macht ein Pathologe?



Was macht ein Pathologe?

Diagnostik von Krankheiten und möglichen Therapieoptionen:

- ▶ *Untersuchung von Gewebeproben (Biopsien, Operationspräparate)*
- ▶ **Makroskopie**
- ▶ **Mikroskopie**
 - ▶ Intraoperative Schnellschnittuntersuchung
 - ▶ Histopathologische Befunde
 - ▶ HE, Spezialfärbungen
 - ▶ Immunhistochemie, in situ Hybridisierung
 - ▶ ELMI
- ▶ **Molekularpathologie**
- ▶ **Zytologie** (Gyn/Extra-Gyn)
- ▶ **Mikrobiologie/Erregerdiagnostik**
- ▶ **Autopsie**
- ▶ Lehre (prä-/postpromotionell)
- ▶ Forschung (Krankheitsursachen/-mechanismen, Verlauf, Therapieoptionen)
 - ▶ „translational research“, „bench to bedside“



Workflow Gewebeproben



OP/Biopsie

Makroskopie

Asservierung/Einbettung

Mikroskopie

Weitere Analysen

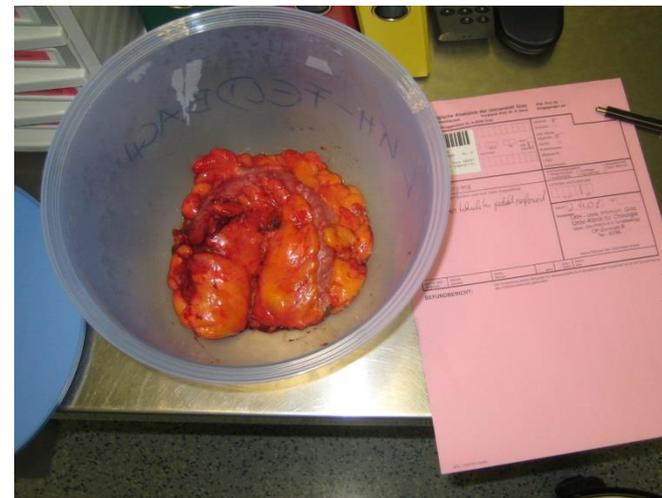


Vom OP zur Pathologie



030825 12 -302

Vom Einsender auszufüllen	MÄDCHENNAME (nur bei verheirateten Frauen)		Allgemein <input type="checkbox"/>
	Ausgebühter Beruf:		Sonder <input type="checkbox"/>
LOKALISATION (Organ)	Mamm Sin		Krankenkasse: Mitglieds-Nr.:
Klinische Diagnose, jetzige Operation, anamn. Daten, Fragen			I-Zahl:
			Aufnahmezahl:
			Untersuchungsmate <input type="checkbox"/> Probe-Excision <input type="checkbox"/> Inzidenzbiopsie
			LETZTER HISTO-E
			Pr. Nr.:
			Datum: 12.0
			Einsender:
			LKH - UNI Universität Vorstand: Uni Leiter: Uni Montag u Mittw
gyn. u. geb. Angaben:	Menstr. anomal	letzte Menstr.	para
			Grav. SSW
			Horm. ther.



Probentransport

▶ Nativ

▶ Schnellschnittuntersuchung (während laufender OP)

- ▶ Indikationen: Repräsentativität, Dignität (Planung weitere Diagnostik, Staging), RR-Analyse etc.
 - ▶ Auswirkung auf weiteres operatives Vorgehen! *Neugierde ist keine Indikation.*
- ▶ Exakte Diagnose oft erst am fixierten Material möglich

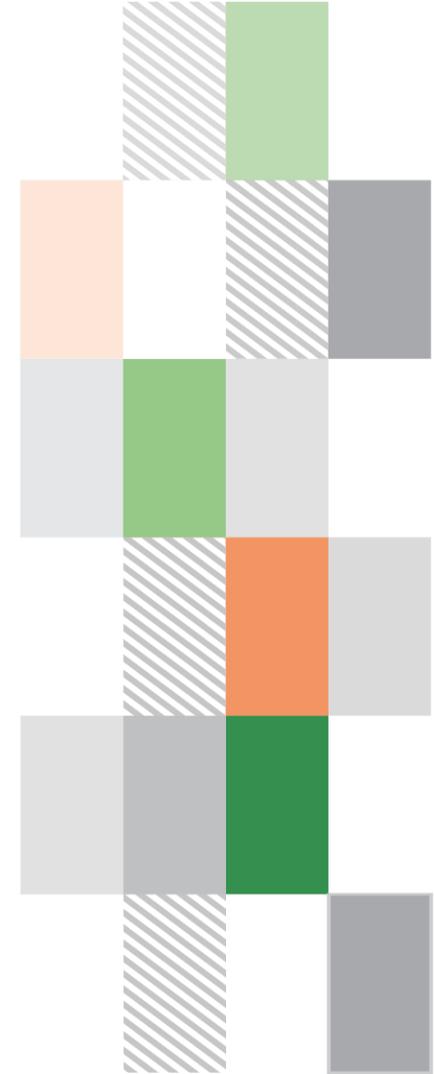
▶ Cryo-asservierung Biobank, Forschung

▶ Fixiert (Formalin)

- ▶ Keine Schnellschnittuntersuchung
- ▶ Biopsien, OP Präparate

▶ NB

- ▶ Möglichst rascher Transport ad Pathologie
- ▶ Keine längere, unfixierte Aufbewahrung (Autolyse!)
- ▶ Verzögerungen Transport/Probenfixierung -> Verzögerungen in der weiteren Aufarbeitung -> Befundverzögerung

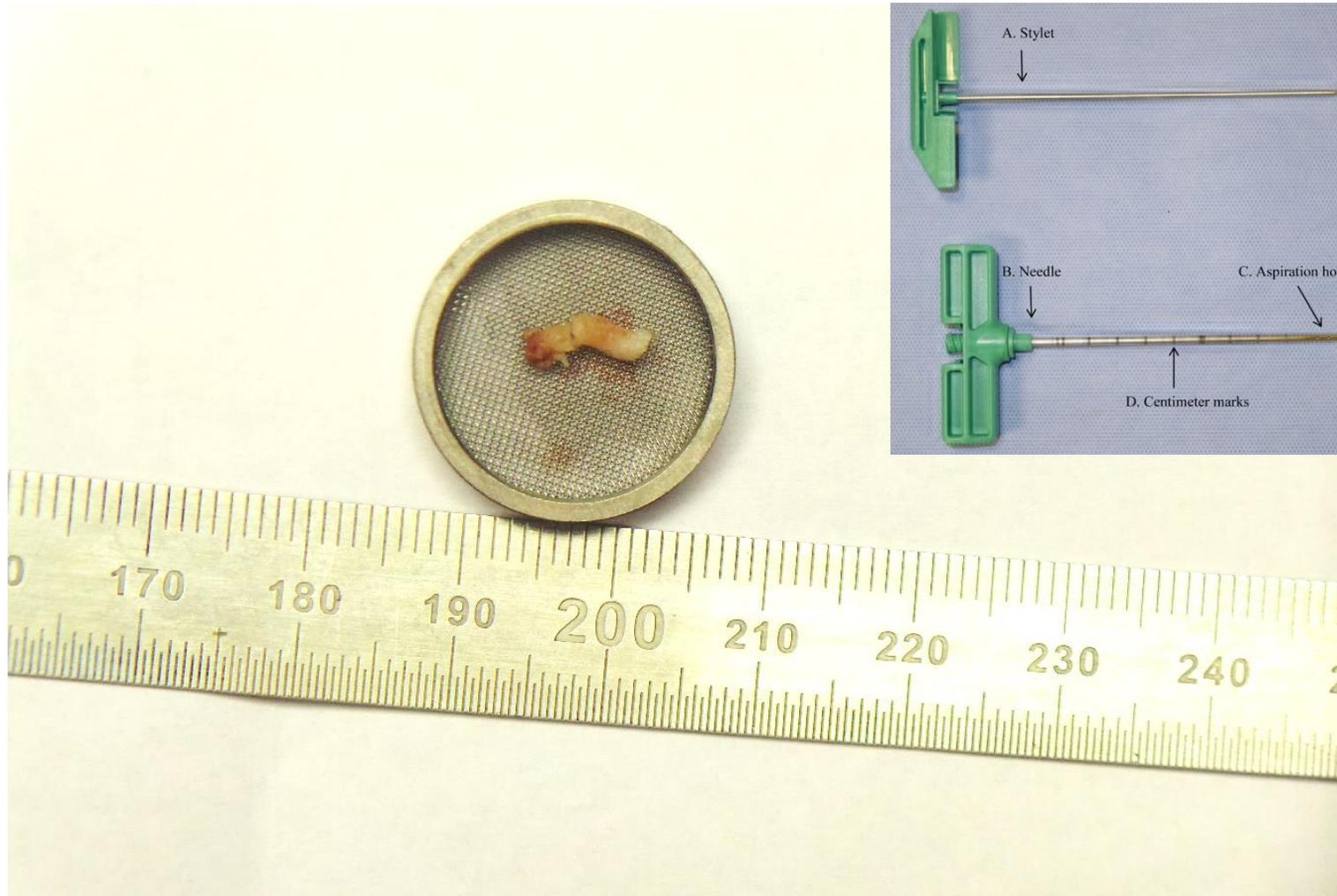


Probenarten

- ▶ **(Stanz-)biopsie:**
 - ▶ CT/US gezielt oder offen
 - ▶ Entitäts- u. Dignitätsabklärung
 - ▶ Diagnose bestimmt weiteres Vorgehen (CTX, RTX, OP)
- ▶ **Curettage:**
 - ▶ Ausräumung benigner/low grade Läsionen (Entzündung, Zysten, Tumore)
 - ▶ Keine RR Bestimmung
- ▶ **Operationspräparat:**
 - ▶ Entzündlich-reaktiv-degenerative Erkrankung
 - ▶ Tumor (maligne - Rezidiv/Metastasierungsrisiko, benigne - Größe, Funktion)
 - ▶ RR Bestimmung



Stanze



Curettage

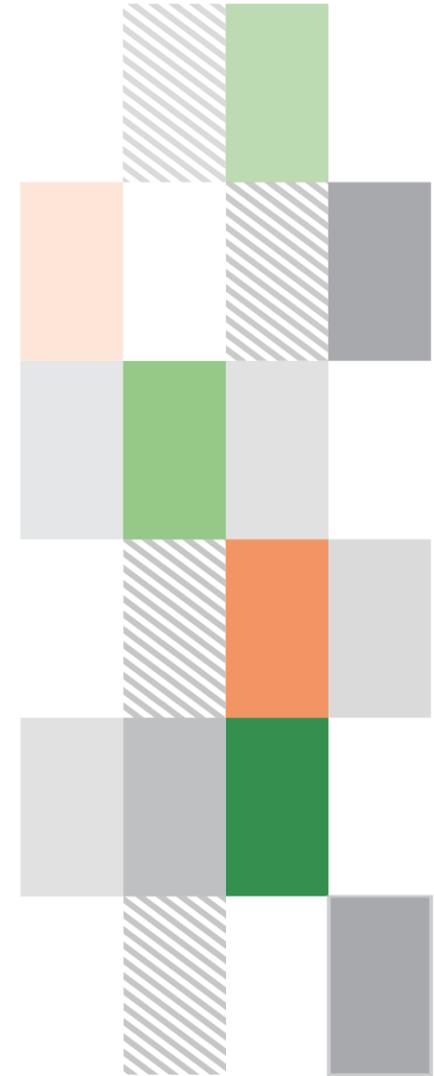


OP Präparat/Resektat

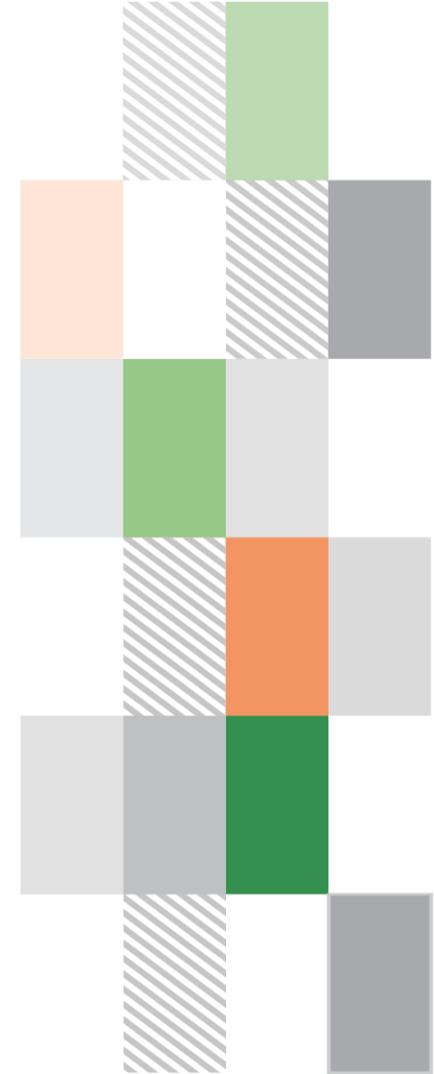


Makroskopie

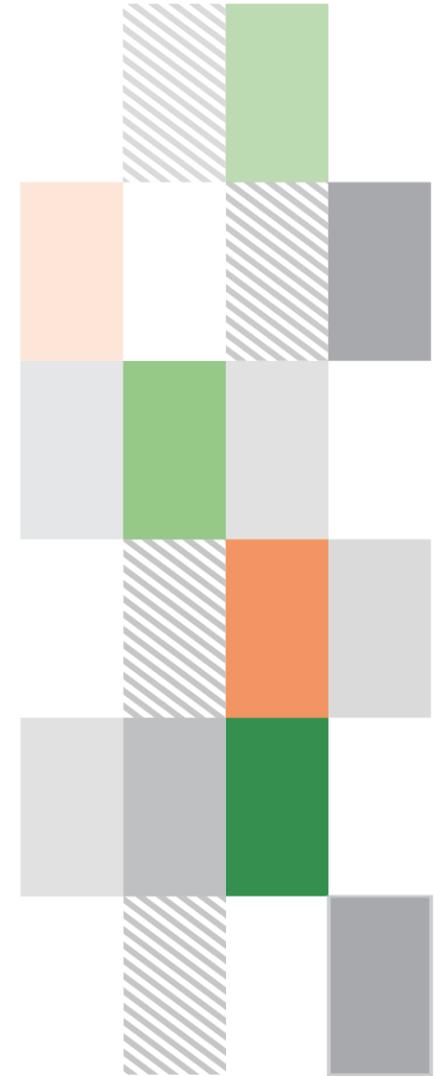
- ▶ Erkennen/Beschreiben von krankhaften Veränderungen mit dem freien Auge
- ▶ Veränderungen der
 - ▶ Form
 - ▶ Begrenzung
 - ▶ Größe, Gewicht
 - ▶ Oberfläche, Struktur
 - ▶ Farbe
 - ▶ Konsistenz
- ▶ Präparat aufschneiden/Lamellieren für adäquate Fixierung
- ▶ Adäquates Sampling für histopathologische Diagnostik
 - ▶ Ätiologie, Dignität, Entität, Staging, Grading, RR etc.



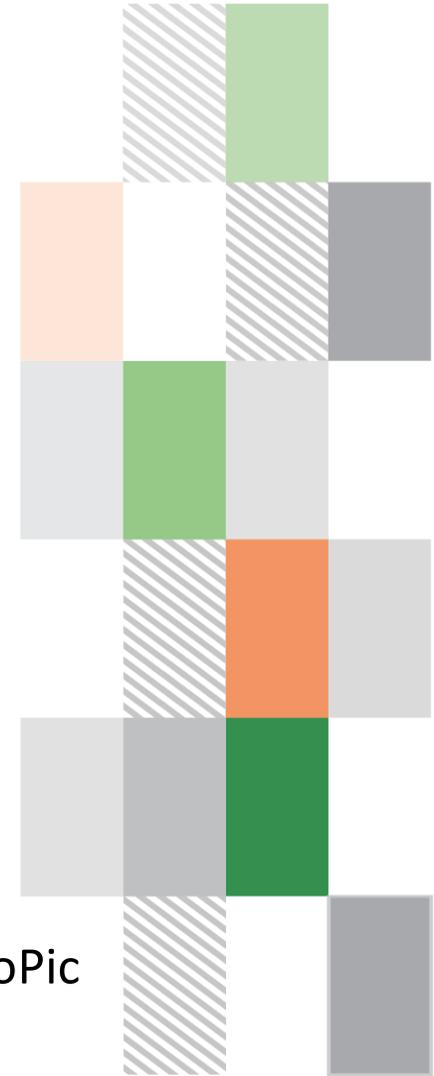
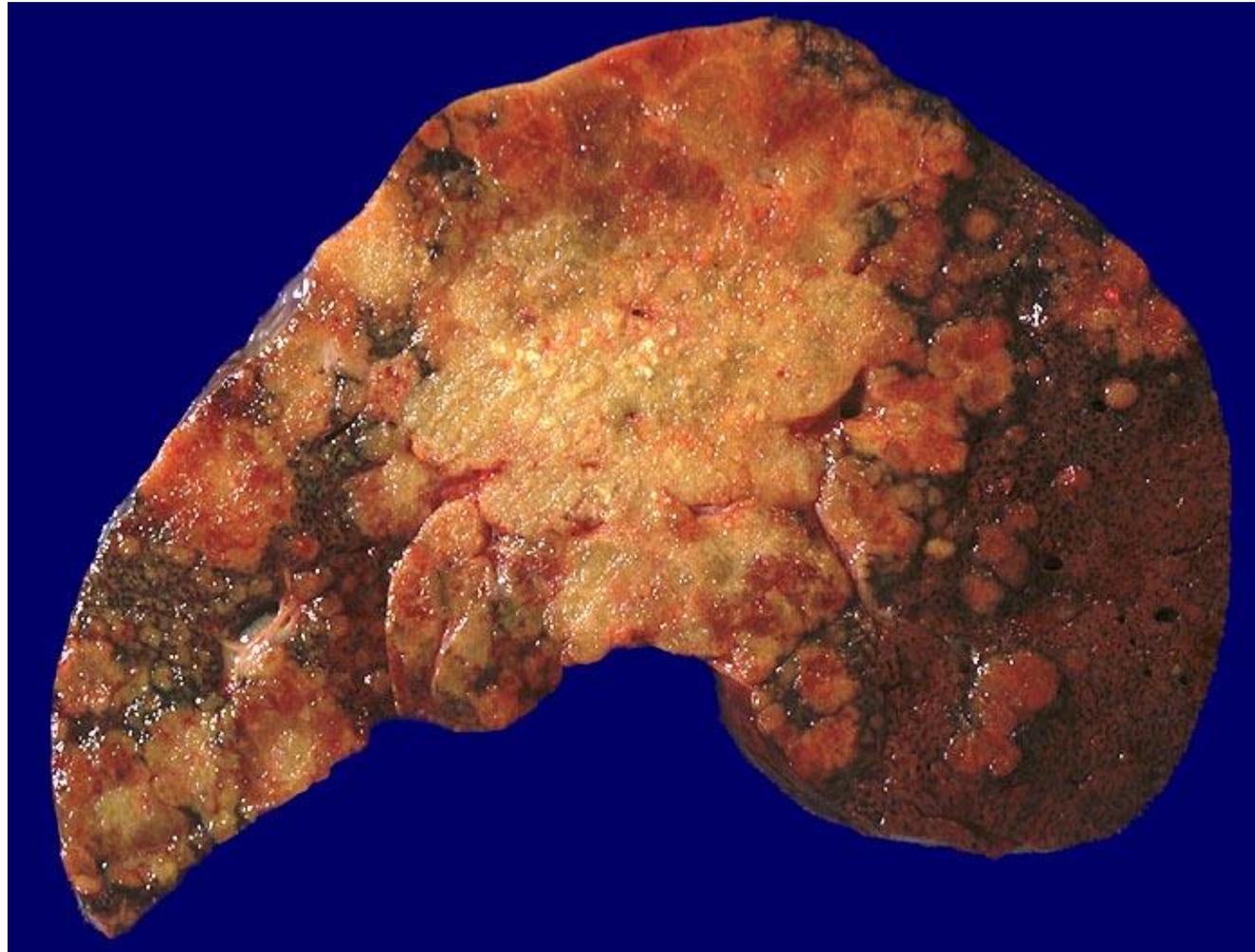
Nävuszellnävus



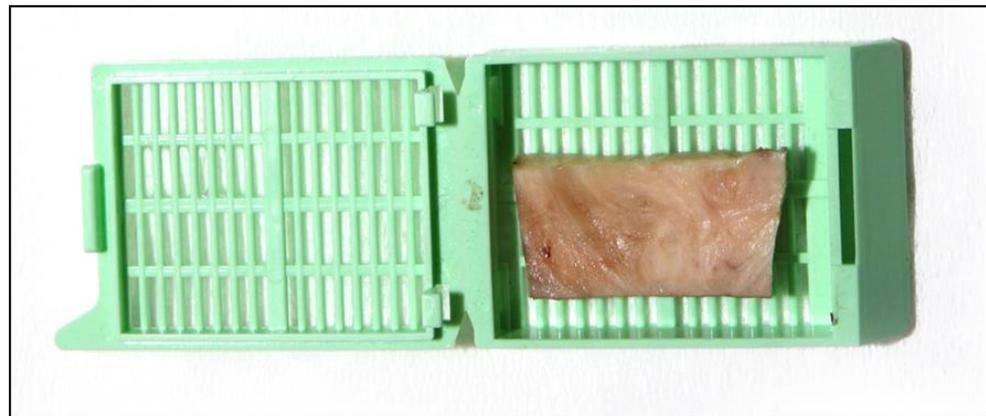
Melanom



Lebermetastasen



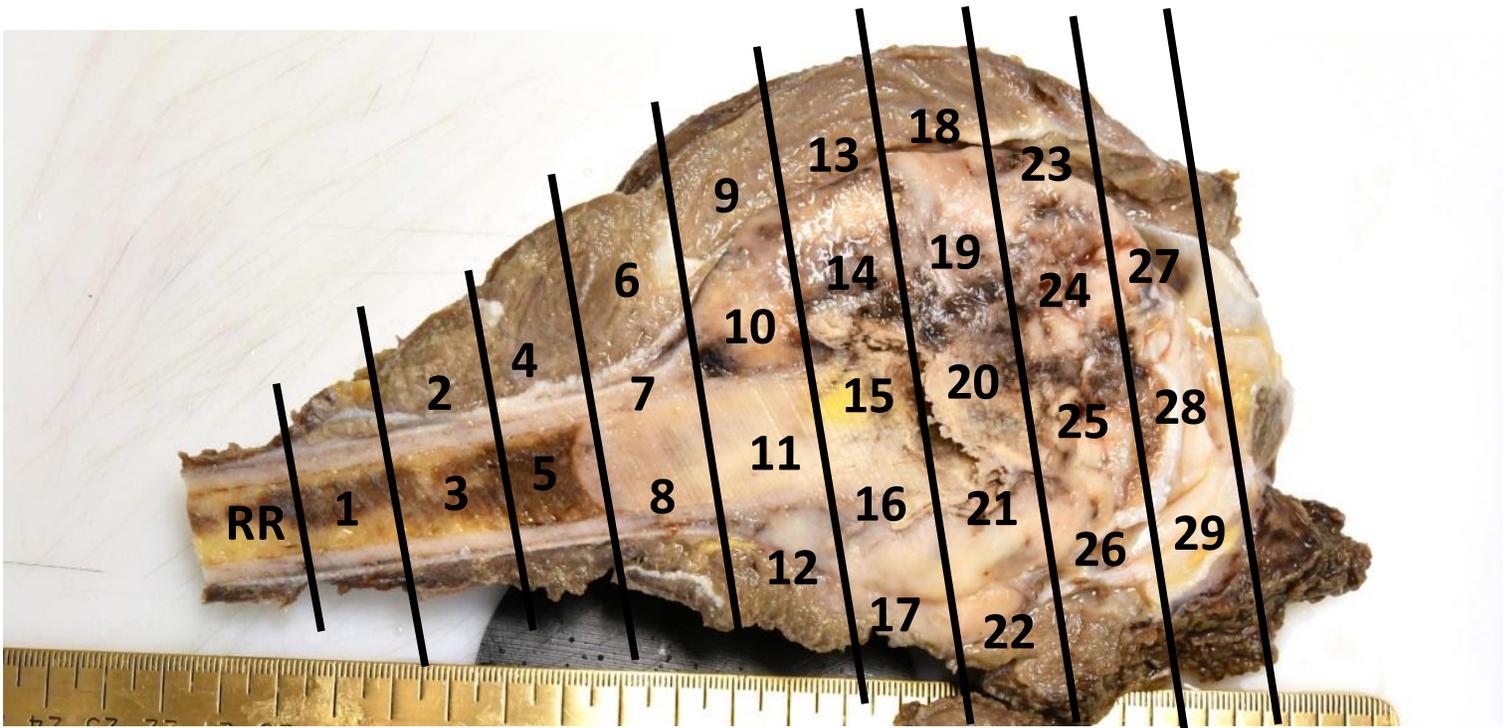
Makroskopische Aufarbeitung



Zuschnitt „Knochensäge“

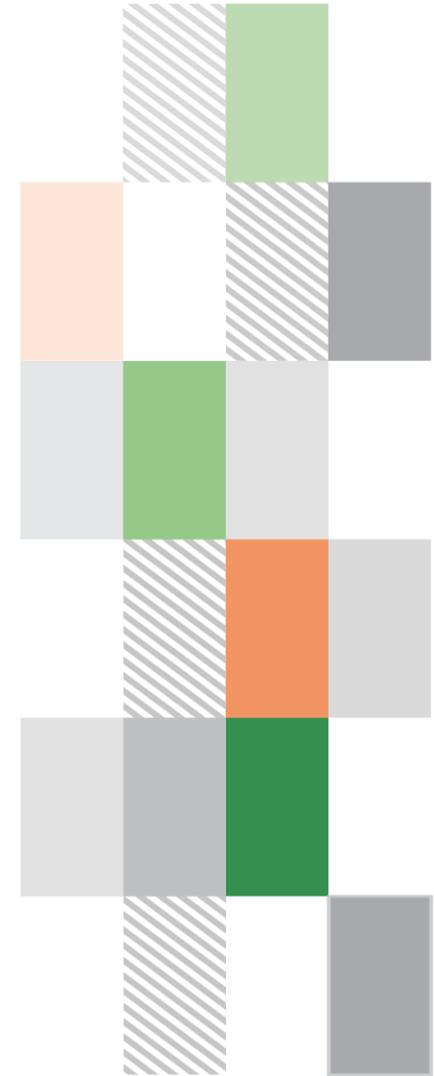


Tumor-Mapping

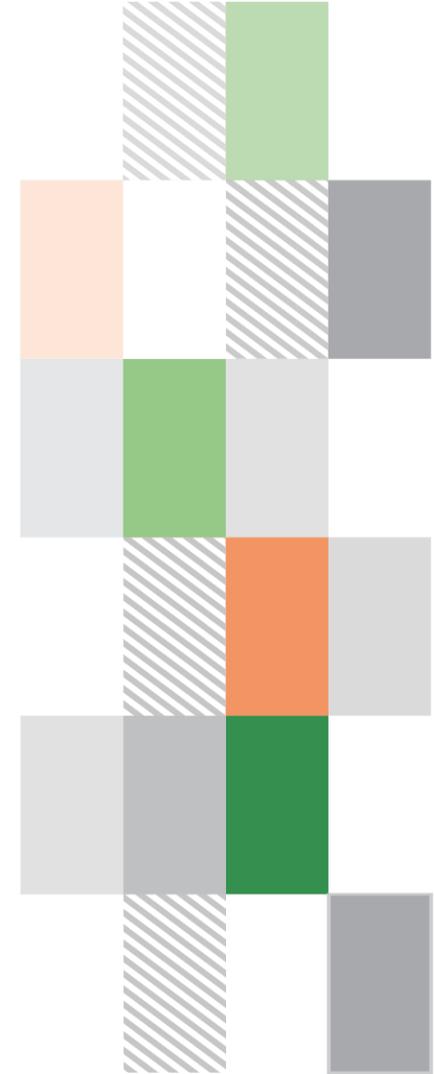


Optimale Probengröße

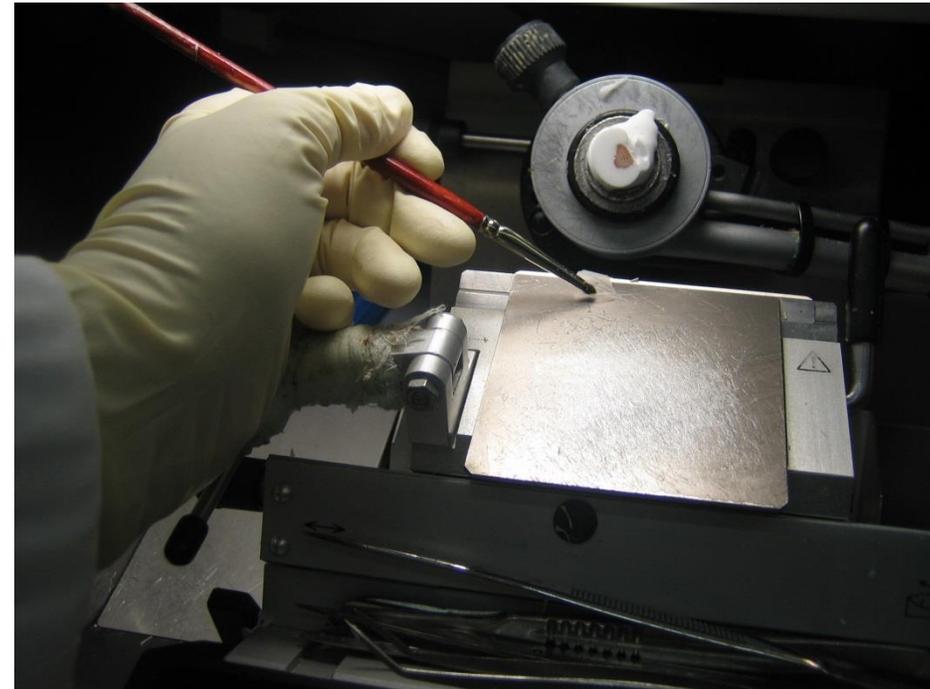
- ▶ Min. 2-3mm Abstand zum Kassettenrand
- ▶ Dicke 3-4mm

