

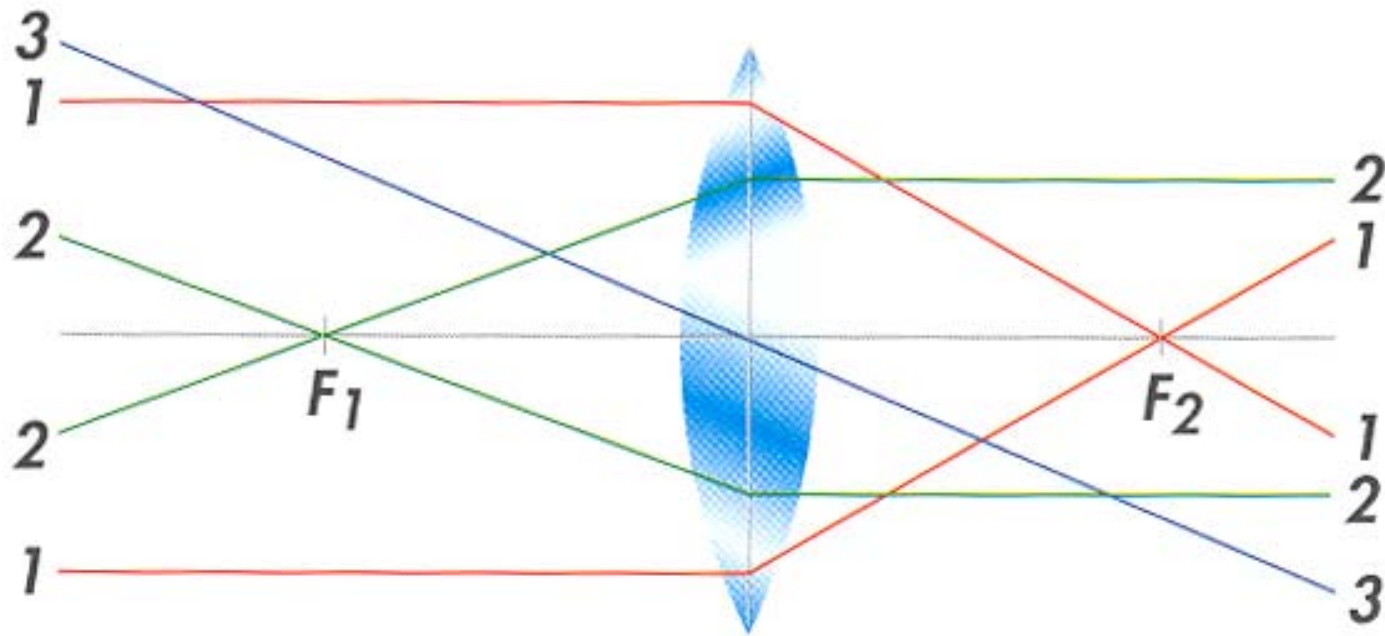
Histologie

**Vorlesung für das
7. Semester**

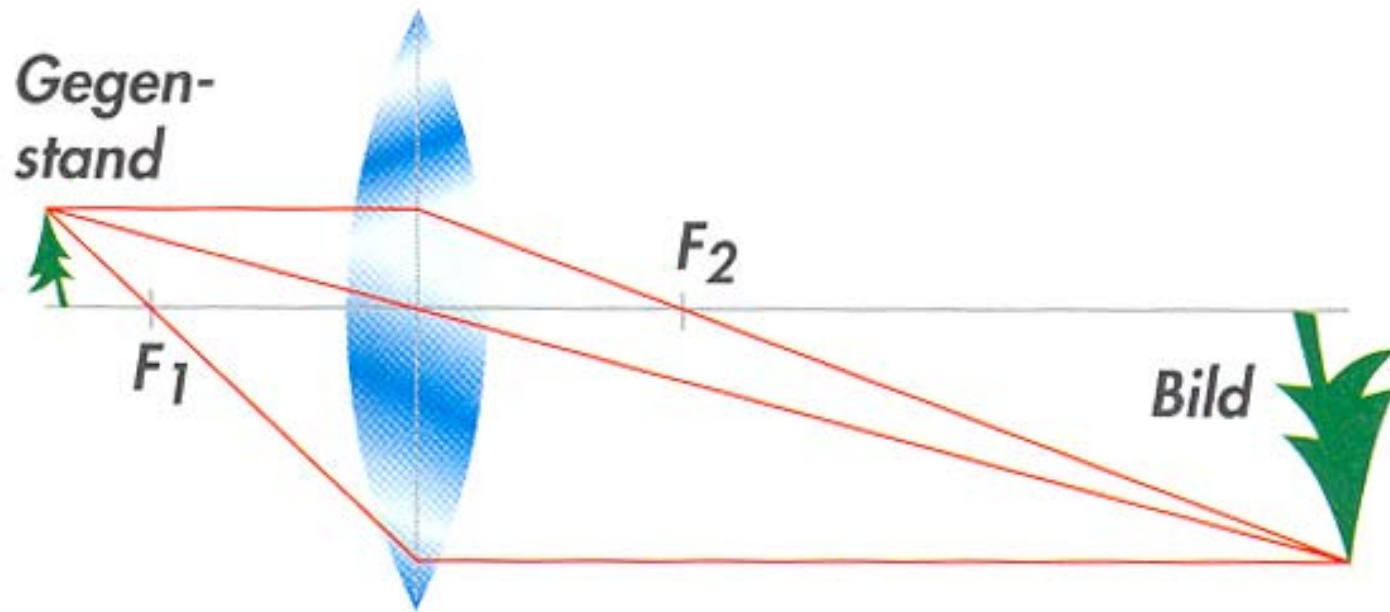
Dr. Tanja Grünewald

- **Mikroskopieren für Anfänger**
 - **Theorie zur Mikroskopie**
 - **verschiedene Mikroskopierverfahren**
- **Rechtliche Grundlagen der Histologie**
- **Anfertigen von Schnitten**
- **Färbungen**
- **Quantitative und qualitative Analyse**
- **Beispiele**
- **Problematik und Nachweis von Hartseparatorenfleisch in Wurstwaren**

