

Infektionspathologische Diagnostik in Zeiten von COVID-19

Prof. Dr. med. Kirsten Mertz

Institut für Pathologie

Kantonsspital Baselland

25.04.2022

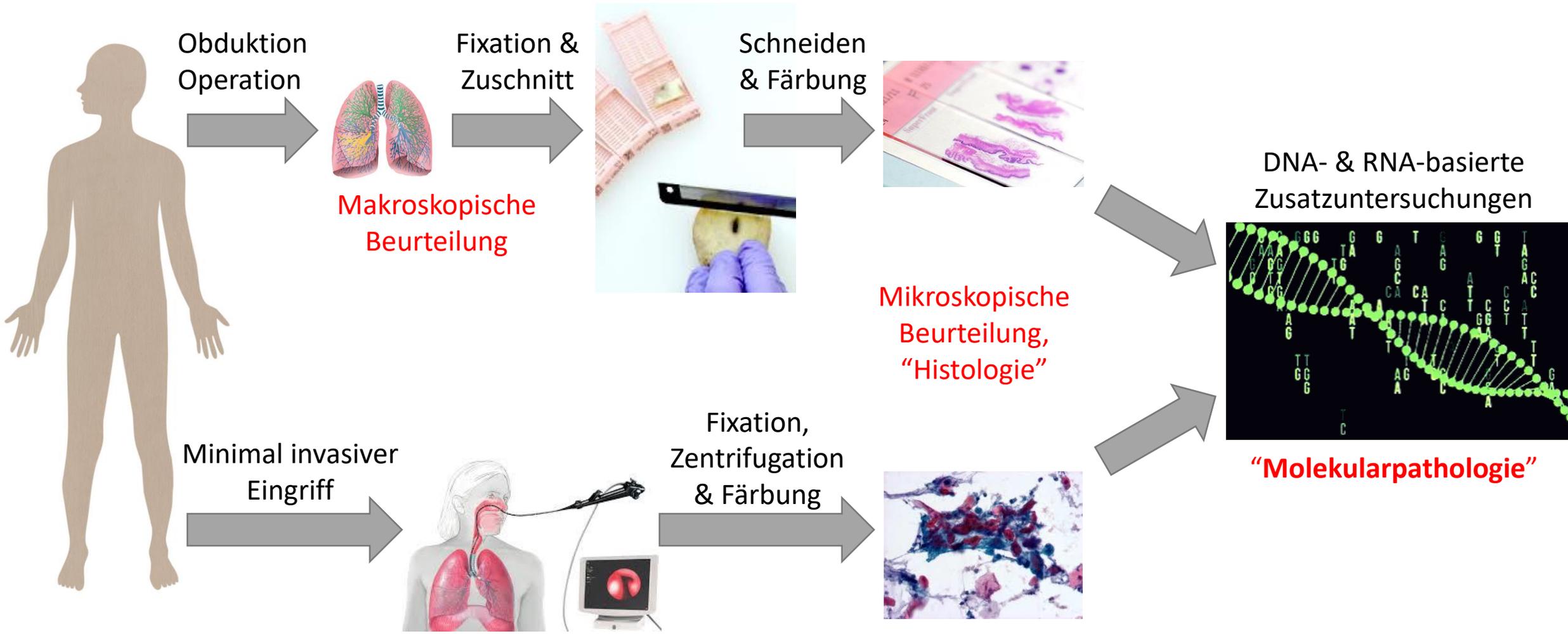


Kantonsspital
Baselland

Inhalt

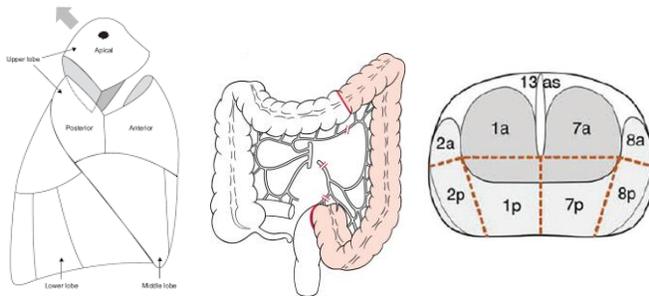
- Probenvielfalt und ihr Einfluss auf die Methodenauswahl
- Histologische Aufklärung infektionspathologischer Fälle
- Formalin-Behandlung und DNA Qualität
- Molekularbiologische Aufarbeitung infektionspathologischer Fälle
- Fallbeispiele

Arbeitsabläufe in der Pathologie



Probentypen

Resektat	Biopsie	Flüssige Proben
In einer OP oder Autopsie entnommene Organe oder Gewebe	Entnahme einer (kleineren) Gewebeprobe	Minimal-invasiv oder nicht-invasiv gewonnene Proben
<ul style="list-style-type: none"> • Lungen-Wedge-Resektat • Hemikolektomie • Prostata-Resektion 	<ul style="list-style-type: none"> • (Fein)Nadelbiopsie • Stanzbiopsie • Zangenbiopsie 	<ul style="list-style-type: none"> • Punktionen (z.B. Ergüsse) • Blut, Urin • Sputum, PAP-Abstrich
Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE), Gefriermaterial	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE)	Nativ oder in Röhrchen mit spezifischen Zusätzen (EDTA, Nährmedien, Fixationsmittel, ...)

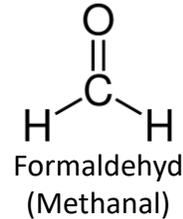


Aufarbeitung infektionspathologischer Fälle



- Arztbericht, Symptome, Krankengeschichte, Fragestellung
- Probenvorbereitung

Der Weg zur FFPE Probe



60% Ethanol
80% Ethanol
90% Ethanol
100% Ethanol
100% Ethanol
100% Xylol



- Formalin = 4-10% Formaldehyd in wässriger Lösung
- Tendenz zur Polymerisation (vernetzt sich selbst, Proteine und Nukleinsäuren = Crosslinking)
- Stoppt Autolyse, dadurch dauerhafte Haltbarkeit
- Aufsteigende Alkoholreihe zum Entfernen von Wasser
- Verhindert das Schrumpfen von Gewebe
- Ermöglicht bzw erleichtert Eindringen von Paraffin (flüssig wenn erhitzt, nicht wasserlöslich)
- Paraffin ist geruch- und geschmacklos, ungiftig, elektrisch isolierend, wasserabstossend, sehr lange Haltbarkeit
- Lagerung bei Raumtemperatur → Grosse Archive kostengünstig

Limitierte Methodenauswahl für fixiertes Gewebe



- **Keine unfixierten flüssigen Proben & kaum Abstriche**

→ Keine Schnell-Analytik

- **Gewebe wird fixiert**

→ Keine Kulturen

→ Kein MALDI-TOF

→ Kein Antibiotika-Sensitivitäts-Test (AST)

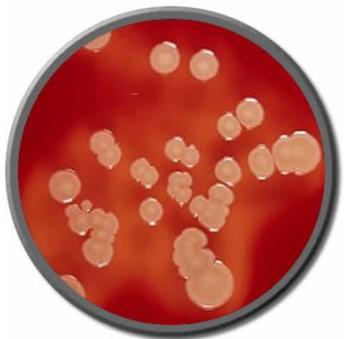
- **DNA wird durch Fixierung fragmentiert**

→ Keine Analyse nativer DNA

→ Kein long-read sequencing (Nanopore)

→ Identifikation der (pathogenen) Spezies an kurzen DNA Fragmenten

- **Probe enthält hauptsächlich humanes Gewebe (und DNA)**

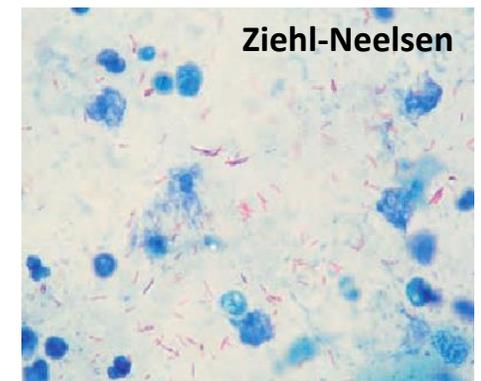
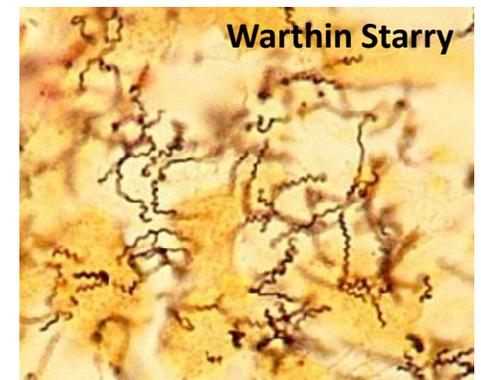
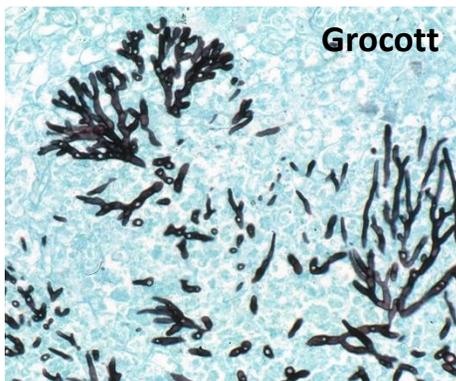
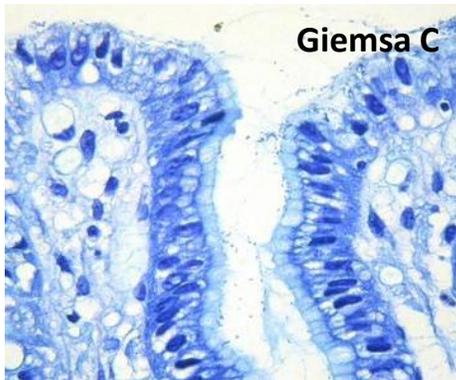
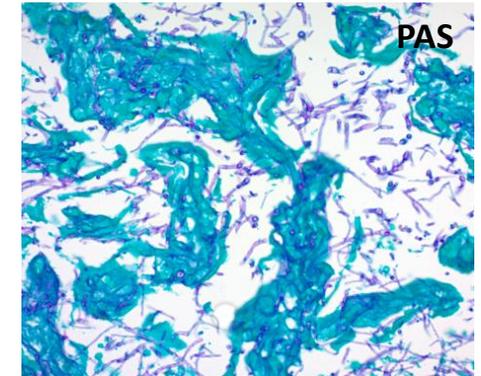
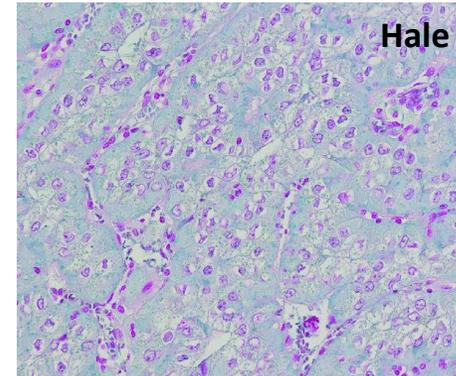
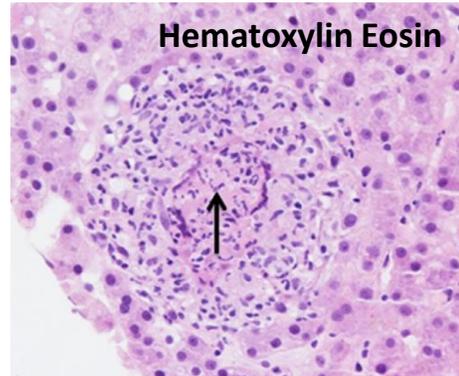
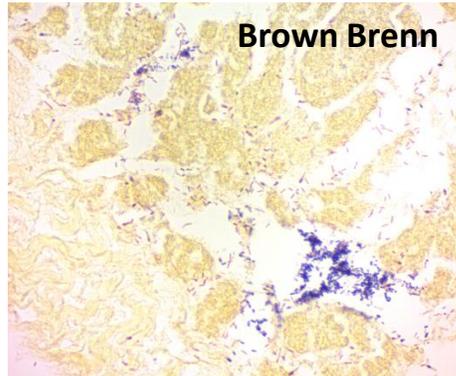


