

5.4 Elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik bei vermuteten bioterroristischen Anschlägen

Norbert Bannert · Hans R. Gelderblom · Michael Laue · Muhsin Özel

Zusammenfassung

Die Beurteilung von Probenmaterial potenzieller bioterroristischer Attacken und anderer infektionsbiologischer Notfallsituationen gewinnt durch den frühen Einsatz mikroskopischer Verfahren an Schnelligkeit und Sicherheit. Das konventionelle elektronenmikroskopische Negativkontrastverfahren bietet die Möglichkeit eines ersten Befundes in weniger als zwanzig Minuten nach Eingang des fixierten Probenmaterials.

Es werden nicht nur alle viralen Erreger, sondern auch Bakterien, Sporen und andere Bestandteile dieser Größenordnungen visualisiert. Hierzu sind keine spezifischen Reagenzien wie Antikörper, Primer oder Sonden nötig, die das diagnostische Spektrum einschränken. Unbekannte, unerwartete oder genetisch modifizierte Keime können deshalb diagnostiziert werden. Spezifische Antikörper werden jedoch für eine exakte Typisierung morphologisch identischer Erreger mit Hilfe der Immuno-EM benötigt.

Die elektronenmikroskopische (EM) Diagnostik ist nicht geeignet für das Screening großer Probenmengen und benötigt morphodiagnostische Kenntnisse und Erfahrungen. Aufgrund ihrer Vorteile sollte die Methode in bioterroristischen (BT)-Verdachtsfällen und ähnlichen kritischen Gefahrensituationen eingesetzt werden, um frühzeitig eine erste orientierende Diagnose zu erhalten oder eine höhere Erregerkonzentration in einer Probe auszuschließen.

Einleitung

Deutschland ist heute in starkem Maße abhängig von globalen politischen und ökonomischen Entwicklungen. Vertiefte Handelsbeziehungen, effiziente Telekommunikation und ein intensives Verkehrs- und Reisewesen beeinflussen zunehmend das Leben unserer Gesellschaft. Offenheit, Mobilität, veränderte Lebensweisen und militärische Engagements in Krisenherden bieten nicht nur vielfältige Chancen und Optionen, sondern erhöhen auch das biologische Gefahrenpotenzial, dem die Gesellschaft und ihre Regierung durch geeignete Maßnahmen begegnen müssen. Eine besondere Bedrohung in diesem Kontext stellen zweifellos die rasche Ausbreitung neuer oder neuartiger Infektionskrankheiten und die absichtliche Freisetzung von bioterroristisch relevanten Keimen oder Toxinen dar. Neue Gefahren drohen durch bis dato unbekannte oder fremde, meist vom Tier auf den Menschen übertragene Infektionserreger (Kurth, 2004). Die schnelle globale Ausbreitung der SARS-Epidemie (Ksiazek et al., 2003b) und der Ausbruch von Affenpocken im Jahr 2003 im mittleren Westen der USA sind dafür gute Beispiele (Reed, Melski, Graham & Regnery, 2004). Aktuell wird eine katastrophale Grippe-Pandemie befürchtet, falls das H5N1-Geflügelvirus den Transfer auf den Menschen bewerkstelligt und hier nach entsprechender Anpassung eine effiziente Mensch-zu-Mensch-Übertragung erreicht. Der Einzelne und das öffentliche Gesundheitswesen werden zudem durch längst besiegt geglaubte Infektionskrankheiten bedroht, zu denen auch das Auftreten antibiotikaresistenter Keime beiträgt.

Die gestiegene terroristische Bedrohung und die 2001 in den USA aufgetauchten Anthraxbriefe haben das schwer zu kalkulierende Risiko eines Anschlages mit biologischen Waffen erheblich erhöht. Die genannten Ereignisse und die nachfolgende Flut an Drohbriefen stellten die Gesundheitsbehörden der meisten Industrieländer vor erhebliche Probleme. Eine ausreichend sichere und rasche Diagnostik der für bioterroristische Zwecke geeigneten Erreger existierte nicht oder wurde nur an sehr wenigen Instituten vorgehalten. Die für BT-Angriffe geeigneten Keime werden heute nach den von ihnen ausgehenden Gefahren gruppiert (Lane, Montagne & Fauci, 2001). Ausschlaggebend sind hierbei Faktoren wie Ausbringmöglichkeit, Mensch-zu-Mensch-Übertragungsrates, Morbidität, Letalität, Anforderungen an das Gesundheitswesen und ihr Panik-Potenzial. In der potenziell gefährlichsten Kategorie A finden sich u. a. das Pockenvirus (siehe Abb.58), der Erreger der Pest und des Milzbrandes.