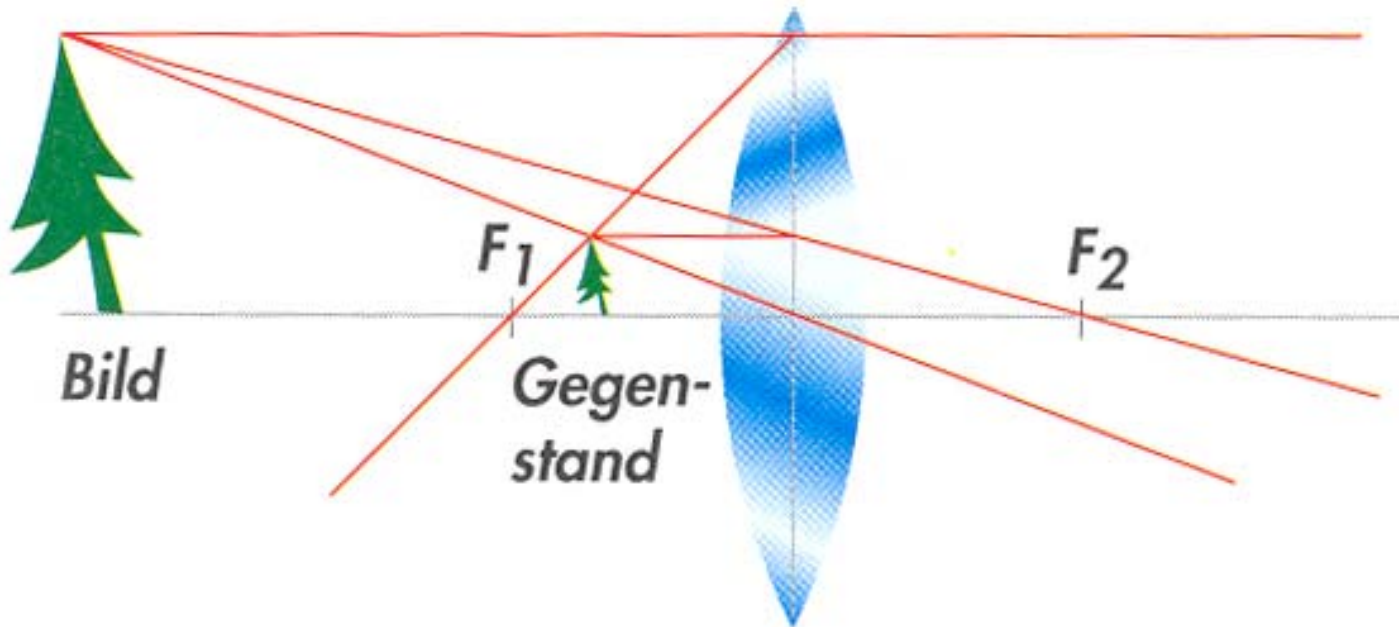
Strahlengang Sammellinse



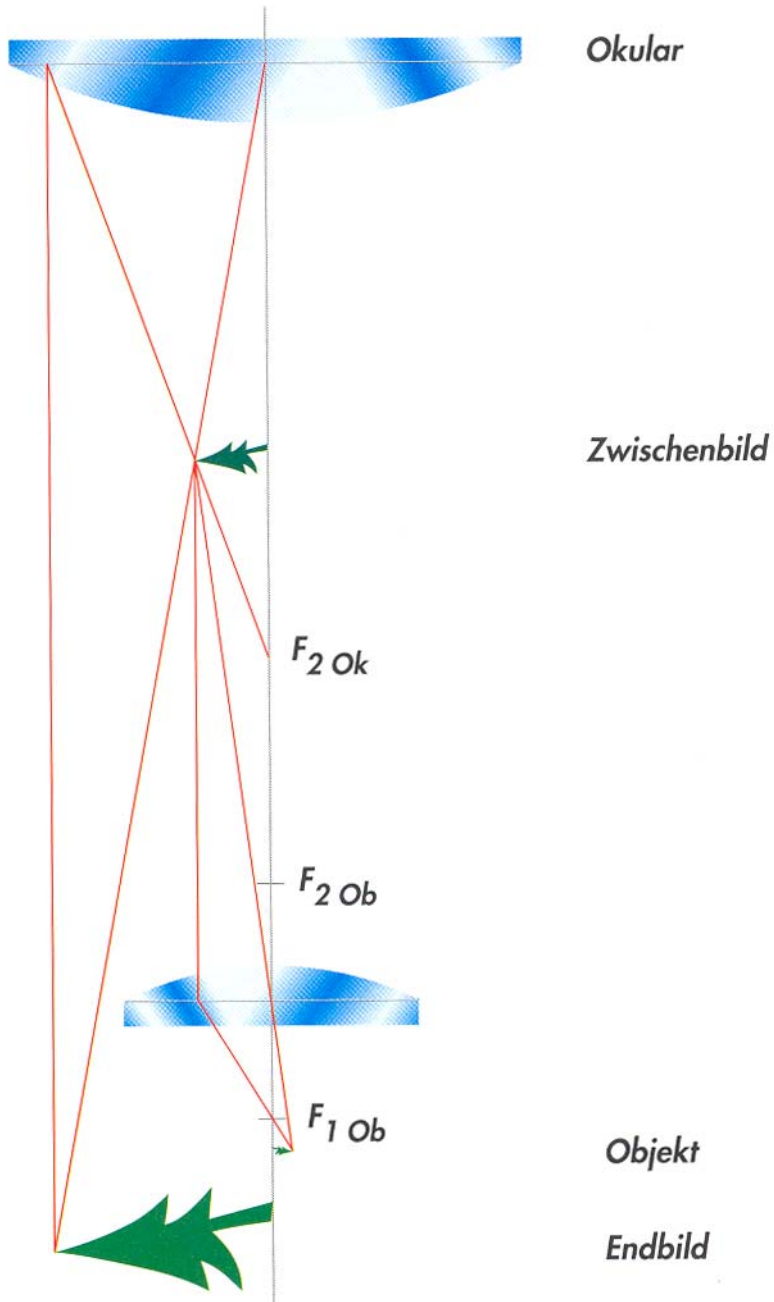
Strahlengang Projektionsobjektiv



Strahlengang Lupe



Strahlengang Mikroskop

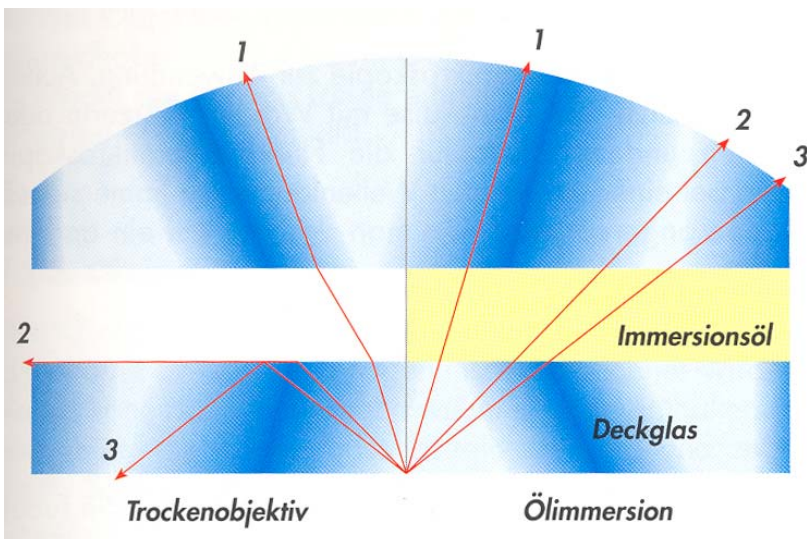


Objektive



numerische Apertur =
Maßeinheit für die Lichtstärke
der Objektive

$$A = n \cdot \sin \alpha$$



Vom Ausmaß der numerischen Apertur hängt die Auflösung ab, die mit dem jeweiligen Objektiv zu erzielen ist.

num. Apertur \uparrow \Rightarrow Auflösung \uparrow

Aus der Formel ergibt sich, dass man die numerische Apertur auf zwei Wegen steigern kann:

- 1) Vergrößerung des Winkels α
- 2) indem man zwischen Präparat-oberfläche und Objektivfrontlinse ein Medium bringt, das einen höheren Brechungsindex als Luft aufweist

\Rightarrow Trockenobjektive

\Rightarrow Immersionsobjektive

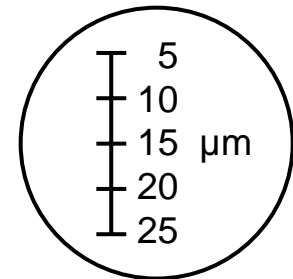


Alle Okulare besitzen eine Linse oder ein Linsensystem, das dem Auge des Betrachters zugewandt ist und als „Augenlinse“ bezeichnet wird.

Dies Augenlinse hat die Funktion einer Lupe.

Darüber hinaus kann das Okular noch weitere Linsen enthalten, z.B. eine Feldlinse, die am unteren Ende des Okulars sitzt und der Vergrößerung des Gesichtsfeldes dient.