Aufarbeitung infektionspathologischer Fälle



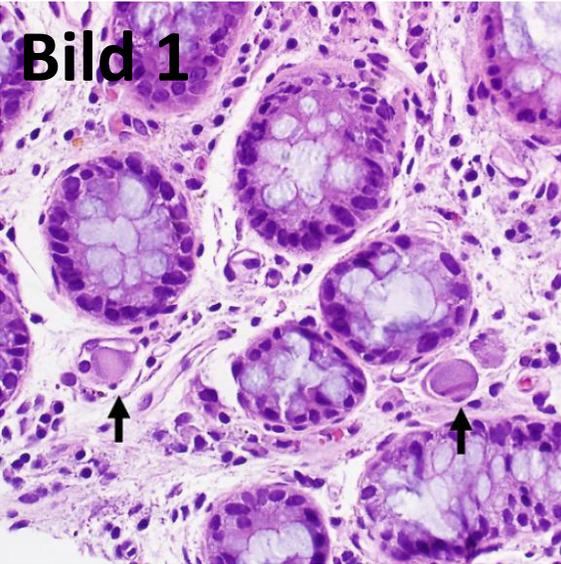
- Arztbericht, Symptome, Krankengeschichte, Fragestellung
- Probenvorbereitung
- Gewebe-Morphologie, Anzeichen für Infektion, Pathogene
- Reaktion des Körpers: Infiltrierende Immunzellen, Granulome, Nekrose etc.
- Gezielter Nachweis individueller Pathogene (z.B. CMV, EBV, ...)

Färbungen

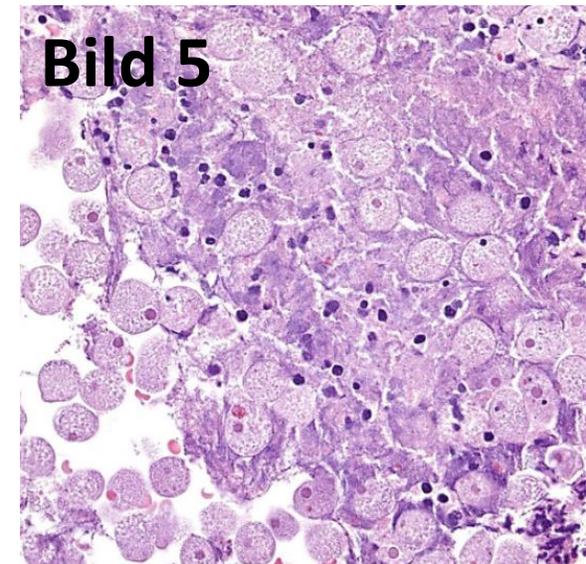
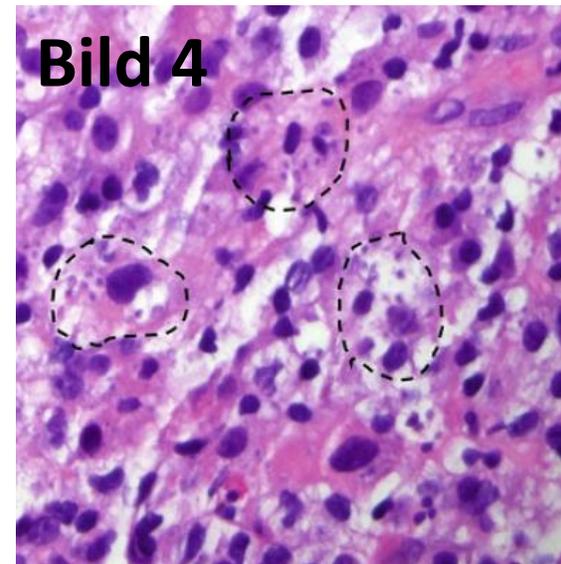
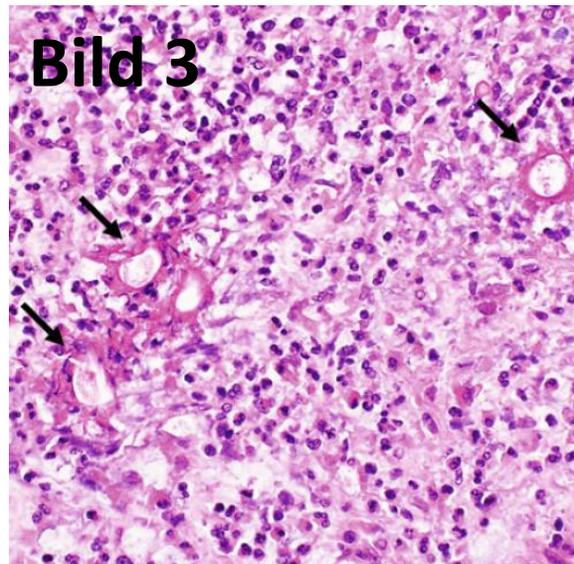
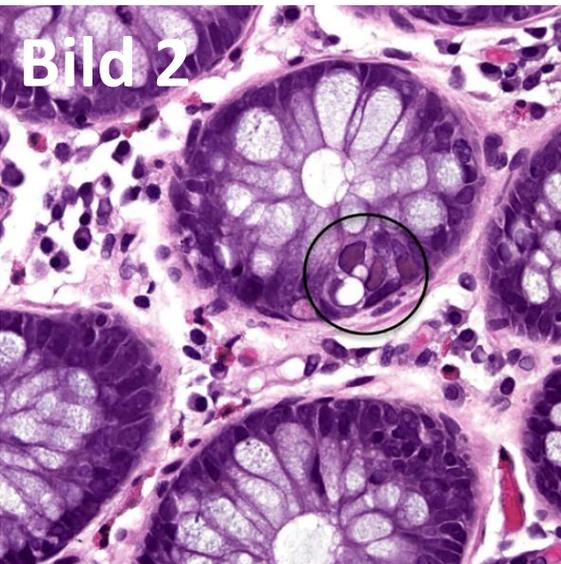


Färbung	Nachweis von
Brown Brenn	Gram+ & Gram- Bakterien (Zellwand, Kerne)
Elastica-Van Gieson	Morphologie (Elastin, Collagen, Muskelgewebe)
Giemsa C	<i>Helicobacter pylori</i>
Grocott	Pilze (Zellwand, Glykoproteine)
Hematoxylin Eosin	Allgemeine Morphologie, Infiltration von Zellen, Nekrose
Hale	Kapseln (z.B. Pneumokokken), Mucine (Polysaccharide)
PAS	Pilze (Glykoproteine)
Warthin Starry	Spirochäten
Ziehl-Neelsen	Säurefeste Stäbchen (Mykobakterien)

