

# Elektronenmikroskopie im Methodenspektrum der Bioterrorismus-Diagnostik

## Zusammenfassung

Die Erregerdiagnostik bei Bioterrorismus-(BT-)Verdacht gewinnt durch den Einsatz visueller Verfahren an Präzision und Schnelligkeit. Die resultierende morphologische Diagnostik am Licht- und Elektronenmikroskop (EM) erfordert keine spezifischen Reagenzien; die Präparation von Proben direkt vom Patienten, aus der diagnostischen Zellkultur oder aus BT-Umweltproben selbst ist einfach und schnell. Die Präparation, überwiegend durch Negativkontrastierung, ermöglicht innerhalb von 15 min durch den „offenen Blick“ die schnelle Visualisierung aller in der Probe enthaltenen Strukturen. Die Auflösung des EM reicht zur Erkennung auch kleinster Viren. Die EM-Diagnose gibt so eindeutig Hinweis auf die vorliegende Virusfamilie, nicht aber auf den spezifischen Typ. Diese „Gruppendiagnose“, z. B. als schnelle Differenzialdiagnose bei Pockenverdacht, reicht dem Kliniker oder Epidemiologen häufig schon für das weitere Handeln. Im Labor führt sie orientierend und frühzeitig zur Ausrichtung der Differenzialdiagnostik auf die relevanten Keime in der Probe. Die Vorteile der EM in der BT-Diagnostik sind nicht nur für die Diagnostik von Viren hilfreich, sondern, wie die Erfahrungen mit der Anthraxdiagnostik in den USA und bei uns gezeigt haben, auch von bakteriellen Erregern. Die Sicherheit für das Laborpersonal kann durch vorhergehende Probeninaktivierung erreicht werden. Zur Sicherung der Qualität der morphologischen Erregerdiagnostik werden vom Konsiliarlaboratorium entsprechende Ringversuche und Laborkurse veranstaltet.

## Schlüsselwörter

Erregerdiagnostik ·  
Bioterrorismus-Diagnostik ·  
Diagnostische Elektronenmikroskopie ·  
Schnelldiagnostik

## Entwicklung der Elektronenmikroskopie in der Infektiologie

Bis in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts, bis zur Einführung leistungsfähiger Lichtmikroskope, gab es nur vage Vorstellungen über die Ursachen von Infektionskrankheiten. Durch die Kombination von Kulturverfahren (Erregerisolierung), Lichtmikroskopie und Tierversuch gelang es Robert Koch – erstmals 1876 beim Milzbrand – ätiologische Zusammenhänge zwischen dem isolierten Keim und der entsprechenden Krankheit herzustellen. Durch konsequente Anwendung der später als Koch-Henle-Postulate<sup>1</sup> bezeichneten Prinzipien gelang es sehr schnell, die Erreger der Tuberkulose (1882), Cholera (1883) und einer Reihe anderer, verheerender Seuchen zu beschreiben [1]. Die wesentlich durch Carl Zeiss und Ernst Abbe in Jena betriebene wissenschaftlich-technische Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie war eine wichtige Voraussetzung für die Erfolge Robert Kochs und seiner Schüler.

Bei einer Reihe von Infektionen des Menschen, von Tieren und Pflanzen stieß die Lichtmikroskopie jedoch an ihre Grenzen: Bei der Tabakmosaik-Krankheit, der Maul- und Klauenseuche und bei anderen Infektionen ließ sich das zweifelsfrei nachgewiesene infektiöse Prinzip nicht darstellen. Die „ultravisiblen“ Agenzien wurden nicht von bakteriendichten Filtern zurückgehal-

ten, sie sedimentierten auch nicht in der konventionellen Zentrifuge [2, 3, 4], weil sie offensichtlich viel kleiner als Bakterien waren.

