Weiterführende Informationen

Referenzzentren / Expertenlaboratorien

Als fachlich qualifizierte Ansprechstellen gelten praktisch alle parasitologischen und tropenmedizinischen Institutionen, z. B.

- Robert Koch Institut, Nordufer 20; 13353 Berlin
- Umweltbundesamt, Postfach 33022; 14191 Berlin

Web-Adressen

- Deutsche Gesellschaft für Parasitologie e.V.: <http://www.dgparasitologie.de> (hier auch interessante Links)
- WHO (World Health Organisation): <http://www.who.int>
- Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit: <http://www.dtg.org>
- CDC (Center for Disease Control and Prevention): <http://www.cdc.gov>

Schlüsselliteratur

1. Dettner K, Peters, W (Hrs.) (1999) Lehrbuch der Entomologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
2. Garcia LS (2001) Diagnostic Medical Parasitology, 4th edn. ASM Press, Washington

3. Kettle, DS (ed) (2000) Medical and Veterinary Entomology. CABI Publishing
4. Krauss H, Weber A, Enders B, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner H (1997) Zoonosen. Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten, 2. Aufl. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
5. Mehlhorn H (2001) Encyclopedic Reference of Parasitology, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
6. Mehlhorn H, Eichenlaub D, Löscher T, Peters W (1995) Diagnostik und Therapie der Parasitosen des Menschen, 2. Aufl. Fischer-Verlag, Stuttgart

Ekzema herpeticum

- Herpes-simplex-Virus (HSV)

Elefantiasis

- Brugia
- Wuchereria

Elektronenmikroskopie in der Erregerdiagnostik

HANS R. GELDERBLOM

Einleitung

Visualisierung als diagnostisches Prinzip

Mit der Studie „Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis“ legte Robert Koch (1843–1910) 1876 das Fundament der wissenschaftlichen Infektiologie. Unter Anwendung der später als Koch'sche Postulate bezeichneten experimentellen Strategie beschrieb er und seine Schüler in kurzer Folge Bakterien als die Erreger einer Reihe gefürchteter Seuchen (Tuberkulose 1882; Diphtherie Loeffler, 1883; Cholera 1884; Typhus Gaffky, 1884; Tetanus Kitasato, 1889). Die Ätiologie einer Infektion galt als gesichert, wenn ein morphologisch, durch Form und Anfärbbarkeit definierter Keim (1.) konstant im erkrankten Gewebe nachgewiesen wurde, (2.) wenn er in Reinkultur isoliert werden konnte, und wenn (3.), das Isolat im Versuchstier die ursprüngliche Krankheit wieder auslöste. Wesentliche Voraussetzung zur Begründung der ätiologischen Rolle von Bakterien war die Einführung von Nährböden für ihre Anzucht und Isolierung – kombiniert mit einer sehr fortschrittlichen, über Ölimmersion, Mikrophotographie und Temperierkammer verfügbaren Lichtmikroskopie und dem Einsatz von Laboratoriumstieren. Das neue Wissen um die Ursache gefürchteter Seu-

chen zeitigte ungeheuren Optimismus: Manchem Zeitgenossen schien das Ende gesundheitlicher Bedrohungen gekommen. Doch kaum drei Jahrzehnte später war erkannt, dass es neben den im Lichtmikroskop darstellbaren Bakterien noch viele andere Infektionserreger bei Mensch, Tier und Pflanze geben musste, die sich weder auf den bewährten Nährböden anzüchten noch im Lichtmikroskop darstellen ließen. Das infektiöse Prinzip, z. B. der Maul- und Klauenseuche und der Tabak-Mosaik-Krankheit, wurde auch nicht von bakteriendichten Filtern zurückgehalten und ließ sich nicht durch Zentrifugation sedimentieren. Die so „negativ“ charakterisierten, submikroskopischen Erreger mussten demnach sehr viel kleiner als die Bakterien sein. Wegen ihrer zunehmend erkannten Rolle als nicht fassbare Seuchenerreger wurden diese „Contagien“ unter dem Begriff Virus (virus, lat.: Gift) zusammengefasst (Überblick bei Krüger et al. 2000).

Elektronenmikroskopie und Virologie

Zur Bekämpfung von Viruskrankheiten fehlten zunächst alle Kenndaten zu Partikelnatur, Zell-Wechselwirkung, Vermehrung und Umweltstabilität von Viren. Das notwendige Wissen ergab sich mit der Einführung der Elektronenmikroskopie (EM) in die Infektionsforschung. Für die förderliche Zusammenarbeit dieser Gebiete gab es in den 30er Jahren des 20sten Jahrhunderts in Berlin hervorragende Voraussetzungen. Die EM wurde hier zunächst als reines Werkzeug der Physiker in drei konkurrierenden Arbeitsgruppen entwickelt (Ernst Brüche, AEG; Ernst

Ruska und Bodo von Borries, Siemens; Manfred von Ardenne). Andererseits gab es vonseiten der Medizin erheblichen Druck, das neue Instrument zur Suche nach den Erregern gefürchteter Seuchen (Influenza, Masern, Poliomyelitis, Pocken, Tollwut) einzusetzen. Der junge Mediziner Helmut Ruska (1908–1973), der Bruder von Ernst Ruska (1906–1988; Nobelpreis für Physik 1986), entwickelte dieses Feld. Sehr bald nutzten auch biomedizinische und chemische Grundlagenforschung das Potenzial des neuen Instruments (Krüger et al. 2000).

Worauf gründete sich die Erwartung einer höheren Auflösung? Die Wellenlänge der in der EM zur Abbildung genutzten beschleunigten Elektronen (0,004 nm) ist erheblich kürzer als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes (400–780 nm) – genutzt im Lichtmikroskop. Andererseits ist durch Ernst Abbe und Hermann Helmholtz seit 1876 bekannt, dass die Auflösung eines Mikroskops ($d_{\min}$), die Fähigkeit zwei eng beieinander liegende Objektpunkte noch getrennt wahrzunehmen, wesentlich von der Wellenlänge (λ) der genutzten Energie- (Licht-) Quelle und dann auch von den Eigenschaften des Mikroskops ($n \times \sin \alpha$ = numerische Apertur) abhängt.

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{n \times \sin \alpha}$$

Chancen und frühe Ergebnisse der EM in der Virologie

Das neue Instrument versprach also eine dramatische Verbesserung in der Auflösung. Heute wissen wir, dass sie durch allfällige Linsenfehler nicht 10^5 -fach, sondern „nur“ etwa 1000-fach höher ist als beim Lichtmikroskop. In den Biowissenschaften ergaben sich sehr schnell Einblicke in bisher unbekannte Dimensionen und Zusammenhänge: Virologie und EM förderten sich wechselseitig. Als erstes „filtrierbares Agens“ wurde 1938 das Ektromelievirus der Maus, ein Orthopockenvirus, am EM dargestellt (von Borries et al. 1938). Obwohl die damalige Präparation nur aus dem Antrocknen der Partikelsuspension auf dem EM-Trägernetz und einer Osmium-„Räucherung“ bestand und damit keine besonders detail- und kontrastreiche Darstellung zuließ, war bald eine Reihe von Viren morphologisch charakterisiert. Die Ergebnisse führten 1943 zur ersten naturwissenschaftlich begründeten Virusklassifizierung durch Helmut Ruska (zitiert in Krüger et al. 2000).