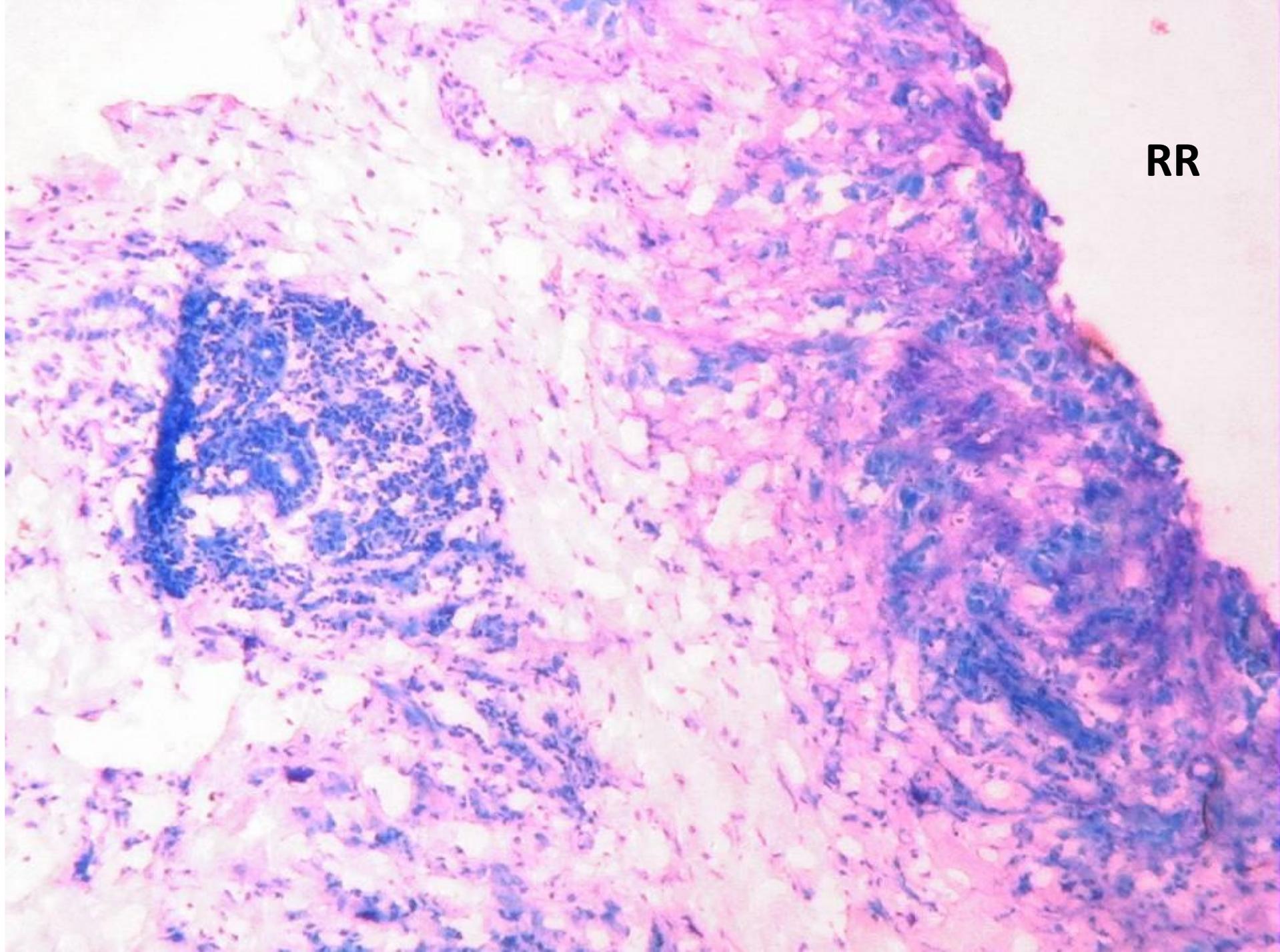


Intraoperative Schnellschnitt- untersuchung



Intraoperative Schnellschnittuntersuchung



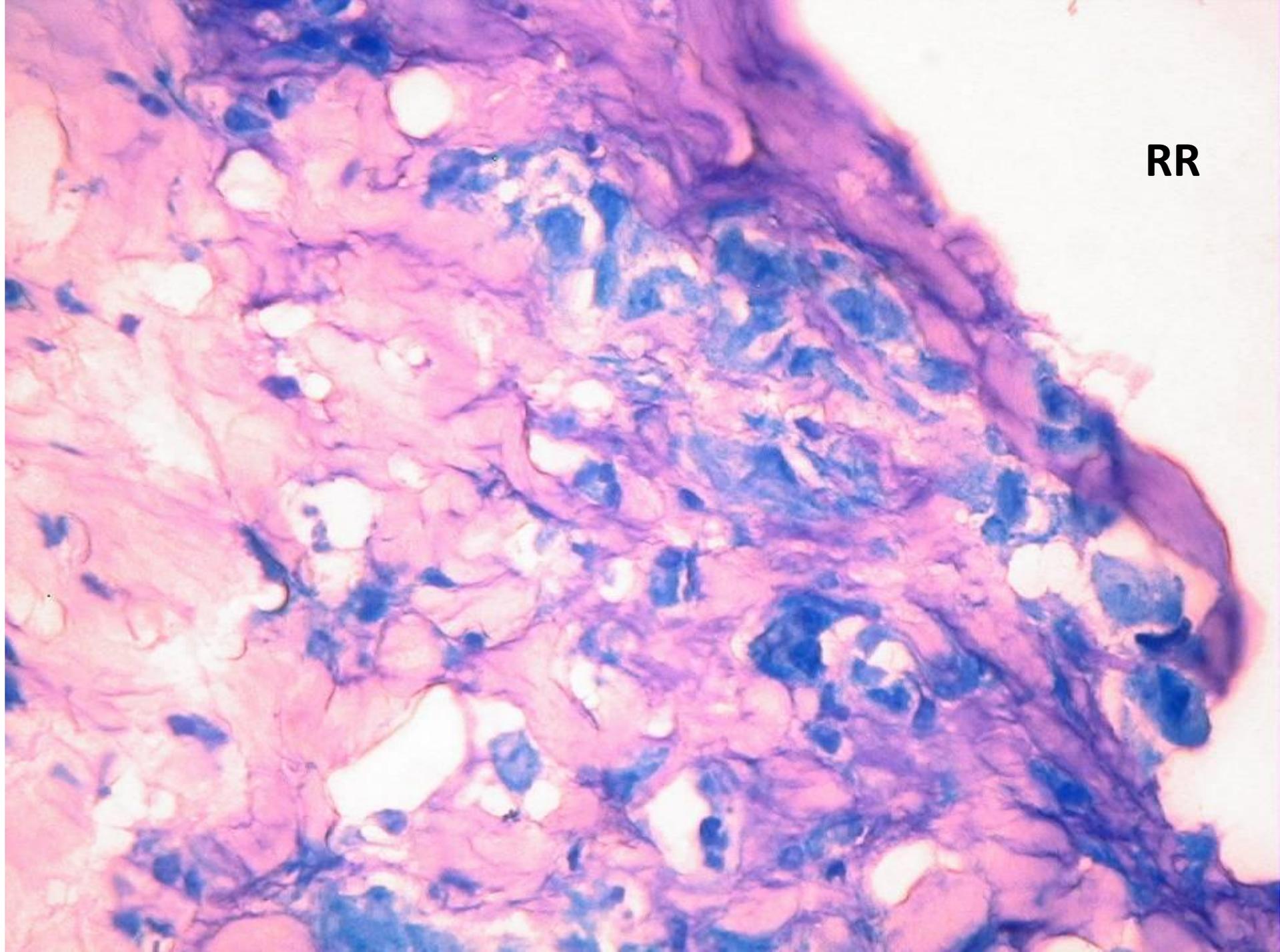


RR



Medical
University of Graz





RR



Medical University of Graz

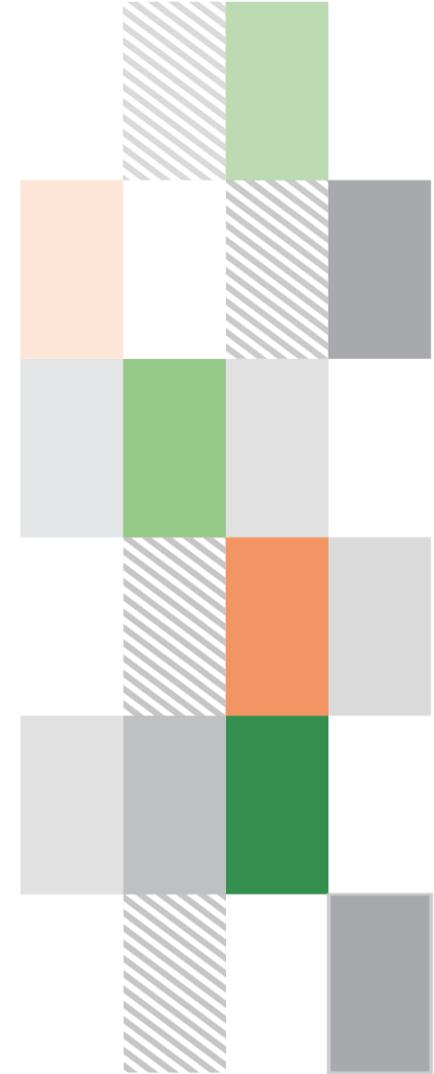


Wie kommen die Präparate auf die Pathologie?

4% Formalin



Unfixiert aus dem OP



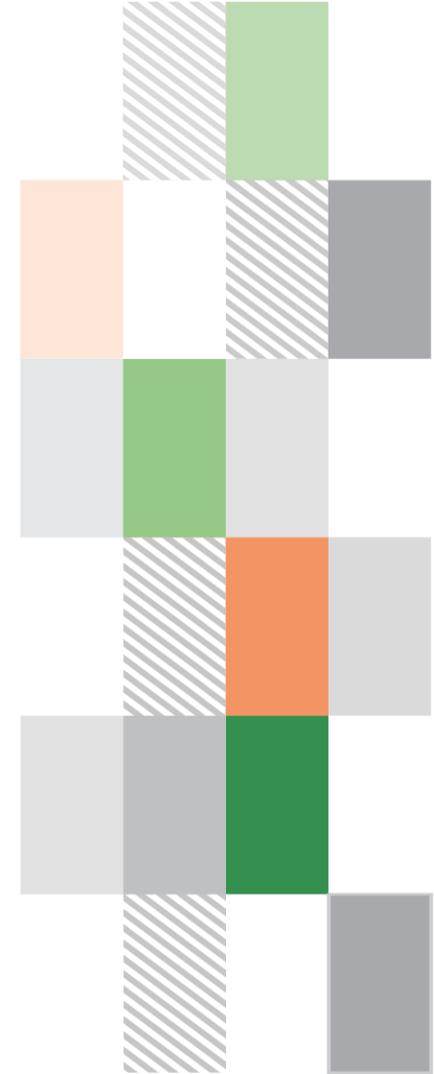
Asservierung von Gewebe und Zellen I

► Fixierung

- 4%iges Formalin (gesättigte Lsg. von Formaldehyd in H₂O ca. 40%ig), pH 7.5, Phosphatpuffer, Eindringtiefe 1mm/h

geeignet für:

- Konventionelle gefärbte Schnitte
 - Immunhistochemie, ISH
 - Gewinnung niedrigmolekularer DNA, RNA
- ## ► Alkohol
- Zytologische Präparate, ISH
 - Gewinnung niedrigmolekularer DNA, RNA
- ## ► 2%iges Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
- Elektronenmikroskopie



Asservierung von Gewebe und Zellen II

▶ Keine Fixierung - Einfrieren

▶ Eis:

- ▶ Enzymnachweis

▶ -20°C:

- ▶ Intraoperative Gefrierschnitte, Enzymnachweis

▶ -70°C:

- ▶ Forschung, Biobanking, hochmolekulare DNA, RNA

▶ Flüssigstickstoff-gekühltes Isopropanol („snap freezing“)

- ▶ Cryoasservierung (Lagerung bei -196°C)

- ▶ Forschung, Biobanking, Histo/Immunhistochemie, hochmolekulare DNA, RNA

▶ Speziallösungen Bsp.:

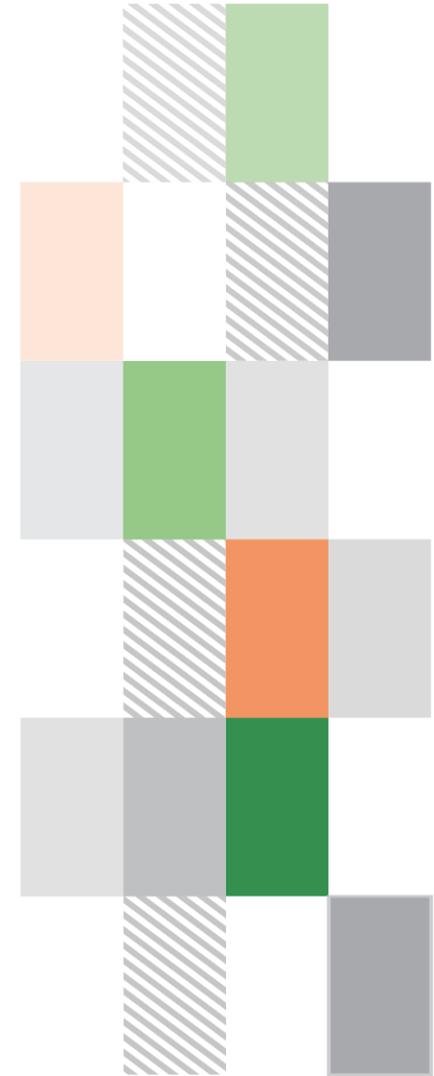
- ▶ RNAlater

- ▶ PAXgene Tissue

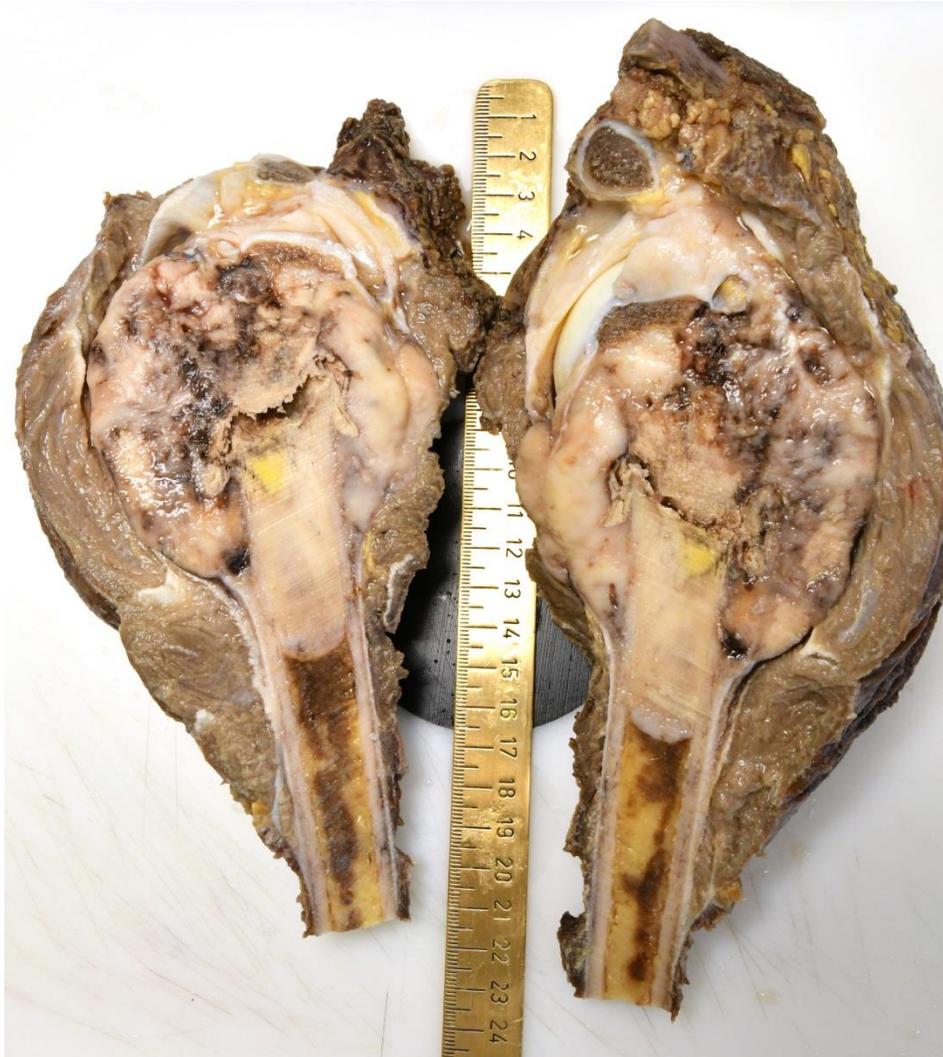


Fixierung

- ▶ Autolyse / Haltbarkeit
- ▶ Makroskopische Aufarbeitung
 - ▶ Konsistenz / Schneidbarkeit, RR Analyse
- ▶ Morphologie
 - ▶ Mikroskopische Aufarbeitung, Schneidbarkeit
- ▶ Immunhistochemie
- ▶ Molekulare Analysen
- ▶ **Befundqualität**



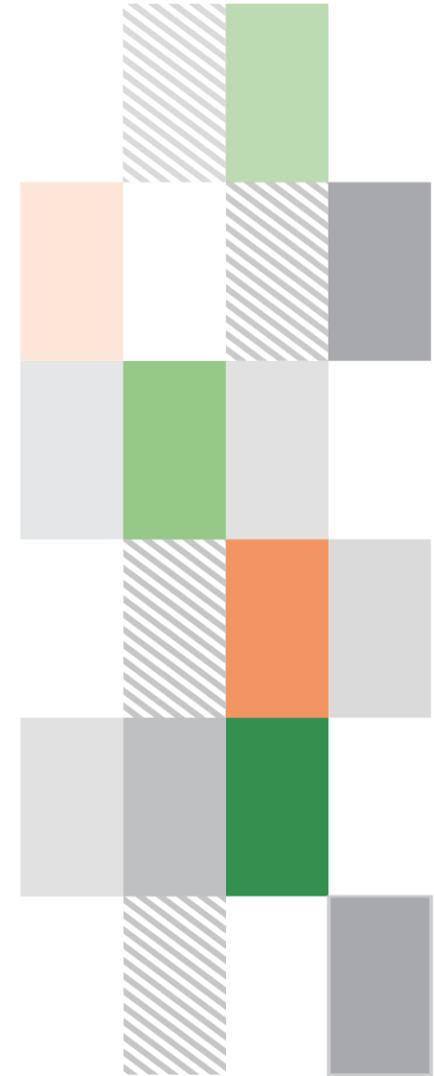
Fixierdauer



1mm/h



Zwischenlagerung

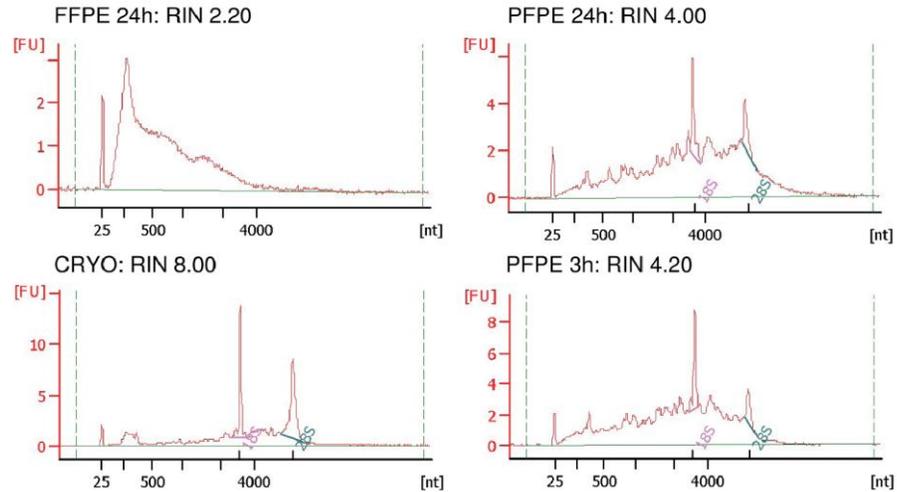


Cryoasservierung



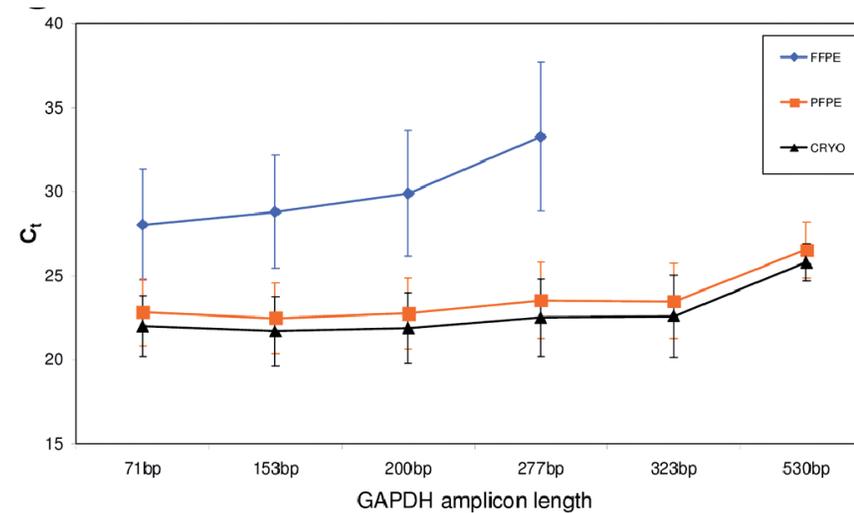
RNA Qualität

RNA quality control



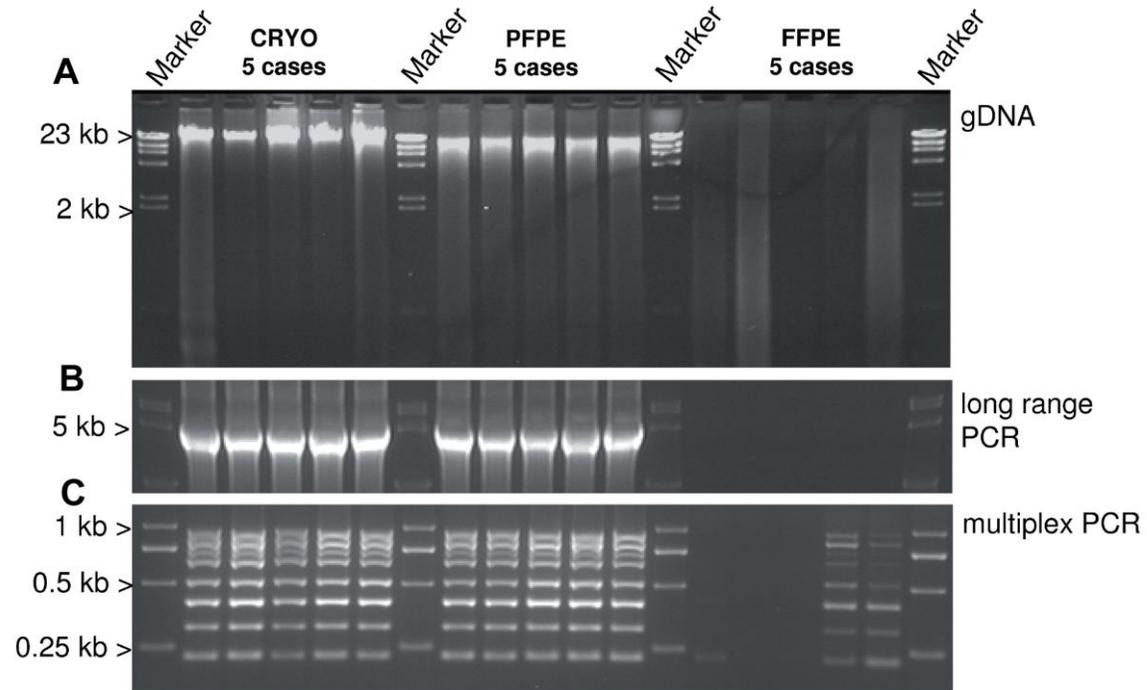
Representative results for **RNA integrity on Agilent Bioanalyzer.**

RT-qPCR assay

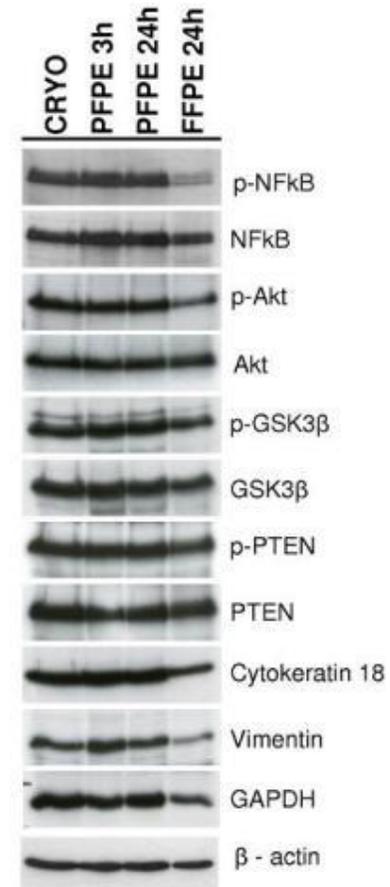


Summary of **~800 RT-qPCR reactions, 45 (non-)malignant tissue samples from different organs** fixed for 3-120h with PAXgene or formaldehyde, analyzed in comparison to corresponding cryopreserved reference.

