

Bericht zum 5. Labor-Meeting des AK-EMED am 15. Juni 2007 in Hamburg

Die Labor-Meetings des AK-EM-Erregerdiagnostik stehen als 3. Fortbildungs-Element neben den Workshops und den Basic Lab Courses. Letztere werden vom entsprechenden Konsiliarlabor am Robert Koch-Institut (Dr. Norbert Bannert, bannern@rki.de) (ko-) organisiert, während die Labor-Meetings, ebenfalls jährlich an wechselnden Orten, jedoch in deutsch und in lokaler Verantwortung stattfinden. Zum Meeting 2007, am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNI) als ganztägige Veranstaltung von Christel Schmetz veranstaltet, kamen am 15. Juni 30 Teilnehmer aus Deutschland und Österreich zusammen.

Die lange und erfolgreiche Geschichte des BNI und seine Stellung als „Blaue Liste“-Institut (heute „Leibnitz Gesellschaft“) wurden durch Barbara Ebert (Pressesprecherin BNI) vorgestellt. Es folgten 12 wissenschaftliche Beiträge, von Kasuistiken bis zur Diskussion aktueller Tendenzen in der EMED. Eingangs diskutierte Hans Gelderblom (hg) an einem veröffentlichten Fall (Nitsche et al., J Clin Virol 38, 165-168, 2007) einige kritische Punkte (zu hohe Vorverdünnung im Zentral-Labor, Verwendung von Papiertupfern, mangelnde Qualität der Negativ-Kontrastierung) und führte dann die zum Erfolg führenden Faktoren an (mehrere Proben aus einer Läsion, hydrophile Grids, Anreichern). Neben der Negativ-Kontrastierung gewinnt der Ultradünnschnitt bei „schwierigen“ Proben an Bedeutung, zumal jetzt zuverlässige Methoden zur schnellen Präparation zur Verfügung stehen (Schröder et al., Micron 37, 577-590, 2006; Laue et al., J Microbiol Meth 70, 45-54, 2007). Als Voraussetzung für ein Überleben der diagnostischen EM diskutierte hg eine Reihe von Faktoren: neben QS und GLP auch ihre institutionelle Vernetzung, vielfältige Kontakte zum „Kunden“, zu Universitäten, und schliesslich auch eine erkennbare, öffentliche Präsenz.

Christiane Linne-Jonas (SVUA Arnsberg) berichtete über den Einsatz nicht-markierter Erreger-spezifischer Antikörper (Ak) bei der Gastroenteritis-Diagnostik bei Kalb, Schwein und Hund, aber auch zur Abklärung von RHDV beim Kaninchen und bei der Katzen-Panleukämie. Bei geeigneter Ak-Vorverdünnung ergeben sich hier technisch einfach und zuverlässig diagnostisch wegweisende Partikel-Aggregate und –Dekoration. Diese unkomplizierte Form der „direkten“ Immun-EM ist sicherlich auch für andere EM-diagnostische Laboratorien interessant.

Kathrin Hoffman (LUA Sachsen, Dresden) diskutierte an Hand zahlreicher Beobachtungen an Nekropsie- und Zellkulturproben, wie weit die Negativ-Kontrastierung für die Mykoplasmen-Diagnostik geeignet sei. Den Mykoplasmen („Mollicutes“) fehlt die für Bakterien typische, rigide Zellwand. Sie erscheinen daher nach Negativ-Kontrastierung als osmotisch labile, polymorphe Membran-gebundene Partikeln ohne weitere Feinstruktur, die allenfalls eine Verdachtsdiagnose rechtfertigen. Wie hg ergänzend aufzeigte, können sie dagegen am Ultradünnschnitt sicher diagnostiziert werden, weil dann auch die intrazelluläre Struktur und/oder das „fädige DNA-Netzwerk“ in den osmotisch „aufgequollenen“ Erregern erkennbar wird.

Bärbel Hauröder (Zentral-Institut San. Dienst der BW, Koblenz) stellte in „Freilebende Amöben als Vehikel für Infektionserreger“ eine bisher wenig bekannte Überlebens-Strategie vieler Bakterien vor. Acanthamöben, Neglerien, Hartmanellen, Tetrahymena und andere Amöben, natürlicherweise vorhanden in Gewässer - z. T. auch in direkter Umgebung des Menschen, phagozytieren u. a. auch Bakterien als Nahrung. Manche Bakterien können dann allerdings überleben, sich hier - geschützt vor Umwelteinflüssen - vermehren und dann auch ihren Wirt zerstören. Acanthamöben z.B. werden von endo-parasitären Legionellen, Burkholderien und

Pseudomonaden lysiert, während sich die endo-symbiontischen E. coli, Salmonellen und Chlamydien hier nur intrazellulär vermehren. Bei lytischer Freisetzung entstehen häufig „Transport-Vesikeln“, die nach dem Muster der Cluster-Bomben mehrere Bakterien enthalten. Bei der Bekämpfung pathogener Keime müssen solch „neue“ Strategien berücksichtigt werden.