In den vergangenen Jahren wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, die Diagnostik dieser Keime und das Notfallmanagement im Falle einer Freisetzung zu verbessern. Die Herausforderungen durch den Bioterrorismus sowie „emerging“ und „re-emerging infections“ sind aber nach wie vor erheblich. Ausbrüche oder Freisetzungen können nur durch eine Vielzahl abgestimmter Maßnahmen beherrscht oder wenigstens eingegrenzt werden. Voraussetzung für ein erfolgreiches Management solcher biologischer Gefahrensituationen sind zunächst das rasche Erkennen des Ausbruchs bzw. des BT-Angriffs und die Bestimmung des Erregers. Die dabei eingesetzte Labormethodik muss zuverlässig, schnell und spezifisch sein, denn das Ergebnis der Untersuchung ist eines der wichtigsten Bestandteile einer fundierten Risikoanalyse, die das weitere Handeln bestimmt (Pauli & Ellerbrok, 2003).

Elektronenmikroskopische Schnelldiagnostik

Die elektronenmikroskopische (EM) Schnelldiagnostik, frühzeitig als „front line“-Methode eingesetzt, bietet eine Reihe von Vorteilen, die bei der Untersuchung von BT-Verdachtsmaterial und in diagnostischen Notfallsituationen sehr wertvoll sind (Gelderblom, 2003). Für EM Schnelldiagnostik wird im Wesentlichen die Negativkontrastierungs-Technik eingesetzt. Nach kurzer Adsorption des Probenmaterials an ein hydrophiles Objektträgernetz und Waschschrritten erfolgt die Kontrastierung mit Schwermetallsalzen. Der dabei entstehende amorphe Niederschlag liefert im Elektronenstrahl ein detailreiches Abbild der Erreger.

Angesichts der kurzen Präparationszeiten ist es möglich, schon nach weniger als zwanzig Minuten nach dem Eintreffen der fixierten Probe im EM-Labor einen ersten orientierenden Befund zu erhalten. Aufgrund der kurzen Wellenlängen der Elektronenstrahlung und des damit verbundenen hohen Auflösungsvermögens lassen sich alle Erreger, von den kleinsten Viren bis zur Größe von Bakterien, Sporen und kleineren Parasiten, visualisieren. Der offene Blick auf alle partikulären Bestandteile der Probe erlaubt sogar das Erkennen von völlig unerwarteten Erregern. Die eindeutige EM-Diagnose von Orthopocken im Probenmaterial des oben erwähnten Affenpockenausbruchs in den USA ist ein Beispiel dafür. Da keine spezifischen Reagenzien, Sequenzinformationen oder Epitope benötigt werden, ist das diagnostische Spektrum extrem groß und genetisch modifizierte Keime, unbekannte Erreger oder neuartige Varianten

können schnell visualisiert werden, wie im Falle der Identifizierung eines Coronavirus als Ursache von SARS geschehen (Ksiazek et al., 2003a).

Die EM-Diagnostik führt auf Grund der beobachteten morphologischen Merkmale meist zur Familie des Erregers. Eine weitergehende, spezifischere Bestimmung morphologisch identischer Keime gleicher Größe ist mit der konventionellen EM-Schnelldiagnostik unter Verwendung der Negativkontrastmethode nicht möglich. Die zu erreichende orientierende Bestimmung reicht dem Kliniker oder Epidemiologen häufig schon als Differentialdiagnose, um die notwendigen ersten Schritte, eine antivirale oder antibakterielle Therapie und/oder Quarantänemaßnahmen, einzuleiten. Dem Labor gibt sie Hinweise für die gezielte weitere Charakterisierung des nachgewiesenen Erregers. Mit Hilfe spezifischer Antikörper oder Antiseren kann auch elektronenmikroskopisch eine genaue Typisierung erfolgen.