DNA und Proteine



- (A) Genomic DNA** extracted from corresponding FFPE, PFPE, and snap-frozen (CRYO) samples of 5 human colorectal cancer cases was separated on 1% agarose gels and visualized with ethidium bromide.
- (B) Long-range PCR** was performed using the QIAGEN LongRange PCR Kit. Primers 33093F and 38185R were used for amplification of a 5093 base pair (bp) fragment of human tuberous sclerosis complex.
- (C) Multiplex PCR** of eight fragments of different human genes (222-955 bp).



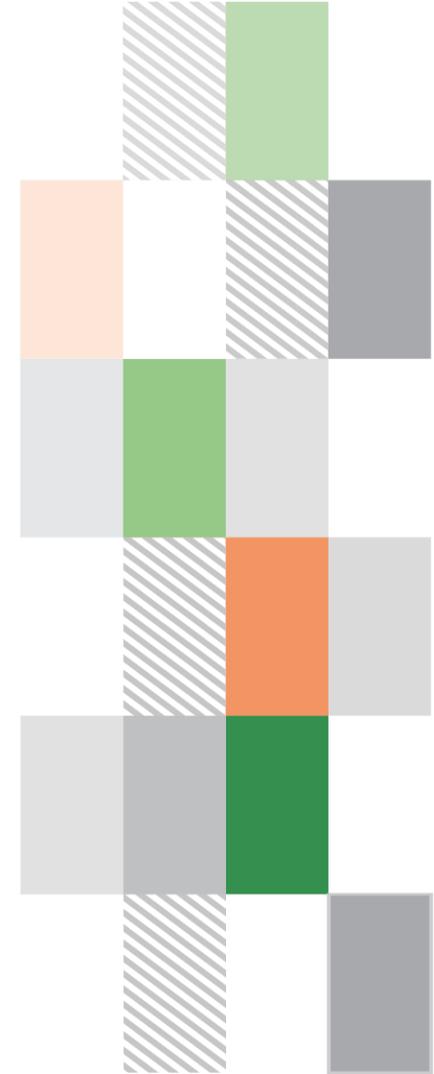
Western blot analysis of protein preservation.

Viertler et al, J Mol Diagn. 2012
Gündisch et al, Plos One 2013

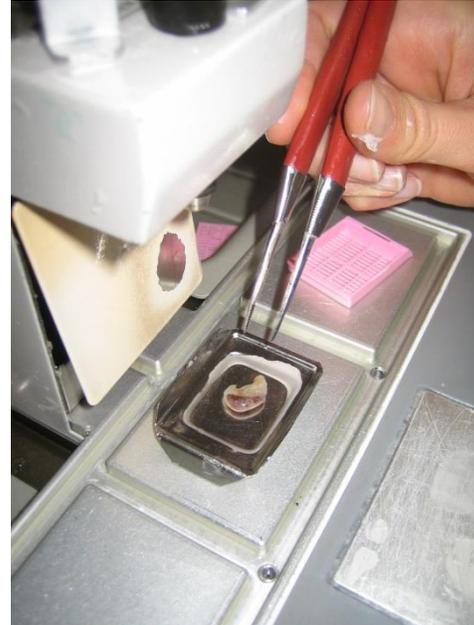


Einbettungs- und Schneideverfahren

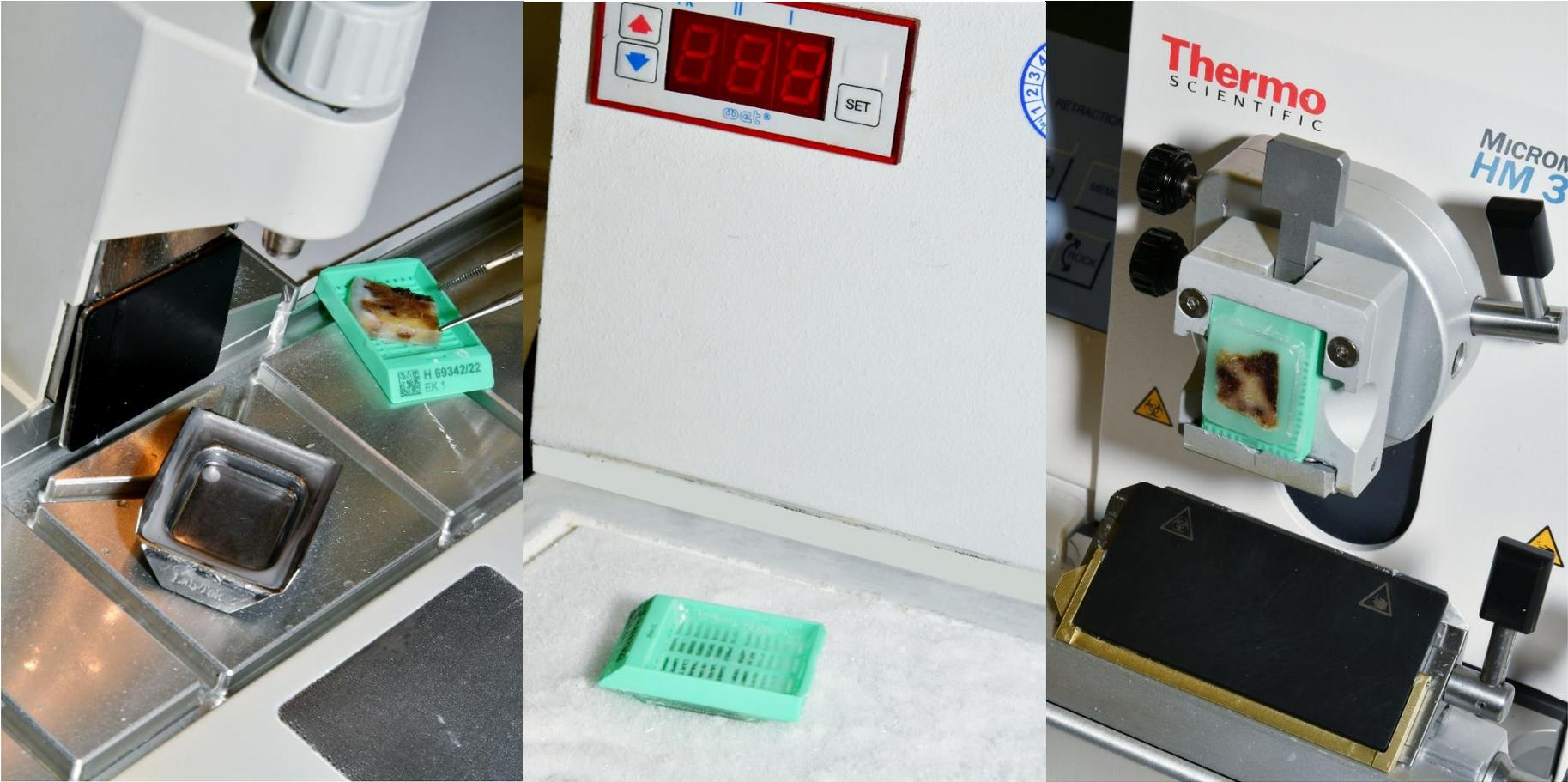
- ▶ Konventionell:
 - ▶ Wasserentzug durch „aufsteigende“ Alkoholreihe
 - ▶ Xylol/Toluol
 - ▶ Paraffinwachs
 - ▶ Mikrotomschnitte: 3-5µm
 - ▶ Warmes Wasserbad: „Strecken“
- ▶ Spezialverfahren:
 - ▶ Knochen Entkalkung: Säure, EDTA
 - ▶ ELMI: Polyacrylamid-Einbettung



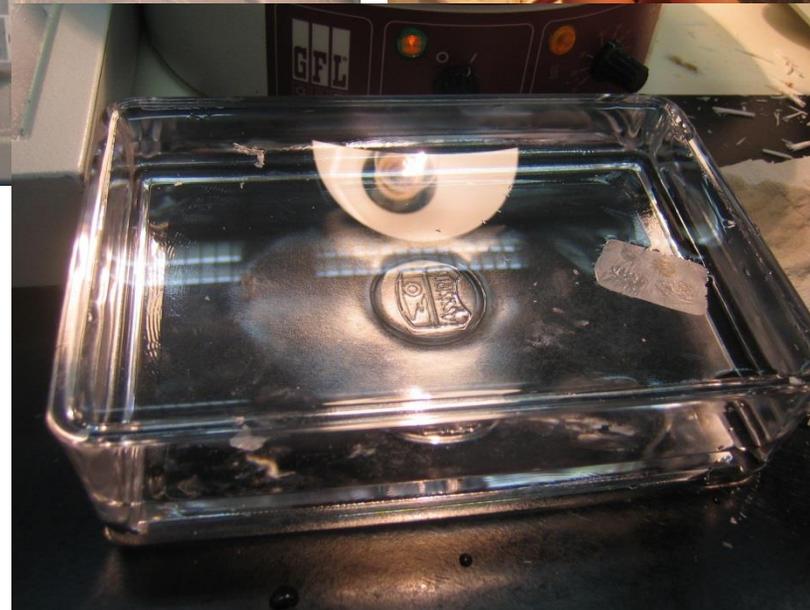
Einbettungs- und Schneideverfahren



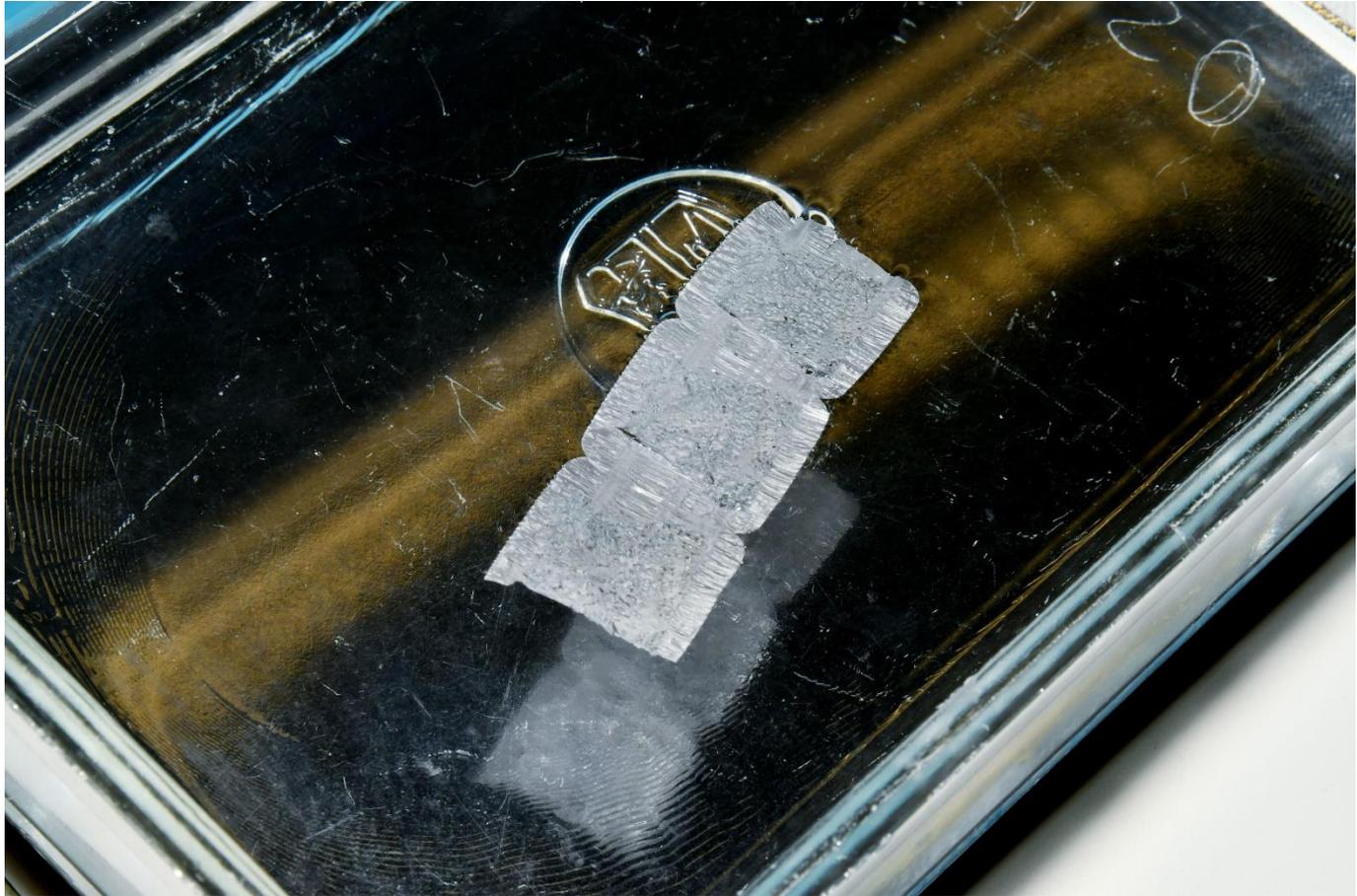
Ausgießen, Schneiden



Schneiden/Mikrotom



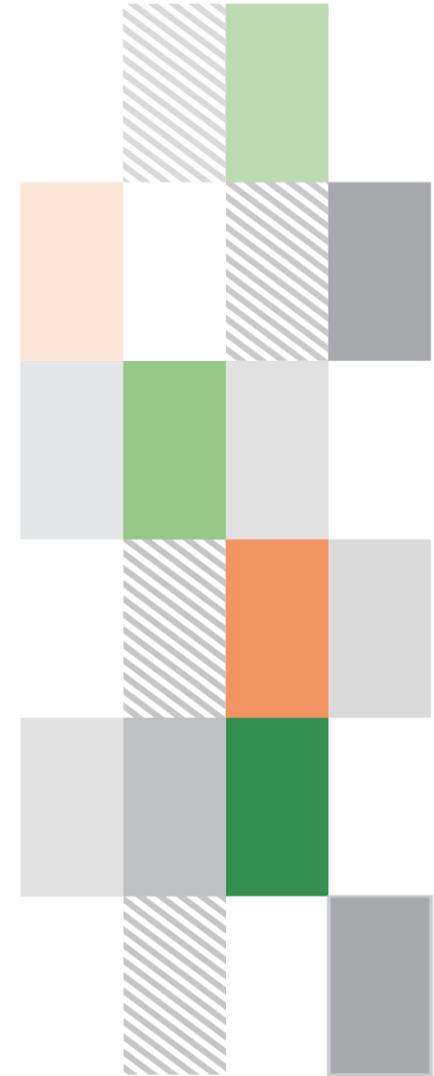
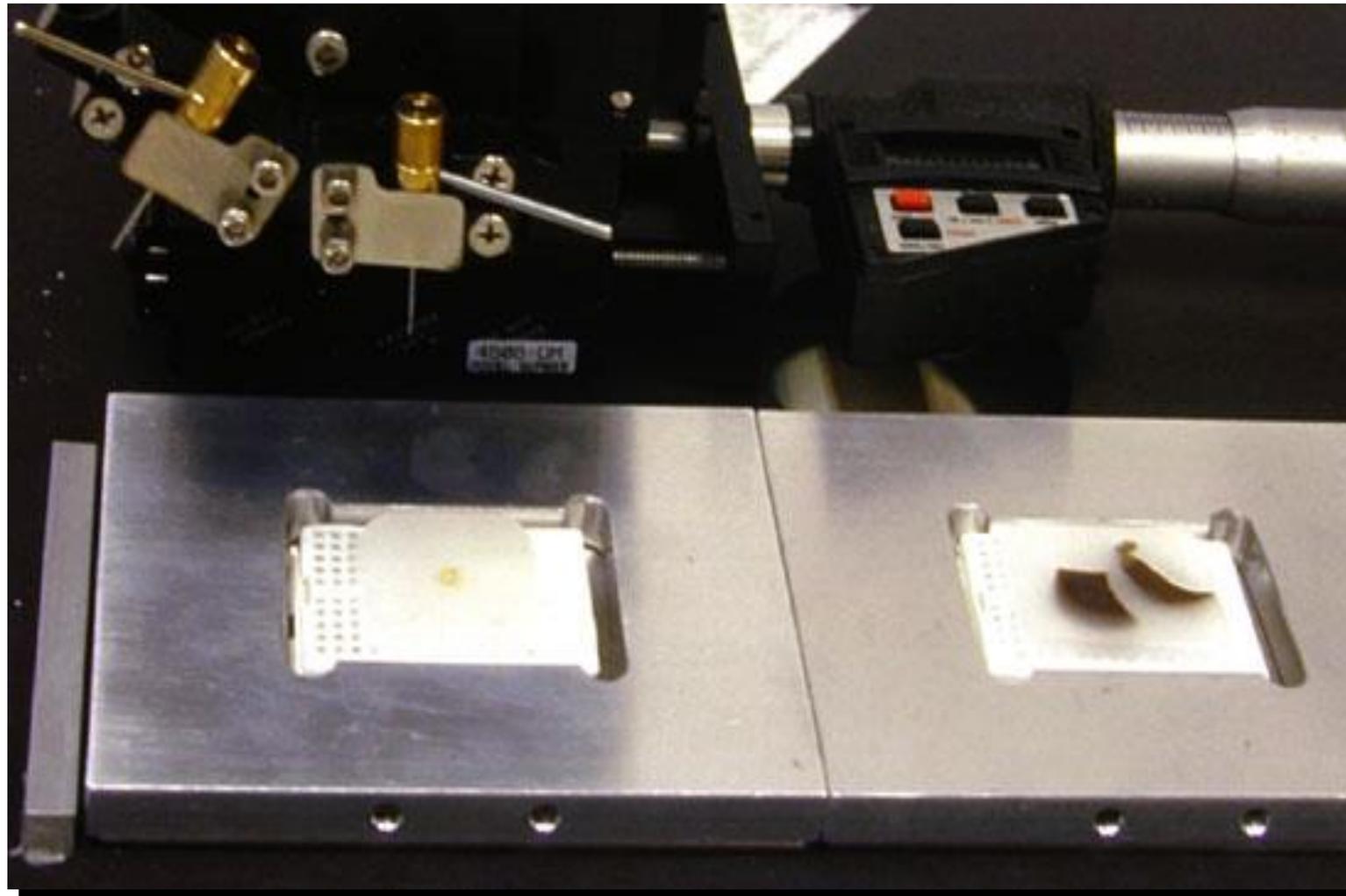
Streckbad



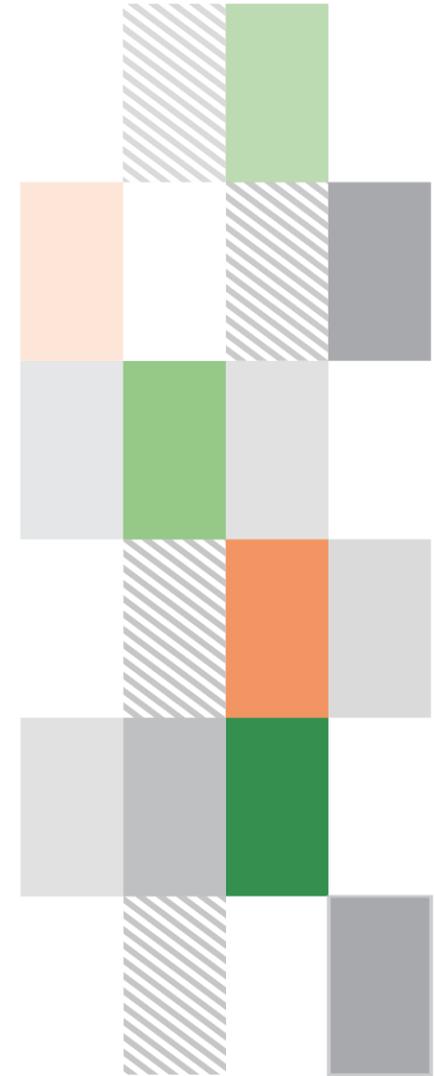
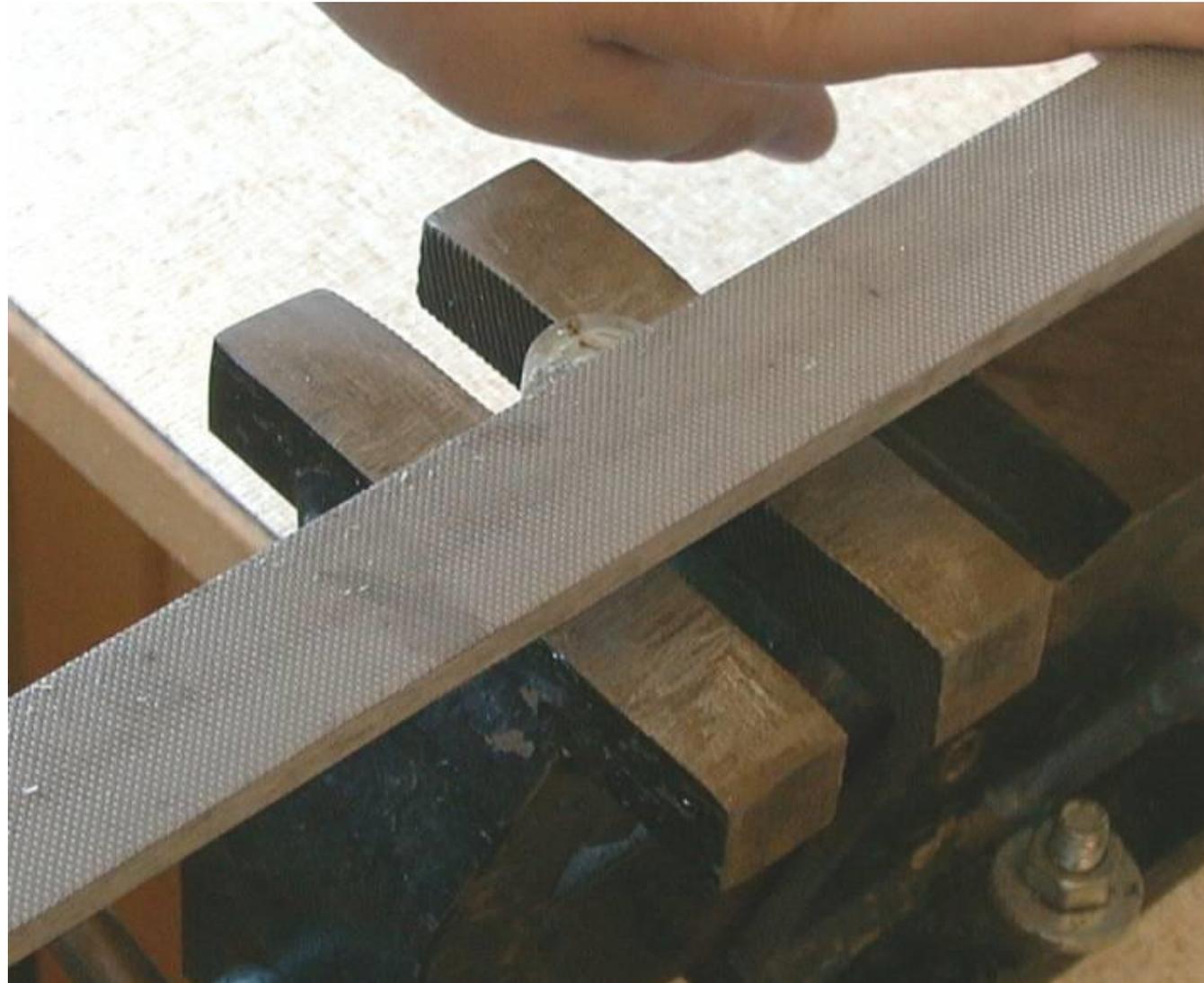
Streckbad