Diese nur negativ definierten Erreger wurden unter dem Begriff Virus zusammengefasst: Ihre Sichtbarmachung forderte ein wesentlich höher auflösendes, nämlich das schon 1873 von Ernst Abbe visionär konzipierte, völlig neuartige „Übermikroskop“ [5]. Bis zu seiner Umsetzung vergingen dann auch nur noch wenige Jahrzehnte: Beschleunigte Elektronen mit ihrer erheblich kürzeren Wellenlänge ermöglichten 1931 die Konstruktion eines zweistufig abbildenden Elektronenmikroskops (EM). Seine Entwicklung und Anwendung wurden durch die enge Zusammenarbeit zwischen den Konstrukteuren Ernst Ruska (1906–1988, Nobelpreis 1986) und Bodo von Borries (1905–1956) mit dem Mediziner Helmut Ruska (1908–1973), durch 2 weitere, konkurrierende Projekte in Berlin (AEG und M. von Ardenne) und schließlich 1937 durch die industrielle Entwicklung durch Siemens und Halske sehr gefördert (Überblick in [6]). Bereits 1938 zeigten die 3 Autoren in einer ersten Übersichtsarbeit neben Abbildungen von Bakterien auch Pockenviren mit ihrer typischen Quaderstruktur [7]. Die EM wurde dann frühzeitig in der Seuchenschnelldiagnostik der Pocken eingesetzt. Insbesondere nach der Einführung zuverlässiger Präparationsverfahren (Ultradünnschnitt-Technik, Negativ-

<sup>1</sup> Von identischen Krankheitsbildern werden immer wieder dieselben Erreger isoliert, diese zeigen makroskopisch einheitliches Wachstumsverhalten und mikroskopisch identische Morphe und Färbbarkeit, und die Isolate verursachen im Tierversuch wieder die ursprünglich beobachtete Erkrankung.

H. R. Gelderblom

## Electron microscopy in diagnosis of bioterrorism agents

### Abstract

In case of a suspected attack diagnostic light and electron microscopy (EM) aids in the laboratory diagnosis of potential bioterrorism disease agents (BT agents). Morphological details of a suspected structure provide evidence for rapid and precise diagnosis of the underlying agent. Sample preparation directly from a patient, a diagnostic culture, or from environmental samples relies mainly on negative staining, does not require specific reagents, and can be performed within a few minutes. By its "open view," EM is a catch all method, i.e., by the intrinsic resolution of EM even the smallest viruses become detectable as well as multiple infections and even agents that were not considered before. The morpho-diagnosis reveals just the virus family, not the specific type. This group diagnosis can provide a rapid and specific answer, e.g., in the differential diagnosis (DD) between smallpox and chickenpox. Diagnostic EM can be applied with advantage to visualize also bacterial BT agents, e.g., the anthrax letters in the USA and Germany. It also helps to focus laboratory DD on the relevant family of agents. Safety of lab personnel is accomplished by prefixation of diagnostic samples, while quality is controlled by participation in external quality assurance schemes and lab courses performed by the Consultant Lab for Diagnostic EM.

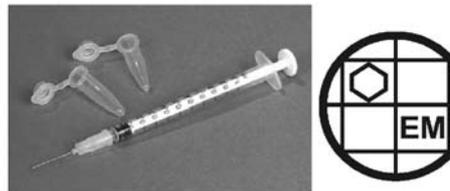
### Keywords

Rapid diagnosis · BT agents ·  
Diagnostic electron microscopy ·  
Negative staining

