

## **Glienicke Workshop 2006: „Diagnostic Electron Microscopy in Infectious Diseases“**

Am 19. und 20. Oktober 2006 fand am Robert Koch-Institut (RKI) in Berlin der „Internationale Workshop zur elektronenmikroskopischen Erregerdiagnostik“ statt. Der Workshop wird im Turnus von zwei Jahren durch das Konsiliarlaboratorium für EM-Erregerdiagnostik und den Arbeitskreis für Elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik (AK-EMED) der DGE organisiert. Aufgrund von Umbauarbeiten im Jagdschloss Glienicke diente diesmal der Hörsaal des RKI den über 90 Teilnehmern aus 19 Ländern als Veranstaltungsort. Insgesamt wurden 28 Vorträge sowie einige Poster präsentiert. Am ersten Tag des Workshops standen die Diagnostik von „Emerging Infectious Diseases“ und gerätetechnische Aspekte im Vordergrund, während am zweiten Tag vorwiegend über ausgewählte diagnostische Fälle, methodische Entwicklungen und Ergebnisse aus der infektionsbiologischen Grundlagenforschung berichtet wurde.

In seiner Eröffnungsrede wies Dick Madeley (Newcastle, England) auf die Vorteile und Einsatzmöglichkeiten der EM-Schnelldiagnostik im Falle ungewöhnlicher Infektionserkrankungen hin. Die rasche und sichere Erkennung eines Erregers bei gefährlichen Infektionsgeschehen ist eine wesentliche Voraussetzung für erfolgreiche klinische und epidemiologische Maßnahmen. Immunologische Nachweismethoden und PCR-Techniken, die heute in Routine- und Speziallabors vorgehalten werden, decken sehr zuverlässig ein großes Spektrum bekannter pathogener Organismen ab. Bei Konfrontation mit neuartigen oder unerwarteten Viren und Bakterien ist eine schnelle Diagnostik aber meist nicht möglich, denn die benötigten Antikörper bzw. Primer fehlen. In solchen Fällen ist die EM als diagnostisches Mittel, aufgrund ihres breiten diagnostischen Spektrums, besonders wertvoll. Ein geschulter Blick auf den Erreger im Elektronenmikroskop liefert einen sicheren Befund oder ist zumindest richtungweisend für eine anschließende Feindiagnostik. Zudem kann aufgrund der kurzen Präparationszeiten mit einer EM-Diagnose oft schon nach einer Viertelstunde gerechnet werden.

Atanu Basu (National Institute of Virology, Puna, Indien) präsentierte sehr eindrucksvoll den Einsatz der EM-Diagnostik bei Epidemien neuartiger Viren wie Nipah oder Chandipura, die speziell bei Kindern zu Enzephalitiden mit fatalen Verläufen führen. Gegenwärtig grassiert in seinem Land eine von Mücken übertragene Seuche, die durch einen afrikanischen Subtyp des Chikungunyavirus verursacht wird.

Aus westafrikanischen Mücken haben Andreas Kurth (RKI, Berlin) und Mitarbeiter eine Reihe unbekannter Viren isoliert und mit Hilfe der EM morphologisch charakterisiert. Darunter befindet sich wahrscheinlich ein neues Mitglied der Reovirus-Familie. Weitere Sequenzierungsarbeiten und die Bestimmung des Tropismus werden die taxonomische Einordnung erleichtern.

Norbert Bannert (RKI, Berlin) betonte in seiner Präsentation, dass Australien gegenwärtig Zeuge einer massiven Endogenisierung (Genomintegration und Vererbung) des Koala Retrovirus (KoRV) ist. Ein starker Befall der Lymphknoten eines infizierten Tieres wurde mit Hilfe der EM dokumentiert. Das Virus begann offenbar erst Anfang des vergangenen Jahrhunderts Koalas zu infizieren und in ihre Keimbahn zu gelangen. Dadurch werden diese Retroviren, die in vielen Tieren zu Leukämien und Lymphomen führen, über Generationen vererbt. Humane Endogene Retroviren stehen ebenfalls im Verdacht, maligne Erkrankungen zu verursachen.

Studien zur EM-Diagnostik und Morphologie neuartiger exogener humaner Viren, darunter PARV4 und das humane Bocavirus (HBoV), stellte Hazel Appleton (Health Protection Agency, London, England) vor. Dabei handelt es sich um zwei kürzlich entdeckte Parvoviren, die nicht von B19-Tests erfasst werden. HBoV wird mit respiratorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht, während PARV4 meist Fieber und Abgeschlagenheit verursacht.