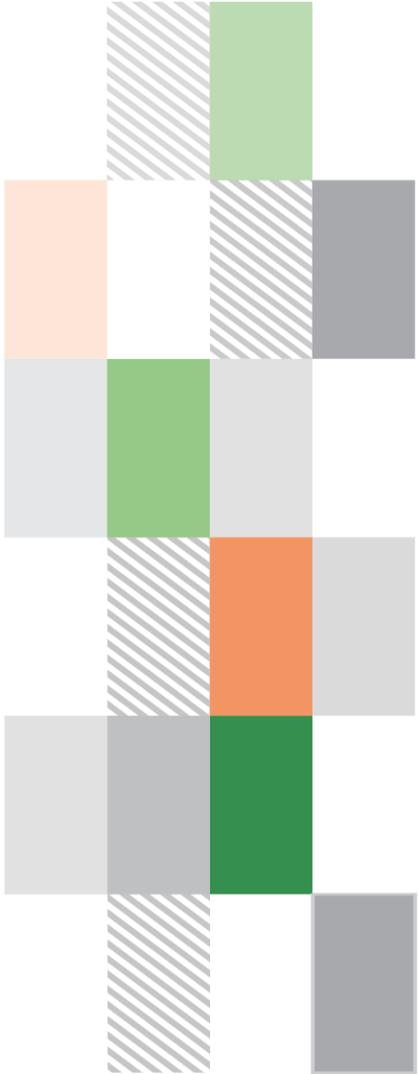
Gewebearray



Acrylatblock

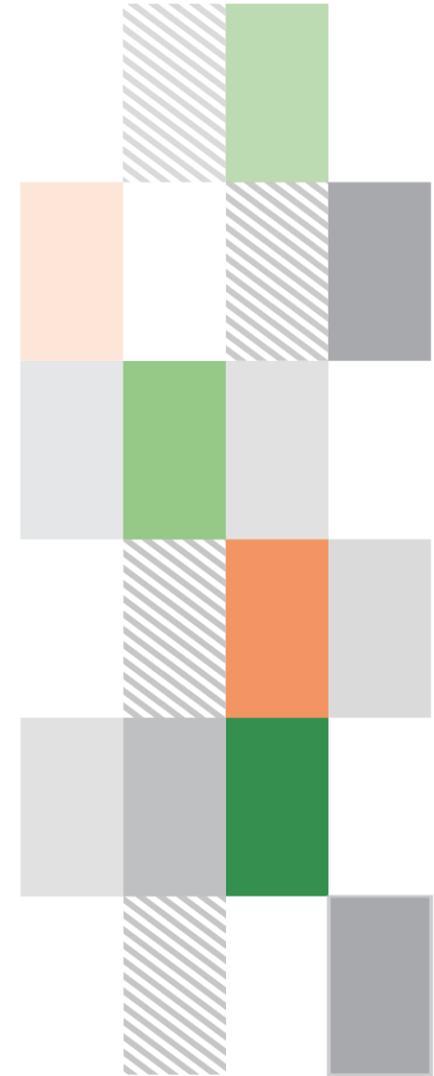


Mikroskopische Diagnostik



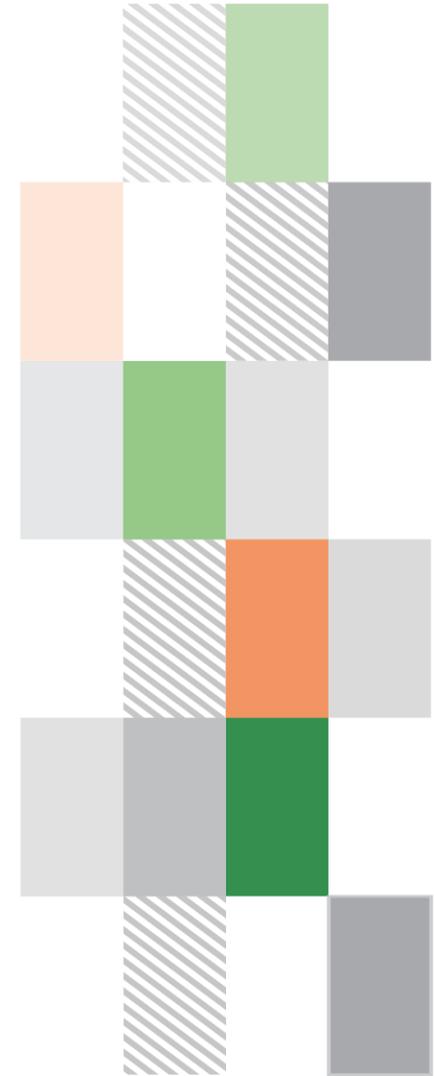
Mikroskopische Diagnostik

- ▶ *Untersuchung von gefärbten Gewebsschnitten oder Zellen im Durchlichtmikroskop*
- ▶ **Übersichts-/Standardfärbung (HE)**
 - ▶ Architektur
 - ▶ Ablagerungen
 - ▶ Nekrosen
 - ▶ Gewebsreaktionen
 - ▶ Fremdgewebe
- ▶ **Spezialfärbungen**
 - ▶ Bindegewebe, Schleim, Fett,
 - ▶ Eisen, Kupfer
 - ▶ Erreger
- ▶ **Zusatzuntersuchungen:**
 - ▶ Enzymhistochemie
 - ▶ Immunhistochemie (Antigen-Antikörper-Reaktion), ISH
 - ▶ Elektronenmikroskopie
 - ▶ Molekularpathologie

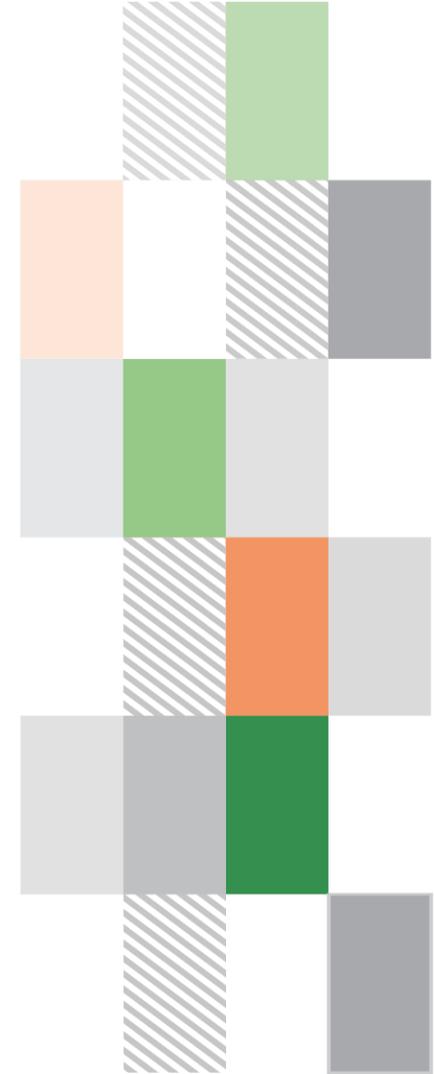
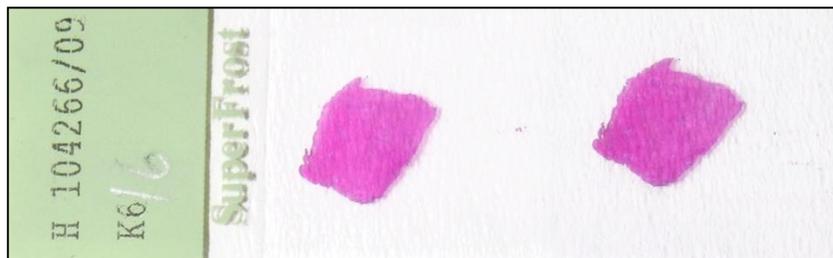


Färbemethoden

- ▶ Entparaffinierung: Xylol
- ▶ Rehydrierung: „absteigende Alkoholreihe“
- ▶ Färbung
 - ▶ HE (Hämatoxylin-Eosin)
 - ▶ Blau: Zellkerne, Bakterien, Kalk, Zytoplasma, Knorpelgrundsubstanz
 - ▶ Rot: Zytoplasma, Kollagen, Erythrozyten
- ▶ Entwässerung
- ▶ Einbettung, Eindeckung

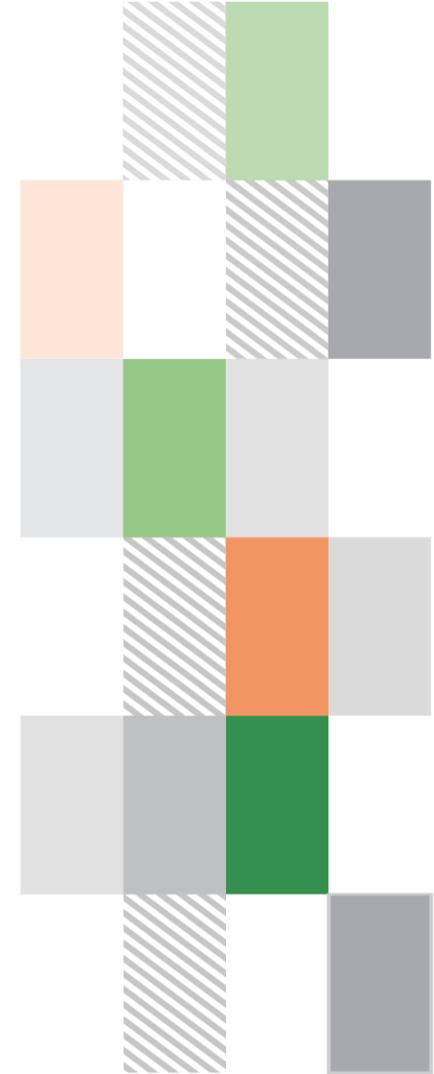
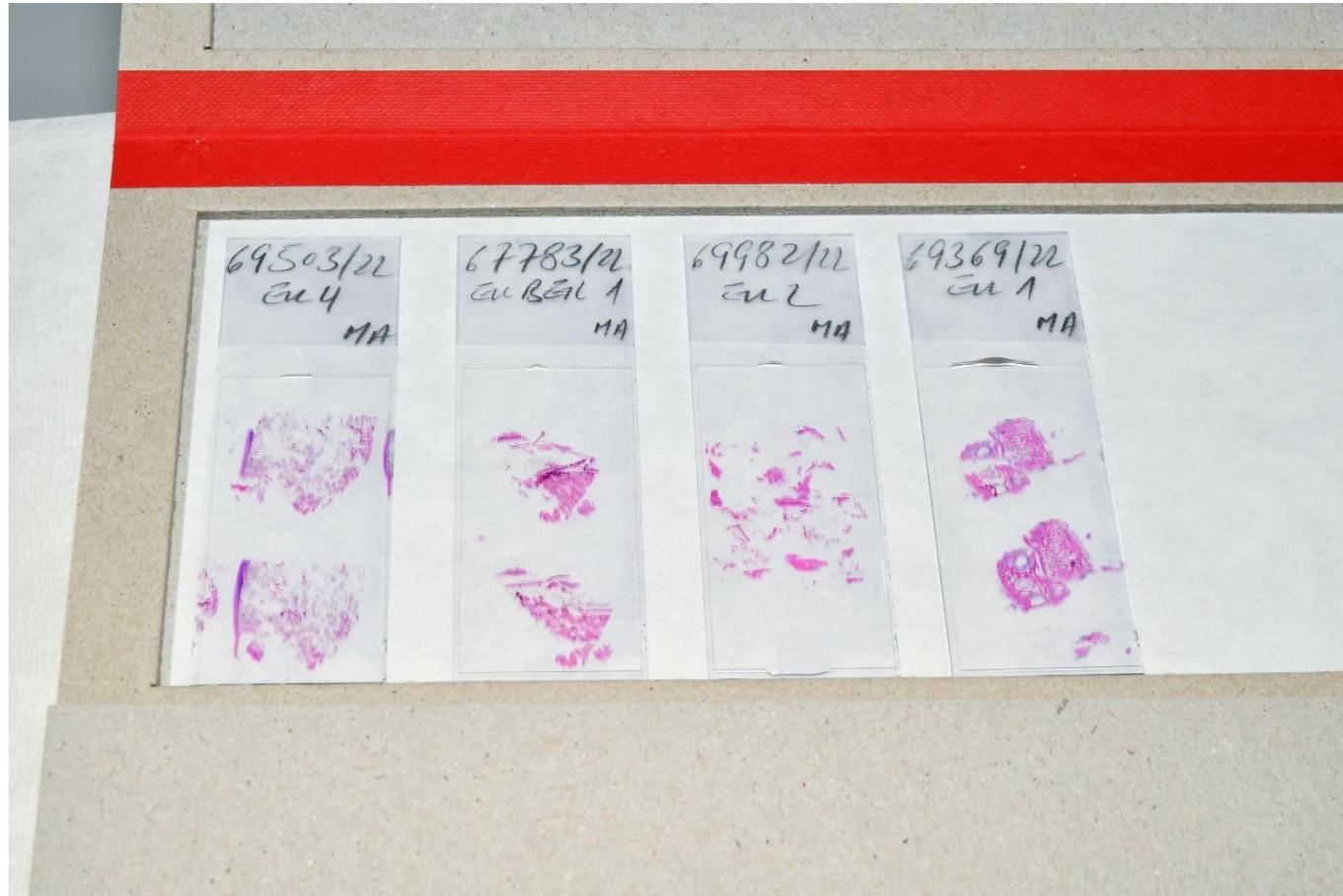


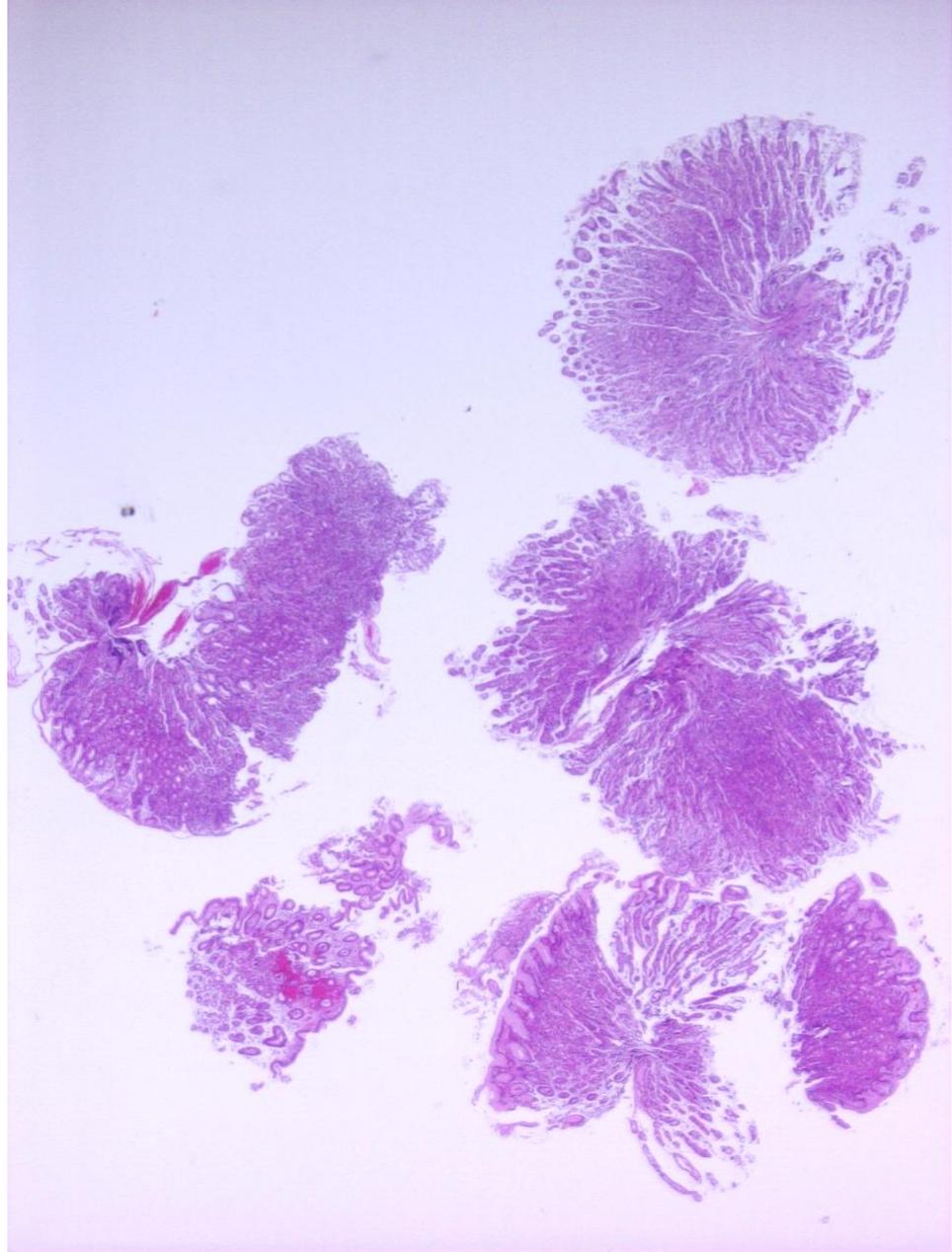
HE Färbung (Hematoxilin und Eosin)



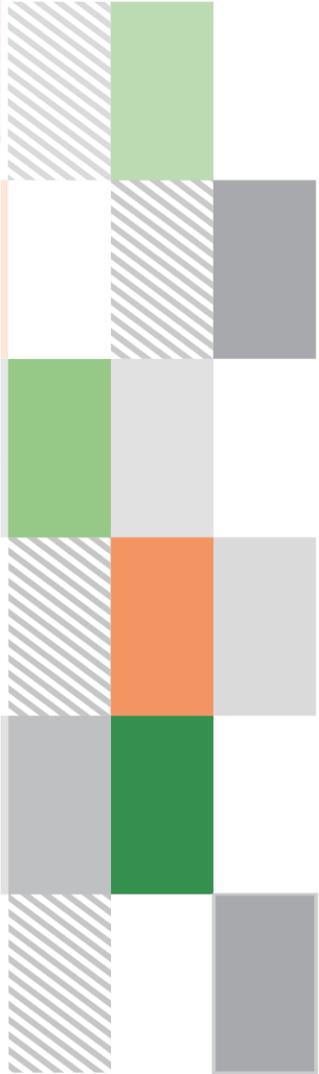


Bereit zur Befundung





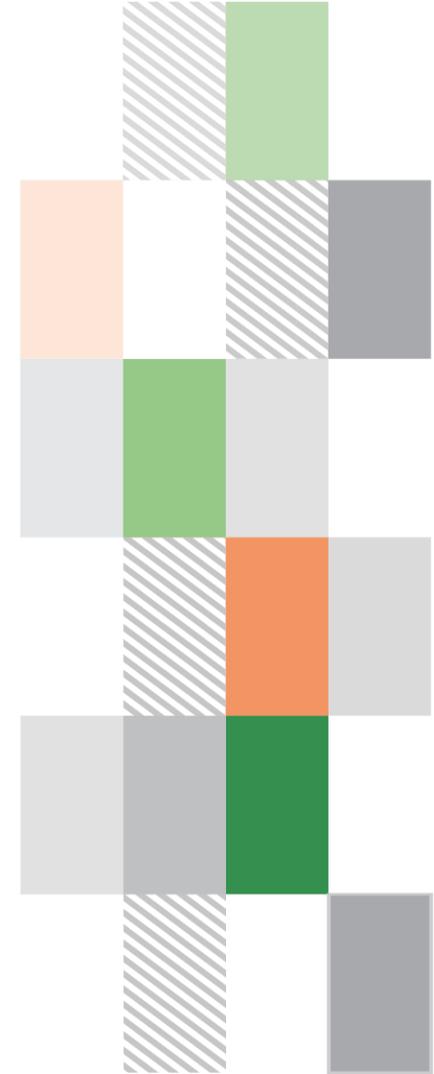
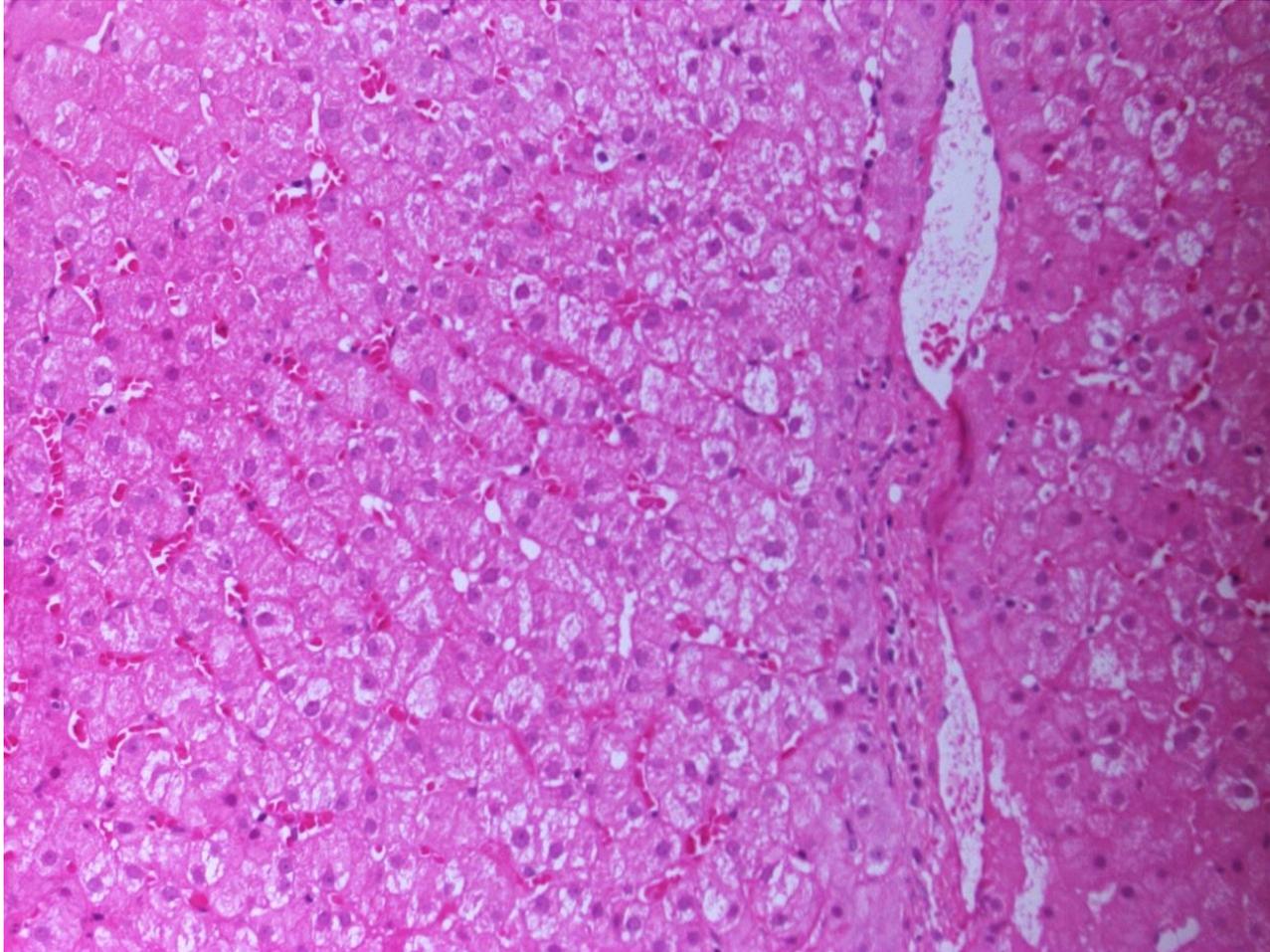
Medical
University of Graz