#### (1) Objektträger mit Vesikel- Abstrich nach Lufttrocknen und Formaldehyd (FA)- Inaktivierung



#### (2) Infektiöser Vesikelinhalt in Kanüle, Spritze oder Kapillare



#### (3) Vesikelinhalt nach Transfer in ein Gefäß mit FA

#### (4) EM-Trägernetz zum Abtupfen und Auftrocknen von Vesikelinhalt

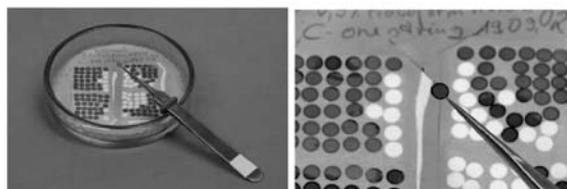


Abb. 1 ▲ Asservieren von Vesikelproben vom Pockenpatienten. Vier Methoden zur Gewinnung von Bläscheninhalt bei Pockenverdacht. Beachte: nur die Methoden 1, 3 und 4 ermöglichen die Formaldehydinaktivierung bereits am Krankenbett

kontrastierung) förderten sich Virologie und EM wechselseitig erheblich. Zwischen 1950 und 1980 wurde eine Vielzahl „neuer“ Viren beschrieben und morphologisch klassifiziert. Die EM wurde essenziell für die Aufklärung von Infektionskrankheiten und zu einer Säule in der biomedizinischen Grundlagenforschung. Die Einführung sensitiver ELISA- und PCR-Methoden in die Diagnostik und Forschung, die kürzliche Neuorientierung der Grundlagenforschung auf Genomics und Proteomics, aber auch kurzfristige Nutzenerwägungen haben seither zur Schließung mancher Elektronenmikroskopie-Gruppe geführt. Als Folge dieser Negativentwicklung in der Biomedizin werden bereits Defizite im Verstehen von Struktur-Funktions-Zusammenhängen konstatiert und ein Gegensteuern gefordert [8].

### Der „offene Blick“ visueller Nachweisverfahren

Licht- und Elektronenmikroskopie unterstützen durch ihre ungerichtete Visualisierung, durch ihren „offenen Blick“ die orientierende BT-Diagnostik. Mit ihrer Hilfe werden die morphologischen Eigenschaften der Erreger erfasst und beschrieben, d. h., sie ermöglichen eine anschauliche Diagnostik, wobei die beobachtete Morphe eine innere Quali-

tätskontrolle darstellt. Das EM macht mit seiner praktischen Auflösung von 10 nm prinzipiell alle in der Probe enthaltenen Agenzien, auch kleinste Viren, sichtbar. Die Morphodiagnose nutzt die letztlich genetisch bedingten Strukturmerkmale von Erregern, wie Größe, Form und Feinstruktur. Die erkannten Details ergeben eine direkte Zuordnung zu einer der taxonomisch definierten Erregerfamilien. Der „offene Blick“ erlaubt auch das Erkennen von Mehrfachinfektionen in der Probe, und schließlich werden hier auch Erreger detektiert, an die der Einsender bei seiner Untersuchungsanforderung primär nicht gedacht hatte.

### Die Elektronenmikroskopie wurde bereits früh in die Seuchendiagnostik eingeführt

Die Morphodiagnostik ist schnell. Die direkte Präparation von Vesikelinhalt (Abb. 1, 2) durch die Negativkontrastierung mit Schwermetallsalzen sowie die Auswertung und das Durchmustern des Präparates am Elektronenmikroskop benötigen kaum 15 min [9, 10, 11, 12]. Prinzipiell können alle partikelhaltigen Suspensionen mit dieser Methode analysiert werden, unabhängig davon, ob sie direkt vom Patienten, aus der diagnostischen Zellkultur oder aus so genannten Um-