Das Strukturwissen wurde um eine biologisch wichtige Dimension erweitert, als von Ardenne et al. und Anderson und Stanley 1941 Gemische von Tabakmosaikvirus und spezifischen Antikörpern am EM untersuchten. Diese frühen Versuche sind die Vorläufer der heute methodisch sehr vielseitigen Immun-EM. Sie ermöglicht die Beschreibung des „antigenen Make-

up“ von Viren, Ribosomen und anderen Makromolekülen sowie die Lokalisierung antigener Determinanten in der Zelle – auch in ihrer räumlichen Anordnung. Die Immun-EM wird auch diagnostisch zur Virus-Typisierung genutzt (Überblick bei Biel und Gelderblom, 1999; Hyatt und Eaton, 1993; Miller und Howell, 1997).

Entwicklung der EM-Erregerdiagnostik

In der Seuchendiagnostik wurde die EM früh zur Differenzierung von Pocken und Windpocken eingesetzt (Überblick bei Hazelton und Gelderblom, 2003; Long et al. 1970). Die Einführung der Negativ-Kontrast-Methode in den 1960er Jahren (Überblick bei Harris, 1997; Hayat und Miller, 1990) und die zunehmende Verbreitung nutzerfreundlicher Geräte förderten den Einsatz der EM in den Biowissenschaften und besonders in der Virologie – in den 60er und 70er Jahren wurden Adeno-, Orthomyxo-, Paramyxo-, Picorna-, Rhabdo- und Reoviren aus diagnostischen Zellkulturen charakterisiert.

Für andere Infektionen, wie Hepatitis und nicht bakterielle Gastroenteritiden, ergaben sich zunächst keine Erkenntnisse, weil hier keine empfänglichen Zellkulturen zur Verfügung standen. Erst in den späten 1970ern erfolgte ein Durchbruch bei diesen „fastidious agents“, als man gelernt hatte, Plasma, Urin und Faeces, also „dirty samples“ mit dem „sauberen“ Instrument zu untersuchen. Die Erreger der Hepatitis B und A wurden aus Plasma, respektive Stuhlproben Erkrankter charakterisiert, Rotaviren als Hauptursache der akut-epidemischen Gastroenteritis erkannt und schließlich mit den kleineren Astro- und Caliciviren noch weitere Gastroenteritis-Viren beschrieben (Überblick bei Gentile und Gelderblom, 2005; Hazelton und Gelderblom, 2003).

Zum Prinzip der Morpho-Diagnose

Der achte Bericht des Internationalen Komitees zur Virusklassifizierung listete 2005 nahe 2.000 Virusspezies bei insgesamt mehr als 30.000 Pflanzen-, Tier- und bakterienpathogenen Virusisolaten. Diese Fülle wurde nach genetischen Eigenschaften in 73 verschiedenen Familien gruppiert, wovon nur 31 vertebraten- und 26 humanspezifisch sind (Fauquet et al., 2005). Die Mitglieder einer jeden Virusfamilie haben einen einheitlichen Genotyp und zeigen deshalb auch eine einheitliche Morphe, während sich die einzelnen Familien – ihrem unterschiedlichen Genotyp entsprechend – deutlich auch in Größe und Form unterscheiden. Aufgrund seiner Feinstruktur kann also ein Virusteilchen eindeutig einer bestimmten Familie zugeordnet werden. Nicht selten – wie bei Circo-, Pocken-, Reo- und Retroviren – ergibt sich dabei auch eine taxonomisch noch genauere Zuordnung zu einem bestimmten Genus innerhalb einer Virusfamilie (► Abb. 3 und 5).

Die Virusfamilien unterscheiden sich auch in ihrer Wechselwirkung mit ihrer Wirtszelle. Um neben der Partikelmorphologie auch Unterschiede in der Virus-Formierung und -Freisetzung zu erfassen, wird die aufwändigere Ultradünnschnitt-Methodik eingesetzt – diagnostisch hilft sie insbesondere bei unklaren Negativ-Kontrast-Befunden.

Vorteile der EM-Erregerdiagnostik

Die Probenvorbereitung erfolgt überwiegend durch die technisch einfache Negativ-Kontrastierung von Partikelsuspensionen (► Abb. 1); dabei werden keine erregerspezifischen Reagenzien benötigt, was die Methode preiswert macht. Die in praxi erreichte Auflösung von 2–3 nm und der „offene Blick“ der EM ermöglichen, jeden auf dem EM-Trägernetz (► Abb. 1) befindlichen Erreger, auch kleinste Viren, zu entdecken und morphologisch einer der bekannten Virusfamilien zuzuordnen – oder als gänzlich „neu“ zu bewerten (Hazelton und Gelderblom, 2003). Auch ohne dass der Erreger zuvor typisiert worden wäre, gibt die Morpho-Diagnose – zusammen mit der Patientenvorgeschichte – dem Kliniker oder Epidemiologen Hinweis auf die vorliegende Erkrankung und für die notwendigen Therapie- und/oder Quarantäne-Maßnahmen. Die EM-Diagnose ist schnell – sie kann binnen 15 min nach dem Eintreffen der Probe im EM-Labor vorliegen – und sie ist sicher, denn die beobachtete Erreger-Feinstruktur dient mit den Patientendaten als interne Qualitätssicherung. Als Differenzialdiagnose (DD) kann sie den Verdacht auf das Vorliegen einer klinisch schwerwiegenden Infektion bestätigen, häufiger aber wird sie diese ausschließen. All dies macht die EM-Diagnostik für den öffentlichen Gesundheitsdienst, für den einzelnen Patienten und

für die Labormedizin zu einer wertvollen, prinzipiell häufiger zu nutzenden Methode (► Tab. 1).

Die Schnelligkeit und der „offene Blick“ der EM werden auch bei bakteriellen und parasitären Fragen diagnostisch genutzt (Curry et al., 2006; Gelderblom, 2003). Organisatorisch ist auch die gemeinsame Diagnostik von Human- und Veterinärproben sinnvoll, da die meisten vertebatenspezifischen Virusfamilien zugleich bei Mensch und Tier vorkommen und häufig auch als Zoonose nachweisbar sind.

Nachteile der EM-Erregerdiagnostik

Als Werkzeug der Labormedizin hat die EM jedoch auch Nachteile: Sie ergibt direkt nur die Familie des vorliegenden Erregers. Die EM benötigt teure Ausrüstung, Erfahrung und hohe Motivation bei den Mitarbeitern. Sie ist vergleichsweise wenig sensitiv; Partikelkonzentrationen unter 10^6 Teilchen pro ml sind nur schwer auszuwerten und damit wenig geeignet für den Durchsatz großer Probenserien. Um auch Proben mit niederem Partikelgehalt und/oder Mehrfach-Infektionen zu erfassen, muss ein diagnostisches Präparat 15 min (oder 10 „Felder“ auf dem 400 mesh Grid) abgesucht werden. Und anders als viele alternative Labormethoden können Probenvorbereitung und Auswertung hier kaum automatisiert werden. Zum Glück stehen aber nicht nur geeignete Anreicherungsverfahren für die EM, sondern alternativ auch andere, kommerzielle Labormethoden mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Verfügung. In der Tat haben heute Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren (klassische PCR, real-time-PCR) und Antigen-Assays (ELISA) die EM weitgehend aus der Routine verdrängt. Dieser Rückzug ermöglicht andererseits, die EM auf wirklich dringende Indikationen zu fokussie-