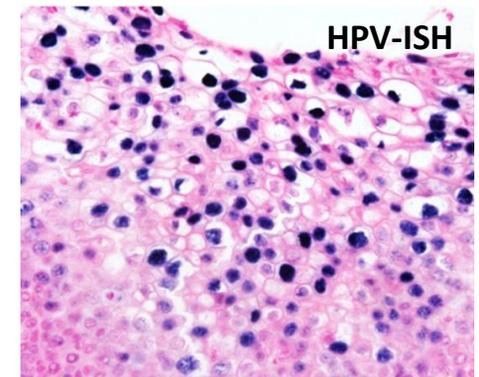
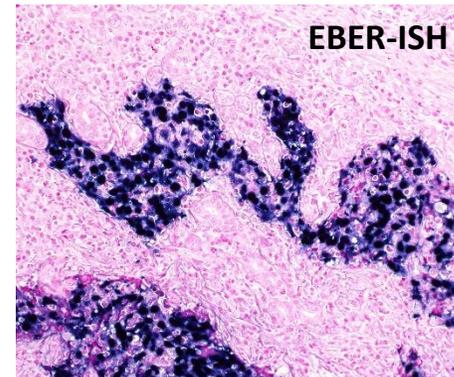
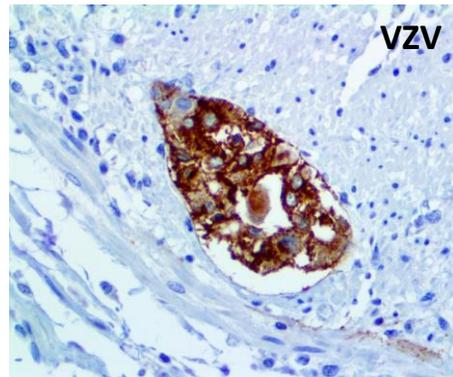
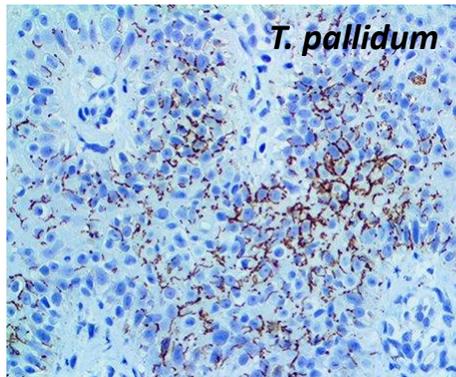
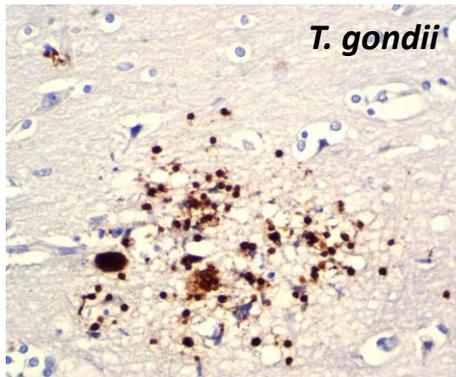
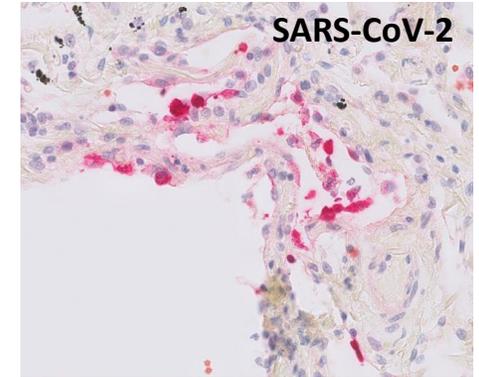
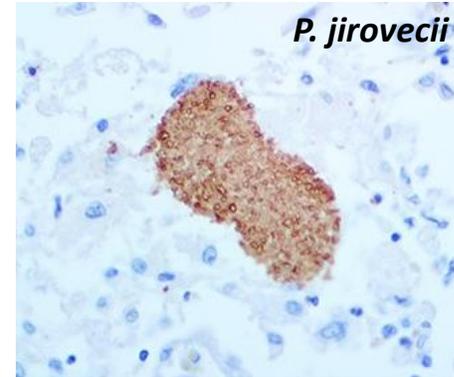
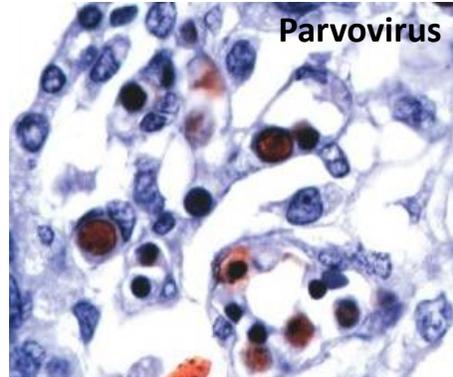
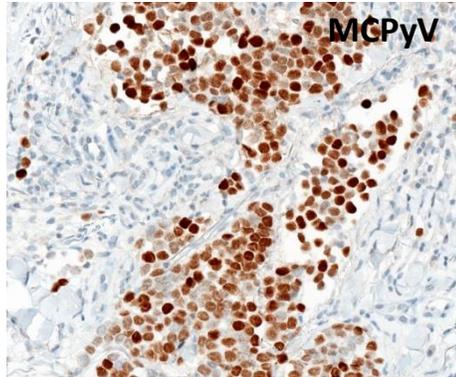
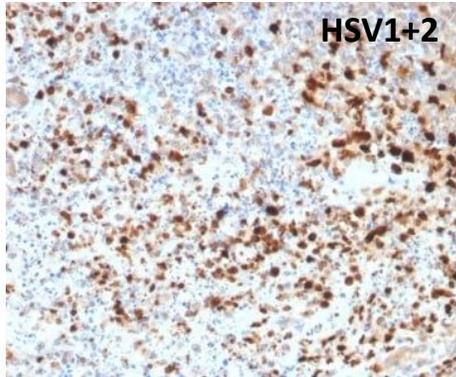
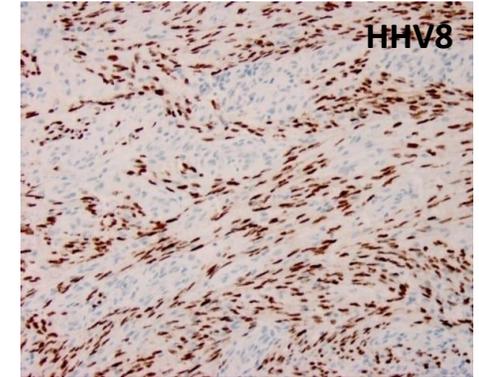
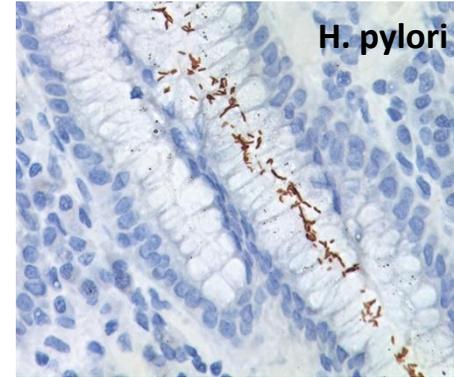
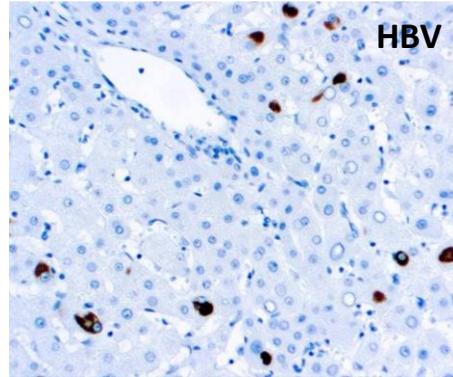
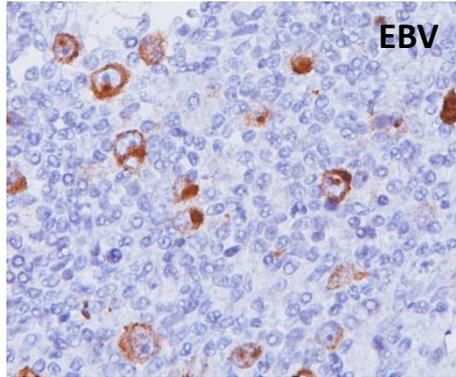
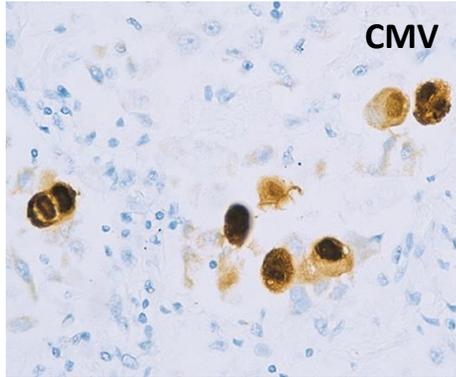
Herausforderungen bei unspezifischen Färbungen



- Bild 1: Cytomegalovirus (CMV) infizierte Zellen (Zellplasma & Kern)
 - Bild 2: Adenovirus (ADV) infizierte Zellen (Zellkern)
 - Bild 3: Basidiobolomykose
 - Bild 4: Makrophagen mit intrazellulärer Hefe
 - Bild 5: *Entamoeba histolytica* Trophozoiten
-
- Schwierig, virale Einschlüsse auf entzündlichem Hintergrund zu identifizieren
 - Fehlende Entzündungsreaktion kann infiziertes Gewebe "normal" erscheinen lassen