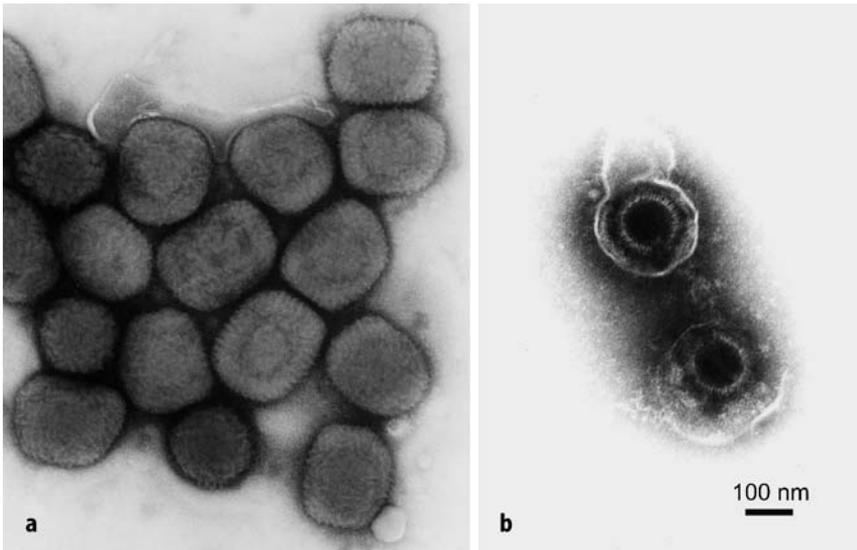


Abb. 2 ▲ **Negativkontrastierung von Pox- und Herpesviren.** Die Negativkontrast-EM von Pox- (a) und Herpesviren (b) differenziert schnell und sicher zwischen den klinisch manchmal nur schwer zu unterscheidenden Pocken und den Windpocken

weltproben stammen. Im Pockenverdachtsfall kann, insbesondere bei Erwachsenen und im Frühstadium, die klinische Diagnose zwischen Pocken und Windpocken schwer fallen: Die EM-Untersuchung ergibt hier die notwendig schnelle und sichere Differenzierung zwischen den Orthopocken- und den Varicella-Zoster-Herpesviren [10, 11, 12, 13, 14, 15, 18].

Die EM kann schon bei einem klinischen Verdacht eingesetzt werden – ohne Ausrichtung auf einen bestimmten Erreger und ohne den Einsatz spezifischer Reagenzien oder Programme. Neben ihrer Schnelligkeit und dem „offenen Blick“ ist das ein weiterer Vorteil gegenüber der übrigen Labordiagnostik, die eher gerichtet auf die wahrscheinlich vorliegende Erregergruppe durchgeführt wird. Die morphologische Zuordnung zu einer Virusfamilie ist für den Kliniker häufig schon ausreichend. Dem Labor ermöglicht sie, die „Feindiagnostik“ – bis hin zur forensischen Genotypisierung – auf nur noch eine bestimmte Erregerfamilie auszurichten. Hieraus kann sich ein erheblicher Zeit- und Effizienzgewinn ergeben. Die Erfahrungen in den USA und bei uns haben gezeigt, dass die EM nicht nur zur Analyse mutmaßlich viraler Proben geeignet ist, sie wurde vielfach auch erfolgreich zur Anthraxdiagnostik, d. h. auch in der Bakteriologie eingesetzt (Abb. 3) ([10], s. auch S.E. Klee et al. sowie G. Pauli und H. Ellerbrok in diesem Heft).

### Grenzen der Diagnostik am Elektronenmikroskop

Voraussetzung für die Morphodiagnostik sind relativ hohe Partikelkonzentrationen in der Probe ( $>10^5$  Teilchen/ml). Diese Bedingung ist häufig erfüllt, z.B. zeigten die Anthraxbriefe 2001 in den USA jeweils etwa 1 g, d.h., mehr als  $10^{12}$  Sporen, während der Vesikelinhalt von Pocken oder Windpockenläsionen mehr als  $10^9$  Teilchen/ml enthält [14]. Für Proben mit geringeren Partikelmengen gibt es probate Anreicherungsverfahren (Ultrazentrifuge, Immunaggregation), [9, 10, 16].