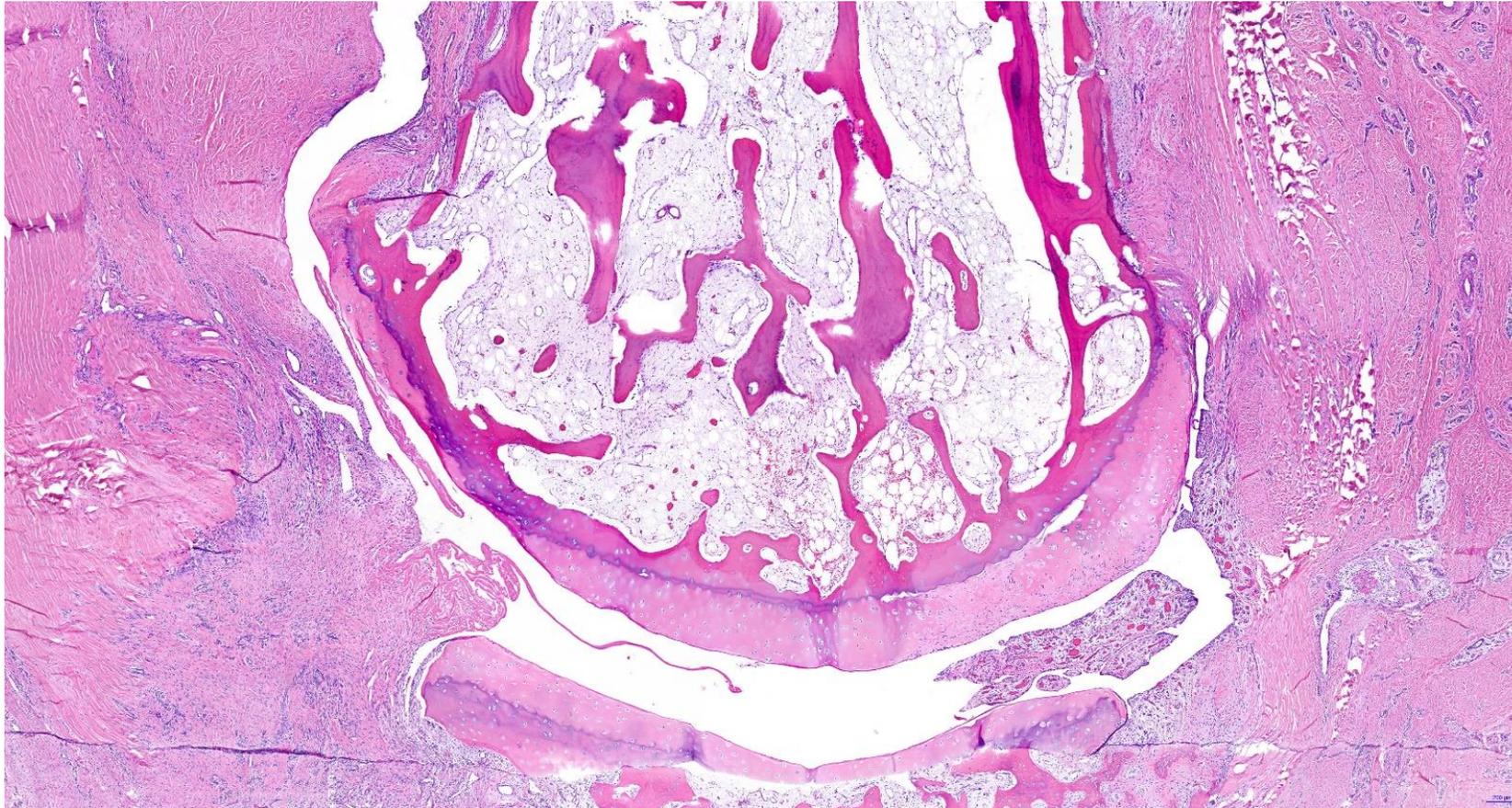
Hematoxilin&Eosin Färbung



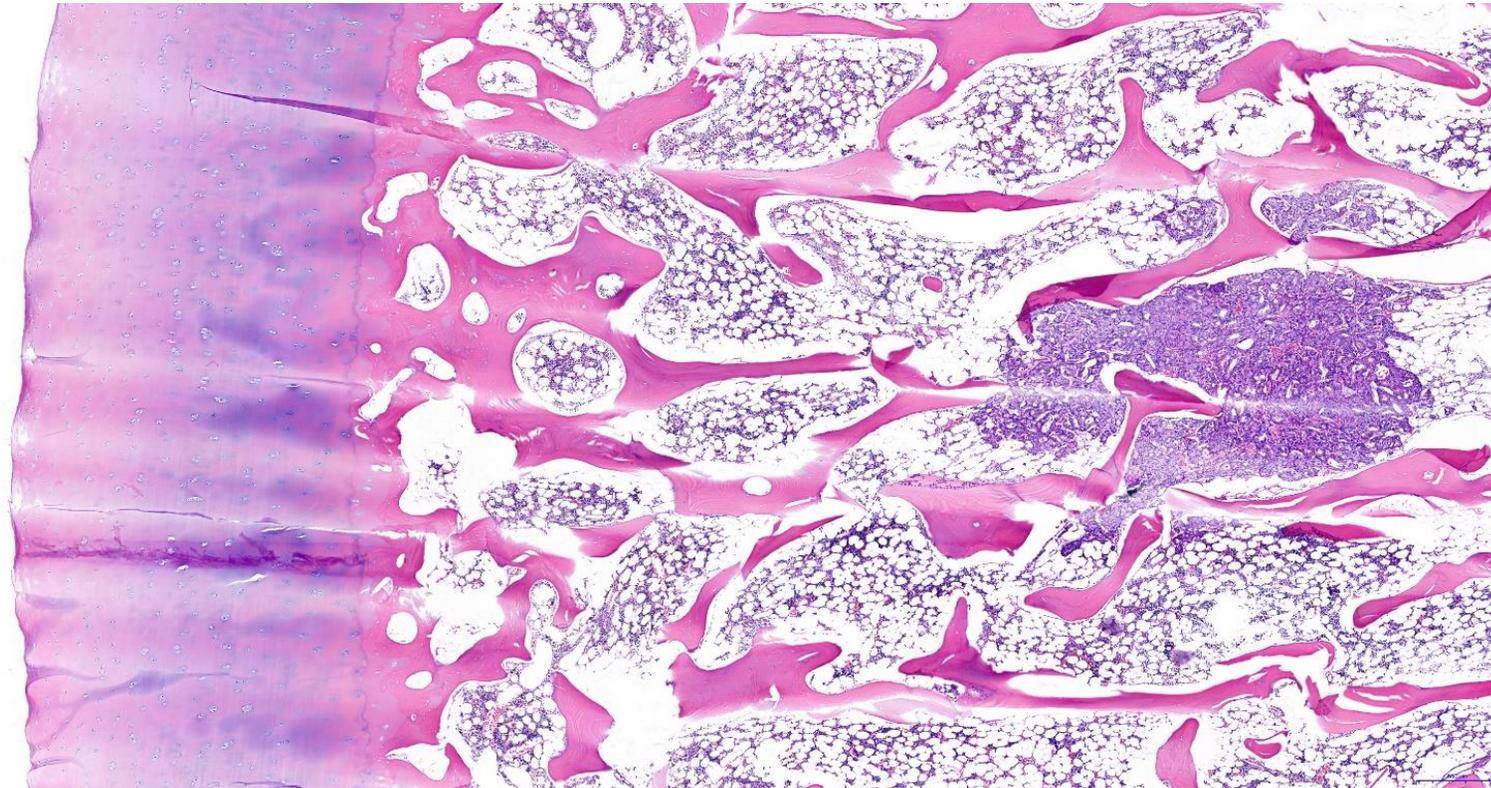
Hematoxilin&Eosin Färbung

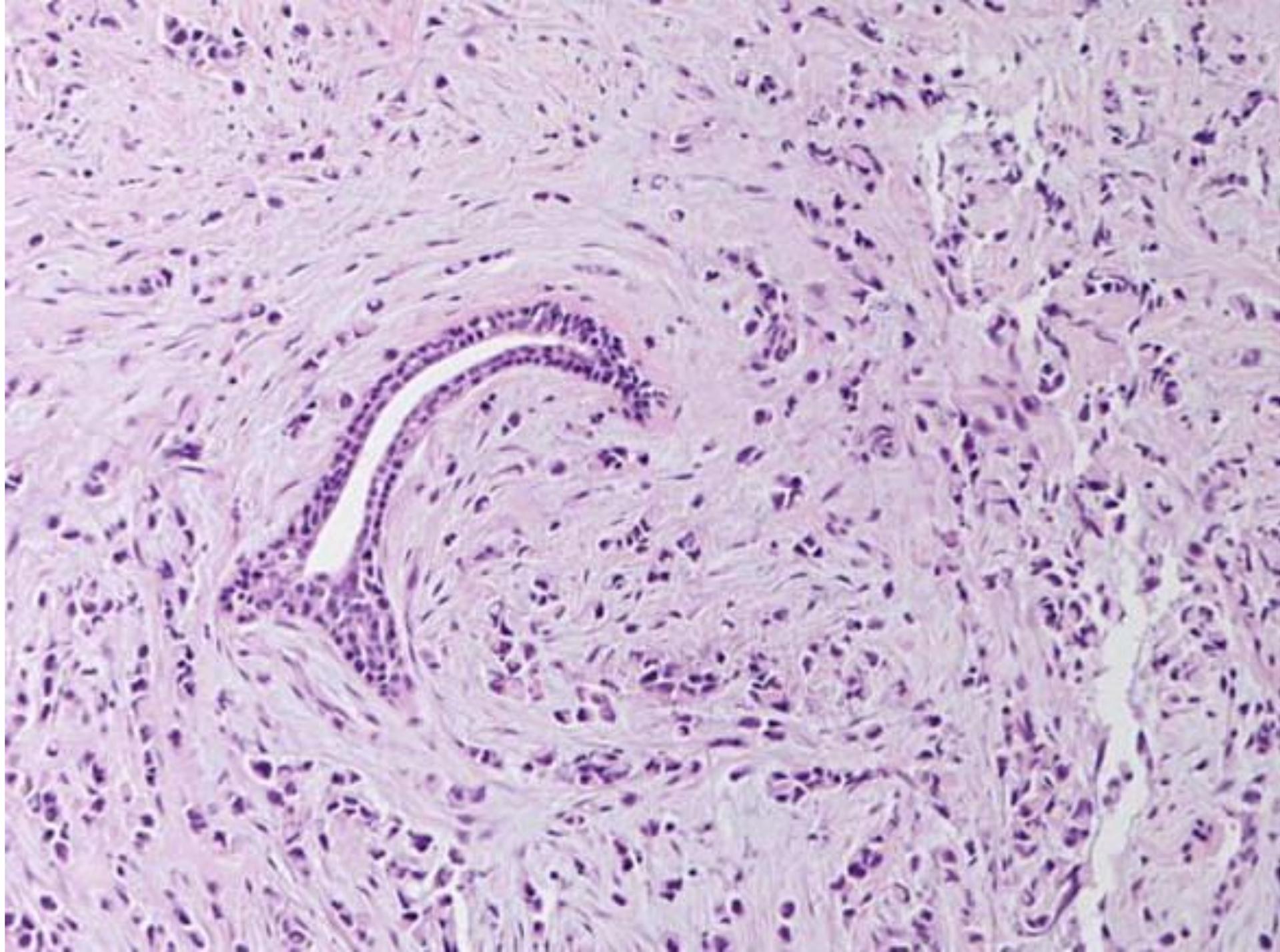


Hematoxilin&Eosin Färbung



Hematoxilin&Eosin Färbung





Medical
University of Graz



Spezialfärbungen I

▶ Giemsa

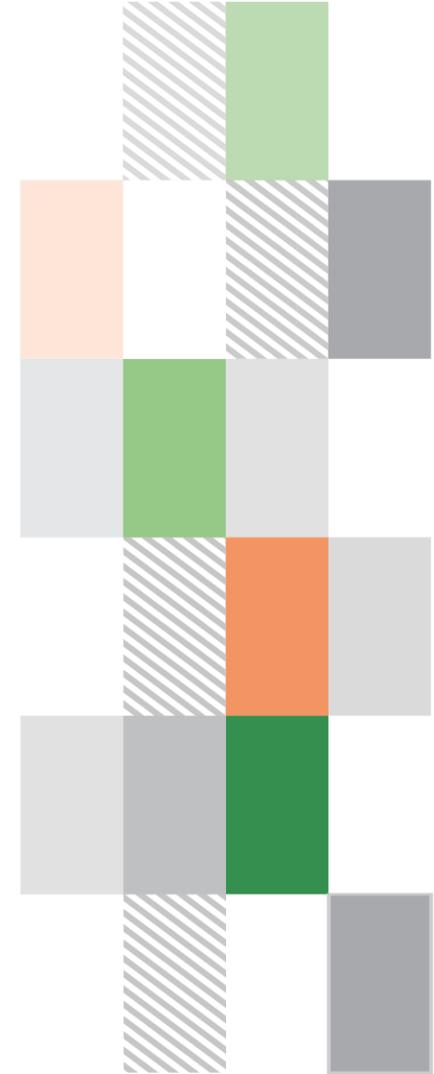
- ▶ Blau: feine Chromatinstrukturen, Bakterien
- ▶ Rot: Zytoplasma, kollagene Fasern
- ▶ Violett: Mastzellen

▶ van Gieson-Elastika

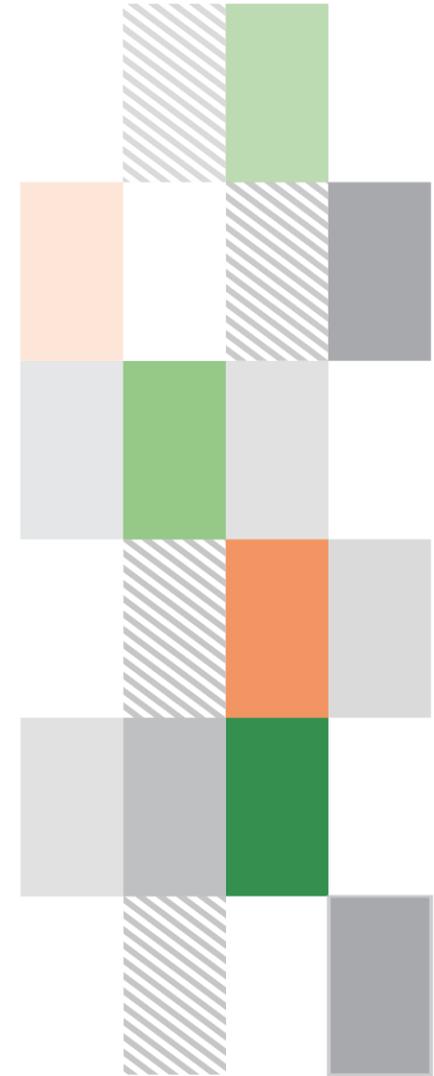
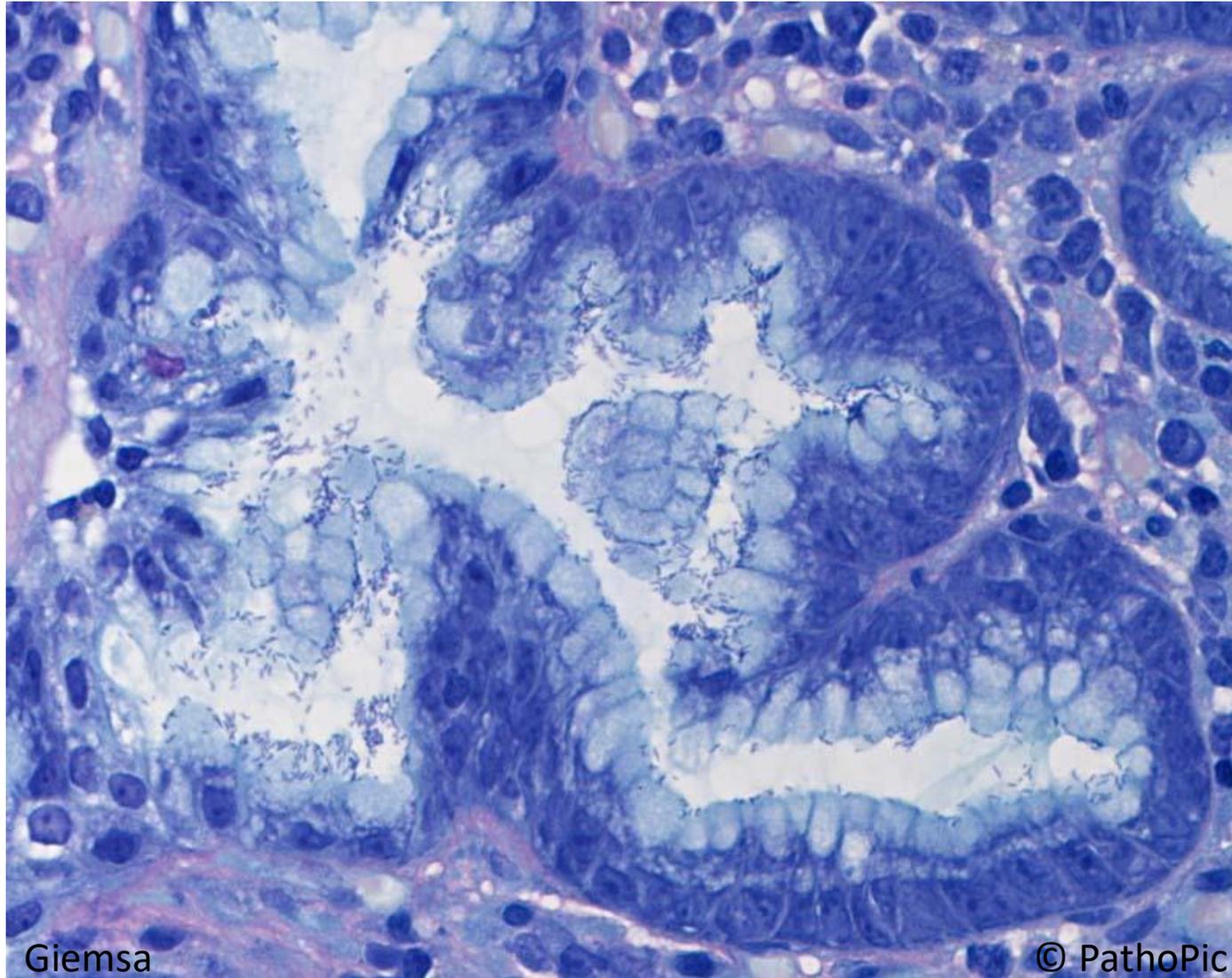
- ▶ Gelb: Muskulatur, Zytoplasma,
- ▶ Rot: Bindegewebe, Hyalin
- ▶ Schwarz: elastische Fasern, Zellkerne

▶ Gomöri

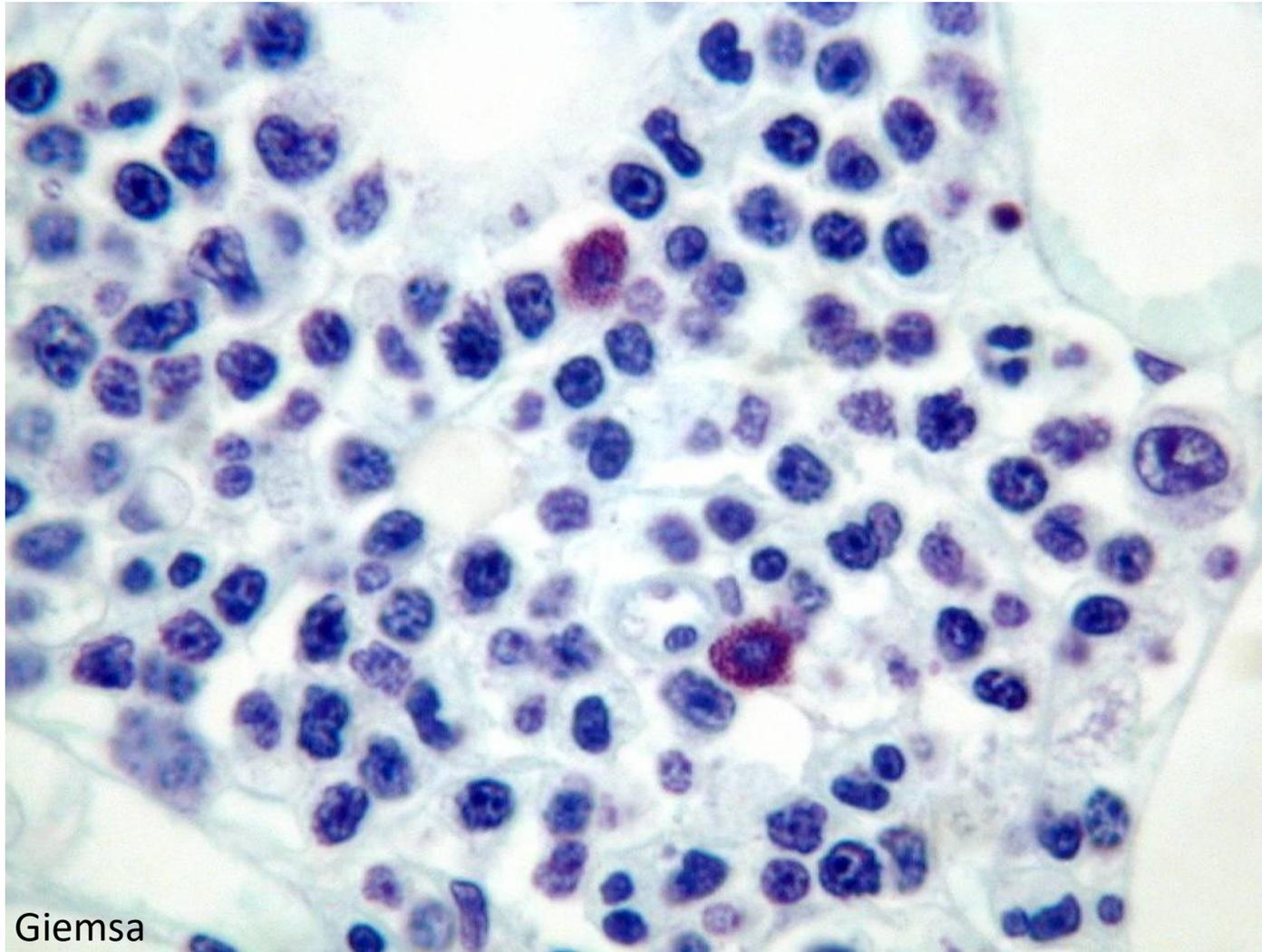
- ▶ Schwarz: Retikulinfasern



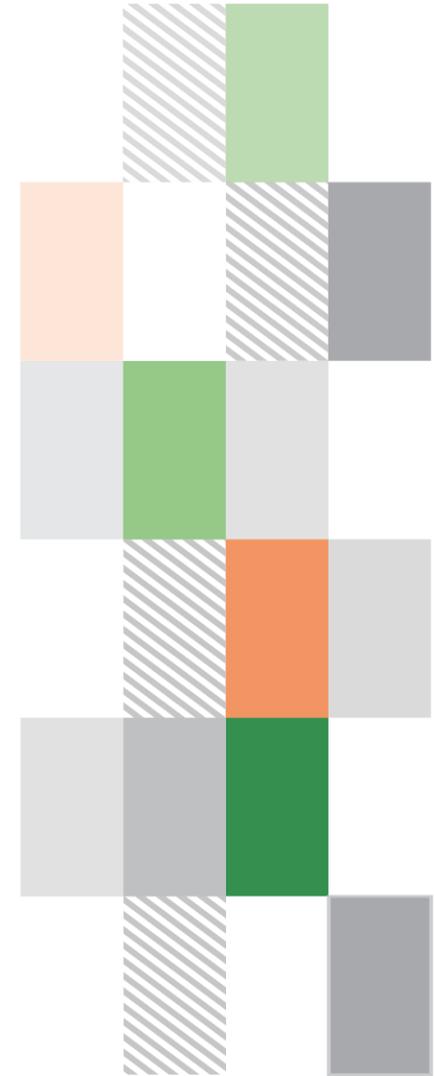
HP-Gastritis



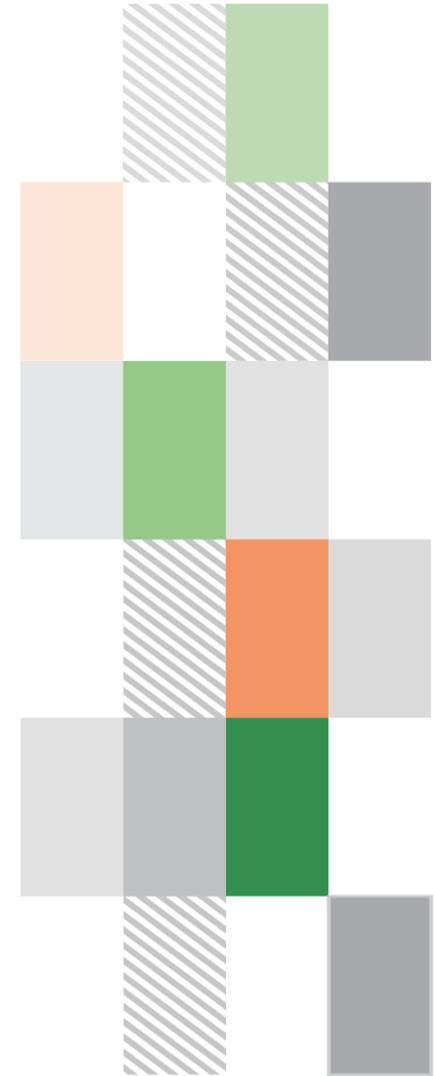
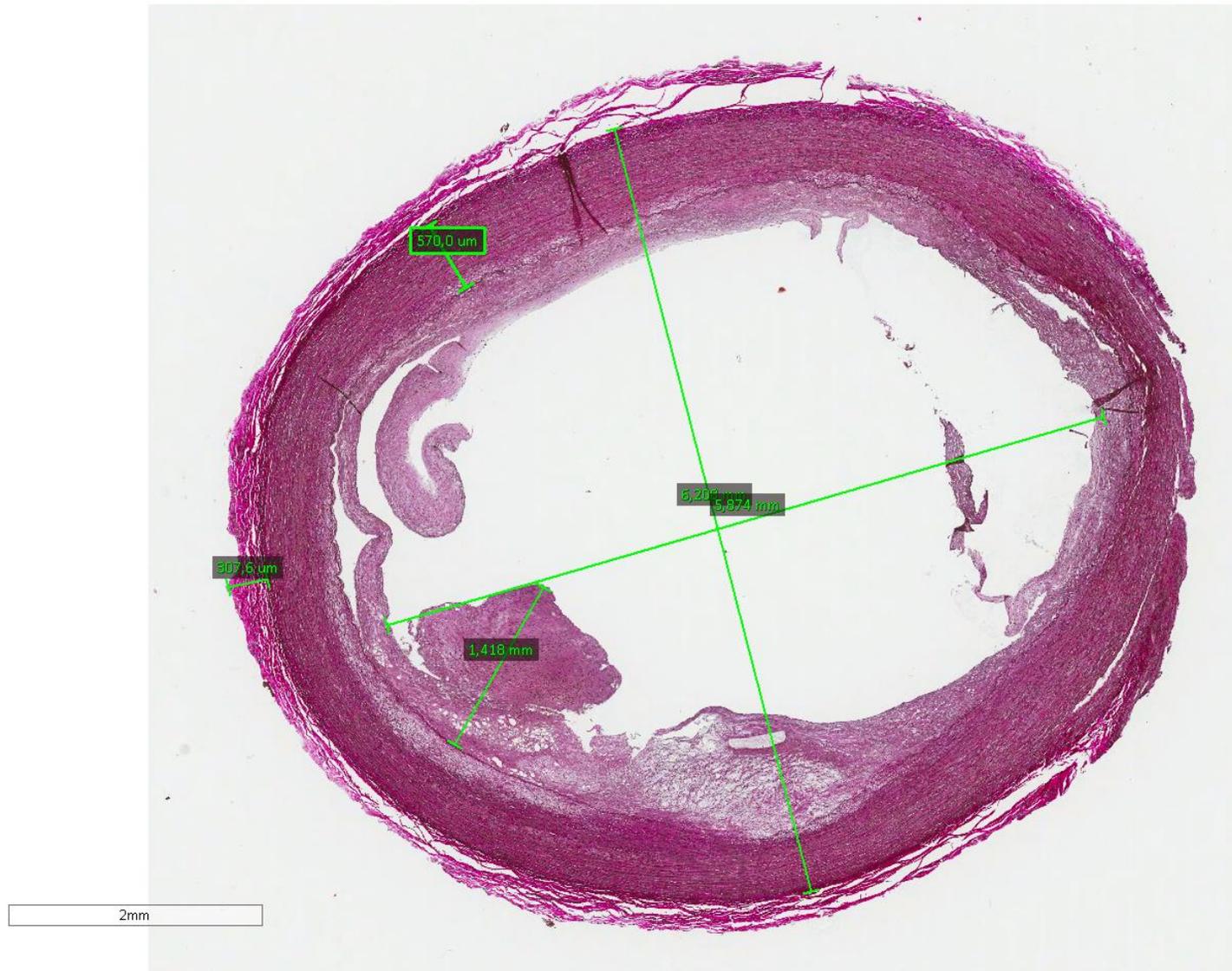
Knochenmark