■ Abbildung 1

Drei-Schritt-Methode der Negativ-Kontrastierung. Die EM-Trägernetze (Grids) werden auf der Probe (links) schwimmend für 5–30 s zur Partikeladsorption gelagert, dann nach rechts zum Freiwaschen von störenden Salzen über A. bidest bis auf den Kontrastmitteltropfen weitergeführt. Nach wenigen Sekunden wird das Grid abgenommen, mit einem Streifen Filterpapier von überschüssigem Stain befreit und nach kurzer Lufttrocknung am EM ausgewertet (nach Gelderblom, 2003)

■ **Tabelle 1**

Indikationen für den Einsatz der EM-Erregerdiagnostik

Indikation	Beispiel
Notfall-Diagnostik als „Rapid Viral Diagnosis“: bei klinischem Verdacht, bei ungewohntem Krankheitsbild durchgeführt als „direkte EM“	in klinisch kritischen Situationen: z. B. bei Windpockenverdacht auf Säuglingsstation oder bei „re-emerging infections“ wegen Immunschwäche (Transplantation, HIV-Infektion): Proben-Gewinnung oft direkt aus der Läsion
Seuchen-Schnelldiagnostik bei Verdacht auf „emerging infections oder BT auch als schnelle Differenzialdiagnose	in epidemiologisch kritischen Situationen und beim Fehlen erregerspezifischer Methoden Orthopocken versus Windpocken
„offener Blick“ für die schnelle Erregersuche bei einem möglicherweise breiten Erregerspektrum	„catch-all“-Methode bei Verdacht auf breites oder unbekanntes Erregerspektrum, z. B. bei Gastroenteritis, BT-Verdacht, Hautläsionen
nach Kultivierung eines unbekannten Agens: Abkürzung der klassisch-konventionellen Labordiagnostik	zytopathischer Effekt in diagnostischen Zellkulturen: Erregersuche im Zellkulturüberstand und/oder nach Frieren/Tauen im Zellaufschluss
Qualitätssicherung in der Routinediagnostik und in der Produktion von biomedizinischen Produkten	gefordert durch GLP-/GMP-Vorschriften zur Überprüfung von Methoden, zum Ausschluss von Kontaminanten, zur Charakterisierung von Impfstoffen, Antikörpern

ren. Hier muss die geringe Sensitivität von 10^6 Partikeln pro ml auch nicht zum Nachteil werden – angesichts zuverlässiger Methoden zur Partikelanreicherung und weil klinische Proben oft sehr viel höhere Erregermengen enthalten.

Indikationen zur EM-Erregerdiagnostik

Schwachstellen haben andererseits auch PCR und ELISA, denn im Gegensatz zur EM mit ihrem „offenen Blick“ wird für ihren Einsatz ein a-priori-Wissen benötigt, mindestens aber eine Idee über das wahrscheinliche Erregerspektrum. Bei verändertem antigenen Make-up versagen Antigenassays, weil sie den vermuteten Erreger nicht mehr erkennen, und die PCR entdeckt nur solche Sequenzen (und damit entsprechende Erreger), für die passende, nukleinsäurespezifische Primer bereitstehen. Die PCR-Reaktion kann auch durch Bestandteile in der Probe gehemmt werden und schließlich gibt es für eine Reihe seltener Keime noch keine kommerziell verfügbaren Reagenzien. Daraus ergibt sich, dass sich die Labordiagnostik nicht monoman auf nur eine einzelne Methode stützen darf. Richtig eingesetzt ergänzen sich PCR und EM, und wann immer eine schnelle und sichere Diagnose gefordert ist, sollte der „offene Blick“ der EM parallel mit anderen front-line Methoden genutzt werden (Gelderblom, 2003; Hazelton und Gelderblom, 2003; Johnsen et al., 2006).

Die Vorteile der EM wurden erst 2003 wieder deutlich, als der Erreger des SARS aus einer diagnostischen Zellkultur mithilfe der EM als ein Coronavirus identifiziert wurde. Diese Zuordnung beschleunigte die endgültige Charakterisierung des neuartigen Er-

regers (Ksiazek et al., 2003). Ähnlich bei einem Ausbruch von Affenpocken beim Menschen in den USA: Die unklare Infektion wurde erst durch die EM nach 10 Tagen der Unsicherheit als Orthopocken-Zoonose erkannt (Reed et al., 2003). In der Tat ist die EM einzig geeignet, auch das Unerwartete für die Diagnostik zu präsentieren.

Auch ökonomische Zwänge und Nachwuchsprobleme haben zu einem Rückgang der EM-Routinediagnostik beigetragen. Aber angesichts diagnostisch schwieriger „emerging“ oder „re-emerging infections“, angesichts ungewohnter Krankheitsverläufe bei immunsupprimierten Patienten und eines kaum zu kalkulierenden Bioterrorismus- (BT) Risikos ist die EM für die Notfalldiagnostik essenziell (Gelderblom, 2003; Hazelton und Gelderblom, 2003). Ihr Einsatz als „catch-all“-Methode ist auch angezeigt, wenn mehrere Keime ätiologisch zur Debatte stehen, wie bei einem Gastroenteritis-Ausbruch. Neben Patientenproben, insbesondere von Haut und Schleimhaut, kann und sollte die EM auch verdächtige zytopathische Effekte in der klassischen Zellkulturdiagnostik aufklären. Sie sollte auch regelmäßig zur Qualitätssicherung im Viruslabor und bei der Herstellung von Bioprodukten (Impfstoffe, monoklonale Antikörper) herangezogen werden.

Probensammlung und -transport

Die EM-Diagnostik erfordert vergleichsweise hohe Partikelkonzentrationen von 10^6 Partikeln pro ml (Biel et al., 2004; Johnsen et al., 2006). Relativiert wird diese „Grenze“ freilich dadurch, dass die EM – im Gegensatz zur Anzucht – auch die in hohem Überschuss

gebildeten nicht infektiösen Virusteilchen entdeckt. In den Hautläsionen bei fieberhaften vesikulären Erkrankungen, bei der DD Pocken-Windpocken, aber auch in Hirn- und Warzengewebe, in Stuhl, Urin und Serum liegen oft Partikelkonzentrationen von über 10^{10} pro ml vor. Die Art der Probengewinnung, Transport und Präparation können den Untersuchungsgang und das Ergebnis erheblich beeinflussen. Für die EM sind die in der Labormedizin gern genutzten Watte- oder Papiertupfer nicht ideal, denn das am Tupfer eingetrocknete Material lässt sich nur unter großen Verlusten resuspendieren. Geeigneter sind das „Abklatschen“ von Vesikelflüssigkeit auf einen Objektträger oder die Entnahme mittels Kapillare oder kleinkalibriger Kanüle (► Abb. 2). Optimal erfolgt die Materialgewinnung bei der „direkten EM“: dabei wird das EM-Trägernetz (Grid) vorsichtig auf den Boden der Läsion getupft: hier, in der Epidermis, werden die differenzialdiagnostisch in Frage kommenden Herpes- und Pockenviren in großen Mengen produziert (Gelderblom, 2003; Gelderblom und Hazelton, 2003). Vor dem Transport in das EM-Labor – vorzugsweise noch am Krankenbett – werden die Proben inaktiviert (► Abschnitt „Biologische Sicherheit“).

Proben für die EM können gekühlt bei 4 °C oder – kurzzeitig – bei Umgebungstemperatur transportiert werden. Wiederholtes Frieren und Tauen zerstört die

Feinstruktur labiler Viren und ist daher zu vermeiden. Der Transport erfolgt in verschlossenen Behältern mit Umverpackung, entsprechend den international geltenden Versandbestimmungen für diagnostische Proben.