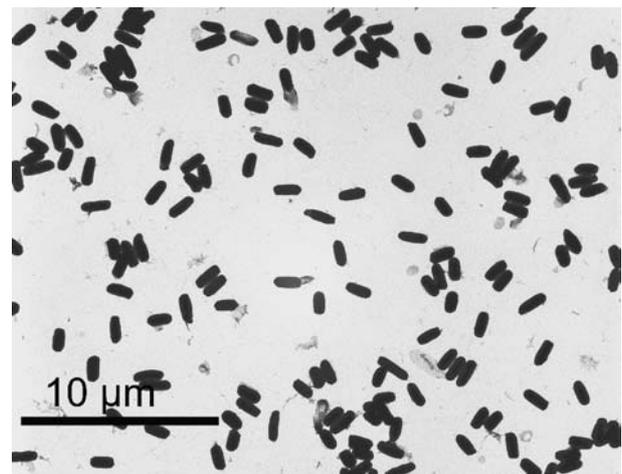
Die Morphodiagnose ist eine Erregergruppendiagnose. Werden z.B. am EM Orthopockenviren festgestellt, so

können Variola-, Affenpocken- oder auch das Vacciniaimpfvirus in der Probe vorliegen. Zur Klärung kann die Krankengeschichte herangezogen werden. Bei BT-Verdacht sind daneben die üblichen differenzialdiagnostischen Untersuchungen vorzunehmen. Prinzipiell ermöglichen Erreger-spezifische Antikörper eine schnelle Erregertypisierung auch am EM (Immun-EM, [16]): Die Immun-EM ist als Instrument der Grundlagenforschung etabliert – für ihren Einsatz in der BT-Diagnostik fehlen bisher weitgehend die spezifischen Antikörper.

### Elektronenmikroskopie im Methodenspektrum der BT-Diagnostik

Angesichts der schwerwiegenden Konsequenzen einer falsch-negativen oder falsch-positiven Befundung sollten BT-verdächtige Proben immer durch mehrere, sich ergänzende Methoden untersucht werden. Dabei ist die orientierende schnelle Primär- und/oder Differenzialdiagnostik methodisch von der Bestätigungs- und Feindiagnostik im Speziallabor zu unterscheiden. In der orientierenden sog. Frontline-Diagnostik hat die EM durch ihre Schnelligkeit und Präzision gegenüber Immunfluoreszenz, Antigenassay und Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT, z.B. PCR) wichtige Vorteile. Ein entsprechender Verdacht kann sehr schnell und präzise verifiziert oder ausgeschlossen werden, und der oben bereits genannte „offene Blick“ lässt auch andere möglicherweise ursächliche Erreger erkennen. Um Material für die weiterführende, ggf. auch

Abb. 3 ► **Negativkontrastierung von Bakteriensporen zum morphologischen Sporennachweis aus Umweltprouben.** Die hier als Modell für den Anthraxnachweis eingesetzten B.-subtilis-Sporen zeigen eine gut auswertbare Verteilung am Trägernetz



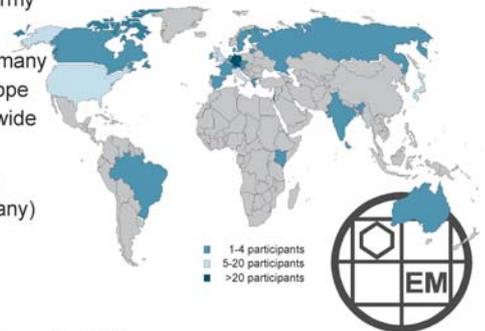
+ 14 EQA runs since 1994

+ participants:  
physicians, veterinarians, universities,  
governmental institutions, industry, army

+ EQA 1 – EQA 3: distribution in Germany  
since EQA 4: distribution in Europe  
since EQA 6: distribution Worldwide

+ supported by ESCV, ESVV (Europe)  
INSTAND, DVV, GFV, DGHM (Germany)  
DGE, AVID - DVG

+ EQA map:  
97 participants from 27 countries  
38 laboratories from Europe  
participating in EQA 14



Consultant Laboratory for Diagnostic EM in Infectious Diseases / March 2003

Abb. 4 ▲ Übersicht zu den externen Ringversuchen (EQA) des Konsiliarlabors für die elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik

forensische Charakterisierung der Isolate zu sichern, muss schließlich auch die klassische Erregeranzucht frühzeitig eingesetzt werden.