Gudrun Wibbelt (Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung IZW, Berlin) berichtete über eine Infektionskette Nager-Elefant-Mensch, verursacht durch das Kuhpockenvirus. Es kommt primär bei Wildnagern (Ratte, Maus) vor, kann aber auch die meisten Säuger (Rind, Katze, Mensch, aber auch Grosstiere, wie Elefant und Nashorn) gefährden. Zoo- und Zirkus-Tiere werden zwar seit 1994 durch MVA-Impfung vor dieser Infektion geschützt, doch erscheint dieser Schutz bisher nicht gesichert. So trat im Januar 2007 in der Elefantengruppe eines kleinen Wanderzirkus eine schwere Erkrankung bei einer Elefantenkuh auf. Trotz Einschaltung der Veterinärbehörde blieb die Erkrankung für 2 Wochen ungeklärt. Angesichts der klinischen Verschlechterung wurde das IZW eingeschaltet, das dann zusammen mit dem RKI die schnelle Negativ-Kontrast-Diagnose „Orthopockenviren“ stellte. Nachdem das Tier auf Grund seines schlechten Zustandes euthanasiert werden musste, wurde der Kuhpocken-Erreger selbst über PCR, Anzucht und Dünnschnitt-EM in den Epithelien von Auge, Schlund, Darm und anderen Organen nachgewiesen. Milz und Leber zeigten auch Einblutungen, typisch für den schweren, hämorrhagischen Pockenverlauf. In der Folge entwickelte einer der beteiligten Tierpfleger ein Vesikel auf dem Handrücken. In dem Bläschen wurde derselbe Erreger mithilfe von EM, PCR und Sequenzierung nachgewiesen. Umgebungs-Untersuchungen im Zirkus ergaben dasselbe Virus auch bei 3 Ratten, sodass hier eine Infektionskette angenommen werden muss.

Marc Hoferer (Chemisches und Veterinär-Untersuchungsamt Stuttgart) berichtete in „2 Jahre EM am CVUA Stuttgart oder: Aller Anfang ist schwer“ über seine Erfahrungen als Novize in der diagnostischen EM und beim Aufbau und Betrieb eines entsprechenden Labors. Entscheidend für die Gründung des Labors im Jahr 2003 war die Einsicht der Behörde, dass die EM nicht nur in der Routine-Erregerdiagnostik und für Projekte, sondern auch für die schnelle Notfall-diagnostik, auch im Bio- und Agro-Terrorismusfall, essentiell sein kann. Das technische Wissen erwarb Hoferer auf Workshops, Labor-Kursen und Labor-Meetings des AK-EMED sowie bei Laborbesuchen. Die weiteren Voraussetzungen - Räume, Beschaffung eines „Mittelklasse“-TEM und Rekrutierung und Ausbildung von drei motivierten Mitarbeitern - waren im Sommer 2006 geschafft. Das Labor wird derzeit zu 70 % für die Veterinärdiagnostik und zu 30 % für wissenschaftlichen Verbundprojekte, Dissertationen etc genutzt. Im Jahr 2006 wurden >350 Proben von einer Vielzahl erkrankter Tiere und aus Zellkulturen analysiert. Diagnostiziert wurden Pocken-, Adeno-, Herpes-, Polyoma-, Parvo-, Circo-, Calici-, Corona-, Ortho- und Paramyxo-, Rota-, Birna- und Rhabdoviren. Für 2007 ergeben sich eine weitere Zunahme im diagnostischen Aufkommen und ein Dissertationsprojekt. Das Landesgesundheitsamt Stuttgart, das in Kürze ein Hochsicherheits-Labor in Betrieb nehmen wird, plant, die EM-Notfall- und BT-Diagnostik am CVUA durchführen zu lassen. Diese „Erfolgs-Story“ liess erkennen, dass eine diagnostische EM auch heute noch erfolgreich neu gegründet werden kann – klare Hausziele, die Mittel und die Motivation bei den Mitarbeitern vorausgesetzt.