Wichtig für den Erfolg der morphologischen Diagnostik sind ausreichende Partikelkonzentrationen ($>10^5 - 10^6/\text{ml}$) und ihre effiziente Adhäsion auf den Trägernetzen. Im Falle eines BT-Angriffes ist davon auszugehen, dass hohe Erregerkonzentrationen vorzufinden sein werden. So enthielt einer der 2001 versandten Anthraxbriefe ca. 10^{12} Sporen (Marshall & Gelderblom, 2005). Ausreichend hohe Erregermengen für die EM-Diagnostik sind in Hautläsionen, Stuhl- und Urinproben, Nasensekreten und Zellkulturen häufig gegeben. Bei Bedarf stehen effiziente Anreicherungsverfahren zur Verfügung (Biel & Gelderblom, 1999) ; (Gelderblom & Bannert, 2005).

Elektronenmikroskopische Schnellschnittmethoden

Falls eine zu untersuchende Probe nicht resuspendierbar ist oder ihre innere Struktur nicht erkennbar, aber von Bedeutung ist, muss sie in kleinere Einheiten zerlegt werden, ohne dass die Feinstruktur darunter leidet. In der Regel werden die Proben hierfür in ein hartes Medium eingebettet und danach in ultradünne Scheiben zerlegt, die mit dem Mikroskop durchstrahlbar sind. Die Standardverfahren sind vergleichsweise langwierig und nicht innerhalb eines Tages mit einer Diagnose abschließbar. Durch die Einführung neuer Techniken ist die Präparation ohne Einbußen bei der Qualität auf wenige Stunden reduzierbar (Schnellschnittverfahren).

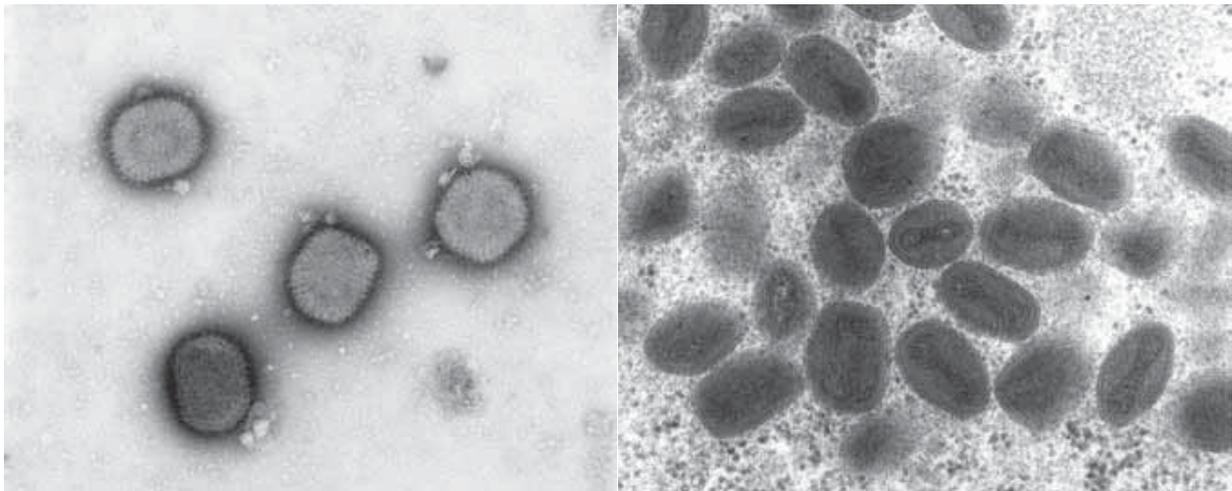


Abb. 58: EM-Aufnahmen von Orthopocken. A: Negativkontrastierung, B: Ultradünnschnitt-Präparat (Positivkontrastierung) von infizierten Zellen.

Mikrowellenunterstützte Arbeitsschritte sind für Schnellschnittverfahren besonders geeignet. Durch gezielte und schnelle Temperaturerhöhung werden die chemische Reaktion und der Transport von Molekülen beschleunigt. In ihren Ergebnissen unterscheiden sich mikrowellengestützte Schnellschnittverfahren nur unwesentlich von Standardverfahren (Leong & Sormunen, 1998). Nachteil der Mikrowellentechnologie ist, dass vergleichsweise hohe Temperaturen bei der Aushärtung der Einbettmedien (Kunststoffe) entstehen, die unter Umständen Moleküle für eine weitergehende Analytik (s. u.) verändern. Alternative Verfahren setzen auf eine Reduktion des Probenvolumens vor der eigentlichen Präparation (schnellerer Stofftransport), eine rasche chemisch katalysierte Polymerisation oder auf Gefrierverfahren. Für alle diese Methoden gilt jedoch, dass nur wenige systematisch erarbeitete Ergebnisse vorliegen und damit die diagnostische Referenz fehlt. Gefrierverfahren sind darüber hinaus apparativ aufwändig und werden daher in der diagnostischen Routine kaum eingesetzt.