### Laborsicherheit in der EM-Erregerdiagnostik

Bei der BT-Diagnostik ergeben sich Infektionsrisiken. BT-verdächtige Proben müssen daher zunächst in einem Hochsicherheitslabor (BSL 3 oder BSL 4) für die EM-Diagnostik vorbereitet werden. Im Bereich der EM wird die Sicherheit, auch gegenüber hoch pathogenen Erregern wie Anthrax-, Ebola- und Variolavirus durch geeignete Probenvorfixierung, z.B. durch Formaldehyd oder Glutaraldehyd am Trägernetz, erreicht (s. Abb. 1). Detaillierte Angaben finden sich in Internet [17, 18].

### Qualitätssicherung in der EM-Erregerdiagnostik

EM, PCR und Immunfluoreszenz sind aber letztlich nur dann schnell, wenn der Probentransport zur Durchführung der Diagnostik auch schnell erfolgt. Für die EM-Erregerdiagnostik stehen in Deutschland regional gestreut mehr als 20 erfahrene, in die BT-Diagnostik einzubindende Laborgruppen zur Verfügung. Der Probentransport ist damit in weniger als 2 Stunden möglich. Transport und effiziente Durchführung der elektronenmikroskopischen Schnelldiagnostik müssen allerdings durch Ab-

sprachen und Alarmpläne und -übungen gesichert werden.

### Für die EM-Erregerdiagnostik stehen in Deutschland mehr als 20 erfahrene Laborgruppen zur Verfügung.

In Deutschland erscheint die Schaffung zusätzlicher EM-Kapazität für die BT-Diagnostik nicht notwendig. Solche Bemühungen wären auch nicht zweckmäßig, da der Aufbau der notwendigen Expertise mühsam und ihre Pflege einen ständigen hohen Probendurchsatz benötigt. Zur Sicherstellung ihrer Qualität sollte die EM-BT-Diagnostik auf der Basis einer guten Routine-EM-Diagnostik erfolgen [10, 12]. Ein BT-Verdacht muss schnell und sicher abgeklärt werden. Die diagnostische Sicherheit der EM ist vergleichsweise hoch. Ein einzelnes, zweifelsfrei identifiziertes Virion reicht zur Diagnose. Die EM sollte dennoch immer parallel mit einer sensitiveren Methode eingesetzt werden. Das am Robert Koch-Institut (RKI) angesiedelte Konsiliarlaboratorium für die elektronenmikroskopische Erregerdiagnostik hat zur Qualitätssicherung unter anderem 14 Ringversuche und 8 Laborkurse durchgeführt (Abb. 4), die insgesamt – auch für das Bedrohungsszenario durch Pockenviren – zu einem hohen Maß an diagnostischer Sicherheit geführt haben (s. Abb. 2, 4) [10, 17, 19].

## Organisatorische Einbindung der EM

Auch „infektionsferne“ EM-Laboratorien mit Erfahrung in der morphologischen Analyse können hier effektiv wirken. Die notwendige Expertise für die EM-BT-Schnell Diagnostik kann z.B. auch in einem Institut für Pathologie vorgehalten werden, sofern die personellen und räumlichen Voraussetzungen gegeben sind und die Zusammenarbeit zur übrigen Infektionsdiagnostik reibungslos und effizient vernetzt erfolgt (s. auch [15, 20]).