Spezifischer Nachweis mittels IHC oder ISH

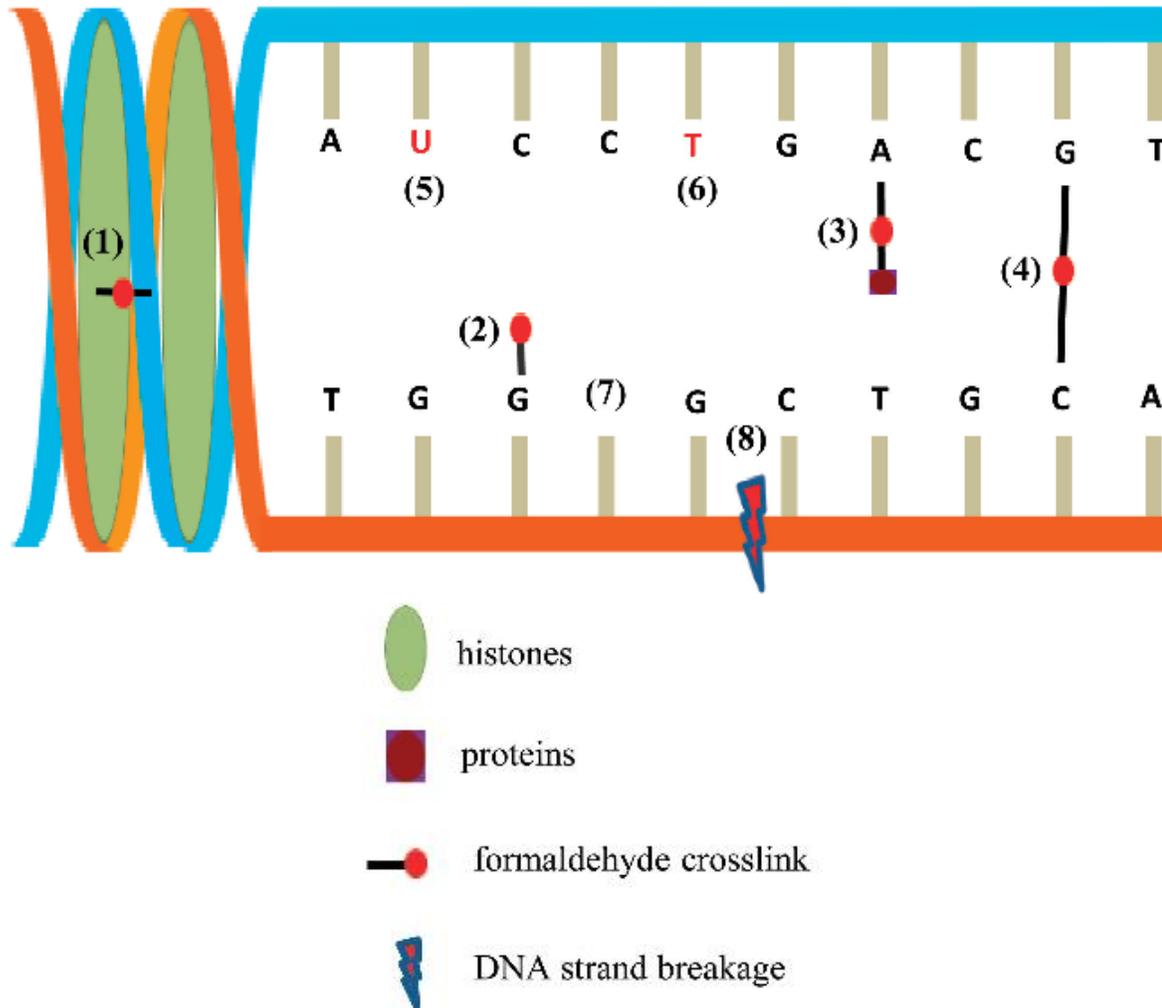


Aufarbeitung infektionspathologischer Fälle



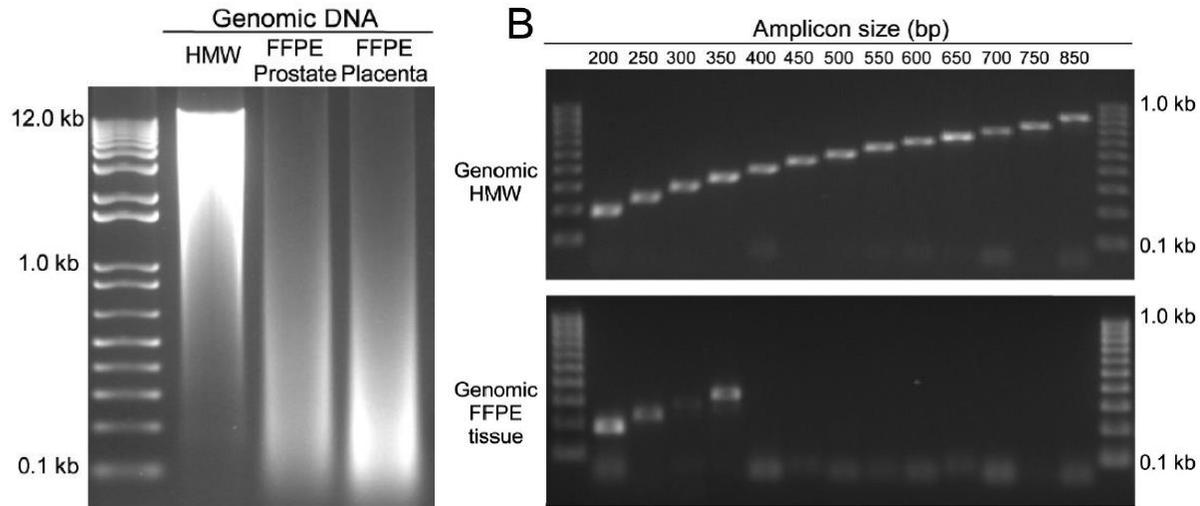
- Arztbericht, Symptome, Krankengeschichte, Fragestellung
- Probenvorbereitung
- Gewebe-Morphologie, Anzeichen für Infektion, Pathogene
- Reaktion des Körpers: Infiltrierende Immunzellen, Granulome, Nekrose etc.
- Gezielter Nachweis individueller Pathogene (z.B. CMV, EBV, ...)
- DNA und RNA Extraktion, Kontrolle von DNA / RNA Quantität und Qualität

Reaktionsfreudiges Formaldehyd



- Vernetzt die DNA mit Histonen¹ und anderen Proteinen³
- Bindet an² und vernetzt⁴ die DNA
- Führt zu Veränderungen der DNA-Sequenz^{5,6}
- Führt zu Brüchen im Einzel-⁸ und Doppelstrang
- Manche Veränderungen sind (zum Teil) reversibel
 - Inkubation bei höheren Temperaturen = De-Crosslinking oder Antigen Retrieval
 - Ausschneiden der Uracile mittels Uracil Dehydrogenase (UDG)

Formalin-induzierte Fragmentierung der DNA



Dietrich - 2013 - Improved PCR Performance Using Template DNA from FFPE Tissues by Overcoming PCR Inhibition

Proben in	2020	2021	2022
Kein Fragment	3%	2%	0%
max. 120bp	13%	9%	7%
max. 250bp	26%	29%	14%
max. 500bp	58%	60%	79%

- Formalin-induzierte Strangabbrüche limitieren die maximale Amplicon-Länge in einer PCR
- Der unterbrochene Strang steht für eine PCR an dieser Stelle nicht mehr zur Verfügung
- Bei Proben mit besonders fortgeschrittener Fragmentierung steigt die Gefahr von falsch-negativen Ergebnisse
- PCR zur DNA-Qualitätskontrolle: Was kann die Probe leisten?
- FFPE Artefakte in der DNA: Typische DNA-Veränderungen sind Folge von zu langer Formalin-Inkubation
 - Cytosin zu Uracil
 - 5-Methylcytosin zu Thymin
- Besonders anfällig sind kleine (Biopsie-) Proben

Aspekte beim Design einer PCR

Amplicon-Länge - Je länger, desto...
... mehr genetische Information
... desto einfacher die Identifikation
... desto höhere Anforderung an die DNA Qualität (Fragment-Länge)

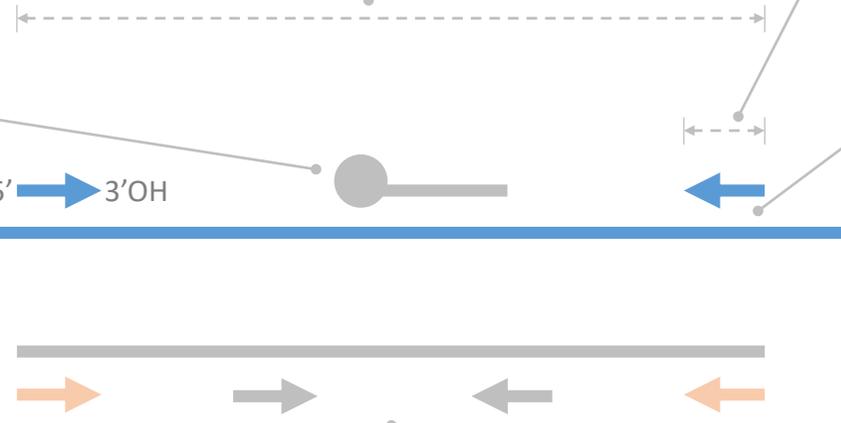
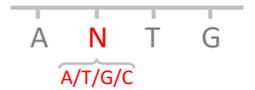
Qualitativ / Quantitativ
- Qualitativ: Einfaches Gel, Amplicon sequenzierbar, günstig
- Quantitativ: Schnell, Angaben zur Menge, spezielle qPCR Geräte, i.d.R. nicht sequenzierbar (z.B. TaqMan)

Primer-Modifikationen
- Polymerase «blind» für 5' Ende
- z.B. Fluorophore oder je nach Funktion zusätzliche DNA Sequenz (z.B. Restriktionsschnittstellen, universelle Primerbindungsstellen, NGS Adapter oder Barcodes, ...)

PCR: Easy to learn,
difficult to master

Primer-Länge - Je länger, desto...
... spezifischer
... mehr self-annealing
... mehr Sekundärstrukturen (z.B. loops & hairpins)

Primersequenz
- Präzise Sequenz vs «Wildcards» (degenerierter Code) = kompatibel zu einer oder mehreren Spezies
- Basenmodifikationen modulieren Bindungsstärke



PCR-Programm, Pufferbedingungen, Polymerase-Typ, ...

Step 1	95°C	2min	initial denaturation
Step 2	95°C	20sec	denaturation
Step 3	54°C	20sec	annealing
Step 4	72°C	45sec	elongation
Step 5	72°C	8min	final elongation
Step 6	4°C	hold	store

34x

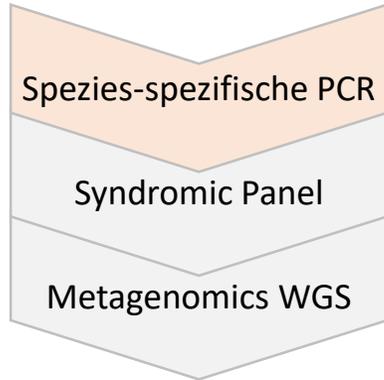
Aufeinanderfolgende PCRs
- PCR Produkt als Template für zweite PCR verwenden
- Mit innen liegenden Primern: höhere Spezifität (Ausschluss anderer Spezies)
- Mit denselben Primern: Sensitivität höher (Anstieg des Backgrounds)

Aufarbeitung infektionspathologischer Fälle



- Arztbericht, Symptome, Krankengeschichte, Fragestellung
- Probenvorbereitung
- Gewebe-Morphologie, Anzeichen für Infektion, Pathogene
- Reaktion des Körpers: Infiltrierende Immunzellen, Granulome, Nekrose etc.
- Gezielter Nachweis individueller Pathogene (z.B. CMV, EBV, ...)
- DNA und RNA Extraktion, sowie Kontrolle deren Quantität und Qualität
- Einzelne Spezies, sehr sensitiv (> 1 Genom), schnell (2-3 Tage), günstig
- Mehrere (40-96) Spezies oder Genera, sensitiv (> 1-10 Genome), 2-5 Tage
- «Alle» Spezies, limitierte Sensitivität (> 100 Genome), 5-10 Tage