- ⇒ zusätzliche Vergrößerung des Zwischenbildes
- ⇒ Begrenzung des Gesichtsfeldes
- ⇒ bringt Austrittspupille auf die richtige Höhe
- ⇒ evtl. Nutzung für Messungen (in der Lochblendenebene eingebaute Glasplatte mit Messskala)



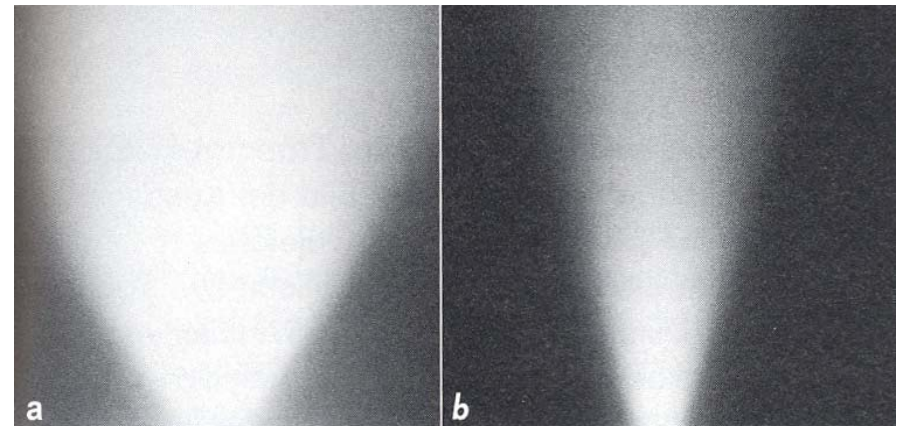
Hellfeldmikroskopie - Kondensator

Kollektivlinsensystem zwischen Lichtquelle und Kondensator ist vom Hersteller fest justiert und liefert ein scharfes Bild der Lampenwedel in der Kondensatorblendenebene

⇒ Voraussetzung für korrekte Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung

Kondensator gewährleistet richtige Größe des Gesichtsfeldes und Beleuchtung mit der korrekten numerischen Apertur

Das Licht tritt aus dem Kondensator in Form eines Kegels hervor, dessen Öffnungswinkel mit Hilfe der Kondensatorblende vergrößert oder verkleinert werden kann.



Der Durchmesser einer überblickten Fläche eines mikroskopischen Präparates hängt von der Maßstabszahl des Objektivs und der Sehfeldzahl des Okulars ab ⇒ die Köhler'sche Beleuchtung erlaubt es, ein Feld von genau diesem Durchmesser zu beleuchten und den Rest dunkel zu belassen

⇒ optimaler Kontrast

⇒ beste Ausleuchtung

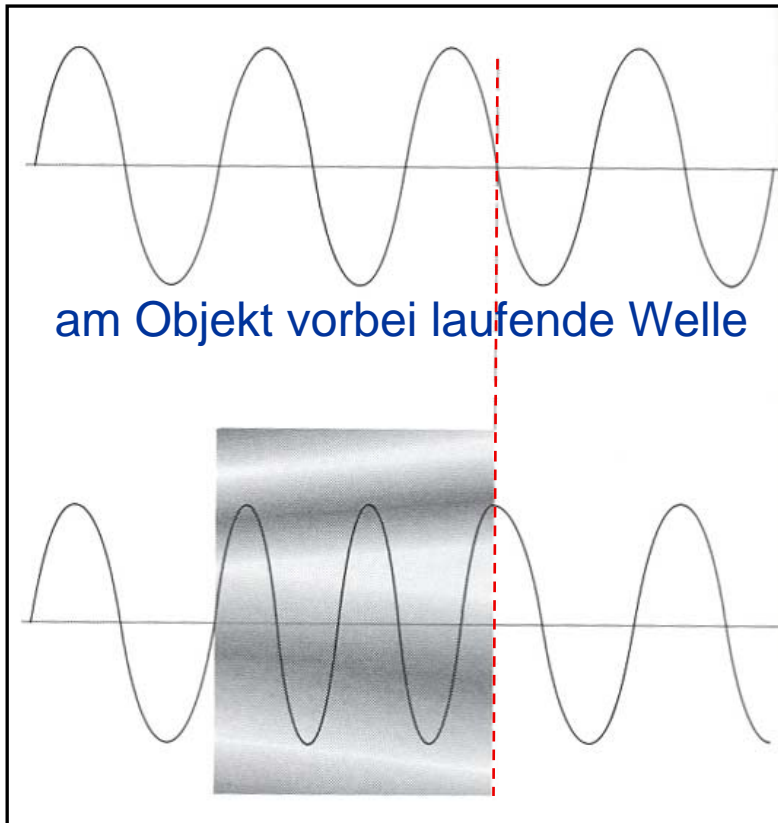
sehr gut geeignet für:

- ⇒ sehr dünne Schnitte ($< 5 \mu\text{m}$)
- ⇒ ungefärbte Schnitte
- ⇒ kontrastarme Objekte
- ⇒ einzelne Zellen oder Objekte, die sehr feine Strukturen aufweisen

man benötigt allerdings:

- ⇒ spezielle Phasenkontrast-Objektive
- ⇒ spezielle Phasenkontrast-Kondensatoren

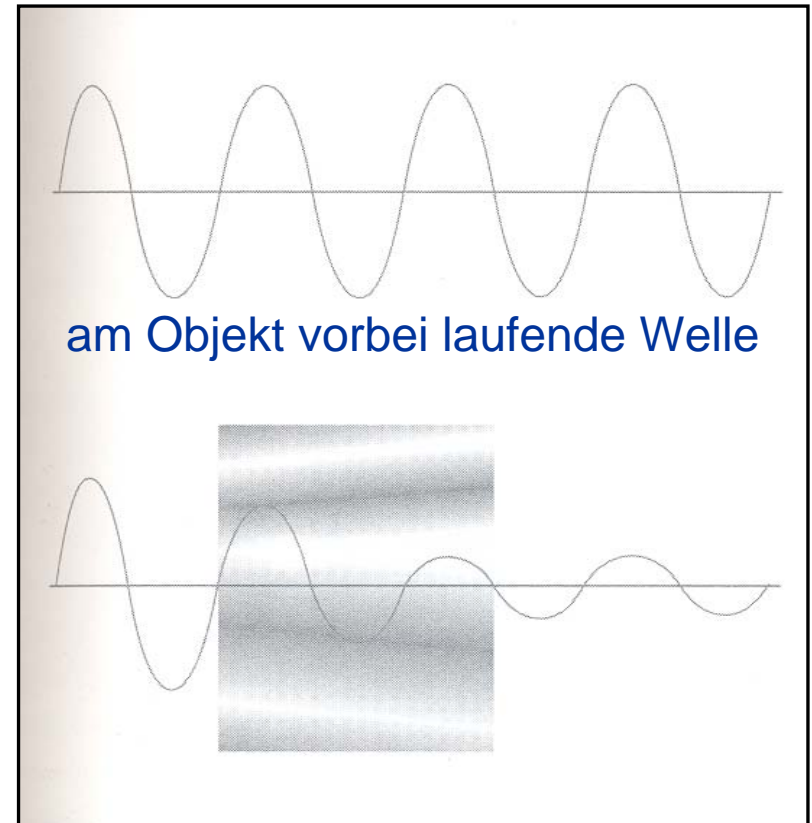
Phasenkontrastmikroskopie



Phasenobjekt

höherer Brechungsindex als die Umgebung - verschiedene Phasen können vom menschlichen Auge nicht unterschieden werden

Umwandlung in

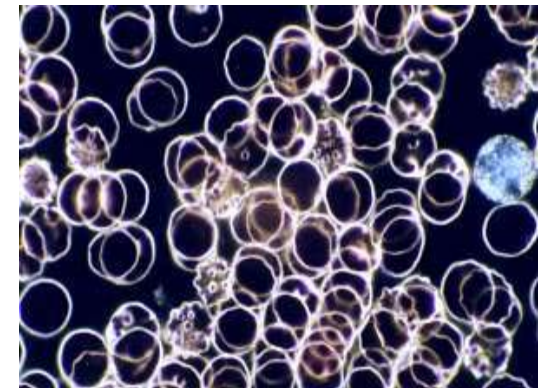


Amplitudenobjekt

gleicher Brechungsindex wie die Umgebung - verschiedene Amplituden können vom menschlichen Auge wahrgenommen werden = Unterschiede in der Helligkeit

sehr gut geeignet für:

- ⇒ Untersuchung kleiner Objekte, die in geringer Konzentration in dünnen Präparaten vorliegen
- ⇒ es werden aber nur die Kanten der Objekte dargestellt
- ⇒ Brechungsindex der Objekte muss von dem des Einschlußmediums verschieden sein



Blutausstrich, DF

nicht geeignet für:

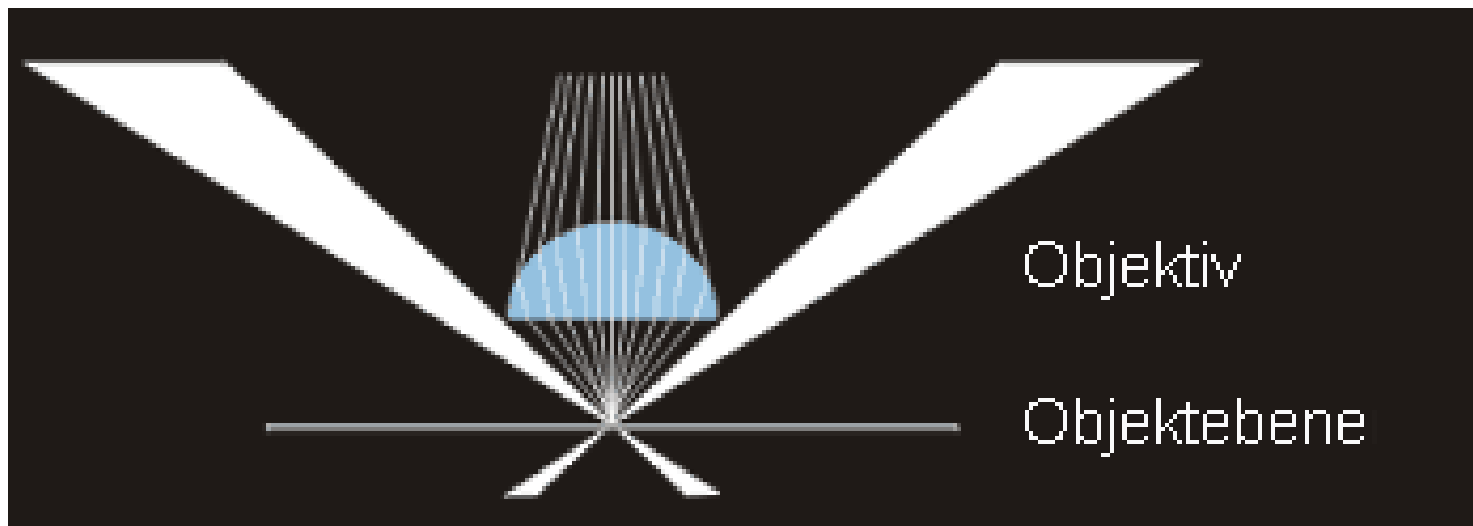
- ⇒ Untersuchungen an Schnitten durch Organe sowie an dicken Objekten

**Im Dunkelfeld wird mit einem Kegelmantel beleuchtet.
Die Spitze dieses Kegelmantels liegt in der Objektebene.
Befindet sich kein Präparat im Strahlengang, so gelangt
kein Mikroskopierlicht in das Okular und beim Blick in
das Mikroskop erscheint ein völlig dunkles Bild.**



Wird ein Objekt in den Strahlengang des Dunkelfeld-Mikroskops gebracht, so gelangt ein Teil des am Präparat abgelenkten Lichts in das Objektiv.

Auf diesem Licht basiert die Bildentstehung im Dunkelfeld-Mikroskop.



Histologie

Histos = griech. *Gewebe*

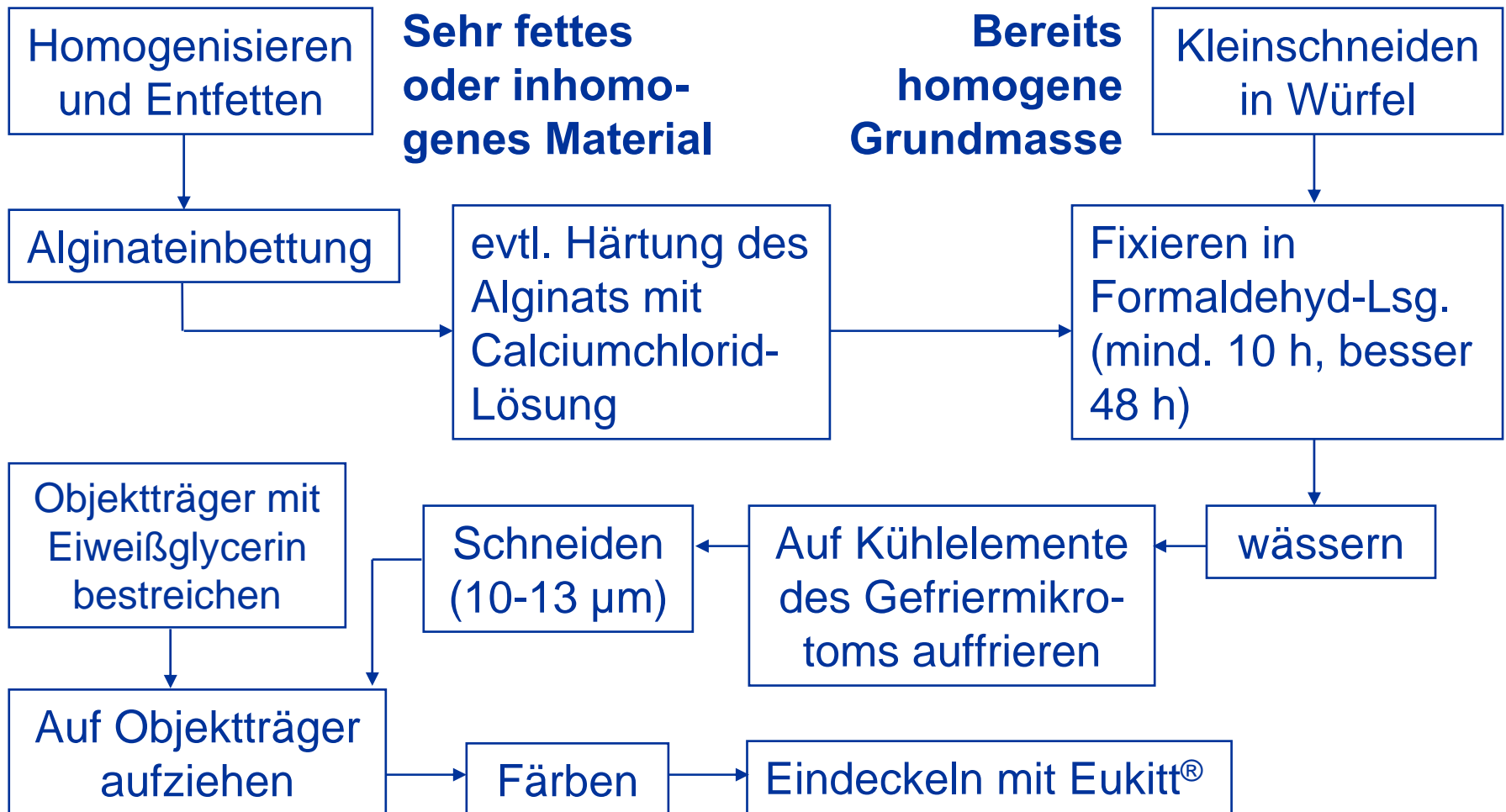
logos = griech. *Lehre*

= **Die Lehre von den Geweben**

Rechtliche Grundlagen

- Untersuchungen nach **§ 35 LMBG** (amtliche Untersuchungsverfahren)
- **§ 17 LMBG** (Täuschung des Verbrauchers)
- **§ 8 LMBG** (Verbote zum Schutz der Gesundheit)
- Deutsches Lebensmittelbuch - **Leitsätze** (Zusammensetzung von Fleischerzeugnissen)

Anfertigen von Schnitten



Ausgangsmaterialien

- **bereits homogene Grundmasse** z.B. Brühwürste (Wiener, Mortadella...)
 - ⇒ kann sofort in Formalin fixiert werden

- **sehr fettes oder inhomogenes Material** z.B. Rohwurst, Leberwurst, Hackfleisch...
 - ⇒ muss zuvor zerkleinert, entfettet und homogenisiert werden

Fleischerzeugnisse müssen **analysenfest** sein, d.h. z.B. in chemisch-analytischer Hinsicht den Anforderungen entsprechen (Wasser, Fett, BEFFE).