Prinzipien der Probenpräparation

Für die EM-Erregerdiagnostik wird durchwegs die konventionelle Transmissions-EM eingesetzt: Sie erfordert gut durchstrahlbare Präparate von kaum 50 nm Dicke. Für ihre Herstellung gibt es zwei verschiedene Wege: das Auftrocknen einer Partikelsuspension in der Negativ-Kontrastierung oder das Ultradünnschneiden von in Plastik eingebetteten Proben (s. u.). Bakterien und Viren bestehen, wie andere biologische Proben, ganz wesentlich nur aus leichten Atomen und besitzen daher nur wenig Massendichte. Hohe Massendichte ist aber Voraussetzung für eine intensive Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt – nur sie ergibt über Elektronenabsorption und -streuung ein detail- und kontrastreiches Bild. Die notwendige Massendichte kann durch Negativ- oder Positivkontrastierung erzeugt werden.

Negativ-Kontrastierung

Für die EM-Darstellung der in der Diagnostik üblichen Partikelsuspensionen ist die Negativ-Kontrastierung die Methode der Wahl. Auf Glas-Objektträgern

■ **Abbildung 2**

Gewinnung von Vesikelproben für die EM-Erregerdiagnostik. Alle Methoden – vom konventionellen „Abklatschen“ auf Glasobjektträger (oben) bis zur „direkten EM“ können mit einer frühen Formaldehyd-Inaktivierung kombiniert werden (nach Gelderblom, 2003)

angetrocknete Proben werden dafür in einem geringen Volumen destillierten Wassers resuspendiert – Pockenkrusten zunächst darin „vorgeweicht“. Stuhlproben zur Diagnostik bei akut-epidemischer Gastroenteritis werden als 10–30 %-Suspension in destilliertem Wasser homogenisiert. Die Überstände werden negativ kontrastiert und am EM ausgewertet. Die hier – allein schon beim Menschen – nachweisbaren Viren sind in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit: Rota-, Noro-, Sappo-, Adeno-, Picorna-, Astro-, Corona-, Reo-, Entero-, Breda- und andere Viren. Nicht selten gelingt hier auch der Nachweis von Doppel- und Mehrfachinfektionen. Neben Bakterien, die in der Norm bis zu einem Drittel der Stuhlmasse ausmachen, finden sich – neben dem Virusbefund – oft verschiedene Phagenformen.

Biopsie- oder Autopsiegewebe wird zunächst in Kuben von 1 mm Kantenlänge geschnitten und dann mechanisch im Mörser homogenisiert. Aus diagnostischen Zellkulturen kann Virus oft schon direkt aus dem Überstand dargestellt werden. Zellassoziertes Virus wird zunächst durch wiederholtes Frieren/Tauen in einem kleinen Volumen destillierten Wassers freigesetzt.

Allgemein werden Suspensionen vor der Kontrastierung niedertourig zentrifugiert (800–2.000 $\times$ g, 15–20 min), d. h. von groben Zelltrümmern, Bakterien und anderem Detritus „geklärt“ (Biel und Gelderblom, 1999; Hazelton und Gelderblom, 2003). Erweist sich eine verdächtige Probe nach 15 min Durchmusterung am EM als „partikelnegativ“, sollte sie zunächst angereichert werden (► unten: Partikelanreicherung). Serumproben enthalten oft große Mengen an (Lipo-) Protein, das die im Präparat enthaltenen Virusteilchen „verschleiern“ kann. Um den Anteil solcher und ähnlicher „klein-molekularer Kontaminanten“ zu drücken, werden Seren vor der Ultrazentrifugation 3–5-fach mit destilliertem Wasser verdünnt. Im Gegensatz zu Rachenspülwasser und Tränenflüssigkeit enthalten Liquorproben nur selten ausreichende Virusmengen. Sputum und andere visköse Proben können in PBS verdünnt und mit 20 % n-Acetyl-Cystein verflüssigt werden (Gentile und Gelderblom, 2005).

Ultradünnschnitt-EM

Ergänzend zur Negativ-Kontrast-EM steht die Auswertung von Ultradünnschnitten. Dafür werden Blöckchen (Kantenlänge < 1 mm) von soliden Geweben, Zellkulturverbände oder Ultrazentrifugensedimente zunächst chemisch durch Aldehyde und Osmium fixiert, nach Einschluss in Agarose durch Schwermetallsalze chemisch kontrastiert und nach Entwässerung in Kunstharz eingebettet. Die durchpolymerisierten Proben werden dann am Ultramikrotom geschnitten: 40–80 nm dicke Schnitte werden mit Bleisalzen nachkontrastiert und am EM ausgewertet.

Konventionell durchgeführt benötigt die gesamte Prozedur 4–5 Tage. Moderne Schnelleinbettungsmethoden (Überblick bei Schröder et al., 2006) ermöglichen heute eine „same-day“-Diagnose – im Vergleich mit der Negativ-Kontrastierung benötigen sie aber erheblich mehr Aufwand und Zeit.

Raster-Elektronenmikroskopie (SEM)

Solide Materialien, auch Bakterien in Kultur und besonders die bei BT-Verdacht anfallenden „Umweltproben“ („weiße Pulver“ im Brief, Abstrich, Bodenprobe) können auch durch SEM analysiert werden. Zum Nachweis der gefürchteten Anthraxsporen wird die Probe durch Glutaraldehyd-Formaldehyd inaktiviert, über Alkohol entwässert, am kritischen Punkt getrocknet und zur Erzeugung der Leitfähigkeit schließlich im Sputtercoater dünn mit Metall beschichtet.

Essentials für die Negativ-Kontrastierung

Wichtig sind mechanisch stabile und hoch adhäsive, d. h. hydrophile Grids. Ohne feste Haftung wird das Gros der adsorbierten Teilchen bei der Kontrastierung weggewaschen. Bewährt haben sich 400 mesh Kupfergrids mit quadratischen, 30 $\times$ 30 μ m messenden „Fenstern“ (► Abb. 1 und 2). Sie sind mit einem transparenten Kunststofffilm (Pioloform®, Formvar, Collodium) überspannt, der zur besseren Wärmeableitung durch eine 2–10 nm dünne, im Vakuum aufgedampfte Kohleschicht verstärkt ist. Kollodiumfilme sind thermisch weniger stabil, aber für sich allein schon hydrophil. Auf dem Kohlefilm haften die Virusteilchen durch Wechselwirkung mit hydrophilen Ladungsgruppen. Kohleschichten sind primär häufig sehr hydrophob – die notwendige Hydrophilizität lässt sich zuverlässig durch Glimmentladung in einer Vakuumapparatur erzeugen. Dabei ergibt sich durch die Spaltung von Kohlenwasserstoff-Kontaminanten im Restvakuum der Apparatur eine günstige Ionisierung des Kohlefilms. Diese kann auch durch poly-L-Lysin, Alcian Blau, Bacitracin, UV-Licht u. a. erzielt werden. Hoch adhäsive Grids sind essenziell, sie helfen Partikelverluste und damit „falsch-negative“ Befunde zu vermeiden (Hayat und Miller, 1990; Hazelton und Gelderblom, 2003). Die Hydrophilizität geht nach 2–3 Wochen verloren, kann aber durch erneute Glimmentladung restituiert werden. Befilmte Grids sind im Handel verfügbar. Andererseits ist die Herstellung im EM-Labor nicht aufwändig – sie ermöglicht überdies auch eine bessere Kontrolle der Grid-Eigenschaften.