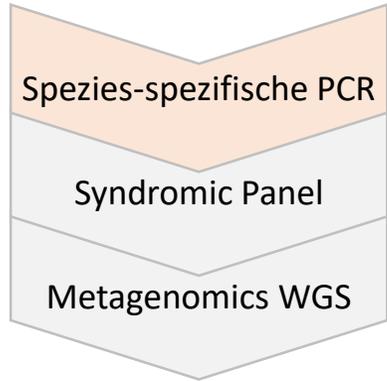
Spezies-spezifische PCRs an FFPE Gewebe



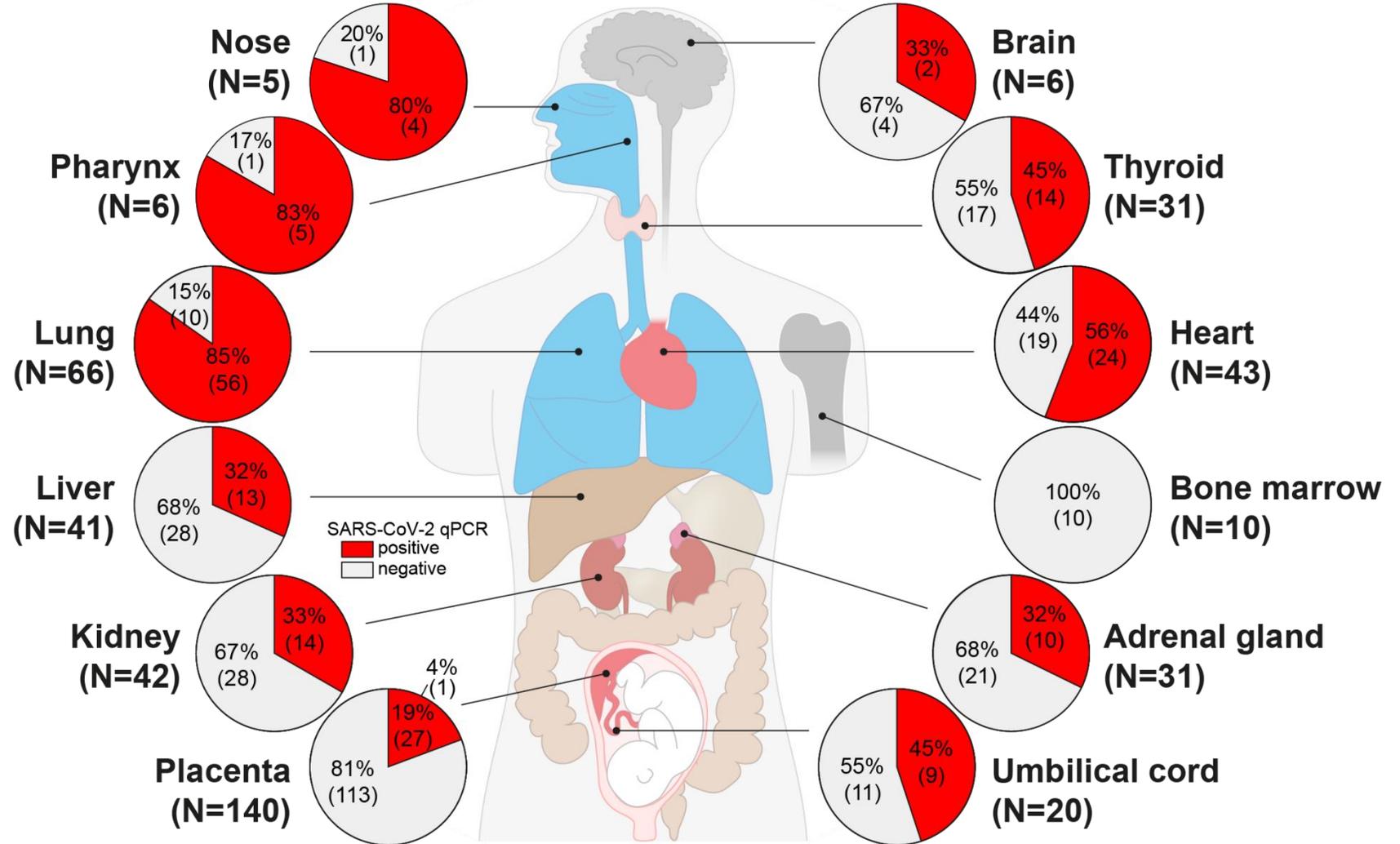
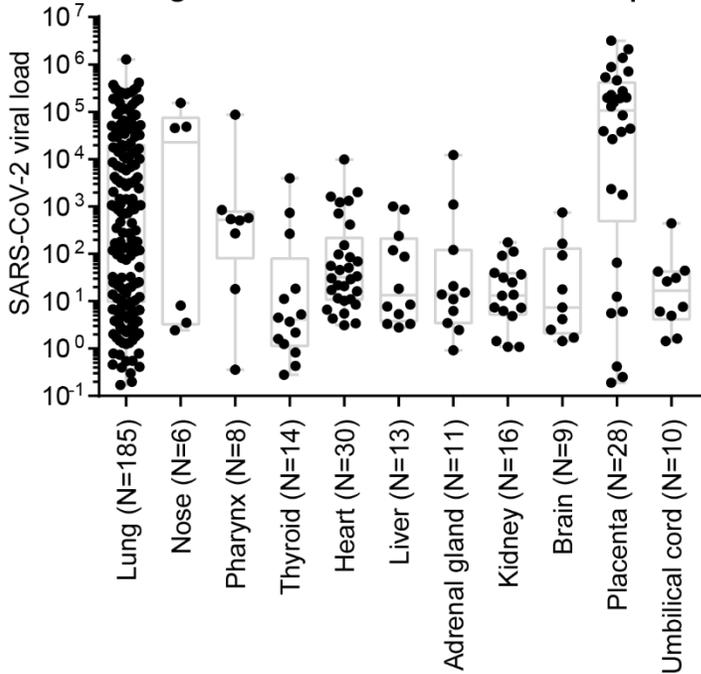
individuelle PCR Analysen	<input type="checkbox"/> Bartonella (quintana & henselae)	<input type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis	<input type="checkbox"/> Echinococcus species
	<input type="checkbox"/> Borrelia species	<input type="checkbox"/> Mycobacteria atypical	<input type="checkbox"/> Leishmania species
	<input type="checkbox"/> Brucella species	<input type="checkbox"/> Nocardia species*	<input type="checkbox"/> HPV Typisierung
	<input type="checkbox"/> Chlamydia (trachomatis & psittaci)	<input type="checkbox"/> Treponema pallidum (Lues)	<input type="checkbox"/> HSV1 & 2 Herpes Simplex Virus
	<input type="checkbox"/> F.tularensis species (Tularämie)	<input type="checkbox"/> Tropheryma whipplei	<input type="checkbox"/> HHV8 Human Herpesvirus 8
	<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori	<input type="checkbox"/> pan-bakterielle qPCR	<input type="checkbox"/> MCPyV Merkel-Zell-Polyomavirus
	<input type="checkbox"/> Resistenzen in H. pylori	<input type="checkbox"/> Aspergillus	<input type="checkbox"/> EBV Epstein-Barr Virus
	<input type="checkbox"/> Helicobacter heilmannii	<input type="checkbox"/> Mucor species (Mykosen)	<input type="checkbox"/> VZV Varizella-Zoster-Virus
	<input type="checkbox"/> Helicobacter species	<input type="checkbox"/> pan-fungale species	<input type="checkbox"/> CMV Zytomegalie-Virus
	<input type="checkbox"/> Yersinia (pseudotuberculosis & enterocolitica)		<input type="checkbox"/> SARS-COV-2
	<p><i>Die Bearbeitungszeit der individuellen PCRs beträgt ca. 2-3 Werktage</i></p> <p><i>"species"-Assays werden zur Identifikation der Spezies mittels Sanger sequenziert, Bearbeitungszeit daher ca. 4-5 Werktage</i></p>		

- Für definierte, eng gefasste Fragestellungen – z.B. «Ist Mycobacterium tuberculosis die Erklärung für die nekrotisierenden Granulome im vorliegenden Lungengewebe?»»
- Sensitiv und schnell, aber die Anzahl der durchführbaren Assays ist durch die verfügbare Probenmenge und Probenqualität begrenzt.
- Der Zugewinn medizinisch nützlicher Information steht und fällt mit der Erfahrung der Infektionspathologen, den richtigen Erreger (Assay) zu wählen.
- Seltene Infektionen werden verpasst.