Über die Rolle der EM bei der Entdeckung des SARS-Virus, der Diagnostik von Affenpockenfällen und über den diesjährigen Mumps-Ausbruch in den USA informierten Charles Humphrey und Cynthia Goldsmith vom CDC (Atlanta, USA).

Michael Laue (RKI, Berlin) stellte eine neuartige Schnellschnittmethode vor, die für verschiedene Proben verwendbar ist, mit der aber insbesondere die elektronenmikroskopische Sporendiagnostik an Sicherheit gewinnt.

Dieser Vortrag und einige weitere zum Themenkomplex Methodenentwicklung, speziell der Immuno-EM (IEM), fanden sehr viel Beachtung. Mit Hilfe von Antikörpern können morphologisch identische Viren im EM differenziert werden. Hierzu haben Tao Hong (CDC Peking, China), Antonio Lavazza (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italien) und Jan Mast (Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brüssel, Belgien) interessante Techniken und Anwendungen vorgestellt. Kristina Johnsen (Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark) stellte eine elegante Methode vor, Viruspartikel nach der Betrachtung im EM anschließend mit der real time PCR zu quantifizieren und zu typisieren.

Zum Abschluss des ersten Workshoptages präsentierten Heiner Jaksch (Zeiss), Wim Busing (FEI), Matthias Rodewald (Jeol), Martin Bartels (Olympus-SIS) und Michael Capers (Hitachi) interessante instrumentelle Entwicklungen ihrer Firmen, bevor der Abend mit einem feierlichen Dinner ausklang.

Das Arbeitsprogramm am 20. Oktober war ähnlich weit gespannt. Paul Hazelton (University of Manitoba, Winnipeg, Canada) behandelte mit dem Thema "Concentration methods in diagnostic virology" eine wichtige Voraussetzung für die Qualität und Akzeptanz der EM-Erregerdiagnostik: ausreichende Partikelmengen am EM-Trägernetz (Grid). Auch wenn manche direkte Probe (insbesondere aus Hautläsionen, Stuhl, Urin oder Zellkulturanzucht) mehrere log<sub>10</sub>-Stufen über dem allgemein akzeptierten Limit von 10<sup>6</sup> Teilchen/ml liegt, muss

hier bedacht werden, dass ein Grid letztlich weniger als ein 1 µl-Äquivalent der Probe tragen kann. Daraus ergibt sich unmittelbar der Wert einer Partikelanreicherung, die sehr erfolgreich durch das Aufzentrifugieren auf das Grid mit Hilfe der druckluftgetriebenen Ultrazentrifuge Airfuge<sup>R</sup> (Beckman Coulter) erreicht wird. Für die Airfuge stehen zwei Rotoren mit unterschiedlicher Effizienz zur Verfügung: der höher, bis 1000-fach anreichernde Partikelzählrotor zeigt gelegentlich Dichtungsprobleme, der Festwinkelrotor A-100/18 ergibt bei Verwendung entsprechender Adapter zuverlässig und schnell 50-100-fach höhere Partikelmengen auf dem Grid – ein erheblicher Gewinn an Sensitivität und Schnelligkeit.

Alex Hyatt (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Geelong, Australien) berichtete aus der Arbeit seines Labors. Integriert in das in SO-Asien sehr aktive staatliche Institut für Tiergesundheit erfüllt es intern und extern diagnostische Aufgaben im Bereich Tierzucht und Wild-life. Unter den >20 von ihm bearbeiteten „emerging viruses“ seien hier nur die beiden Paramyxoviren Hendra und Nipah genannt. Zum Veterinärbereich gehören auch die Schwerpunkte Aquakultur und ozeanische Umwelt – darüber hinaus ist das Labor national auch für die Notfalldiagnostik, die Aufklärung unbekannter Infektionen beim Menschen und nach „9/11“ auch für die Bioterror-Diagnostik zuständig. Zur Aufgabenerfüllung verfügt das Labor über exzellente Negativ-Kontrast- und Ultradünnschnitt-EM, bei Bedarf werden beide sehr erfolgreich durch IEM ergänzt. Mit dem Zentrum Geelong betreiben Universitäten und der Public Health Bereich die EM-Erregerdiagnostik z. T. schon zuverlässig „vernetzt“ als „Australia’s Microscopy“, bzw. „Australia’s Biosecurity Microscopy Network“, mit ständiger Erreichbarkeit und Möglichkeiten zur Telemikroskopie. Dieser hohe Grad an Vernetzung sei nicht nur durch die ungeheure Größe seines Landes gefordert, sie sei auch notwendig, weil als Folge vielfältig-massiver Störungen der Ökosysteme auch in Zukunft mit neuartigen Erkrankungen bei Mensch und Tier zu rechnen sei.