Außer den Grids werden für die Negativ-Kontrastierung ein Becher mit Brucheis zur Probenkühlung und eine niedertourige Laborzentrifuge benötigt, dazu spitze Pinzetten zum Transport der Grids, kalibrierbare Pipetten, Parafilm® zum Auslegen von Probe,

Waschflüssigkeit (destilliertes Wasser), Kontrastmittel („Stains“ = Schwermetallsalzlösungen), schmale Streifen von Filterpapier zum Entfernen überflüssiger Flüssigkeit und schließlich mit Filterpapier ausgelegte Petrischalen zur Aufbewahrung der Grids.

Methodik der Negativ-Kontrastierung

Der Prozess besteht aus den drei Schritten: adsorbieren, waschen, kontrastieren (► Abb. 1). Auf Parafilm® wird ein Tropfen der Probe aufgebracht, auf diesen werden ein oder mehrere Grids zur Adsorption für 5–30 s aufgelegt. Auch längere Adsorptionszeiten – in der feuchten Kammer, auch über Nacht – sind möglich und gelegentlich von Vorteil. Um störende Ionen zu entfernen, wird das Grid mit der adsorbierten Probe auf mehreren Tropfen A. bidest gewaschen (jeweils für 2–10 s) und dann für 5–10 s auf dem Kontrastmitteltropfen abgelegt. Überschüssiger Stain wird mit Filterpapier entfernt. Das Präparat darf bis dahin nicht trockenfallen und kann dann, nach kurzer Lufttrocknung, am EM untersucht werden. Zu der geschilderten Parafilm®-Methode gibt es auch Alternativen (Präparation von Partikel-Stain-Gemischen, Spray-, und Pinzetten-Methode: siehe Hayat and Miller, 1990).

Kontrastiert wird mit wässrigen Schwermetallsalzlösungen, bevorzugt mit Phosphorwolframsäure (PTA, 1,0–4,0 % mit NaOH auf pH 6,5–8,5 eingestellt – gelegentlich auch weit höher) und Uranylacetat (UAc, 0,5–2 % ungepuffert, pH 2,5–3,0). PTA und UAc unterscheiden sich u. a. in ihrer Verteilung auf dem Grid, ihrer Korngröße (Auflösung), Empfindlichkeit gegenüber dem Elektronenstrahl und der Qualität der Membrandarstellung (► Abb. 3a–c; 4a, c, e; 5; 6). Abhängig von den Ladungseigenschaften von Probe und Grid spreitet häufig nur ein Stain optimal über Partikel und Gridoberfläche, während der andere hydrophob kristallisieren und verklumpen kann – bei unbekannten Proben sollten daher beide parallel eingesetzt werden. Neben PTA und UAc gibt es weitere Kontrastmittel mit hervorragenden Eigenschaften, die aber nicht so universell einsetzbar sind (Harris 1997; Hayat und Miller, 1990). Bei der Negativ-Kontrastierung reagiert der Stain nicht mit den chemischen Gruppen des Objekts, er umhüllt tatsächlich nur das Virion mit einer opaken Masse. Er kann dabei auch Virusinnenbereiche kontrastieren, vorausgesetzt, er dringt ein über Defekte in der schützenden Hülle (► Abb. 3a und 4e) oder im Kapsid. Das eingetrocknete Salz ist glasartig und stabilisiert labile Struk-

■ **Abbildung 3**

Drei Mitglieder der Pockenvirusfamilie, dargestellt nach Negativ-Kontrastierung mit 1 % Uranylacetat (UAc). (a) Ektromelievirus der Maus, ein Mitglied des Genus Orthopockenvirus. Beide Teilchen zeigen ovalen Umriss, das obere darüber hinaus die typischen, das Virion parallel umlaufenden Oberflächendifferenzierungen. Das untere Virion ist zum Teil vom Kontrastmittel penetriert. (b) Wie alle Orthopockenviren ist das Vakziniavirus eher quaderförmig und zeigt nur kurze Oberflächengräte. (c) Kanarienvirus, Genus Avipockenviren, sind nicht nur größer als (a) und (b), sondern tragen auch noch die Reste einer zusätzlichen Hülle. Vergrößerung a–c: 100.000-fach

turen. Diese Umhüllung mit dem feinkörnigen, elektronendichten Stain lässt Details bis zu einer Auflösung von 2–3 nm sicher erkennen.

Negativ-Kontrastierung und Artefakte

Die Kontrastierung ist schnell und unkompliziert, aber das Waschen auf destilliertem Wasser und die Lufttrocknung ergeben eindeutige Schäden (► Abb. 5). Die Hülle membrangebundener Viren schwillt osmotisch auf, platzt und wird zum Teil zerstört, die Kapside größerer Viren können kollabieren, Kapsidkomponenten gehen verloren und die adsorbierten Teilchen werden durch Ladungswechselwirkung abgeflacht. Solche Artefakte lassen sich nur durch eine aufwändige Gefrierpräparation vermeiden (Überblick zu modernen Präparationsmethoden bei Grünwald und Cyrklaff, 2006). Andererseits können gerade diese Artefakte bei der EM-Diagnose helfen, wenn nämlich diagnostisch signifikante, aber normalerweise nicht zugängliche Innenstrukturen, wie das Kapsid von

Herpes- oder das Ribonukleoprotein (RNP) von Paramyxoviren, durch die labilisierte Membran hindurch kontrastiert werden.

Mit der Darstellung der osmotisch höchst labilen Retroviren erreicht die konventionelle Negativkontrastierung allerdings ihre Grenze (► Abb. 5); diese Viren können nur nach Gefrierpräparation oder im Ultradünnschnitt mit gutem Strukturerehalt abgebildet werden. Die im konventionellen Ultradünnschnitt erzielte Auflösung von 2–3 nm ermöglichte schon in den 80er Jahren die Klassifizierung der Retroviren in auch genetisch einheitliche Subfamilien, die frühe Einordnung des HIV in die Subfamilie der Lentiviren, bei HIV die Ableitung von Pathomechanismen und auch schon die Darstellung seiner Glykoprotein-Trimerie (Überblick bei Gelderblom, 1991). Die Trimerstruktur wurde erst 15 Jahre später durch Kryo-Tomographie bestätigt (zitiert in Grünwald und Cyrklaff, 2006).

■ **Abbildung 4**

Vergleich verschiedener Viren nach Negativ-Kontrastierung (oben) und Ultradünnschnittpräparation (unten). (a) SARS-Coronavirus mit typisch keulenförmigen Oberflächenfortsätzen (Peplomeren), direkt aus der diagnostischen Zellkultur inaktiviert und kontrastiert (Phosphorwolframsäure, PTA, 2 %). Im Ultradünnschnitt (b) zeigen die SARS-Virusteilchen ihr Ribonukleoprotein (RNP) schalenförmig unter der Lipidhülle und einen inkompletten Peplomeren-Besatz. (c) Influenzavirus Typ A, ein Orthomyxovirus, aus der Impfstoffproduktion mit dichtem Hämagglutinin-Besatz (1 % UAC), (d) Influenza Typ A an der Zelloberfläche: im Querschnitt sind direkt unterhalb der Virushülle das dichte Matrixprotein und im Innern ein Teil der RNP-Fragmente erkennbar. (e) Herpesviren, diagnostisches Präparat. Die schützende Lipidhülle ist komplett verschwunden, die sechs freiliegenden Kapside sind zum Teil vom UAC penetriert, bei anderen wird ihr Kapsomeren-Aufbau erkennbar. (f) Der Dünnschnitt zeigt drei intakte Herpesviren: Im Innern sieht man das DNA-Genom als dunkle Masse, geschützt vom polygonalen Kapsid. Nach außen sind mäßig dunkel das Tegument und die dicht mit Oberflächenfortsätzen besetzte Virushülle sichtbar. Vergrößerung a–f: 70.000-fach