Quantitativer SARS-CoV-2 Nachweis im Gewebe



Range of viral load in FFPE samples



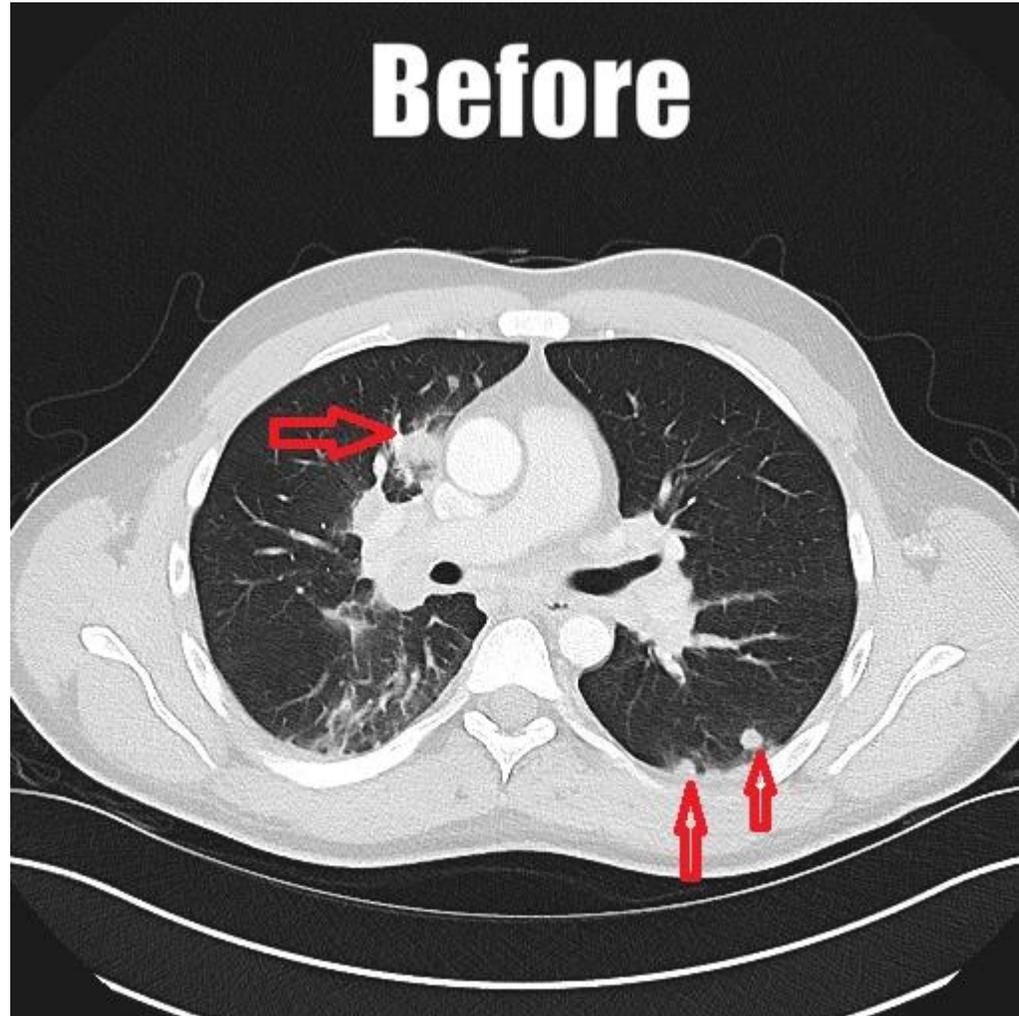
Infektion statt Lungentumor

Fallbeschreibung

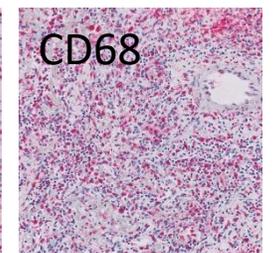
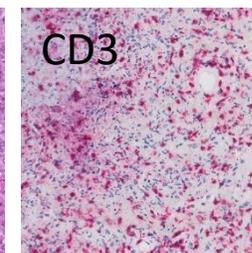
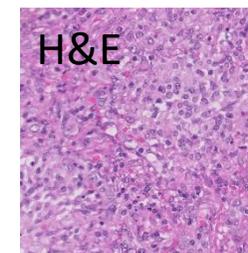
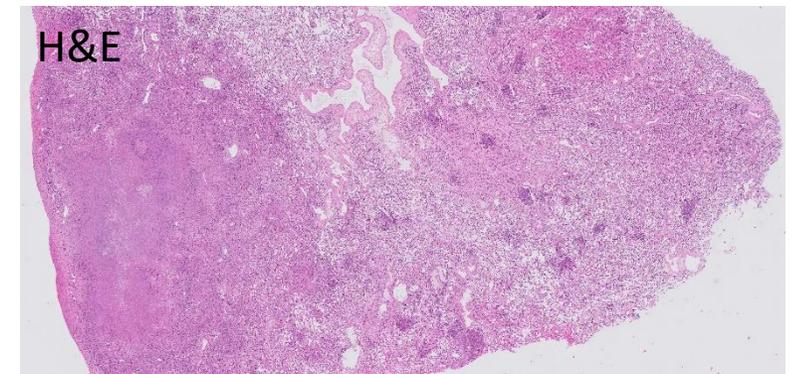
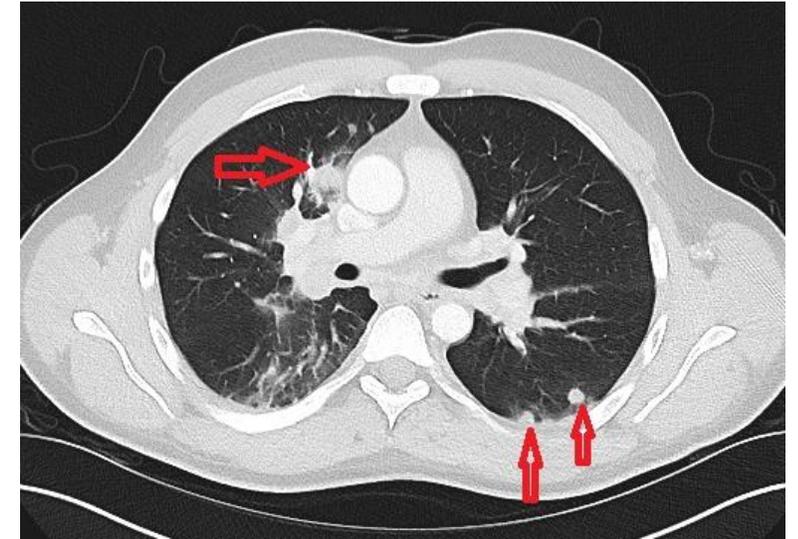
Histomorphologie

Spezies-spezifische PCR

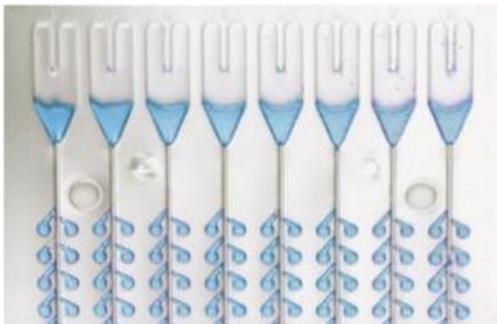
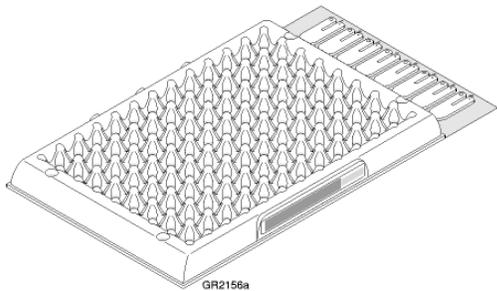
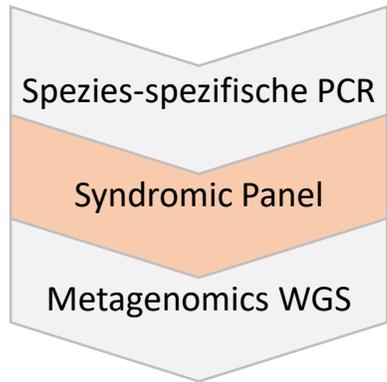
Pathologie Bericht



Francisella tularensis



Syndromic Panel Analysen



Respiratorische Erreger-Panel	<input type="checkbox"/> Corona- & Influenza-Panel <i>Bearbeitungszeit ca. 2-3 Werktage</i>		
	- Influenza A virus (pan)	- Human coronavirus 229E	- MERS
	- Influenza A virus (H1N1)	- Human coronavirus HKU1	- SARS-COV-1
	- Influenza A virus (H3N2)	- Human coronavirus NL63	- SARS-COV-2
	- Influenza B virus	- Human coronavirus OC43	
	<input type="checkbox"/> Bakterien- & Pilz-Panel <i>Bearbeitungszeit ca. 2-3 Werktage</i>		
	- Bordetella (pan)	- Haemophilus Influenzae	- Mycoplasma pneumoniae
	- Bordetella holmesii	- Klebsiella pneumoniae complex	- Staphylococcus aureus
	- Bordetella pertussis	- Legionella pneumophila	- Streptococcus pneumoniae
	- Chlamydophila pneumoniae	- Moraxella catarrhalis	- Pneumocystis jirovecii
<input type="checkbox"/> erweitertes Viren-Panel <i>Bearbeitungszeit ca. 2-3 Werktage</i>			
- Human coxsackievirus	- Human rhinovirus	- Mumps virus	
- Enterovirus D68	- Human adenovirus	- Human parainfluenza virus 1	
- Parechovirus	- Human metapneumovirus	- Human rubulavirus 2	
- VZV Varizella-Zoster-Virus	- Human respiratory syncytial virus A	- Human parainfluenza virus 3	
- EBV Epstein-Barr Virus	- Human respiratory syncytial virus B	- Human parainfluenza virus 4a+b	
- CMV Zytomegalie-Virus	- Measles virus, genotype D8 & H1	- Human bocavirus	
- Human betaherpesvirus 6B (HHV6)			

- Fragestellungen können «offener» formuliert werden (z.B. anhand der Symptomatik des Patienten)
- Antworten (Set detektierbarer Spezies) sind vordefiniert
- Möglichkeit von «unerwarteten» Entdeckungen

COVID-19 Verdacht – aber bakterielle Infektion

Fallbeschreibung

- Männlich, 73 Jahre
- Hämorrhagische Pneumonie
- Kardiale Dekompensation
- Ende 2020, mitten in der 2. Welle der COVID-19 Pandemie