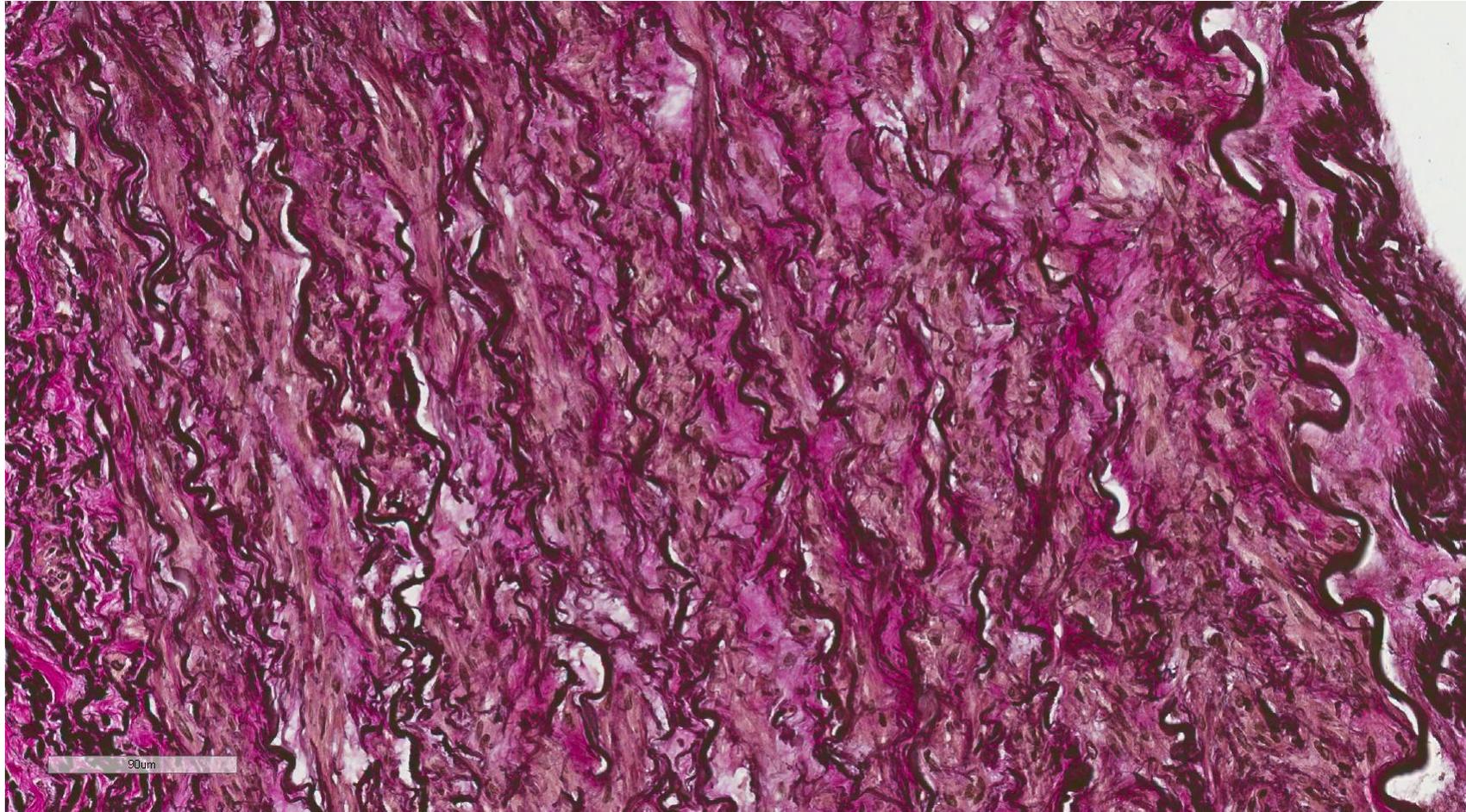
Giemsa

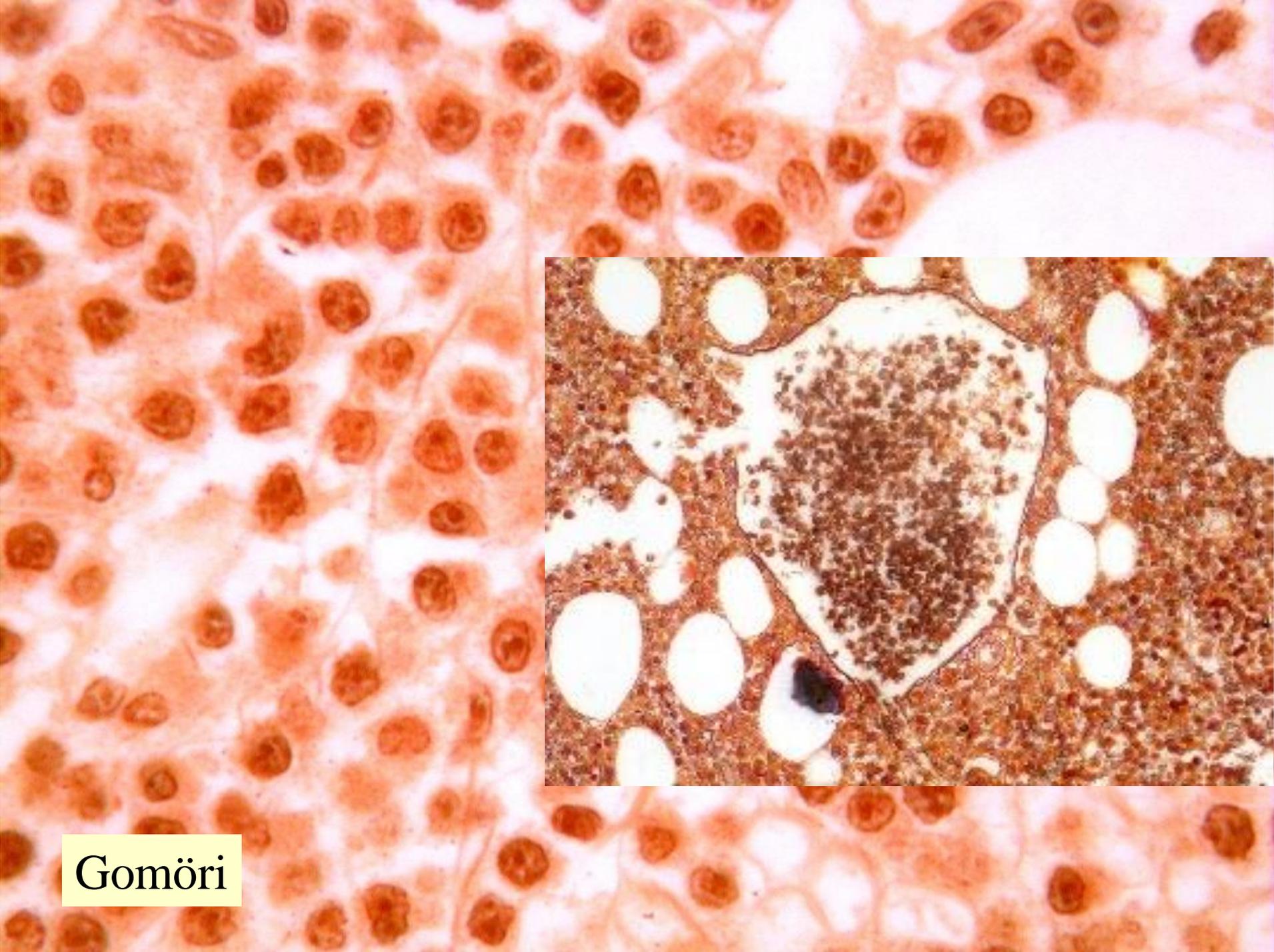


EvG

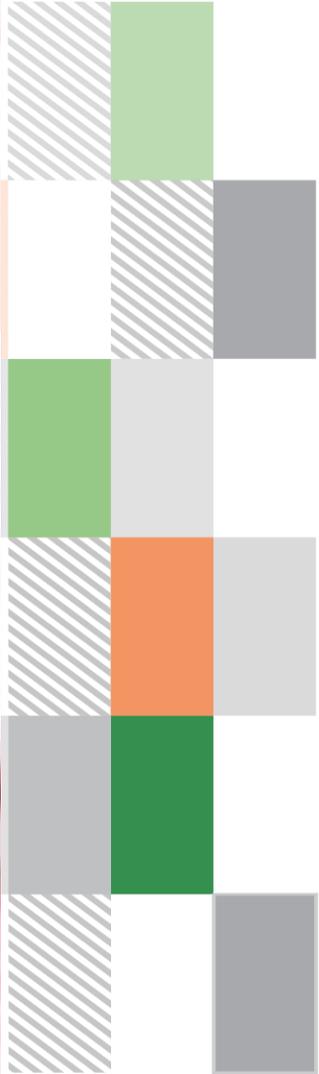


EvG



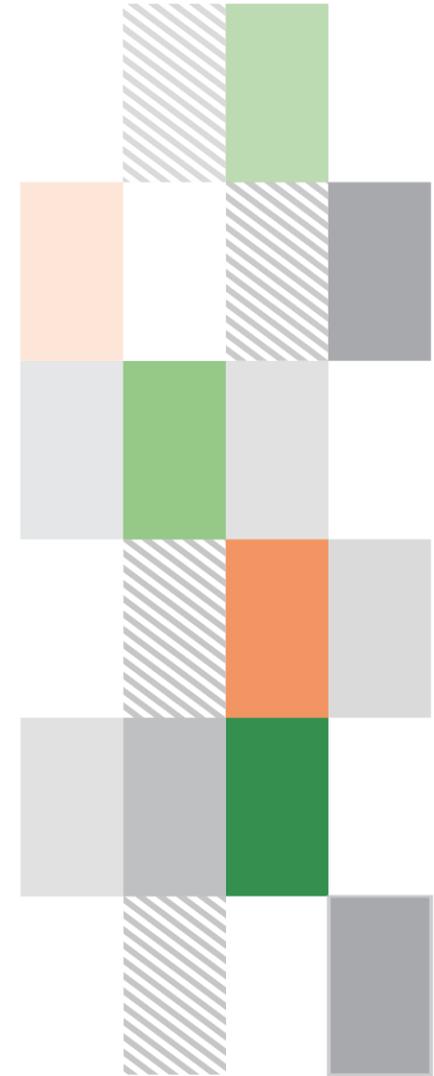


Gomöri

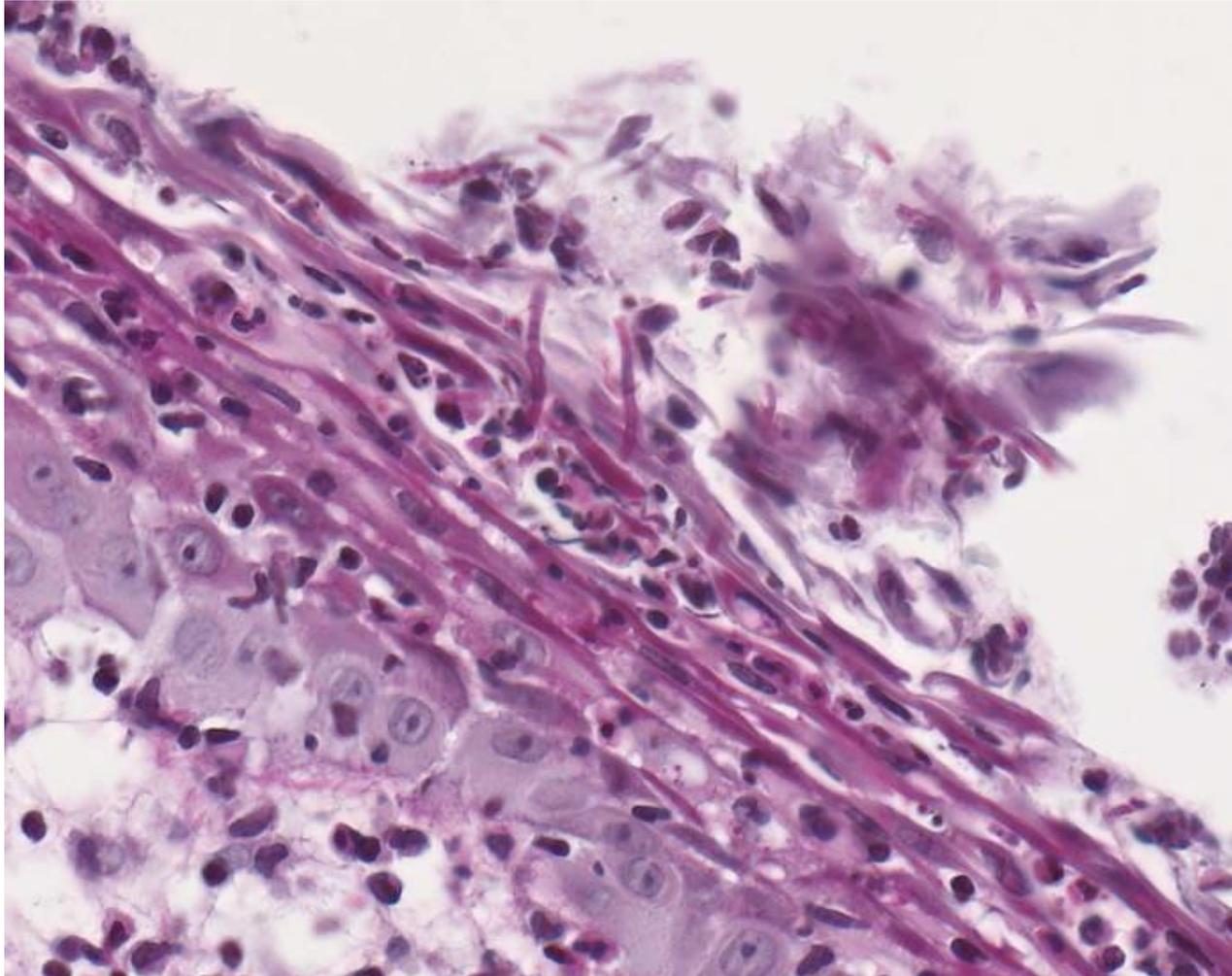


Spezialfärbungen II

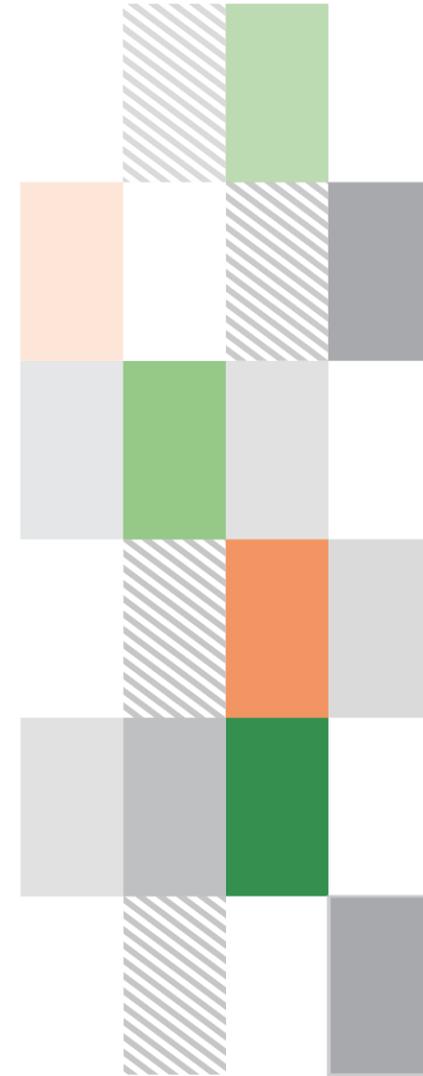
- ▶ **PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)**
 - ▶ Rot: neutrale Glykosaminoglykane, Kohlehydrate, Glykogen
 - ▶ Blau: Zellkerne
- ▶ **Alcianblau: saure Glykosaminoglykane**
- ▶ **Sudan-Fettfärbung: rot**
- ▶ **Berliner-Blau: Eisen, Hämosiderin**
- ▶ **Gram (Bakterien)**
 - ▶ Blauviolett: gram+ Bakterien
 - ▶ Rot: gram- Bakterien
- ▶ **Ziehl-Neelsen: Mykobakterien (TBC)**
- ▶ **Kongorot: Amyloid, grün polarisierend**



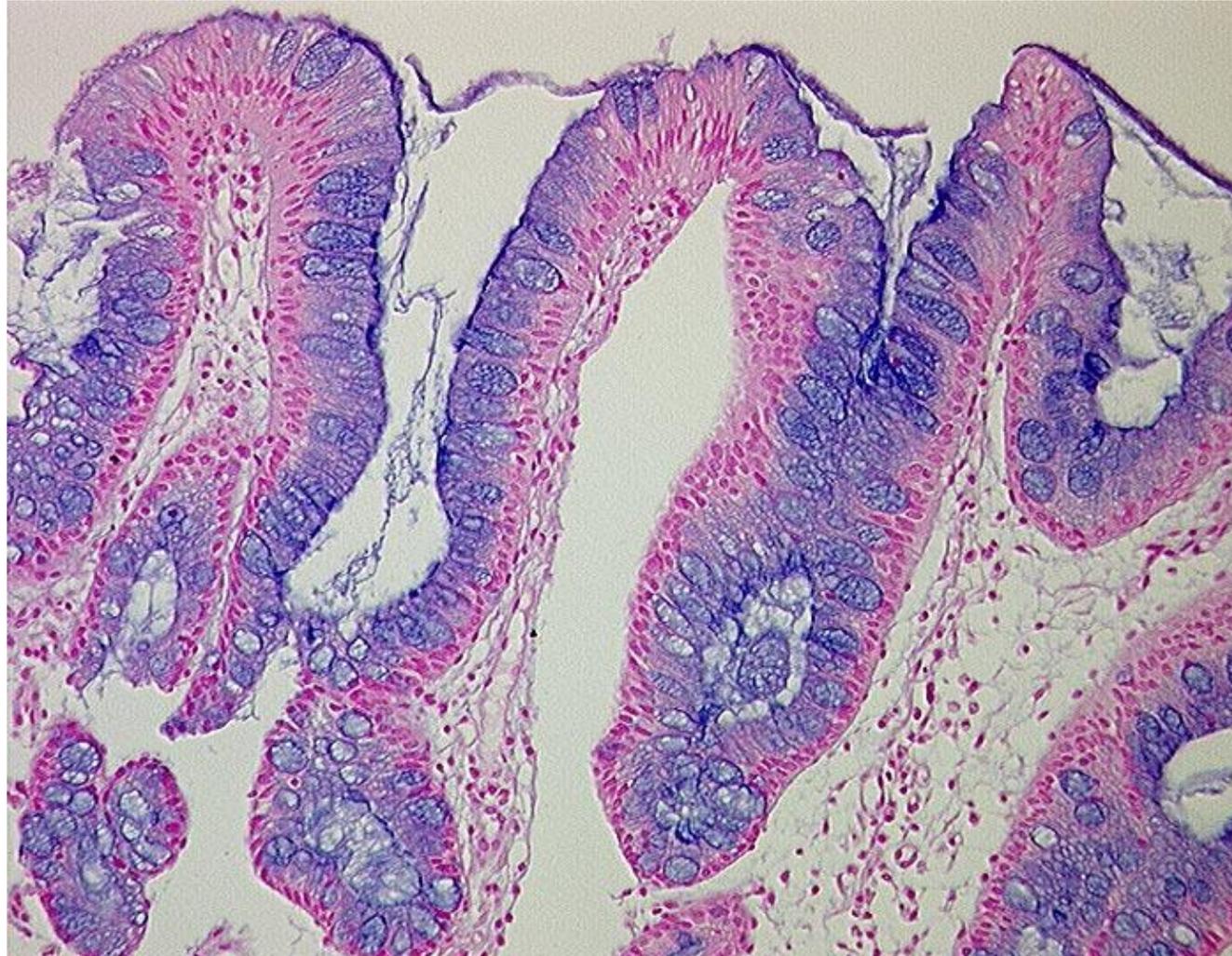
PAS (Periodic acid-Schiff): Bsp. *Pilze*



- oxidizes glucose residues, creates aldehydes that react with the Schiff reagent
- Red: neutral glycosamino-glycans, carbohydrates, glycogen
- Blue: nuclei



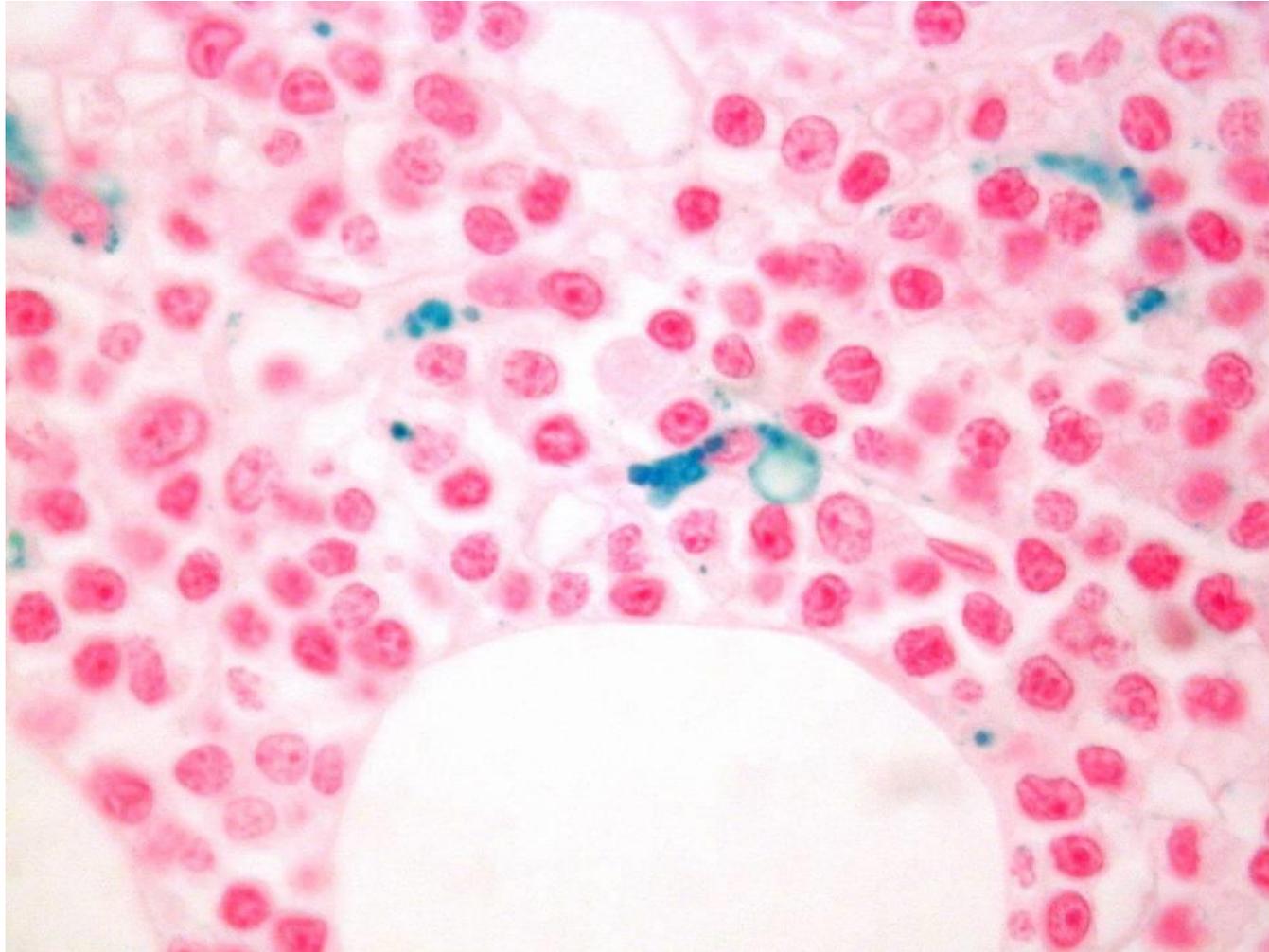
Alcian Blau



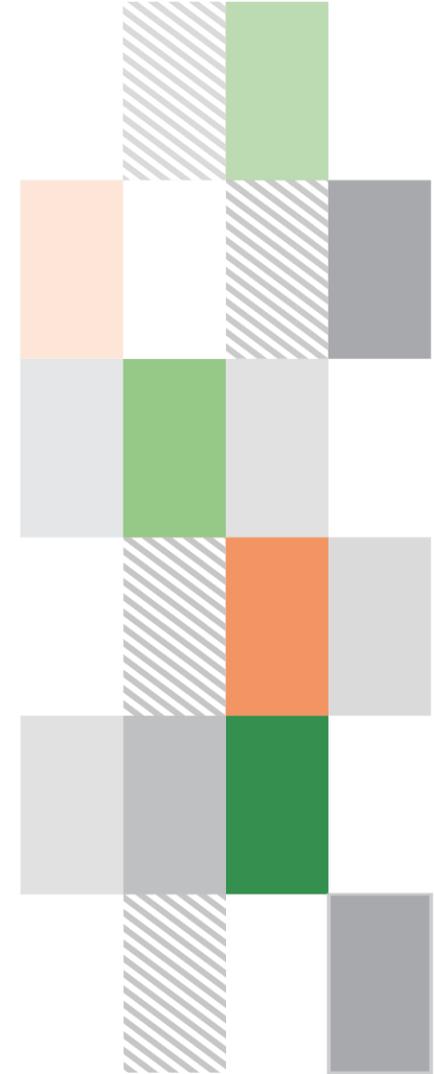
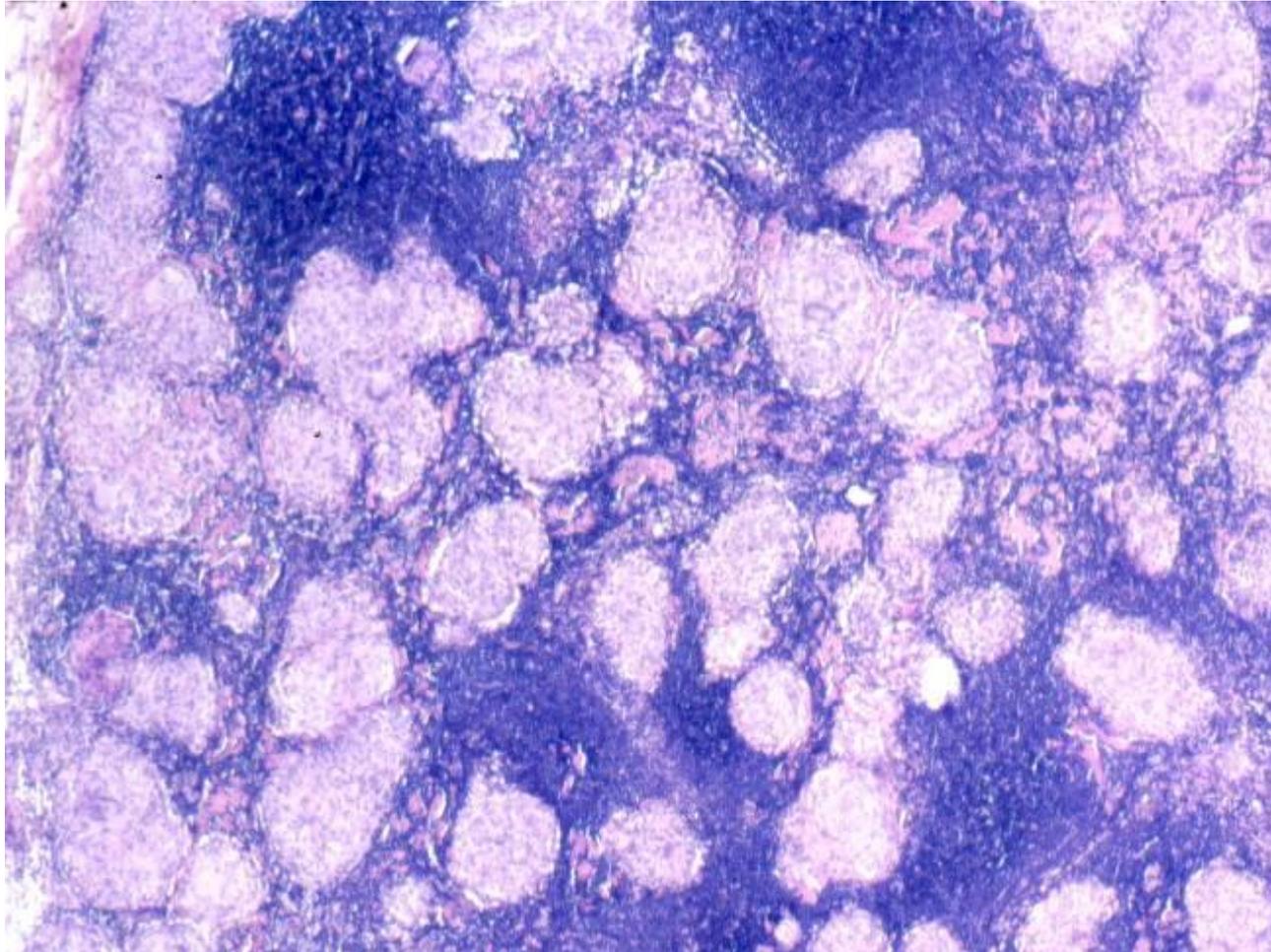
- Acid glycosaminoglycans
- Barrett Mucosa (esophagus)