Abbildung 5

Vergleich von Negativ-Kontrast- und Ultradünnschnitt-EM von HIV-2. (a) Aus der Zellkultur isolierte Virusteilchen: nach Kontrastierung mit 1 % UAC weitgehend zerstört mit Resten von Virusinnenkörper und Hülle (hell). (b) Im Ultradünnschnitt zeigen die reifen Viren ein konisches Core und Lateralkörper – typisch für die Subfamilie der Lentivirinae. Das unreife Virion (links) mit dem konzentrisch angeordneten Ribonukleoprotein ist dicht mit Glykoprotein-Knobs (gp120-Trimere) besetzt, während die reifen HIV-Teilchen die Mehrzahl ihrer Knobs „shedded“ haben. Vergrößerung: 100.000-fach

Messen und Zählen in der Erregerdiagnostik

Bei unbekannten Strukturen oder morphologisch nicht einfach zu differenzierenden Viren (Reo- vs. Rota-, Polyoma- vs. Papilloma-) Viren kann die Diagnose durch Messungen gestützt werden. Die Software moderner TEMs verfügt über zuverlässige Messmöglichkeiten. Bei der Bestimmung von Partikeldurchmessern ist jedoch zu beachten, dass biologische Strukturen bei Adsorption an das Grid mehr oder weniger abflachen – Messwerte können erheblich – auch > 50 % – über den realen Sollwerten liegen. Realistische Messungen ergeben sich, wenn nicht einzeln liegende Teilchen, sondern dichte Partikelpackungen – idealerweise sich selbst stabilisierende 2D-Kristalle von Viren – vermessen werden. Zur Orientierung über die Messgenauigkeit können auch in ihren Dimensionen definierte Objekte helfen, die der zu untersuchenden Suspension zugemischt und gemeinsam mit ihr ausgewertet werden. Als interne Größenmarker werden Katalasekristalle mit ihrer fixen 8,75 nm-Periode genutzt.

Partikelkonzentrationen lassen sich auf verschiedenen Wegen, auch mithilfe interner Marker, objektivieren. Dazu werden Latexpartikel bekannter Konzentration in definiertem Volumen einem definierten Probenvolumen zugemischt. Nach der Auszählung

am EM ergibt sich die gesuchte Konzentration aus dem Zahlenverhältnis für den bekannten Mengenmarker und den zu bestimmenden Partikeln (Überblick bei Zheng et al., 1996).

Effiziente Diagnostik durch Partikelanreicherung

Ein konventionell präpariertes Grid trägt das Äquivalent von < 1 µl der Probe. Die Auswertung von gering konzentrierten Suspensionen erfordert daher – besonders bei kleinen Viren – einen nicht vertretbaren Aufwand. Sie werden besser zuvor durch Ultrazentrifugation oder Immuno-Affinitätsmethoden angereichert (Überblick bei Hazelton u. Gelderblom, 2003). Dazu werden die Viren in der konventionellen Ultrazentrifuge ins Sediment gefahren (rotorabhängig, z. B. 60 min bei 100.000 × g). Die Sedimente werden in einem kleinen Volumen destillierten Wassers aufgenommen, „klär-zentrifugiert“ und dann als Überstände ausgewertet. Benötigt werden dabei nicht nur relativ große Probenmengen und > 2 Stunden an Präparation, sondern auch eine teure Investition. Die kleine mit Druckluft getriebene Beckman Coulter Airfuge® ermöglicht im Festwinkelrotor A-100/18 mit speziellen Adaptern eine sichere, direkte Partikelsedimentation auf das Grid – sie ergibt in der Routine

■ **Abbildung 6**

Pathogene Bakterien direkt aus der Kultur nach Negativ-Kontrastierung mit 0,5 % UAc. Die Keime zeigen morphologische Besonderheiten, die bei der EM-Diagnose helfen können. (a) *Corynebacterium diphtheriae*, keulenförmige Stäbchen, unbegeißelt mit endständigen Polkörperchen. (b) *Yersinia pestis*, der Erreger der Pest, ein kurzes Stäbchen, meistens durch den Biss eines Rattenflohes auf den Menschen übertragen. (c) *Burkholderia pseudomallei*, unipolar begeißeltes Stäbchen, infiziert in den Tropen als Melioidose den Menschen (Pneumonie, Sepsis, Hautinfektion). (d) *Bacillus anthracis*, der Erreger des Milzbrandes bei Mensch und vielen Huftieren ist ein langes, unbegeißeltes, in Ketten wachsendes Stäbchen. Vergrößerung: 10.000-fach

nach 15–20 min Laufzeit eine 50–1.000-fache Anreicherung (Hazelton und Gelderblom, 2003). Agar-Diffusion und -Filtration sind dagegen einfache Methoden, die um den Faktor 5 anreichern und zusätzlich „saubere“ Präparate ergeben. Die Anreicherung kann auch erregerspezifisch mithilfe spezifischer Antikörper in der Solid Phase Immuno EM (SPIEM) und in der Serum-in-Agarmethode erfolgen (Biel und Gelderblom, 1999). Besonders vorteilhaft ist die Kombination von SPIEM und Airfuge-Sedimentation (Antonio Lavazza, Brescia, personal communication, 2006).

Kriterien zur Erregeridentifizierung

Auffallende Teilchen werden über ihre Feinstruktur identifiziert: Neben Größe und Form dienen der Aufbau und die Symmetrie des Kapsids, die An- oder Abwesenheit einer Lipidhülle, eines Ribonukleoproteins, schließlich auch die Art der Virusoberflächen-Fortsätze (Spikes, Knobs, Fibern) als morphologische Kriterien. Rasches, auf Erfahrung gegründetes „Pattern-Recognition“ ordnet die beobachteten Partikel direkt

einer bestimmten Virusfamilie zu. Eine Typisierung, z. B. die Differenzierung der beobachteten Herpesviren in Varizella zoster, Herpes simplex Typ 1 oder 2, kann dann auch am EM mithilfe typspezifischer Antikörper durch Immun-Aggregation oder -Dekoration erfolgen. Beide IEM-Methoden haben sich in der Vergangenheit bei der Identifizierung von nicht kultivierbaren Agenzien, wie Hepatitis C, Norwalk- und Parvovirus B19, bewährt (Überblick bei Gentile und Gelderblom, 2005; Hazelton und Gelderblom, 2003).