Stefanie Deike (Veterinärmedizin, Uni Giessen) berichtete in „Irrungen und Wirrungen auf dem Weg vom zpE in Zellkultur zur Diagnose“ über die Notwendigkeit enger Zusammenarbeit von EM, PCR und klassischen Verfahren. Der Gingivalabstrich einer auffällig retardierten Katze mit Gingivitis ergab in der Zellkultur einen schwachen zytopathischen Effekt und Synzytienbildung, die sich zunächst nicht weiter klären liessen. Erst die EM an Ultradünnschnitten der in situ-eingebetteten Kultur ergab morphologisch den Befund: „Spuma-Retroviren“. Weitere Passagen

steigerten die Virus-Produktion dann derart, dass der Erreger selbst im Kultur-Überstand durch Negativ-Kontrastierung nachgewiesen wurde. Die nach dem EM-Hinweis ausgerichtete molekulare Feindiagnostik ergab das Vorliegen eines Katzen-Spumaretrovirus, das in der Folge sequenziert und phylogenetisch eingeordnet wurde.

Gudrun Holland (RKI Berlin) zeigte in ihrem Beitrag „Morphologische Charakterisierung atypischer Anthrax-Isolate afrikanischer Affen“, dass für die Beschreibung neuer Erreger das volle Spektrum aller diagnostischen Methoden herangezogen werden sollte. Die Isolate stammen aus dem Tai-Nationalpark der Republik Elfenbeinküste, wo eine vermehrte Sterblichkeit unter Gorillas und Chimpanse aufgefunden war. In der Kultur zeigten sich Gram-positive Stäbchen mit kettenförmigem Wachstum. Die daraufhin durchgeführte real time-PCR wies die auf Anthrax hinweisenden Virulenzgene *pag* und *capC* nach. SEM und Negativkontrastierung zeigte dann jedoch bei den Affen-Isolaten einige morphologische Besonderheiten, u. a. Tendenzen zum Verkrümmen und Wirbelbildung und das Vorhandensein von Geißeln. Diese Phänomene kommen bei klassischen Anthrax-Stäbchen nicht vor, so dass die ursprünglich veröffentlichte Diagnose sicherlich noch modifiziert werden muss.

Dirk Plähn (BNI Hamburg) stellte in „Arbeit im Hochsicherheitslabor“ die am Bernhard-Nocht-Institut beim Umgang mit gefährlichen Erregern der Risikogruppe 4 (Marburg-, Ebola- und Lassavirus) eingehaltenen Bedingungen vor. Unterschieden werden organisatorische (Zugang, Entsorgung, Überwachung), technische (gestaffeltes, separates Belüftungssystem, Personen- und Material-Schleusen, Desinfektions-Zwangsdusche beim Verlassen, Abwasser-freier Betrieb) und persönliche Schutzmaßnahmen (zwangsbelüfteter Vollschutzanzug). Zur Desinfektion werden die Biozide Peressigsäure und Wasserstoff-Peroxid eingesetzt (die leider keinen Struktur-Erhalt zulassen). Plähn stellte auch den im Fortschreiten befindlichen BNI-Neubau mit dem integrierten Hochsicherheitslabor vor. Der futuristische „Festungs-Bau“ gilt als von der Bevölkerung gut akzeptiert.

Andreas Kurth (RKI Berlin) behandelte in „Virus-Inaktivierung in der Erregerdiagnostik“ zwei Komplexe: die Eignung und „Sicherheit“ des zum Probenversand weit eingeführten Stabilisierungs-Cocktails *RNAlater*TM (Quiagen) für nachfolgende EM-Untersuchungen und die Inaktivierung von Pockenviren durch Formaldehyd (FA). *RNAlater*TM stabilisierte Proben-DNA und RNA hervorragend für die PCR, ermöglichte aber im Vergleich zur Glutaraldehyd-Fixierung (GA) keinen zufriedenstellenden Erhalt zellulärer Strukturen. Pockenviren liessen sich nach 5 Tagen bei 37°C in *RNAlater* dagegen noch hervorragend konserviert im Ultradünnschnitt zeigen. Die entsprechenden Proben enthielten auch eine bemerkenswerte Restinfektiosität! Diese überraschende Stabilität war Anlass, die Resistenz von Pockenviren auch gegenüber Aldehyden systematisch zu untersuchen. Versuche an Vacciniavirus mit 2% oder 4% FA ergaben eine nur etwa 10.000fache „Abreicherung“, jedoch eine erhebliche Rest-Aktivität (wenn man bedenkt, dass eine Pockenpustel bis zu 10¹⁰ infektiöse Einheiten enthält). Erst die Zugabe von 0.05 % GA zum FA ergab sichere Inaktivierung. Es bleibt abzuklären, ob die Rest-Infektiosität nach alleiniger FA-Inaktivierung auf dem Auswaschen des Monoaldehyds FA vor dem Infektiositäts-Test beruht. Die Suche nach einer nicht nur sicheren, sondern auch Feinstruktur- und Antigen-erhaltenden Fixierungsmethode ist jedenfalls noch offen.