2.221.03 *Wiener, Bockwurst, Würstchen, Saftwürstchen, Cocktailwürstchen, Dünne, Münchner Dampfwurst, Saitenwürstchen, Bouillonwürstchen, Fleischwürstchen, Jauersche, Knobländer*

Ausgangsmaterial: grob entsehntes Rindfleisch (1.112)
 fettgewebsreiches Schweinefleisch (1.123)
 Speck (1.212)

Besondere Merkmale: fein zerkleinert; Bouillonwürstchen und Jauersche teilweise etwas gröber; umgerötet; engkalibrig

Analysenwerte: BEFFE nicht unter 8 %
 BEFFE/FE histometrisch nicht unter 70 Vol-%
 chemisch nicht unter 75 %

Fleischerzeugnisse dürfen in ihrer **geweblich-substantiellen Zusammensetzung** nicht von der Verkehrsauffassung abweichen.

2.414 Von Knochen, Schwarte (1.312) und sichtbarem Fettgewebe (1.21) befreite Rohschinken (2.41) enthalten selbst im weichsten (zentralen) Magerfleischanteil Wasseranteile von nicht mehr als

- 65 % bei Knochenschinken (ausgenommen Katen-, Tennen-, Dielen-(Deelen)schinken, Katenrauchschinken), Rinderrrauchfleisch, Schwarzwälder Schinken (...)
- 68 % bei Rohschinken (...)
- 70 % bei Roll- oder Nussschinken, Blasenschinken, Schinkenspeck, Karbonadenschinken, Schinkenecken, Eckschinken
- 72 % bei Lachsschinken und Lachsfleisch

Nicht alle beim Schlachten gewonnenen und für tauglich befundenen **Tierkörper Teile** dürfen nach Art und Menge freizügig zu Fleischerzeugnissen verarbeitet werden.

1.61 Folgende Tierkörper Teile werden nicht in Fleischerzeugnissen verarbeitet ³⁾

- Häute von Wiederkäuern, ausgenommen die unter 1.312 genannten Teile;
- Nackenband und große Gefäßstämme von Rindern;
- Knochen und Knorpel, sofern sie nicht üblicherweise Bestandteil des Erzeugnisses sind (z.B. Knochenschinken sowie technologisch nicht vermeidbare Knorpelreste beim Schweinebauch)
- Därme;

³⁾ Anlage 1 Kapitel IV Nr. 10 und 11 der FIHV in der jeweils geltenden Fassung

- Harnblase einschließlich Harnröhre;
 - Gekröse einschließlich Netzfettgewebe;
 - Hirn;
 - Rindermilz;
 - Rückenmark;
 - Fibrin, das vom Blut getrennt worden ist;
 - Dickblut, das bei der Blutplasma-Herstellung anfällt;
 - Kesselfett oder Knochenfett, das nicht nach Nr. 1.22 dem Fettgewebe gleichgestellt ist;
 - Schleimhaut
- Der Nachweis derartiger Tierkörperanteile (v.a. Innereien) erfolgt i.d.R. mit histologischen Methoden!

Färbungen

In der amtlichen Methode nach § 35 LMBG sind **12 Färbungen** erwähnt.

1. Methylenblau-Färbung: Zur Darstellung von Gewebsstrukturen
2. Haematoxylin-Eosin-Färbung: zur Darstellung von Gewebsstrukturen
3. Calleja-Färbung: zur Darstellung des kollagenen Bindegewebes

4. Heidenhain'sche Azanfärbung: (modifiziert nach Kotter), (= AOE = Anilinblau-Orange-Eisessig) zur Darstellung des verleimten Kollagens
5. Van Gieson-Färbung: (ohne Kernfärbung) zur Darstellung des nativen Kollagens
6. Elastika-Färbung nach Hart: zur Darstellung des elastischen Bindegewebes
7. Silbernitrat-Imprägnierung nach Kossa: (modifiziert nach Königsmann) zur Darstellung von Knochen

8. Trichromfärbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra: zur Darstellung von Muskel-eiweiß, Kollagen und mineralisch behaftetem Knochen
9. Alciangrün-Färbung: zur Darstellung von hyalinem Knorpel
10. Trichromfärbung nach Charvat: zum Nachweis wiederverarbeiteter Brühwurst
11. Lugol'sche Färbung: zur Darstellung von Stärke
12. Färbung nach Bauer und Calleja: zur Darstellung der Kohlenhydratkomponenten in TVP (textured vegetable protein)

Amtliche Methode - Histologie (§ 35 LMBG)

- **Qualitative** histologische Untersuchung (Feststellung der geweblich-substantiellen Zusammensetzung)
- **Quantitative** histologische Untersuchung (Quantitative Bestimmung einiger Gewebekomponenten = Histometrie, z.B. BEFFE, Knochensplitter)

Amtliche Methode - Histologie (§ 35 LMBG)

7.2. Mikroskopische Untersuchung

7.2.1 Qualitative histologische Untersuchung

Der Untersucher hat sich zunächst bei den sechs angefertigten Schnitten nach Abschnitt 7.1.4 mit dem **schwachen Trockensystem** (etwa 20fache Vergrößerung) einen **Überblick** zu verschaffen, aus welchen Komponenten die Probe besteht. **Insbesondere** ist zu beachten, **ob unzulässige Bestandteile** verarbeitet wurden. Können – auch bei stärkerer Vergrößerung – verdächtige Gewebekomponenten **nicht eindeutig identifiziert** werden, sind **weitere Präparate** zu untersuchen. Während der qualitativen Auswertung soll der Untersucher zugleich einen **Eindruck der Häufigkeit** der einzelnen Gewebsarten gewinnen.