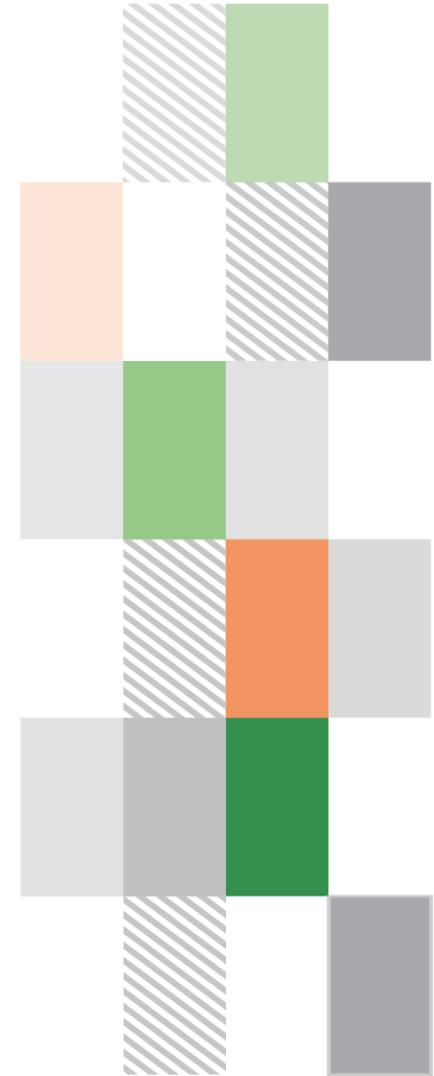
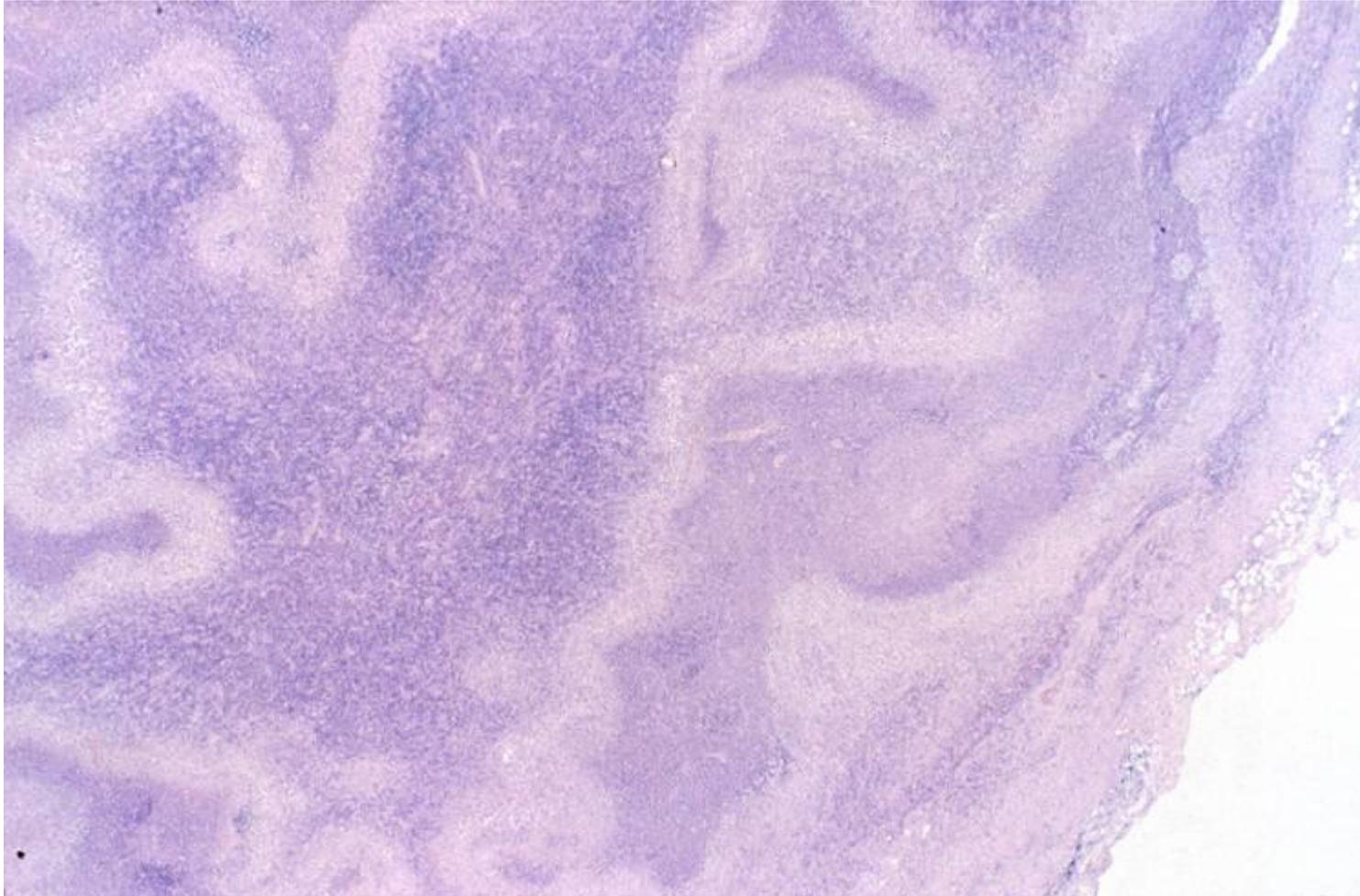
Berliner Blau



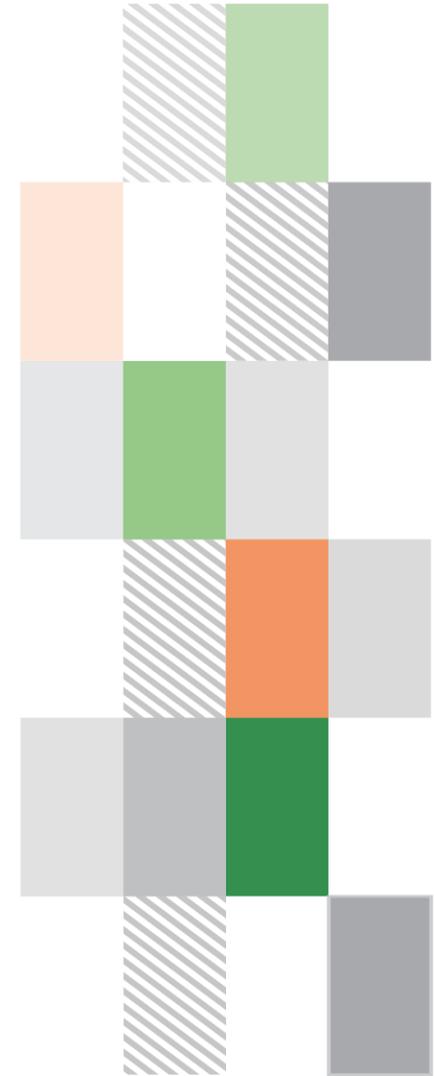
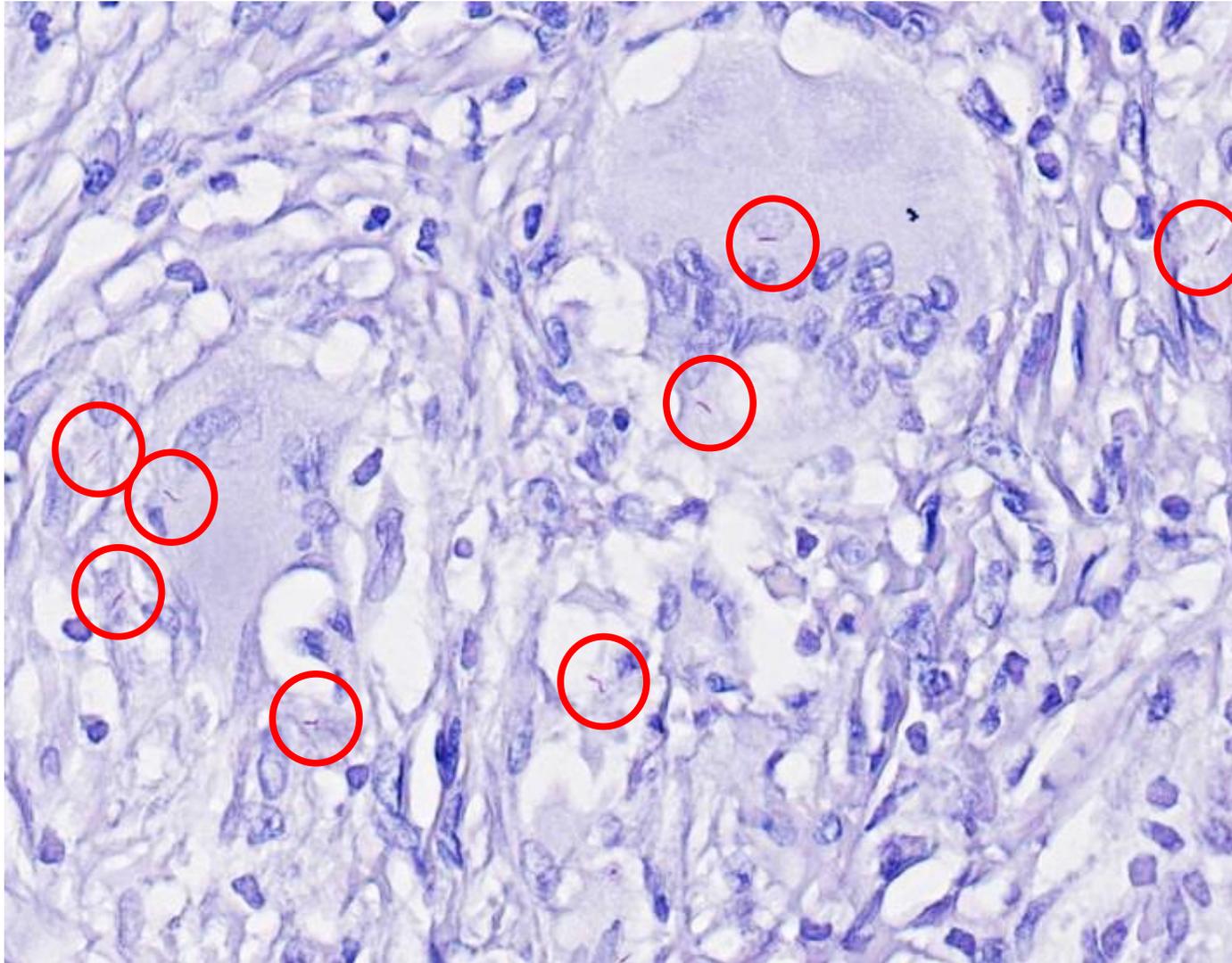
Epitheloidzellig- granulomatöse Lymphadenitis



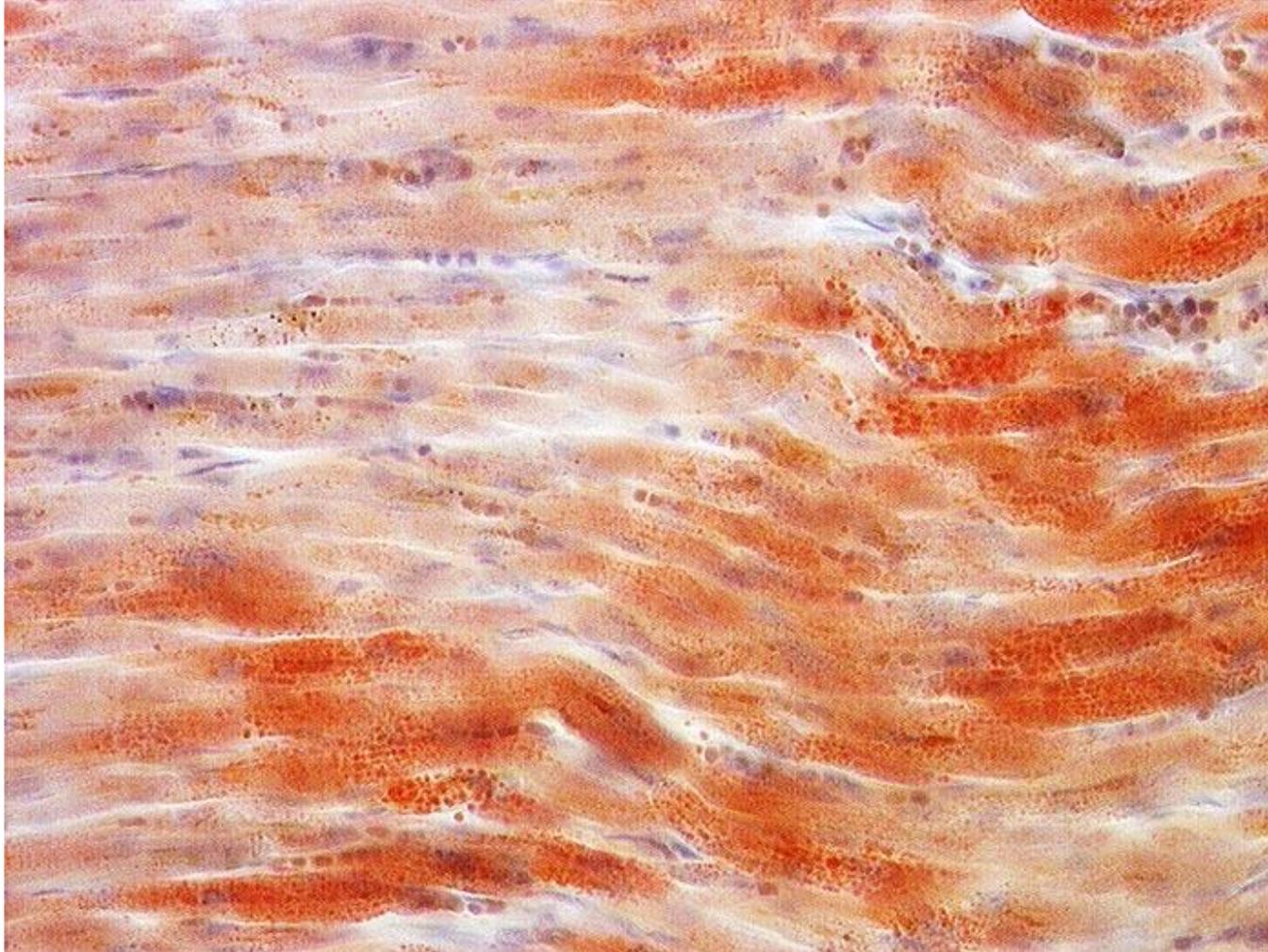
Tuberkulose



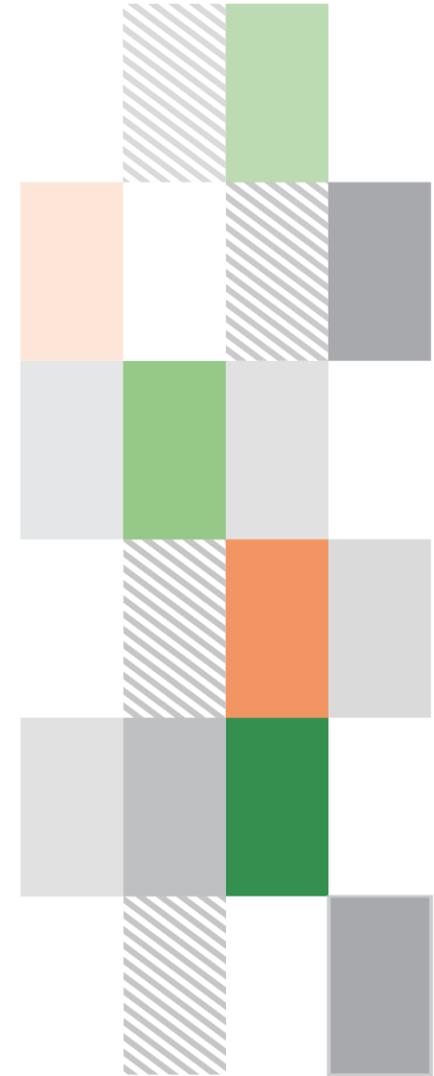
Ziehl-Neelsen



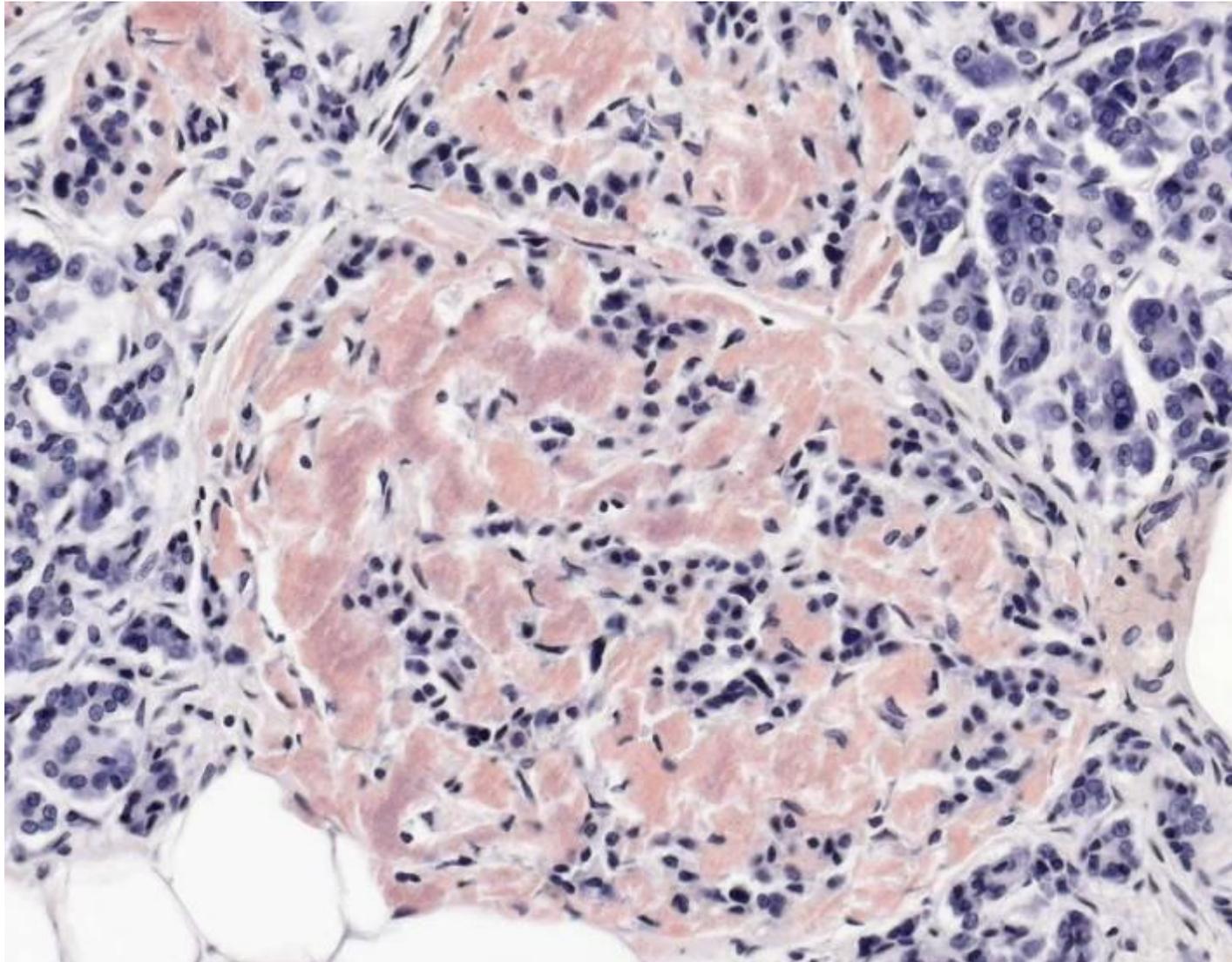
Sudan Öl Rot



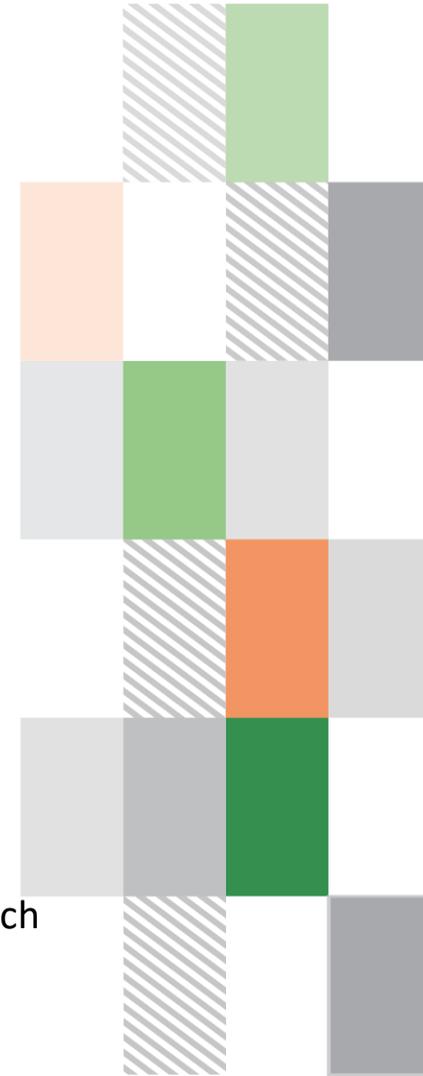
- Neutral lipid
- Cardiac muscle



Kongo Rot

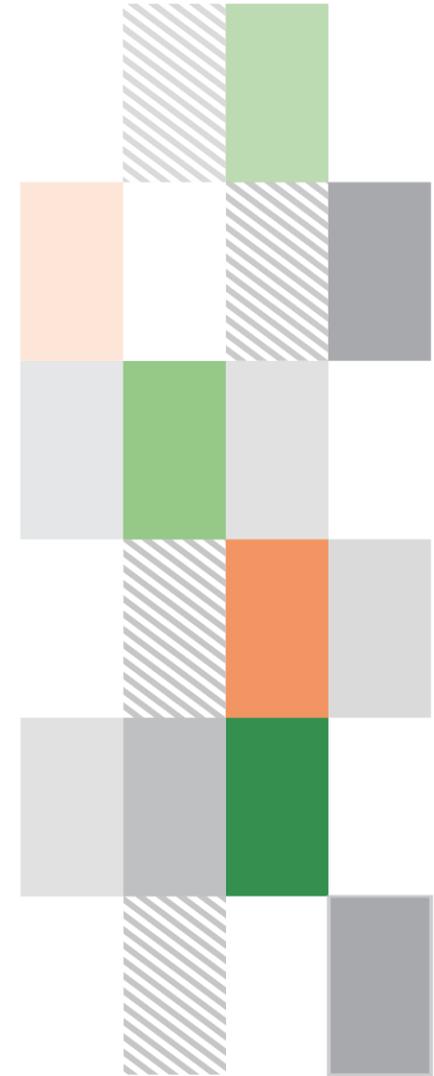


- Amyloid deposits: rötlich
- Polarisation: "apfelgrün"