Histomorphologie

- Lungengewebe zeigt deutliche Anzeichen einer Infektion

Spezies-spezifische PCR

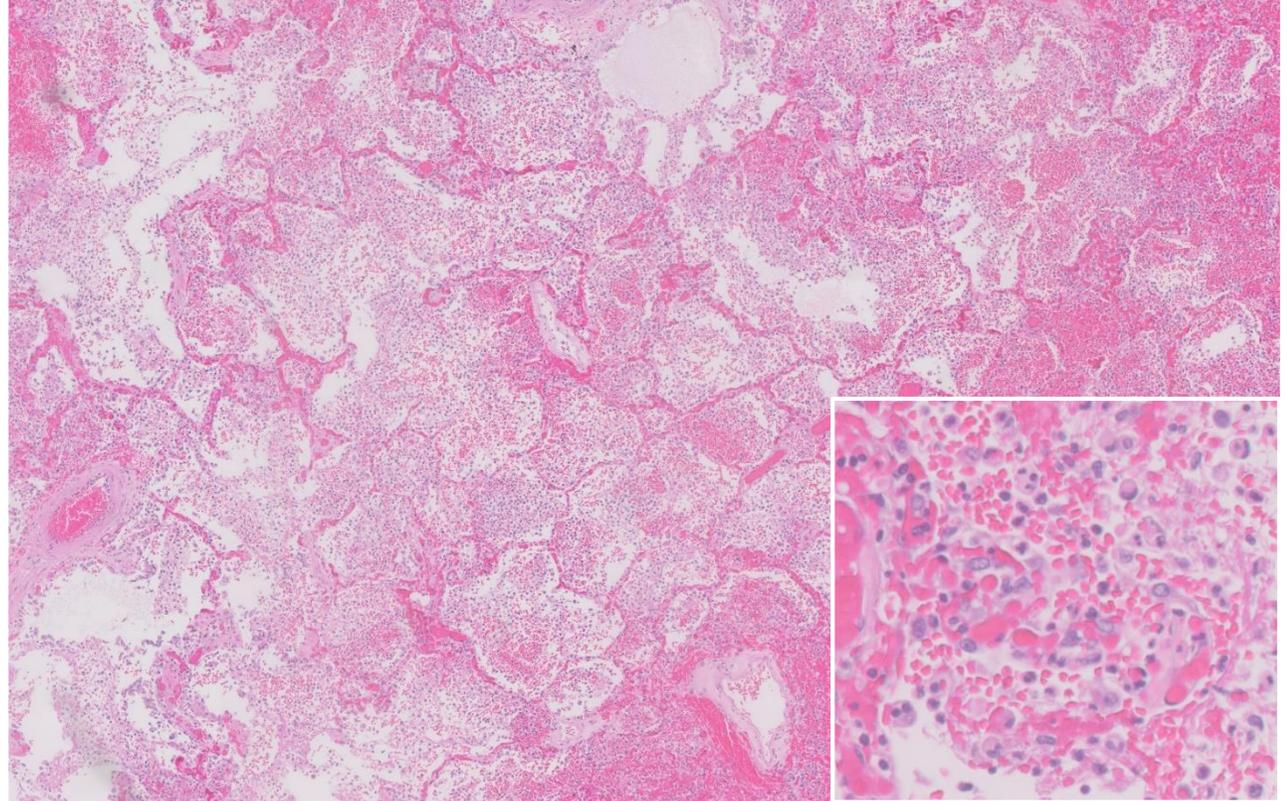
- SARS-CoV-2 PCR negativ

Syndromic Panel

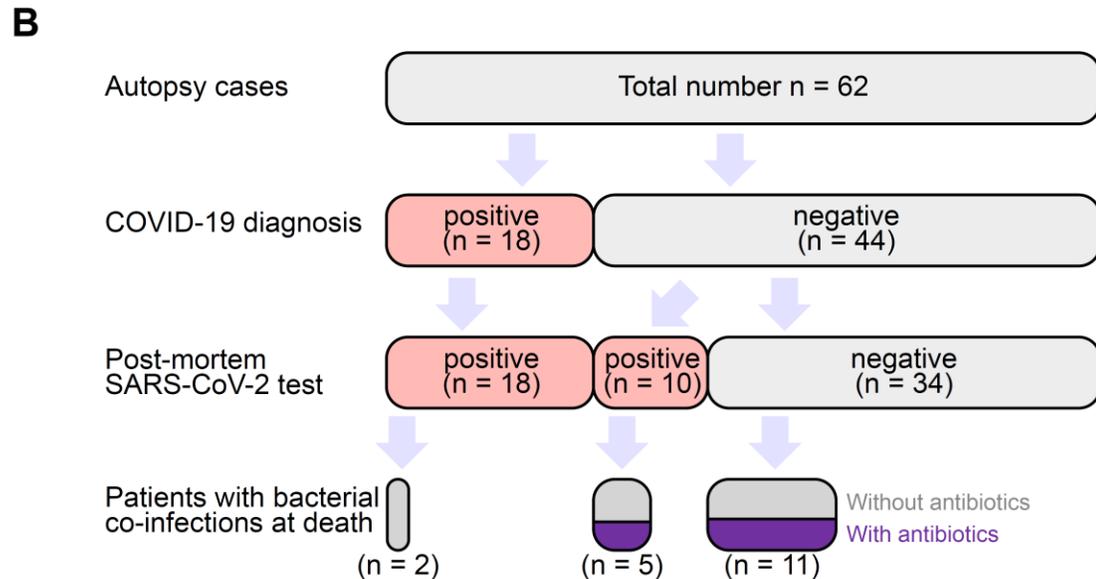
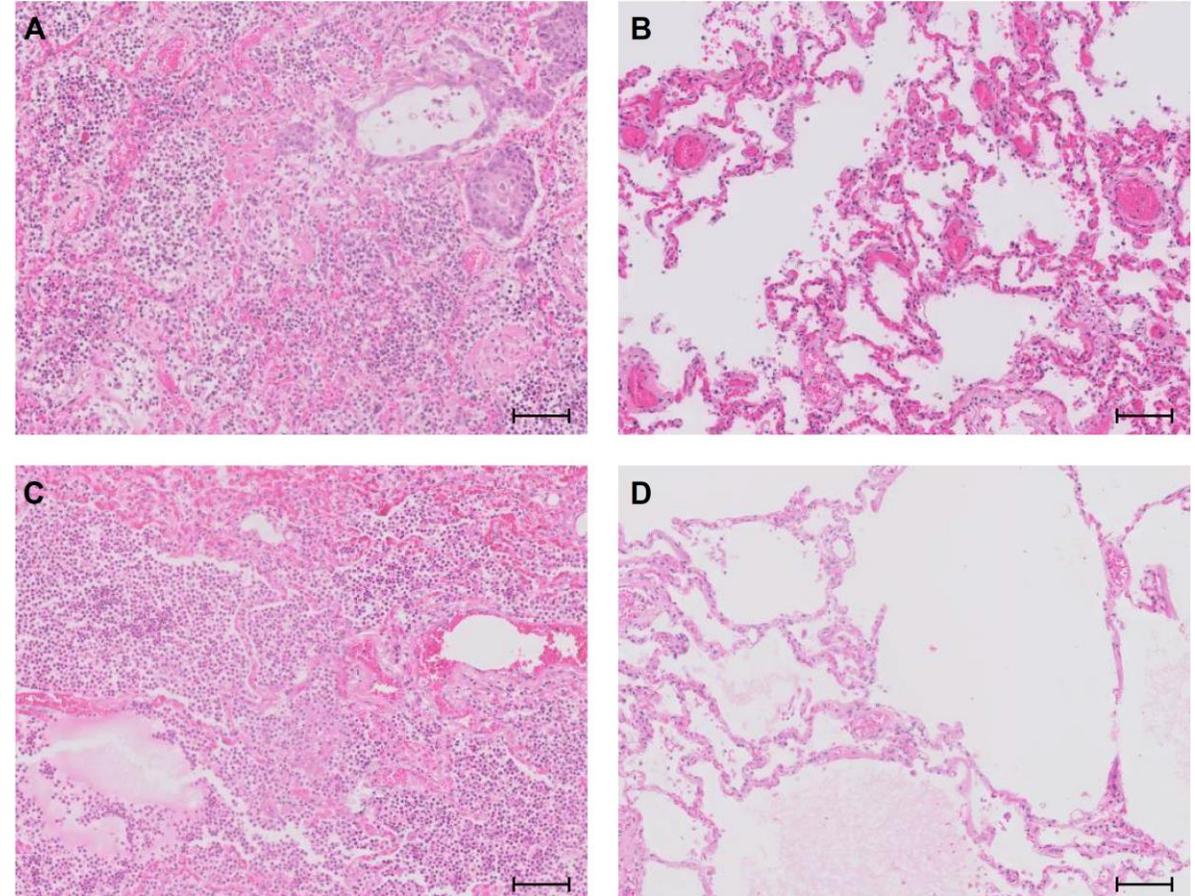
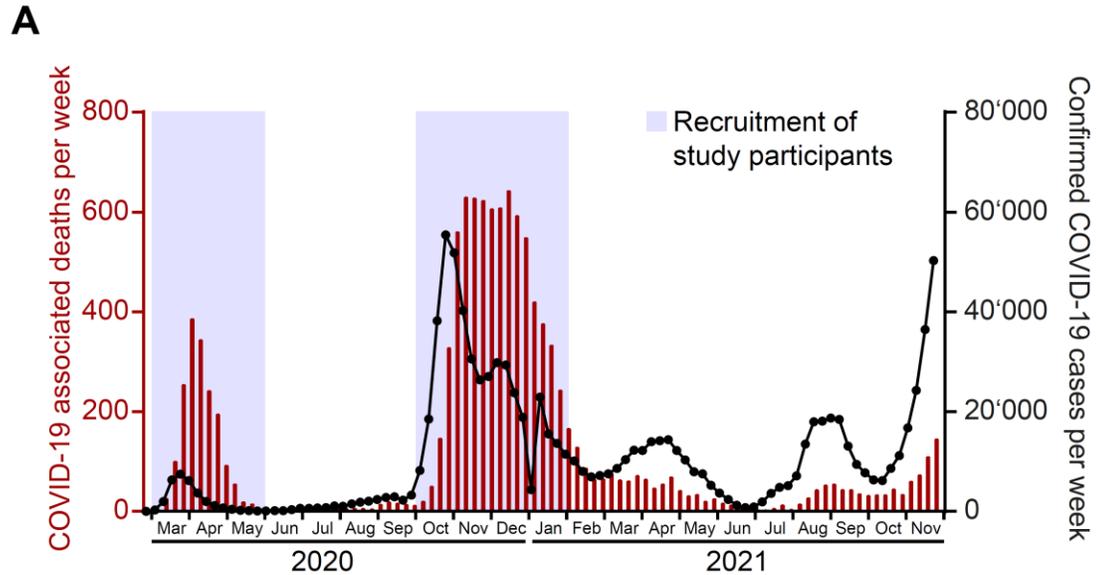
- Validierung der negativen SARS-CoV-2 PCR: Infektion mit *Legionella pneumophila*

Pathologie Bericht

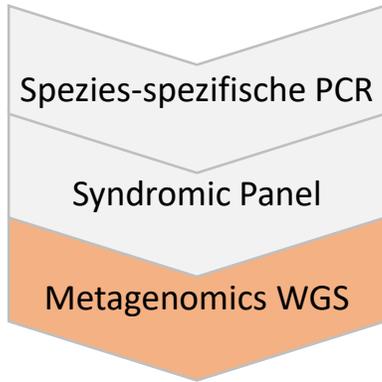
- Fazit: Verpasste Legionellose
- Information an Kantonsarzt, Suche von Infektionsherden, Frage nach Typisierung



Kein COVID-19 Verdacht – aber SARS-CoV-2 Infektion



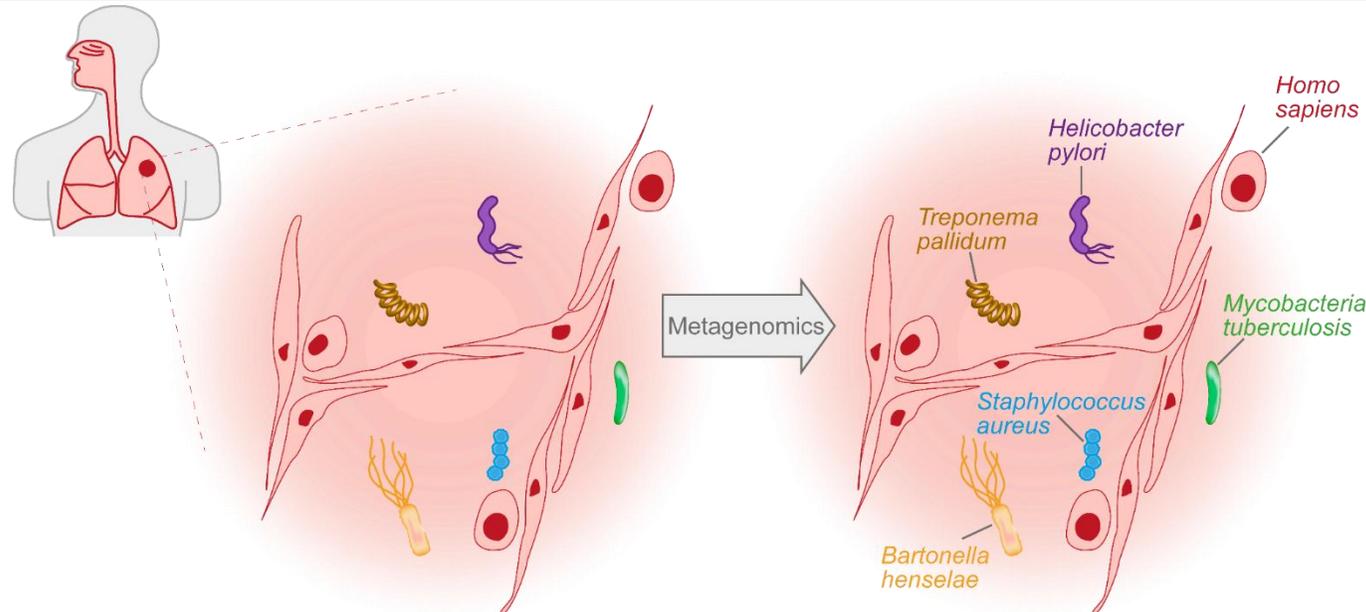
New Kid on the (FFPE) Block: Metagenomics WGS