Roland Fleck (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, England) berichtete über die Rolle von Lichtmikroskopie und EM bei Forschungs- und Amtsaufgaben seiner Institution, der Entwicklung, Bewertung und Standardisierung von Immun-Präparaten, Vakzinen und anderer biopharmazeutischer Produkte. Am NIBSC werden modernste Imaging-Methoden eingesetzt: an der Basis bringt die konfokale LM (cLSM) hier durch ihre Schnelligkeit in Präparation und Auswertung und durch ihren gegenüber der EM großen Gesichtswinkel eine wesentliche Arbeitserleichterung. Durch die Vorklärung am cLSM wird die EM entlastet und kann sich auf die kritischen Fälle konzentrieren. Die von modernen Gefrier-Präparationsmethoden unterstützte EM wird insbesondere auf den Gebieten Gen-Therapie und Vakzineentwicklung (DNA-, bakteriell, viral) eingesetzt.

Alan Curry (Health Protection Agency, Manchester, England) betonte den Wert der Ultradünnschnitt-EM für die Differenzierung von Parasiten, insbesondere von Mikrosporidien und anderen Sporozoen. *Isospora belli* verursacht beim Menschen eine Kokzidiose.

Mikrosporidien sind von einer massiven Zellwand begrenzt; die 1.5 µl großen Sporen besitzen weder Mitochondrien noch Golgi-Apparat. Im Dünnschnitt zeigen die Sporen zwei Exemplare einer apolar angeordneten, mehrfach gewendelten „Springfeder“ (benötigt für die Infektion einer neuen Wirtszelle) und eine solide Zellwand. Da sich die Zahl der „Feder“-Windungen bei verschiedenen Mikrosporien-Gattungen unterscheidet, dient diese Struktur in der Hand des Experten zur Typisierung.

Barry Dowsett (Health Protection Agency, Porton Down, England) berichtete in “A nosocomial poxvirus outbreak in Pakistan” über die Klärung einer sich bevorzugt über Hospitäler ausbreitenden Hauterkrankung („febrile vesicular rash disease“). Durch Negativ-Kontrast-EM konnte er *prima vista* und mit großer Sicherheit Orthopockenviren darstellen, die sich dann molekulargenetisch auf die in SO-Asien endemischen Buffalo-Poxviren zurückführen ließen. Die nicht erwartete Mensch-zu-Mensch-Übertragung dieser Viren könnte mit den besonderen sozio-gesundheitlichen Problemen der Betroffenen erklärt werden.

Wie Larissa Kolesnikova (RKI, Berlin) in ihrem Beitrag ausführte, erfolgt die Virusfreisetzung (Budding) des Marburgvirus oft an Zellfortsätzen. Für Ultrastruktur- und IEM-Untersuchungen setzte sie die für Filoviren besonders empfindlichen HH-7-Hepatom-Zellen ein. Diese wurden unter BSL-4 Bedingungen infiziert und nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd *in situ* eingebettet - parallel in Epon für optimale Feinstruktur und in LR Gold für IEM. Zusätzlich wurden Whole-Mount-Präparate der Virus-produzierenden Zellen hergestellt: bei der Immuno-Gold-Negativ-Kontrast-Analyse zeigten sie, dass die Freisetzung der Viren vom zellulären Aktin „getrieben“ wird. Entsprechend findet sich das Marburgvirus überwiegend an der Spitze oder an den Flanken der Aktin-reichen Filopodien.

Ilya Vinogradov (Vector, Novosibirsk, Russland) berichtete zunächst über den Wert der Negativ-Kontrast-EM für die schnelle Differentialdiagnose zwischen Pox- und Herpesviren (chickenpox vs smallpox) bei „febrile vesicular rash diseases“. Er zeigte dann an Ultra-/Semidünn-Schnitten infizierter Chorioallantoismembran (CAM), dass sich Varizella-, Kuhpocken- und echte Pockenviren durch Größe, Form, Einschlusskörper vom Typ A und Vaskularisierung der CAM-Läsionen licht- und elektronenmikroskopisch differenzieren lassen. Er empfahl, wo immer möglich, die aufwendigere Dünnschnitt-EM parallel zur obligatorischen Negativ-Kontrast-EM einzusetzen, da der Schnitt erheblich mehr an diagnostisch interessanter Information über Virus und Zelle enthält.

Guisy Cardeti (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Rom, Italien) hat die konventionelle EM für die Schnelldiagnostik viraler, aber auch bakterieller und parasitärer Bienenkrankheiten eingesetzt. Häufig ergab die Negativ-Kontrast-EM schon die gesuchte Enddiagnose, in anderen Fällen diente der morphologische Befund als Basis für die molekularbiologische Typisierung.