Biologische Sicherheit in der EM-Erregerdiagnostik

Das heutige Sicherheitsdenken fordert eine stringente Laborsicherheit, neben der Befolgung der Good Laboratory Practices- (GLP-) Richtlinien. Präpariert werden darf nur unter geeignetem Schutz (Handschuhe, Schutzbrille, Laminar Flow Biosafety Kabine der Klasse 2), denn diagnostische Proben können bekannte und unbekannte Erreger mit einem Gefährdungspotenzial für das Laborpersonal, aber auch für

die Umwelt, enthalten. Gute Strategie ist es, keine gefährlich infektiösen Proben in das EM-Labor kommen zu lassen, d. h. potenziell in der Probe enthaltene Erreger möglichst schon vor dem Transport durch Aldehyd zu inaktivieren (Gelderblom et al., 2006). So ist bei Pockenalarm vorgesehen, dass die Proben für PCR, Anzucht und EM separat aus Vesikeln oder Krusten entnommen werden und dass dabei die EM-Probe mit gepuffertem Formaldehyd inaktiviert wird. In Suspension werden manche Viren schon durch 4 % Formaldehyd (FA) inaktiviert – Milzbrandsporen dagegen erst durch 10 % FA und 0,05 % Glutaraldehyd (GA). Hohe GA-Konzentrationen sind zu vermeiden, denn sie führen zu einer Vernetzung von Viren mit dem in der Probe enthaltenen Detritus, zur Partikelaggregation und zu Verlusten an Strukturdetail (diskutiert in Gelderblom et al., 2006). Pinzetten und andere Ausrüstung müssen gründlich gereinigt und desinfiziert werden, um eine Verschleppung der Probe zu vermeiden. Angesichts nur schwer oder gar nicht durch Aldehyd inaktivierbarer Erreger (Parvoviren, BSE und andere übertragbare spongiforme Enzephalopathien), werden auch die bereits ausgewerteten Grids inaktiviert (1 % NaOH). Biologische Sicherheit wird also auf zwei Wegen angestrebt: durch strikte Einhaltung der Sicherheits- und GLP-Regeln und durch die Probeninaktivierung.

Qualitätssicherung in der EM-Erregerdiagnostik

Die Qualität der morphologischen Diagnostik wird durch Teilnahme an einschlägigen Ringversuchen gesichert (EQA-EMV; Gelderblom, 2003). Die EQA werden weltweit und kostenfrei vom Konsiliarlabor für die EM-Erregerdiagnostik am Robert Koch-Institut in Berlin (Leitung Dr. Norbert Bannert, bannertn@rki.de) durchgeführt. Am 17. EQA nahmen 112 Stellen aus 32 Ländern teil.

Organisation der EM-Erregerdiagnostik

In Deutschland wird die EM an > 50 Stellen zur Erregerdiagnostik eingesetzt – überwiegend an Universitäten, aber auch im öffentlichen Gesundheits- und Veterinärwesen, auch bei Industrie und Bundeswehr. Europa- und weltweit werden EM-diagnostische Laboratorien überwiegend an Universitäten und zentralen Gesundheitsbehörden betrieben, um so mindestens auch für die Leit-Institute und die Politik eine schnelle Notfalldiagnostik sicherzustellen. Insbesondere durch die BT-Problematik besteht ein gesteigertes Interesse an der EM-Diagnostik. Der Probenumsatz an Universitäten ist nicht immer hoch – er liegt im Bereich von nur einigen 100 Proben pro Jahr. Als Maximum hat ein nationales Labor 2002 mehr als 9.200 Stuhlproben diagnostiziert. Die meisten dieser

Laboratorien unterziehen sich Maßnahmen zur Qualitätssicherung (Ringversuche, Fortbildung). Eine effiziente EM-Erregerdiagnostik kann im Verbund mit anderen Ultrastruktur-Aufgaben in Virologie, Pathologie, Dermatologie etc. betrieben werden. Sie ist heute auch ohne „eigenes“ Instrument und ohne EM-spezifisches Personal möglich, nämlich bei gemeinsamer Gerätenutzung im „Nachbar“-Institut. Sie gewinnt auch durch eine Einbindung in die biomedizinische Grundlagenforschung: damit kann ihre Qualität gesichert und geeigneter Nachwuchs rekrutiert werden. Technische Grundlagen und erste Erfahrungen in der EM-Diagnostik lassen sich durch Laborkurse und Besuche in einem Expertenlabor erwerben. Eigene Expertise wird aber nur bei einem gewissen Probandumsatz aufgebaut – angesichts der Wertigkeit der EM-Erregerdiagnostik sollte sie erfahrenen Laboratorien vorbehalten bleiben. Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche EM-Erregerdiagnostik sind mithin vielfältig: Motivation, geeignete Organisation, Netzwerkbildung und regelmäßige Weiterbildung sind notwendige Schritte zu diesem Ziel (Gelderblom, 2003).

Zur Zukunft der EM-Erregerdiagnostik

Im infektionsdiagnostischen Repertoire gilt die EM als „catch-all“-Methode und einzigartig durch schnelle Präparation und das Prinzip der visuellen Auswertung durch „pattern recognition“. Um diese Vorteile angemessen zu nutzen, muss die EM front-line, d. h. parallel zu PCR und Anzucht, eingesetzt werden. Die „Familienzuordnung“ eines Erregers hilft der Klinik und fokussiert die weitere Labordiagnostik auf die Mitglieder einer einzelnen Virusfamilie. Dieses Prinzip wurde bei der Suche nach dem SARS-Erreger und der Aufklärung des Affenpockenausbruchs in den USA genutzt (Ksiazek et al., 2003; Reed et al., 2003), aber auch schon zuvor in Australien, als die EM-Untersuchung von diagnostischen Zellkulturen drei Tage vor anderen Laborergebnissen Paramyxovirus spezifische Strukturen nachwies – und damit den ersten Hinweis auf das „neue“ Hendra-Virus ergab (Murray et al., 1995).

Den Wert einer schnellen Diagnostik bestätigen auch BT-Erfahrungen in den USA. Die unmittelbar nach 9/11 am 18. September und am 9. Oktober 2001 verschickten sechs Briefe enthielten bis zu 1,2 g an lungengängigen Anthraxsporen. Sie verursachten 22 klinische Infektionen und 5 Todesfälle. Untersucht wurden > 120.000 Proben (u. a. auch mithilfe von TEM und SEM). Die Zahl von 32.000 unter Antibiotikenschutz gestellten Personen lässt die Verunsicherung in der Bevölkerung ahnen. Neben *B. anthracis* gibt es eine Reihe weiterer Bakterien, Viren und Toxine mit hohem Patho- und Panikpotenzial. Diese Agenzien der Kategorie A, ausgezeichnet durch leichte Aus-

bringbarkeit und Mensch-zu-Mensch-Übertragung und damit hochgeeignet für einen BT-Angriff, umfassen auch die „im Felde“ ausgerotteten Pocken, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, verschiedene Hämorrhagische Fiebertypen und das Botulinum-Toxin (Lane et al., 2000). Die drei Erstgenannten wurden im Biowaffenprogramm der früheren Sowjetunion produziert, und es wird diskutiert, dass Reste aus diesem Programm „überlebt“ haben und damit für BT-Angriffe verwendbar seien (Brumfield, 2003). Eine realistische Risikoabschätzung ist kaum möglich: Der Pockenerreger, das Variola major Virus, gilt „im Feld“ als ausgerottet – es gibt auch kein tierisches Reservoir. Letzte Pockenvirus-Vorräte werden noch in zwei von der WHO kontrollierten Referenzzentren an den CDC, Atlanta, USA und bei VECTOR in Koltsovo, Russland für die Etablierung antiviraler Strategien gehalten. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Pockenvirus – weil übersehen oder weil mit Absicht zurückgehalten – auch noch in anderen Laboratorien vorhanden ist. „Pockenvirus“ mag auch durch genetische Manipulation aus anderen, apathogenen Orthopockenviren gewonnen werden. Darüber hinaus besteht zweifellos die Möglichkeit, pathogene Viren aus allgemein verfügbaren Grundstoffen zu konstruieren (Cello et al., 2002). Zusammengefasst: Auch wenn das Risiko für das Auftreten einer „emerging infection“ oder eines BT-Angriffs kaum kalkulierbar ist, müssen die entsprechenden Dienste sich für den „worst case“ vorbereiten. Nur eine schnelle und eindeutige Diagnose – und dabei hilft die EM – kann die Konsequenzen für die Bevölkerung eingrenzen und öffentlicher Panik vorbeugen (Morens et al. 2001). Auf diesen „worst case“ darf die EM aber nicht untätig warten – zur Wahrung von Expertise und Anerkennung ihres Stellenwertes sollte die EM auch andere infektiologische Problemfelder (► Tab. 1) intensiv bearbeiten.