Heiko Sigmund (Pathologie, Universität Regensburg) berichtete detailliert über „Qualitätsmanagement (QM) und Akkreditierung im Zentralen EM-Labor Regensburg“. Akkreditierung bezeichnet das „Verfahren, in dem eine maßgebliche Stelle formell anerkennt, dass eine Stelle oder Person kompetent ist, bestimmte Aufgaben auszuführen“. Im Gegensatz

zur Zertifizierung wird hierbei neben dem eigentlichen Arbeitsprozess auch die Qualität der Ergebnisse beurteilt. Die Akkreditierung erfolgte in der Pathologie Regensburg nach den Normen DIN EN ISO 9001 (QM-System) und DIN EN ISO/IEC 17020 (Inspektionsstelle). Der Aufbau und die Organisation des QM-Systems sind in einem QM-Handbuch mit vorgegebenem Aufbau festgelegt (1. allgemeiner Teil, 2. eigentliches QM-Handbuch mit Führungs-, Kern-, und Unterstützungsprozessen, 3. mitgeltende Unterlagen). Zu den Kernprozessen zählen die wiederum standardisierten allgemeinen Verfahrens- und detaillierten Arbeits-Anweisungen z.B. zum Probeneingang, zur Probenpräparation, Befundung und Ergebnis-Dokumentation. Die Akkreditierung erfolgt nach Sichtung der QM-Unterlagen und einer vor Ort-Überprüfung des im Handbuch beschriebenen QM-Systems durch einen Vertreter des Deutschen Akkreditierungsrates (DAR). Begehungen finden auch nach der „Erst-Akkreditierung“ regelmässig, etwa alle 2 Jahre, zur Aufrechterhaltung der Akkreditierung statt. Der Nutzen der Akkreditierung für ein kommerziell arbeitendes EM-Labor ist evident: standardisierte, verlässliche Methoden und transparente Abläufe sichern gleichbleibend hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse. Es wurde aber auch deutlich, dass die Akkreditierung durch die Einführung des QM-Systems mit einem hohem Aufwand verbunden ist.

Stephan Pfeiffer und Christel Schmetz (Microscopy Sciences, Kiel; BNI Hamburg) präsentierten an zwei ultrastrukturell anspruchsvollen Erregern das Thema „Hochdruckgefrierfixierung und Gefriersubstitution (GS) im Vergleich zur konventionellen Präparation“. Nach physikalischer Fixierung (schnelles Einfrieren und Abkühlen der Probe, >10.000 °C pro sec), GS und Einbettung in HM20 zeigte Leishmanien hohe Formstabilität, dichtes Zytoplasma und guten Erhalt ihres Mikrotubuli- und Zilien-Systems - vergleichbar gute Erhaltung auch bei *Entamoeba histolytica*. Zugleich ermöglichten die Kryo-Präparate auch den Antigen-Nachweis am Ultradünnschnitt. FA/GA-Fixierung und konventionelle Einbettung ergaben dagegen drastisches Auswaschen des Zytoplasma, Depolymerisation des Mikrotubuli-Systems und Antigen- und Formverlust. Die Notwendigkeit einer Kryo-Präparation für die Charakterisierung neuer Erreger ist evident! Offen bleibt andererseits, wie weit die Kryo-Präparation angesichts ihres Zeitaufwands auch in der Schnelldiagnostik genutzt werden kann. Und schliesslich: die EM-Erregerdiagnostik profitiert eindeutig von den Schäden der konventionellen Präparation – die makromolekularen Erreger werden durch osmotisches Schwellen und Zytoplasmaverluste nur leichter erkennbar.

Abschliessend sprach hg noch zwei Herausforderungen für die EM-Erregerdiagnostik an: Kostendruck und gelegentlich auch mangelndes Wissen und Verständnis bei Vorgesetzten und in der Politik. Er wies darauf hin, dass eine verbesserte Vernetzung mit der Labor-Medizin, mit Kliniken, ÖGD und den Universitäten ebenso nötig ist wie das unter GLP-Richtlinien QS-gesicherte Arbeiten und eine aktive, angemessen engagierte Öffentlichkeitsarbeit. Schliesslich wurden Termine und Perspektiven diskutiert: im Rahmen der DGE-Jahrestagung in Saarbrücken (02.-05. September 2007) sollen auf dem AK-EMED-Workshop am 4. September u.a. eine thematische Erweiterung des AK-EMED und eine erneute „Europäische Initiative“ verhandelt werden. Ausserdem stehen Sprecherwahlen an, da hg dort nach >12 Jahren die Funktion als Erster Sprecher des AK-EMED aufgeben möchte.

Das 5. Labor-Meeting – effizient und zugleich angenehm organisiert auch dank einer Spende der Firma FEI - fand seinen harmonischen Abschluss in einer Hafentour.

Dr. Hans Gelderblom, 28.06.2007