NGS

□ Metagenomics* - pan-bakterielles & pan-virales NGS

Deckt ca. 5'000 pathogene Bakterienspezies und bis zu 10'000 DNA-basierte Viren ab, Durchführung 1x pro Woche



- Offene Fragestellung, Hypothesen-freie & Ergebnis-offene Analyse
- PCR-frei und dadurch ohne Bias durch Amplifikation, aber auch reduzierte Sensitivität
- Möglichkeit zur Validierung von PCR Ergebnissen
- Regelmässig «unerwartete» Resultate
- Prüfung der Plausibilität mittels Vergleich der vorhandenen klinischen Daten: «Kann die detektierte Spezies für die Histomorphologie verantwortlich sein?»

Infektion statt Lungentumor

08.2019

12.2019

01.2020

03.2021

Erstdiagnose durch Hausarzt:

- 71jährig, weiblich
- Gewichtsverlust von 20kg innerhalb 5 Monate
- CT Abdomen unauffällig aber Unterlappen-Infiltrat pulmonal rechts
- Keine B-Symptomatik, Dyspnoe, Husten oder Auswurf
- Nikotinstopp zirka 1975, kumulativ 10 py

Bronchialsekret (rechts):

- Keine Anhaltspunkte für Malignität
- Granulozytär entzündliches Zellbild

Lunge (UL rechts):

- Keine Anhaltspunkte für Malignität
- Atypische kleinzellige Infiltrate
- Tumordinfiltrate sind nicht nachweisbar
- CT Thorax zeigt persistierendes Unterlappen-Infiltrat

Bronchialsekret (rechts):

- Keine Anhaltspunkte für Malignität
- Reichlich neutrophile Granulozyten

Bronchialbürstenabstrich (rechts):

- Keine Anhaltspunkte für Malignität
- Vereinzelt fragliche Granulome

Bronchus (UL rechts):

- Keine Anhaltspunkte für Malignität
- Vereinzelt fragliche Granulome
- Gemischtes lymphozytäres Infiltrat

- PCR negativ für *Mycobacterium tuberculosis*
- PCR negativ für *Mycobacterium species*
- PCR negativ für *Francisella tularensis*

Lunge (UL rechts):

- Vermehrte Alveolarmakrophagen
- Unschärf begrenzte intraalveoläre Granulome
- Ausbildung von Riesenzellen
- Prominente peribronchiale Metaplasie
- Kein Nachweis einer lymphoproliferativen Erkrankung
- In Zusatzfärbungen kein Hinweis für eine spezifische Infektion.

- Vorstellung des Falles an Tumorboard

- PCR negativ für *Mycobacterium tuberculosis*
- PCR negativ für *Mycobacterium species*
- PCR-Array negativ für 42 respiratorische Erreger

Metagenomics : *Tropheryma whipplei*

- PCR positiv für *Tropheryma whipplei*

- PCR positiv für *Tropheryma whipplei*

- PCR positiv für *Tropheryma whipplei*

Mycobacterium avium

Fallbeschreibung

- Weiblich, 4 Jahre, submandibuläre nekrotisierende granulomatöse Lymphadenitis
- Frage nach nicht-tuberkulösen Mykobakterien

Histomorphologie

- H&E zeigt verkäsende Granulome
- Ziehl-Neelson Färbung für säurefeste Stäbchen (Mykobakterien) an einem Lymphknoten ist negativ

Spezies-spezifische PCR

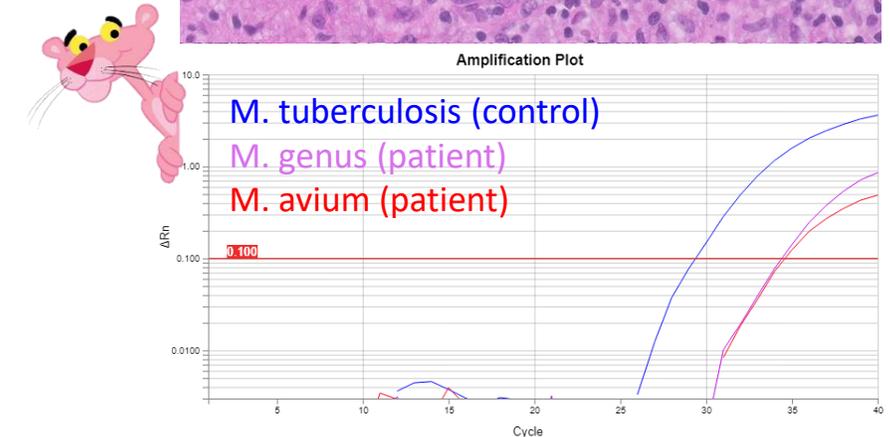
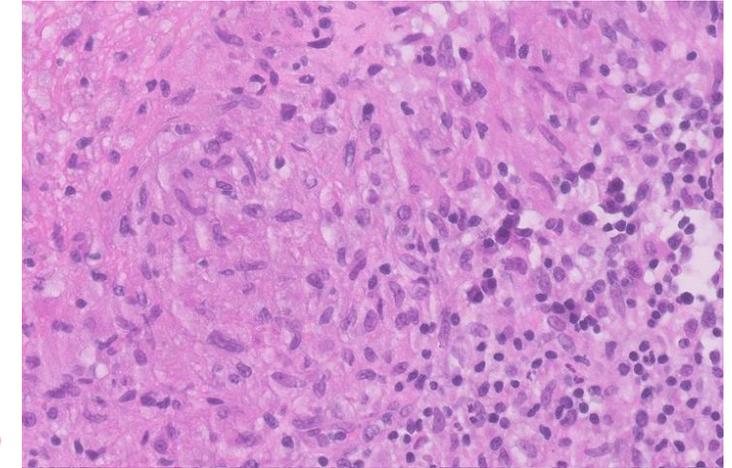
- Quantitative PCR schwach positiv für *M. genus* (Ct 35) und *M. avium* (Ct 34)
- Patientin negativ für *M. tuberculosis*

Metagenomics WGS

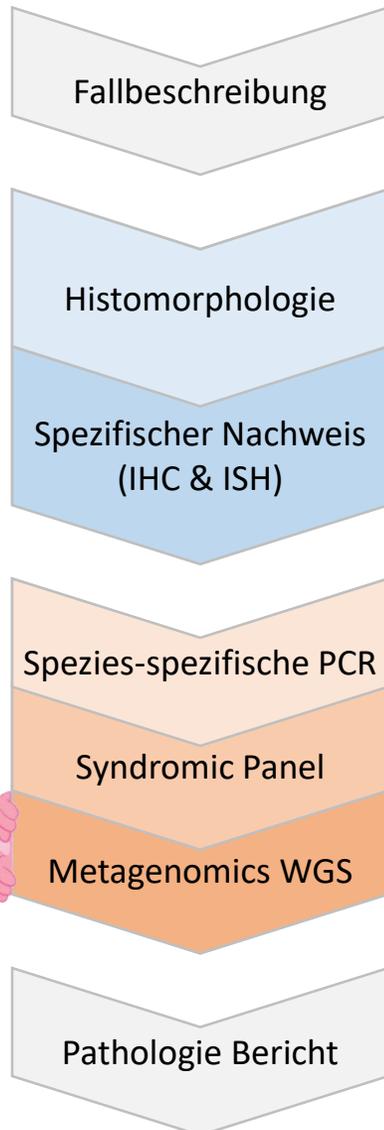
- Die Metagenomics Analyse zeigt als einzige pathogene Spezies *Mycobacterium avium* an (126 *M. avium* Reads in 19'000'000 Reads)

Pathologie Bericht

- Ein derart schwaches Signal ist äusserst selten bei *M. avium* Infektionen.
- Abschliessende Beurteilung: Probe positiv für *M. avium*



Aufarbeitung infektionspathologischer Fälle



- Arztbericht, Symptome, Krankengeschichte, Fragestellung
- Probenvorbereitung
- Gewebe-Morphologie, Anzeichen für Infektion, Pathogene
- Reaktion des Körpers: Infiltrierende Immunzellen, Granulome, Nekrose etc.
- Gezielter Nachweis individueller Pathogene (z.B. CMV, EBV, ...)
- DNA und RNA Extraktion, sowie Kontrolle deren Quantität und Qualität
- Einzelne Spezies, sehr sensitiv (>1 Genom), schnell (2-3 Tage), günstig
- Mehrere (40-96) Spezies, sensitiv (>1-10 Genome), 2-5 Tage
- «Alle» Spezies, limitierte Sensitivität (>100 Genome), 5-10 Tage
- Korrelation der molekularen Resultate, Abgleich mit klinischen Vorbefunden
- Synoptische Berichte, bei Bedarf mit Erläuterungen



Wir helfen gerne ...

Molekularpathologen

Gieri Cathomas, Kirsten Mertz, Veronica Zsikla

- Medizinische Interpretation der Resultate
- Planung von Studien & Forschungsprojekten

Molekularpathologie-Labor

- Was können wir aus einer Probe herausholen?
- Biologie hinter NGS Ergebnissen erläutern
- Verarbeitung von Studienproben
- Technische Fragen klären

pathologie@ksbl.ch

Sekretariat: 061 925 26 20



**Kantonsspital
Baselland**