Zusammenfassung

Die EM-Erregerdiagnostik hat sich in der klinischen Routine, in der Pockendiagnostik, bei neuartigen Infektionen und im BT-Fall vielfach bewährt – sie ist prinzipiell auch für die Diagnostik gentechnischer Konstrukte gerüstet (Curry et al., 2006; Gelderblom, 2003; Hazelton und Gelderblom, 2003; Ksiazek et al., 2003; Long et al., 1970; Reed et al., 2003). Sie ist nicht beschränkt auf die Virologie, sondern für die Diagnose aller möglichen Erreger und Proben geeignet – gewonnen direkt vom Patienten, nach Amplifikation in der Zellkultur oder als „Umweltprobe“ bei BT-Verdacht. Die Grenzen der mehr als 130 Jahre alten, von Robert Koch eingeführten Erregervisualisierung wurde vor nahezu 70 Jahren mit der Einführung der EM erheblich erweitert – die Auflösung wurde 1.000-fach gesteigert. Überdies wird die EM heute auch durch moderne Methoden, durch Schnelleinbettung (Über-

blick bei Schroeder et al. 2006), Immun-EM und internetbasierte Telemikroskopie, ergänzt. Angesichts ihrer Ergebnisse und ihres Potenzials ist die EM auch in Zukunft unverzichtbar für eine effiziente und rationale Infektionsdiagnostik (Biel und Gelderblom, 1999; Curry et al., 2006; Hazelton und Gelderblom, 2003; Madeley, 2003).

Referenzzentren

- Konsiliarlaboratorium für schnelle EM-Erregerdiagnostik, Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin, E-Mail: bannertn@rki.de
- Arbeitskreis für Elektronenmikroskopische Virusdiagnostik der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie (AK-EMED), Dr. Hans R. Gelderblom, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin, E-Mail: gelderblomh@rki.de

Homepages / Webadressen mit weiterführender Information

- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333, USA: <http://www.bt.cdc.gov/labissues/index.asp> = Website der CDC, klick: Packaging Protocols for biological Agents/Diseases, Negative Staining Electron Microscopic Protocol for Rash Illness
- <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing/> klick: Specimen Collection Guidelines
- Deutsche Gesellschaft für Elektronenmikroskopie (DGE) und Arbeitskreis für EM-Erregerdiagnostik der DGE (AK-EMED): <http://www.dge-homepage.de>
- Emerging Infectious Diseases: Website des Journals: <http://www.cdc.gov/eid>
- Konsiliarlabor für EM-Erregerdiagnostik, Robert Koch-Institut, Berlin www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/Konsiliar_inhalt.html für Handouts und Veröffentlichungen; klick zu: Kurse – Unterlagen oder Publications – out of the Consultant Lab
- Microscopic Society of America (MSA) <http://www.microscopy.org>
- Society for Ultrastructural Pathology <http://sup.ultra-kohl.com>
- The Big Picture Book of Viruses: http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVHomePage.html
- US Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) <http://www.usamrid.army.mil>
- Virus Ultrastructure <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/linda.html>

Lehrbücher

1. Bozzola JJ, Russell LD (1999) Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists, 2. Aufl. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 670 Seiten, ISBN 0-7637-0192-0
2. Flegler SL, Heckman JW, Klomparens KL (1995) Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 279 Seiten ISBN 3-86025-341-7

Schlüsselliteratur

1. Biel SS, Gelderblom HR (1999) Diagnostic electron mi-

- croscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol* 13:105–119
2. Biel SS, Nitsche A, Kurth A, Siegert W, Özel M, Gelderblom HR (2004) Detection of human polyomaviruses in urine from bone marrow transplant patients: a comparison of electron microscopy with PCR. *Clin Chem* 50:306–312
 3. Brumfield G (2003) Still out in the cold. *Nature* 423:678–680
 4. Cello J, Paul AV, Wimmer E (2002) Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in absence of natural template. *Science* 297:1016–1018
 5. Curry A, Appleton H, Dowsett B (2006) Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron* 37:91–106
 6. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, (Hrsg) (2005) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg
 7. Gelderblom HR (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5:617–637
 8. Gelderblom HR (2003) Elektronenmikroskopie im Methodenspektrum der Bioterrorismus-Diagnostik. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheits-schutz* 46:984–988
 9. Gelderblom HR, Bannert N, Pauli G (2006) Arguments pro disinfection in diagnostic electron microscopy: A response to Madeley and Biel. (19. Mai 2006) *J Infect* (im Druck)
 10. Gentile M, Gelderblom HR (2005) Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy. *New Microbiol* 28:1–12
 11. Grünwald K, Cyrklaff M (2006) Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography. *Curr Opin Microbiol* 9:437–442
 12. Harris JR (1997) *Negative Staining and Cryo-Electron Microscopy: the Thin Film Techniques*. Bios Scientific Publishers, Oxford
 13. Hayat MA, Miller SS (1990) *Negative Staining*. McGraw-Hill Publishing Company, New York
 14. Hazelton PR, Gelderblom HR (2003) Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* 9:294–303
 15. Hyatt AD, Eaton BT (1993) Immunogold Electron Microscopy in Virus Diagnosis and Research. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo
 16. Johnsen CK, Böttiger B, Blom J (2006) Confirmation of electron microscopy results by direct testing of viruses adhered to grids using nucleic acid amplification techniques. *J Virol Methods* 134:92–98
 17. Krüger DH, Schneck P, Gelderblom HR (2000) Helmut Ruska and the visualization of viruses. *Lancet* 355:1713–1717
 18. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S et al. (2003) A novel coronavirus associated with a severe respiratory syndrome. *New Engl J Med* 348:1953–1966
 19. Lane HC, Montagne JL, Fauci AS (2001) Bioterrorism: a clear and present danger. *Nature Med* 7:1271–1273
 20. Long GW, Noble J, Murphy FA, Herman KL, Lourie B (1970) Experience with electron microscopy in the differential diagnosis of smallpox. *Appl Microbiol* 20:497–504
 21. Madeley CR (2003) Diagnosing smallpox in possible bioterrorist attack. *Lancet* 361:97–98
 22. Miller SE, Howell DN (1997) Concerted use of immunologic and ultrastructural analyses in diagnostic medicine: immunoelectron microscopy and correlative microscopy. *Immunol Invest* 26:29–38
 23. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430:242–249
 24. Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A et al (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268:94–97
 25. Reed KD, Melski JW, Graham MB, Regnery RL, Sotir MJ, Wegner MV et al (2004) The detection of monkeypox in humans in the Western hemisphere. *New Engl J Med* 350:342–350
 26. Schröder JA, Gelderblom HR, Hauröder B, Schmetz C, Milios J, Hofstaedter F (2006) Microwave-assisted tissue processing for same day EM-diagnosis of potential bioterrorism and clinical samples. *Micron* 37:577–590
 27. von Borries B, Ruska E, Ruska H (1938) Bakterien und Virus in übermikroskopischer Aufnahme. *Klin Wochenschrift* 17:921–925
 28. Zheng YZ, Webb R, Greenfield PF, Reid S (1996) Improved method for counting virus and virus like particles. *J Virol Methods* 62:153–159

El-Moro-Canyon-Virus

► Hantaviren