Amtliche Methode - Histologie

(§ 35 LMBG)

7.2. Mikroskopische Untersuchung

7.2.2 Quantitative histologische Untersuchung

Ergibt sich im Verlauf der qualitativen histologischen Untersuchung der **Verdacht**, dass der **Gehalt** einer oder mehrerer Gewebekomponenten **nicht den Anforderungen entspricht**, so ist der Befund durch eine **histometrische Analyse** zu erhärten. Bei der praktischen Durchführung empfiehlt sich jeweils ein horizontaler und vertikaler Treffervorschub von 1 mm, damit die Unabhängigkeit zwischen den ausgewerteten Gewebstreifen, die jeweils eine Stichprobeneinheit bilden, gewährleistet bleibt. Leerstellen werden nicht registriert, weil sie keinerlei Information über die Zusammensetzung der Grundgesamtheit enthalten.

Amtliche Methode - Histologie (§ 35 LMBG)

8 Auswertung

8.2 Quantitative histologische Untersuchung

8.2.1 Orientierende Auswertung

Überwiegend – > 50 %

In reichlicher Menge

In mittlerer Menge

In mäßiger Menge

In geringer Menge – regelmäßig 1 Partikel pro Schnitt

Vereinzelt – niedrigere Anteile als „in geringer Menge“

Amtliche Methode - Histologie

(§ 35 LMBG)

8.2.2 Statistische Auswertung histometrischer Ergebnisse

Bezugsgrundlage bildet die Anzahl der ausgezählten Gewebepunkte, wobei für den einzelnen Treffer eine **alternative Merkmalsprägung** unterstellt wird, z.B. Bindegewebe – *bindegewebsfreies Fleischeiweiß* (= „Nicht-Bindegewebe“) oder *Knochen - Fleischeiweiß* (= „*Nicht-Knochen*“).

Wenn bei jeder Stichprobe nur zwei Ergebnisse möglich sind und Unabhängigkeit zweier aufeinander folgender Ereignisse besteht, stellt die Bernoulli- oder **Binominalverteilung** ein zutreffendes Modell der Merkmalstruktur dar.

Amtliche Methode - Histologie

(§ 35 LMBG)

8.2.2.1 Intervallschätzung des mittleren Komponentenanteils

Berechnung mittels Auszählen und Formel (...)

8.2.2.2 Geschlossene Sequentialpläne mit normierter Hundert-Treffer-Strategie

Bestehen **verbindliche Qualitätsstandards** für eine Gewebskomponente, ist mit Hilfe der histometrischen Analyse zu überprüfen, **ob die zu untersuchende Probe die Norm erfüllt** oder den Ansprüchen nicht genügt („Gut-Schlecht-Entscheidung“). Hierfür eignen sich besonders die sequentiellen Verfahren, da sie Entscheidungen mit durchschnittlich minimalem Stichprobenumfang ermöglichen.

n	$a(n)$	$r(n)$
100	100	66
200	183	149
300	266	233
400	349	316
500	432	399
600	515	482
700	598	565
800	681	648
900	764	731
1000	847	814
1100	930	897
1200	1013	980
1300	1096	1063
1400	1180	1146
1500	1263	1229
(...)		
2500	2077	2076

Tabelle für Grenzanteil für BEFFE von $p = 0,85$

n = ausgezählte Punkte

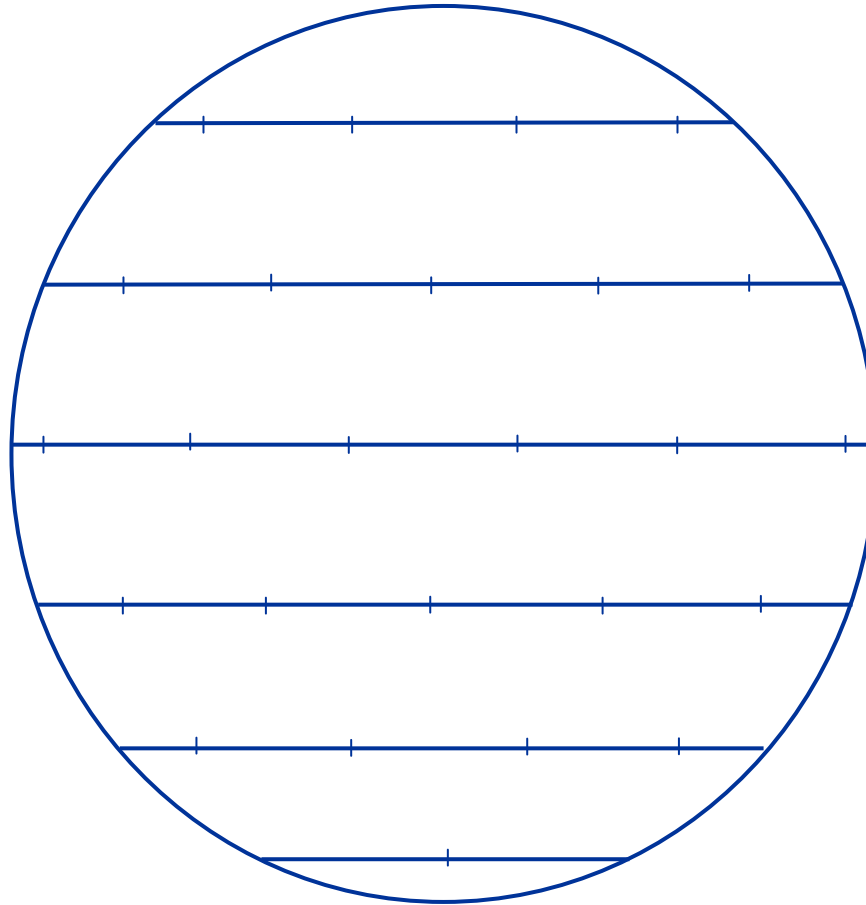
$a(n)$ = Annahmezahl = BEFFE in der Probe liegt $> 85\%$

$r(n)$ = Rückweisezahl = BEFFE in der Probe liegt $< 85\%$

$\alpha = 0,01$ = Produzentenrisiko, d.h. das ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Produkt abgelehnt wird, der Komponentenanteil aber über p liegt

$\beta = 0,01$ = Konsumentenrisiko, d.h. das ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Produkt angenommen wird, der Komponentenanteil aber unter p liegt

25 – Punkte – Okular – Schablone



25 – Punkte – Okular – Schablone

Es wurde eingesandt: ein Schweinefuß, Stück Schwarte

Herkunft: wurde bei einer Betriebskontrolle bei einem Bauern im Schweinestall in einem Futtertrog gefunden

Fragestellung:

roh oder gekocht ?