Neben der morphologischen Information per se bieten Schnittpräparate auch den Vorteil, dass innere Strukturen freigelegt und für zytochemische sowie spektroskopische Methoden zugänglich werden. Diese Eigenschaft ermöglicht im Prinzip die Kombination morphologischer und molekularer Kriterien für die Diagnostik. Bisher werden derartige Methoden in der Routine-Erregerdiagnostik nicht angewendet. Ein potenzielles Einsatzgebiet für solche Verfahren ist die Sporendiagnostik, bei der mit immunologischen Techniken am

Schnitt eine weitere Differenzierung erfolgen könnte. Voraussetzung für die Anwendung dieser Technik ist die Herstellung von Antikörpern, die unter diesen besonderen diagnostischen Bedingungen eine sichere Differenzierung der Sporen verschiedener Arten oder auch Stämme ermöglicht (z. B. zwischen *Bacillus anthracis* und *Bacillus cereus*).

Visuelle Diagnostik im Spiegel der Zeit

Der Wert visueller Diagnostik hat sich in der Vergangenheit mehrfach gezeigt: Ohne das Lichtmikroskop hätte Robert Koch 1876 nicht die „Ätiologie der Milzbrandkrankheit“ aufklären und damit die erfolgreiche Ära der Bakteriologie begründen können. Doch schon gegen Ende des 19. Jahrhunderts war klar, dass es neben den Bakterien eine Vielzahl weiterer Erreger – u. a. für Poliomyelitis, Grippe, Pocken, Maul-und-Klauenseuche – geben musste, die erheblich kleiner als die bis dato bekannten Bakterien waren.

Virologie und EM haben sich aus ihren Anfängen heraus wechselseitig gefördert. Die wissenschaftlichen Grundlagen der Elektronenoptik waren schon früh in den 1930er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erarbeitet worden. Anstoß für den Bau des Elektronenmikroskops durch die Industrie gaben aber erst die dringenden Fragen nach der Natur dieser unter dem Virusbegriff zusammengefassten Krankheitserreger (Kruger, Schneck & Gelderblom, 2000). Die ersten Aufnahmen eines Viruspartikels, des Ektromelie-Mäusepockenvirus, wurde 1938 von der Arbeitsgruppe um Ernst Ruska (Nobelpreis 1986) veröffentlicht (von Borries, Ruska & Ruska, 1938). Helmut Ruska, der Mediziner in der Arbeitsgruppe, charakterisierte die verschiedensten viralen Erreger, schlug eine morphologische Einteilung vor und kam damit schon 1943 zu einer naturwissenschaftlich begründeten Virusklassifizierung. Das EM wurde anschließend zur schnellen Differentialdiagnose von Pocken- und Herpesviren aus klinisch schwer zu differenzierenden Hautläsionen eingesetzt. Als die Elektronenmikroskopie in den 1960er Jahren vermehrt zum Einsatz kam, insbesondere mit der Einführung der Negativkontrastierung als einfacher und effektiver Präparationsmethode (Brenner & Horne, 1959), wurden zahlreiche neue Viren beschrieben und diagnostiziert. Wie die Ultrazentrifuge gehörte das EM, das sich auch bei der Pockeneradikation bewährt hat, zur Grundausstattung in Forschung und Diagnostik. Mit dem Beginn der 1990er Jahre wurde aber die EM aus der Routinediagnostik durch andere Methoden, insbesondere durch

Nukleinsäureamplifikationstechniken und immunologische Verfahren mit viel höherem Probendurchsatz und höherer Sensitivität, weitgehend verdrängt. Als Indikation geblieben sind in erster Linie die Erreger-Schnelldiagnostik von Umwelt- und klinischen Proben in Notfallsituationen sowie die Diagnostik bei seltenen Hautläsionen, die Gastroenteritis-Diagnostik (insbesondere in der Veterinärmedizin), Zellkultur-Diagnostik und die Qualitätssicherung von Impfstoffen und anderen biologischen Präparaten (Gentile & Gelderblom, 2005).