Sara Miller (Duke University, Durham, USA) berichtete in „Making lemonade from lemons and other special techniques in electron microscopy“ aus dem Fundus ihrer jährlich etwa 500 Dünnschnitt- und 1000 Negativ-Kontrast-Proben. Das Prinzip der korrelativen Mikroskopie erlaubt ihr, eine am LM im Paraffin-Schnitt auffallende Struktur gezielt durch Ultradünnschnitt-EM aufzuklären. Hier berichtete sie über das seltene, sich an der Haut manifestierende Krankheitsbild der Trychodysplasia spinulosa, eine Polyomavirus-Infektion. In Durham wird das Kollektiv der Nieren-Transplant-Patienten regelmäßig durch Negativ-Kontrast-EM von Urinproben auf die Ausscheidung von Polyomavirus überprüft. Wenn es, als Zeichen massiver therapeutischer Immunsuppression, zur Virus-Ausscheidung kommt, ist das Transplantat gefährdet und seine Abstoßung droht. Mit Hilfe dieses Urin-Monitoring wird in Durham die therapeutisch notwendige Gabe von Immuntherapeutika justiert.

Hans Gelderblom (RKI, Berlin) erläuterte an Positiv- und Negativ-Beispielen das Potential der EM für Klinik und Öffentlichen Gesundheitsdienst: dieses könne für die Zukunft nur dann erhalten werden, wenn die Präparation grundsätzlich „stimmt“. Die geforderte „Labor-Sicherheit“ könne nur parallel, durch Inaktivierung und strikte Einhaltung der Sicherheitsrichtlinien erreicht werden. Essentiell sind stabile, hoch-adsorptive Grids, die Verwendung unterschiedlicher Kontrast-Salze, interne und externe Qualitätssicherung und Maßnahmen zur Fortbildung. Unbedingt hilfreich sind Methoden zur Partikelanreicherung, oft auch der Paralleleinsatz der Dünnschnitt- neben der obligatorischen Negativ-Kontrast-EM und eine gute Vernetzung des EM-Labors im diagnostischen und im akademischen Bereich. Neue, Mikrowellen-gestützte Präparationsverfahren, die Kombination von IEM und Airfuge-Anreicherung oder die Nutzung des EM-Grids auch für die PCR sollten helfen, die schnelle Morpho-Diagnose im Labor-diagnostischen Repertoire zu erhalten.

Nach kurzer Abschluss-Diskussion endete der Arbeitsteil des Workshops um 15.00 Uhr. Die anschließende Bootstour auf der Spree führte die Teilnehmer durch die Mitte Berlins bis zum Schloss Charlottenburg.

Das Spektrum und die inhaltliche Qualität der Vorträge sind nur zwei Gründe für die positive Resonanz der Veranstaltung. Sie sind Ansporn, den seit 1994 stattfindenden Workshop auch in Zukunft fortzuführen.

Die Veranstalter danken dem Robert Koch-Institut, der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie sowie den Firmen FEI, Hitachi, Jeol, Olympus-SIS und Zeiss für die Unterstützung.

*Norbert Bannert, Michael Laue, Hans Gelderblom*

*Robert Koch-Institut*

*Nordufer 20*

*13353 Berlin*

## **Ringversuche zur Qualitätssicherung der EM-Erregerdiagnostik (EQA-EMV) und weitere Aktivitäten des Konsiliarlabors für EM-Erregerdiagnostik**

Im März 2006 wurden sechs inaktivierte Virussuspensionen an 114 Teilnehmer in 33 Länder verschickt. Mit einer Rücklaufquote von 70 % und 77 % korrekter Diagnosen war der 19. EQA-EMV erneut recht erfolgreich. Im Mai 2007 ist der Versand des nächsten Ringversuchs (EQA-EMV-20) geplant.

Am 02. und 03. März 2006 fand der „13. Basic Lab Course on Diagnostic EM in Infectious Diseases“ am RKI statt. Insgesamt neun Teilnehmern wurden dabei Grundlagen und Prinzipien der EM-Erregerdiagnostik vermittelt. Der 14. „Grundkurs“ wird voraussichtlich am 11. und 12. Oktober 2007 stattfinden. Anfragen und Anmeldungen bitte an das Konsiliarlabor am Robert Koch-Institut ([BannertN@rki.de](mailto:BannertN@rki.de)) richten.



Teilnehmer am Glienicke Workshop 2006 am Robert Koch-Institut in Berlin (19. Okt. 06).