Warum ist das wichtig?

gekocht = Verfütterung von Speiseabfällen = Ordnungswidrigkeit

roh = Verfütterung von Schlachtabfällen = Straftat (Verurteilung ⇒ Vorstrafe oder Gefängnis!)

Durchführung:

HE - Färbung und Heidenhain'sche Azanfärbung (modifiziert nach Kotter)

Durchführung:

Fuß wurde in zwei Hälften gesägt, die eine Hälfte gekocht, die andere so belassen wie sie war ⇒ Vergleich

Ergebnis: Heidenhainsche Azan-Färbung:
gelb bis mischfarben gelb-blau = nicht
verleimtes Bindegewebe ⇒ hier der Fall!
rein blau = verleimtes (kollagenes)
Bindegewebe

Haematoxylin-Eosin-Färbung:
typische native Struktur aus kollagenen
Bindegewebsfasern. Erst das im Institut vor-
genommene Erhitzen führte zum Aufquellen
bzw. Verleimen der kollagenen Bindegewebs-
fasern (⇒ strukturlose homogene Areale).

Schweinefuß war roh ⇒ Fall ging vor Gericht!

Problematik:

Hartseparatorenfleisch in Wurst und Fleischerzeugnissen

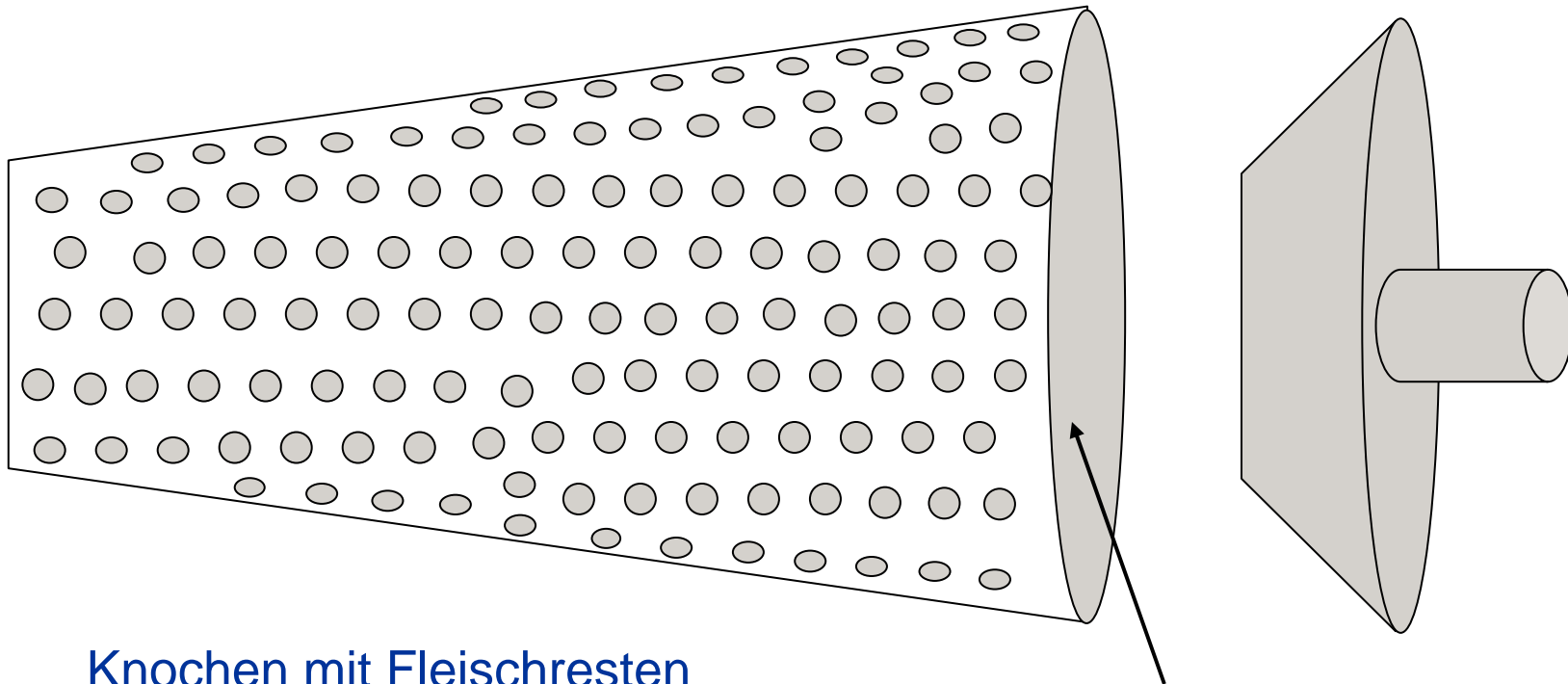
Hartseparatorenfleisch:

Erzeugnis, das durch maschinelle Ablösung des nach dem Entbeinen noch am Knochen anhaftenden Fleisches so gewonnen wird, dass die Zellstruktur des Fleisches zerstört wird.

Herstellung von Hartseparatorenfleisch

- nach manuellem Entbeinen immer noch bis zu 30% Restfleisch auf den fleischtragenden Knochen
- ohne weitere Behandlung dieser Knochen wirtschaftliche Verluste
- reines manuelles Ablösen des Restfleisches zu arbeitsintensiv und damit zu teuer

Hartseparator- schematisch



Knochen mit Fleischresten
wird von innen gegen die Löcher
gepresst → Fleisch quillt vor nach
außen → Messer schaben es ab

Fleisch mit noch
anhaftendem
Knochen

Hartseparatorenfleisch von Rindern...

Risikomaterial WS !!
Spinalganglien !!



...

Verbot der Gewinnung von
Separatorenfleisch von Knochen von Rindern, Schafen und Ziegen!

(EG-Verordnung 270/2002 vom 14.02.2002)

Nachweisverfahren

- ☞ **Histologie:** Anfärben und Auszählen der Knochenpartikel (Trichromfärbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra)
- ☞ **AAS:** Bestimmung des Calcium-Gehaltes
- ☞ **Serologie:** Nachweis von ZNS

Bis jetzt gibt es keine rechtlichen Beurteilungskriterien für die Anzahl der Knochenpartikel oder des Calciumgehaltes!!