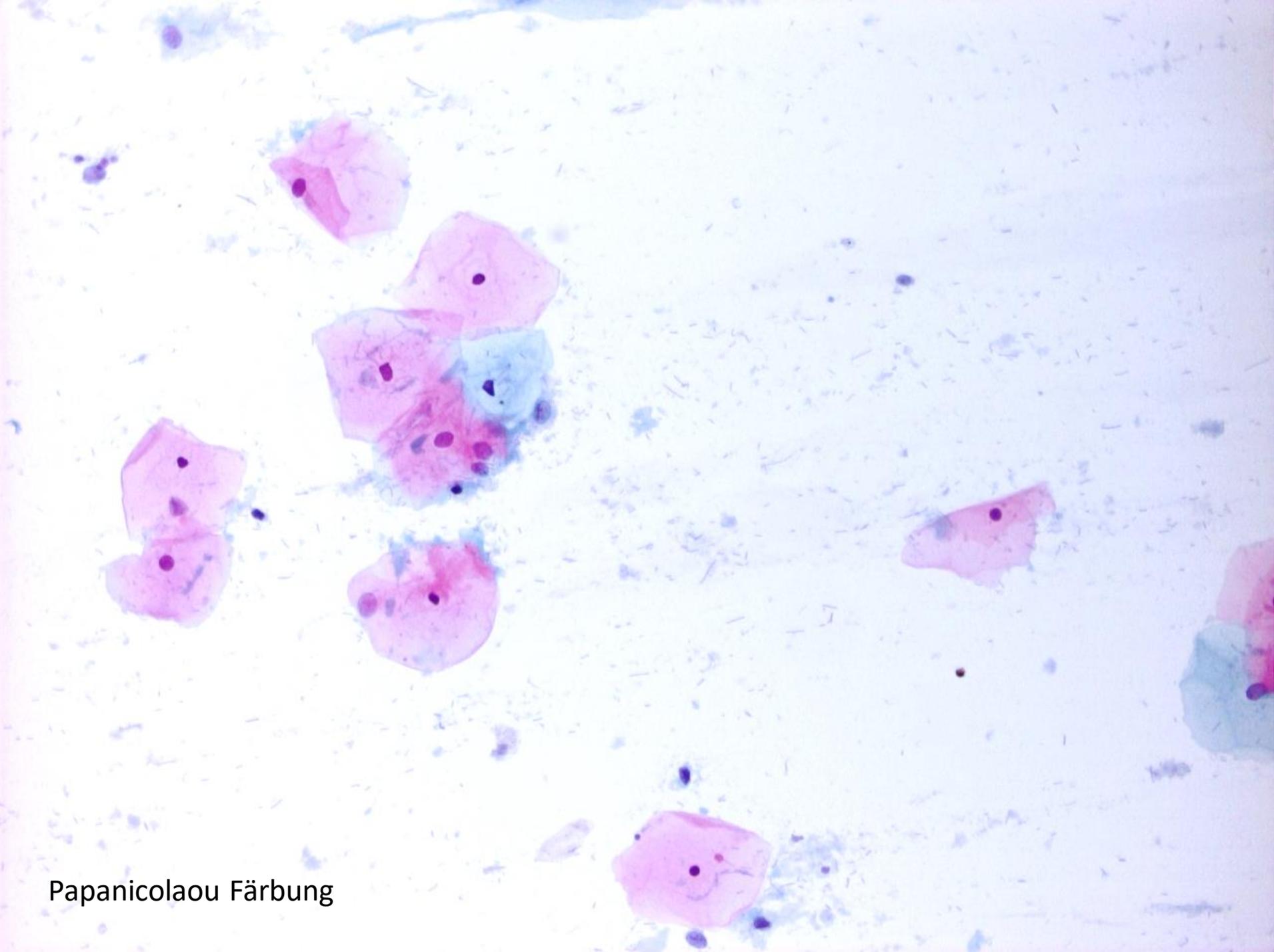
Zytologische Diagnostik

- ▶ Prophylaktisches Screening
- ▶ Minimal invasive Diagnostik: Entzündungszellen, Tumorzellen
- ▶ Untersuchung von einzeln gelagerten und aus dem Gewebsverband herausgelösten Zellen
- ▶ Bsp.:
 - ▶ Exfoliativzytologie (Zellabstriche, z. B. Muttermund)
 - ▶ Feinnadelaspiration (Ansaugen von Zellen durch Unterdruck, z. B. aus der Schilddrüse oder Leber)
 - ▶ Ergußzytologie (abgesaugte Flüssigkeit von Körperhöhlen, z. B. aus der Bauchhöhle oder Pleurahöhle)
 - ▶ Spülzytologie (Lavage, z. B. Harnblase, Bronchien)

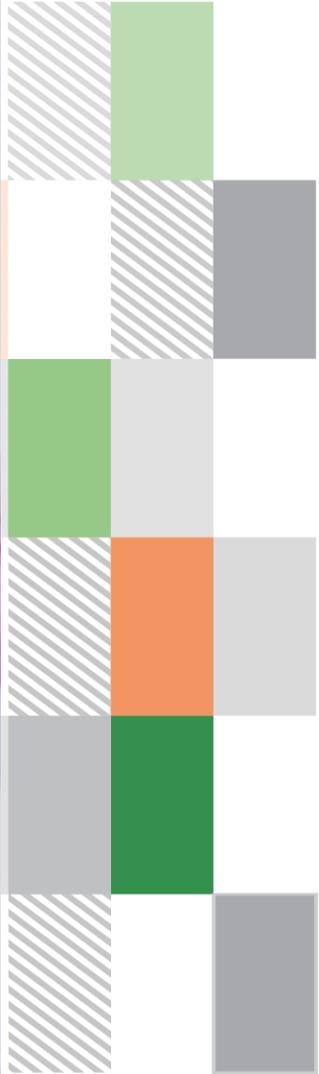


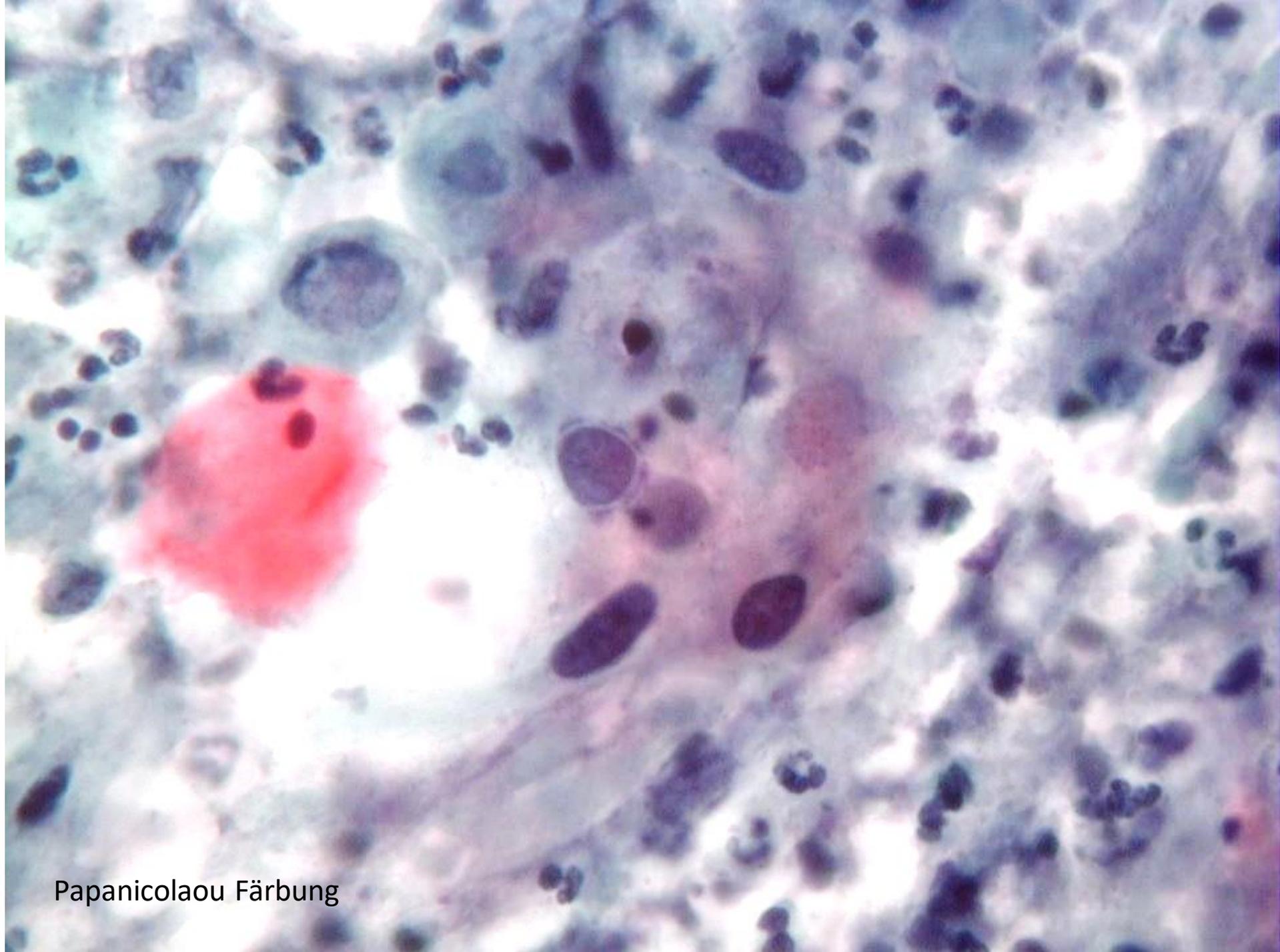


Medical
University of Graz



Papanicolaou Färbung

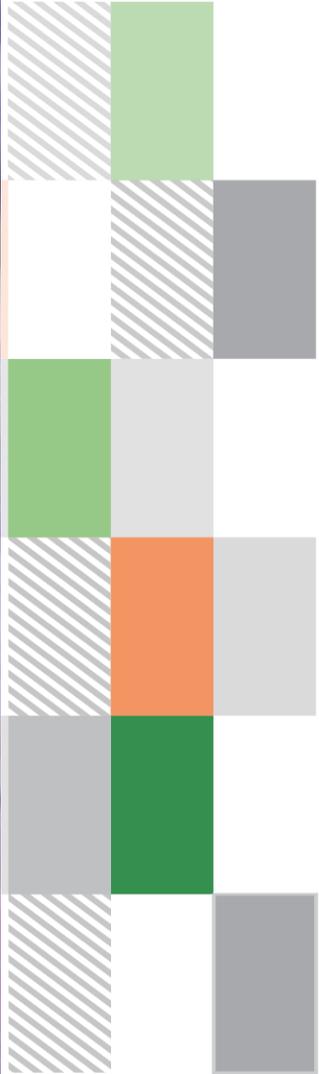




Papanicolaou Färbung

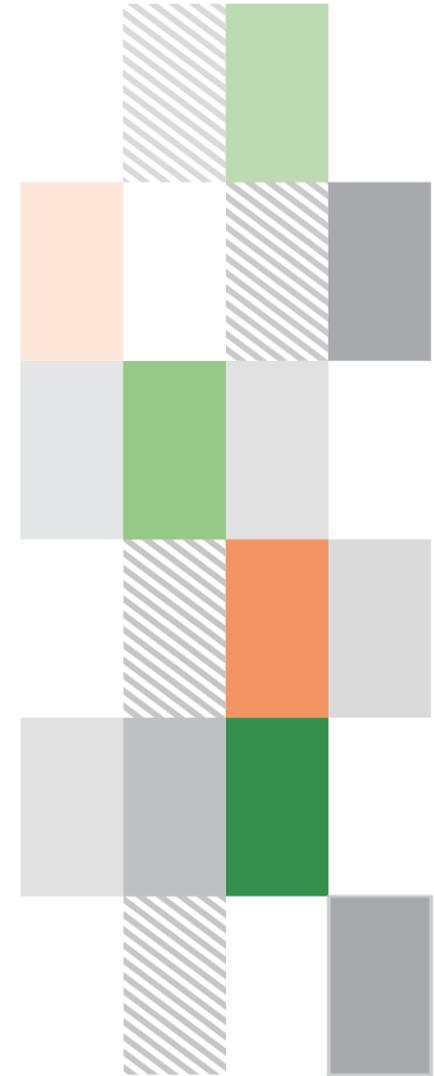


Medical
University of Graz



Mikrobiologische Diagnostik

- ▶ Bakteriologie (Nachweis und Züchtung von Bakterien, Resistenzbestimmung gegen Antibiotika)
- ▶ Virologie (Nachweis von Viren)
- ▶ Parasitologie
- ▶ Tropenmedizin
- ▶ Serologie (Antikörperbestimmung im Blutserum)
- ▶ Molekulare Erregerdiagnostik
 - ▶ NGS Pan-bakterielle, Pan-fungale PCR

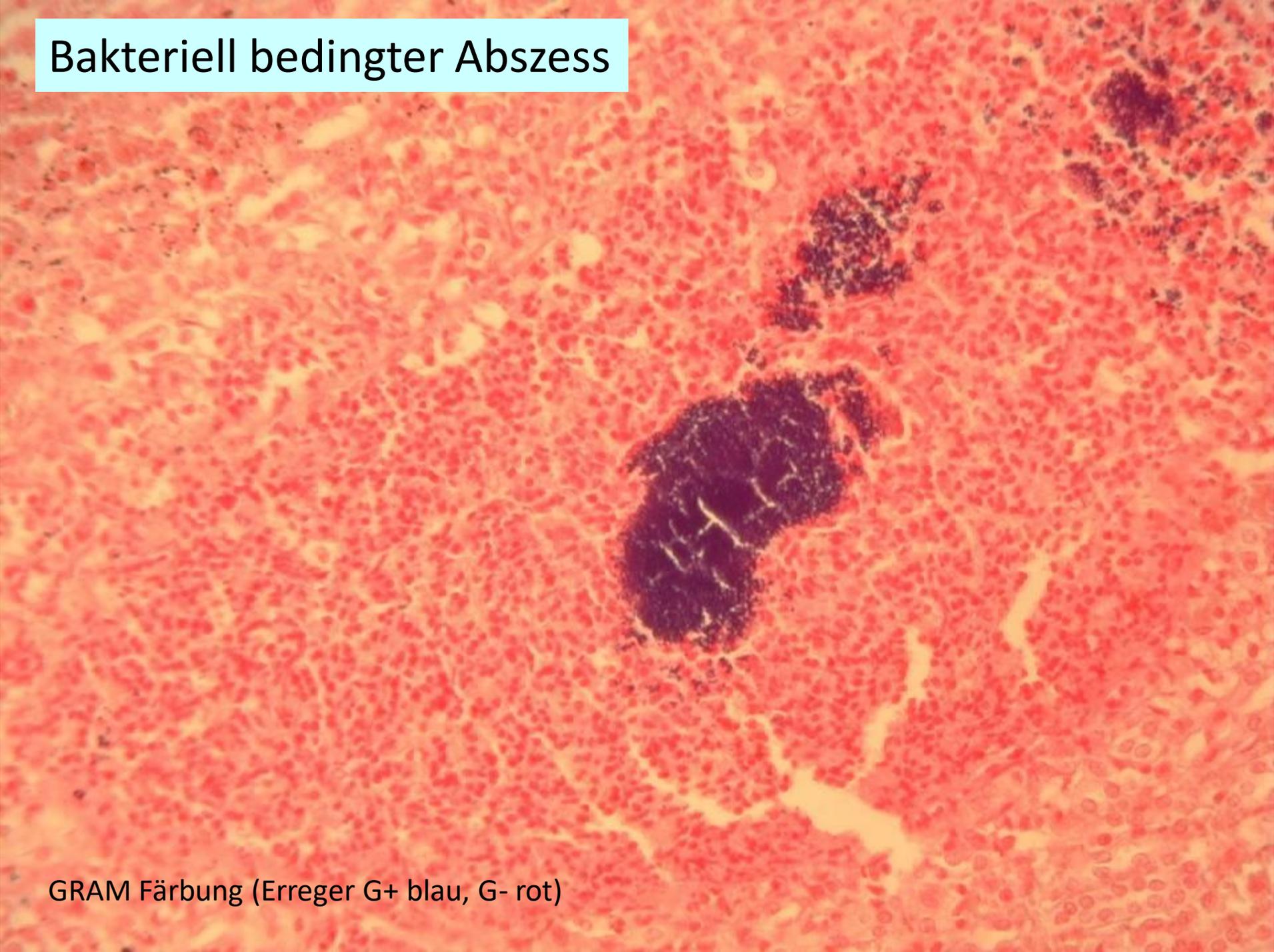


His

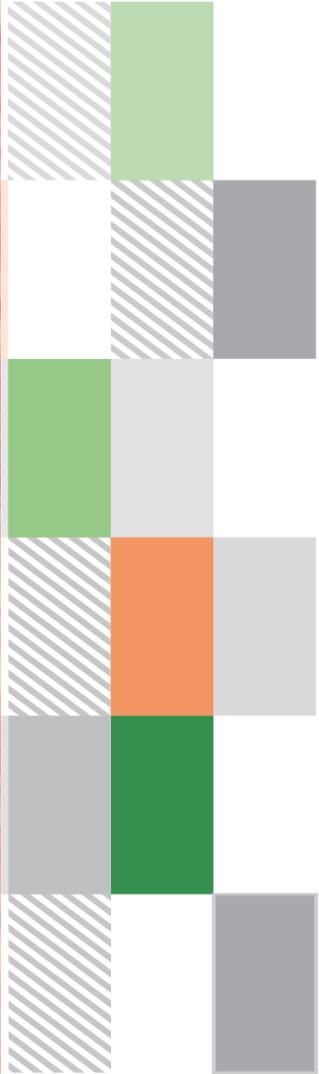
Bakteriell bedingter Abszess

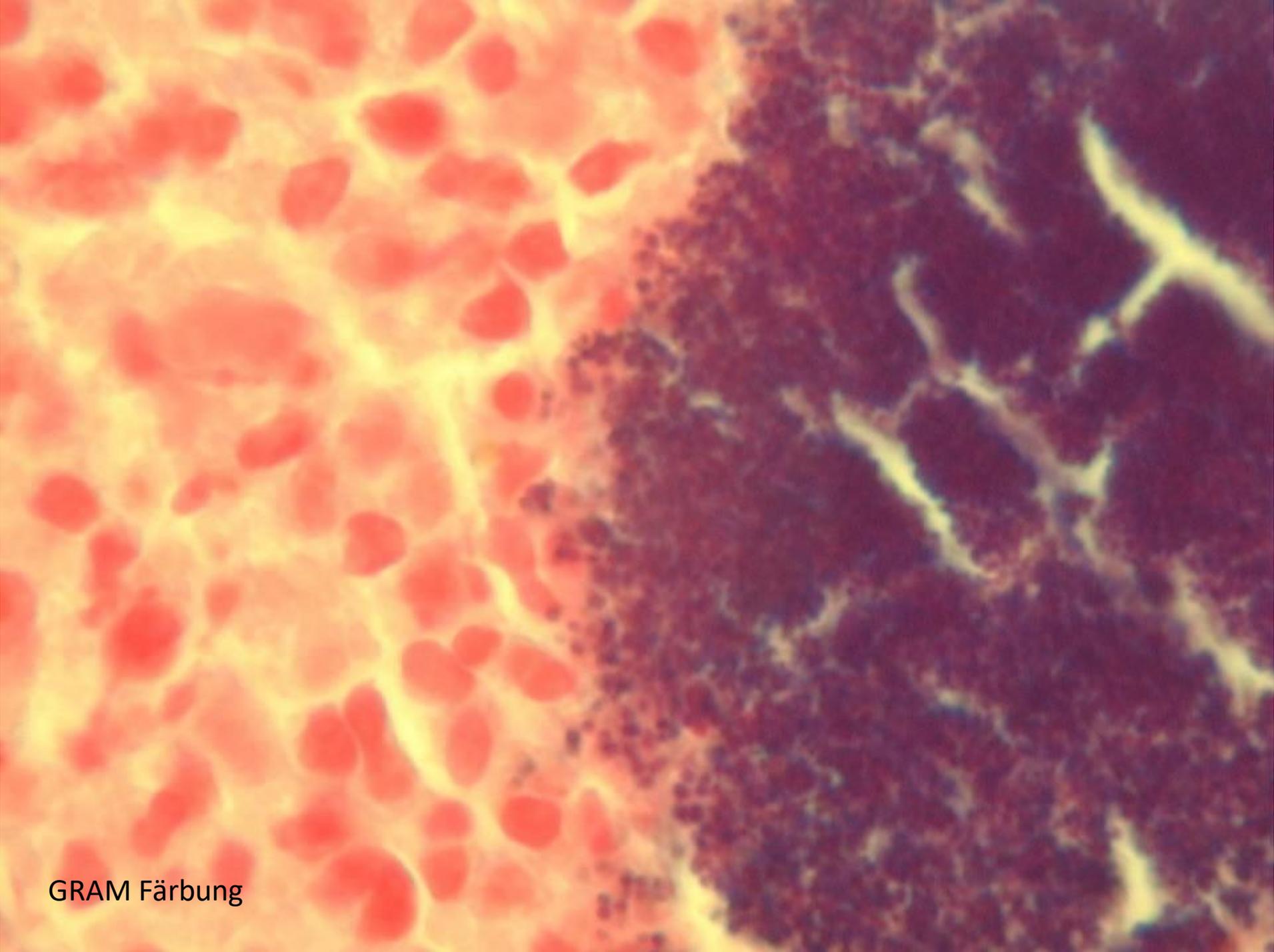


Medical
University of Graz



GRAM Färbung (Erreger G+ blau, G- rot)

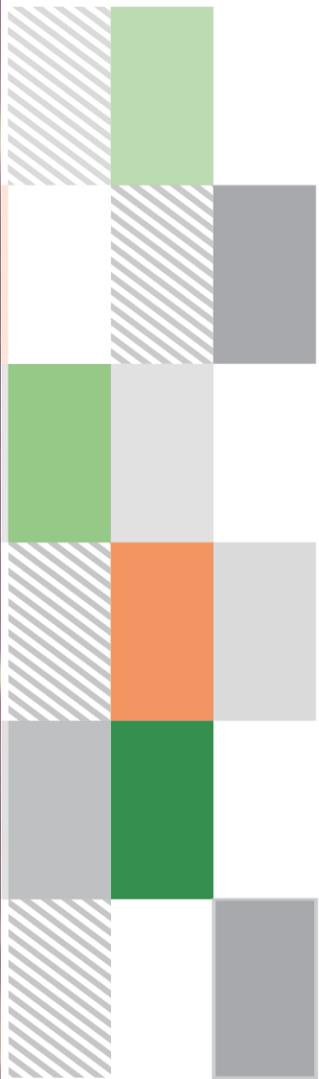




GRAM Färbung



Medical University of Graz



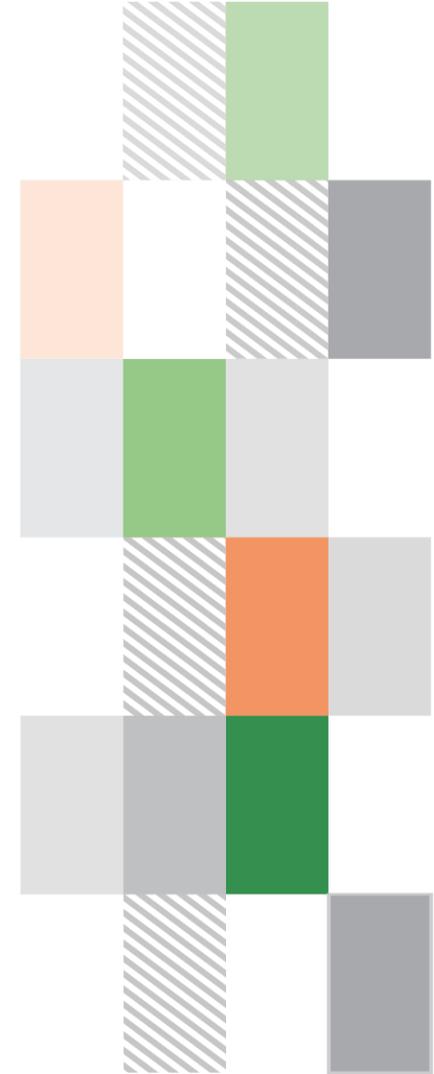
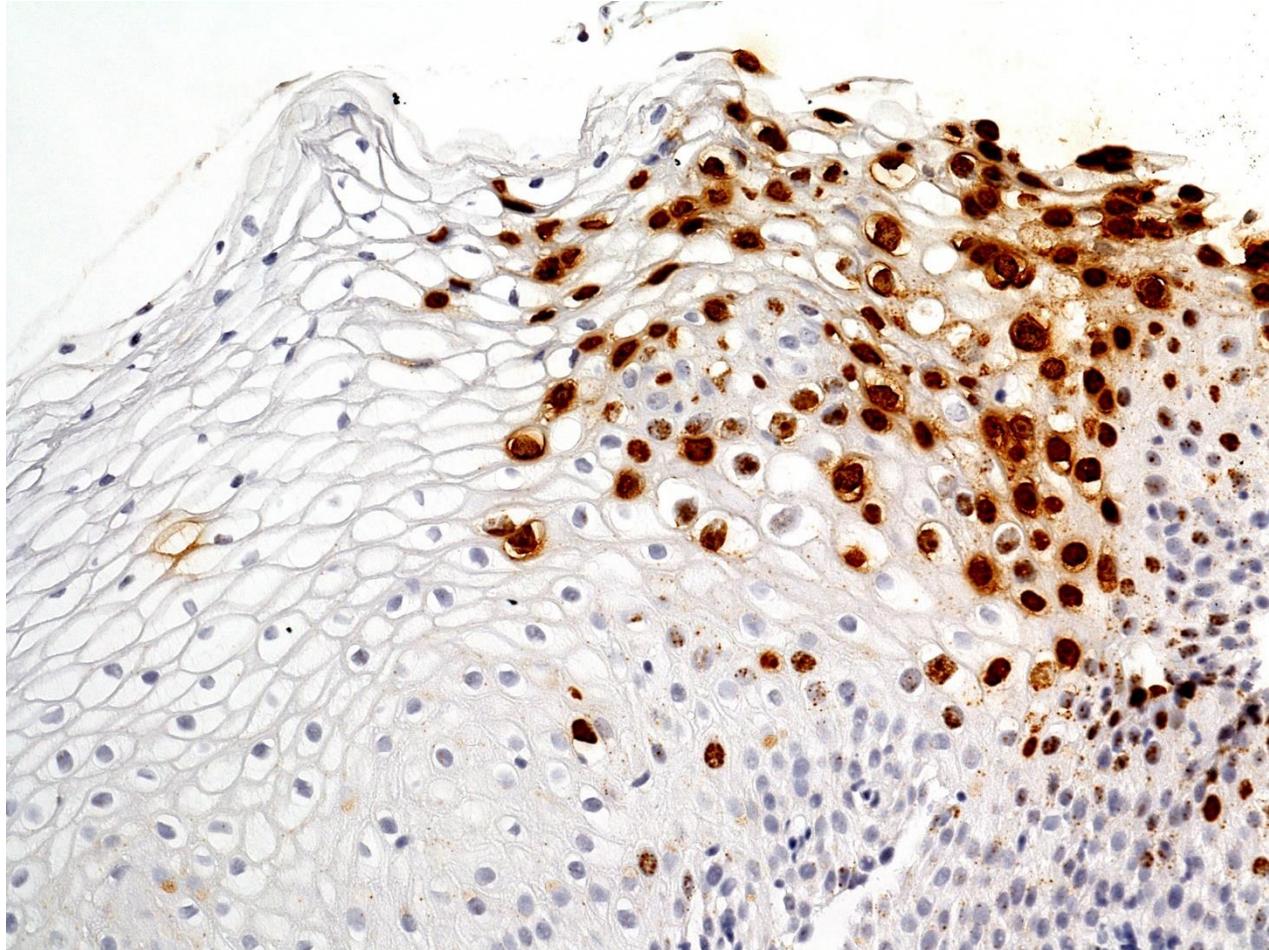
Portiobiopsie mit virusassoziierten Veränderungen



Medical
University of Graz



HPV



Postmortale Diagnostik

▶ Totenbeschau

- ▶ bei jeder Leiche vor der Bestattung durchzuführen

▶ Klinische Obduktion (Pathologe)

- ▶ bei Verstorbenen in öffentlichen Krankenanstalten
- ▶ unklare Todesursache, nach Eingriff, Lehre

▶ Sanitätspolizeiliche Obduktion (Pathologe/Gerichtsmed.)

- ▶ Tod außerhalb einer öffentlichen Krankenanstalt (z. B. zu Hause)
- ▶ unklare Todesursache, Infektionskrankheiten

▶ Gericht-/Staatsanwaltliche Obduktion (Gerichtsmed.)

- ▶ bei Verdacht auf Fremdverschulden
- ▶ vom STA angeordnet