Zu den technischen Entwicklungen, von denen die EM-Schnelldiagnostik in Zukunft profitieren wird, zählen die Nutzung des Internets in Verbindung mit der Telemikroskopie-Technologie für die Betrachtung von Proben durch einen Experten in einem entfernten Labors sowie die Verfügbarkeit von leistungsfähigen und leicht zu transportierenden Elektronenmikroskopen in der Größe eines Licht-Mikroskops (DeLong Instruments, Brno, CZ).

Qualitätssicherung in der EM-Diagnostik

Neben gerätetechnischen und organisatorischen Voraussetzungen sind spezifische Erfahrungen notwendig, um einen visualisierten Erreger korrekt zu diagnostizieren. Diese Expertise kann nur durch einen gewissen Probendurchsatz und durch Schulung aufgebaut werden. Zur Qualitätssicherung der EM-Erregerdiagnostik werden deshalb vom Robert Koch-Institut Laborkurse und seit 1994 externe Ringversuche (EQA-EMV) durchgeführt, an denen zur Zeit 115 Labore aus 32 Ländern teilnehmen. Weitere Informationen zu diesen Veranstaltungen und Angeboten sind auf der Homepage des Konsiliarlaboratoriums für elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik des Robert Koch-Instituts verfügbar (www.rki.de/cln_169/nn_651760/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/EM__node.html?__nnn=true; Leitung: Dr. Norbert Bannert; BannertN@rki.de). Ergänzende Informationen sind über den Arbeitskreis EM-Erregerdiagnostik der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie (AK-EMED der DGE über Gelderblom@rki.de, LaueM@rki.de oder bei www.dge-homepage.de zu erhalten).

Literaturhinweise

BIEL, S. S. & GELDERBLOM, H. R. (1999). „Electron microscopy of viruses.“ *Virus Cell Culture – A Practical Approach*, 111-147.

BRENNER, S. & HORNE, R. (1959). „A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.“ *Biochim.Biophys.Acta.*, 34, 103-110.

GELDERBLOM, H. R. (2003). „Elektronenmikroskopie im Methodenspektrum der Bioterrorismus-Diagnostik.“ *Bundesgesundheitsblatt.Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.*, 46, 984-988.

GELDERBLOM, H. R. & BANNERT, N. (2005). „Diagnostic electron microscopy in infectious diseases emergencies and bioterrorism.“

GENTILE, M. & GELDERBLOM, H. R. (2005). „Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy.“ *New Microbiol.*, 28(1), 1-12.

KRUGER, D.H., SCHNECK, P. & GELDERBLOM, H. R. (2000). Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *Lancet.*, 355(9216), 1713-1717.

KSIAZEK, T. G., ERDMAN, D., GOLDSMITH, C. S., ZAKI, S. R., PERET, T., EMERY, S., et al. (2003a). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N.Engl.J.Med.*, 348(20), 1953-1966.

KSIAZEK, T. G., ERDMAN, D., GOLDSMITH, C. S., ZAKI, S. R., PERET, T., EMERY, S., et al. (2003b). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N.Engl.J.Med.*, 348(20), 1953-1966.

KURTH, R. (2004). [The emergence of old and new epidemics as a consequence of human actions]. *Bundesgesundheitsblatt.Gesundheitsforschung.Gesundheitsschutz.*, 47(7), 611-621.

LANE, H. C., MONTAGNE, J. L. & FAUCI, A. S. (2001). „Bioterrorism: a clear and present danger.“ *Nat.Med.*, 7(12), 1271-1273.

LEONG, A. S. & SORMUNEN, R. T. (1998). Microwave procedures for electron microscopy and resin-embedded sections. *Micron.*, 29(5), 397-409.

MARSHALL, H.-J. & GELDERBLOM, H. R. (2005). „Elektronenmikroskopie bei Biowaffenverdacht. Wehrtechnik“, 37, 60-64.

PAULI, G. & ELLERBROK, H. (2003). „Diagnostik von Proben bei vermuteten bioterroristischen Anschlägen – Allgemeine Aspekte und grundsätzliche Erwägungen.“ Bundesgesundheitsblatt.Gesundheitsforschung.Gesundheitsschutz., 46, 976-983.

REED, K. D., MELSKI, J. W., GRAHAM, M. B. & Regnery, R. L. (2004). The detection of monkeypox in humans in the Western hemisphere New Engl. J.Med., 350, 342-350.

VON BORRIES, B., RUSKA, E. & RUSKA, H. (1938). „Bakterien und Virus in übermikroskopischer Abbildung.“ Klin.Wschr., 17, 1713-1717.