Die Probenvorbereitung für die diagnostische Routine-EM erfordert prinzipiell L2-Laborsicherheitsbedingungen: Die BT-Diagnostik sollte hier an Formaldehyd-inaktivierten Proben erfolgen. Die Negativkontrastierung, d.h. das Umhüllen der an das Trägernetz adsorbierten Partikel mit elektronendichten Schwermetallsalzen, ist technisch einfach und schnell. Andererseits fordert die BT-Diagnostik besondere Anstrengungen hinsichtlich der Sensitivität, die Verwendung besonders stabiler und hydrophiler Trägernetze etc. Die Auswertung kann an jedem konventionellen Transmissionselektronenmikroskop erfolgen. Befunde werden heute zunehmend elektronisch, d.h. nicht mehr aufwändig fotografisch, auf entsprechendem Negativmaterial dokumentiert. Die Informationstechnik erleichtert heute auch den schnellen Befundaustausch und die Diskussion mit einem Referenzlabor. Darüber hinaus ergibt in der Zukunft die Einführung der vom Internet gestützten Telemikroskopie, d.h. die Mikroskopsteuerung und Befundung durch einen räumlich entfernten Experten, eine weitere Qualitätssicherung in der Morphodiagnostik [21].

### Zum Risiko eines bioterroristischen Anschlags

Infektionserreger eignen sich als BT-Waffe, weil sie Krankheiten, z.T. auch Epidemien und Tod bei Mensch und Tier induzieren können. BT-Erreger haben auch ein hohes Panikpotenzial, denn sie entziehen sich durch ihre Unsichtbarkeit einer rationalen Betrachtung. Entsprechend ihrem pathogenen Potenzial werden 3 verschiedene Erregergruppen unterschieden [22]. Das Risiko der Bedrohung durch einen BT-Anschlag lässt sich kaum sicher erfassen.

Betrachtet man das Beispiel der Pocken ([22, 23] und R. Thomssen in diesem Heft), so wissen wir, dass die Infektion selbst seit 1977 ausgerottet ist und dass die letzten Pockenvirusvorräte in den USA bei den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und in Russland bei VECTOR sicher gelagert werden. Aber könnten nicht doch letzte Vorräte trotz wiederholter Nachfragen durch die WHO in einzelnen Terrorstaaten zurückgehalten worden sein oder unerkannt in Laborkühltruhen schlummern? Kann nicht Virus aus dem BT-Programm der früheren UdSSR oder in Pockenopfern im Permafrost überlebt haben [24]? Spekuliert werden kann schließlich auch über molekulargenetisch modifizierte oder gar de novo synthetisierte Viren [25, 26].

Es gibt gute Argumente, die diese Risiken deutlich kleiner erscheinen lassen. Auch Pockenviren sind temperaturlabil, und sie sind besonders komplex reguliert. Ihr Überleben im Labor über Jahrzehnte erfordert aufwändige Viruspassagen und/oder eine konstant effiziente Tiefkühlung – beides war in vielen Ländern kaum realisierbar. Und aus Permafrosttoten ließ sich bisher kein Pockenvirus isolieren. Wie in diesem Heft von G. Pauli und H. Ellerbrok sowie von S.R. Klee et al. an mehreren Beispielen diskutiert, erfordert der Einsatz von Infektionserregern – gegenüber etwa Sprengstoffen – ein erhebliches Können und eine nur schwer zu realisierende technische Infrastruktur. Da aber das Risiko eines BT-Anschlags theoretisch nicht gänzlich auszuschließen ist, müssen Vorbereitungen für eine angemessene Diagnostik und Maßnahmen zur Schadensbegrenzung getroffen werden [13].

### Umweltprobe oder klinische Probe?

Auf beides muss die Labordiagnostik vorbereitet sein. Das lässt sich auch aus den Erfahrungen mit den Anthraxbriefen in den USA im Jahr 2001 ableiten: BT-Anschläge fallen erst dann auf, wenn erste Erkrankungen auftreten. Erst dann wird die gezielte Suche in Umweltproben möglicherweise weitere Anschläge aufdecken. Das dürfte auch für einen Anschlag mit Pockenviren gelten. Eine konstante Luftkeimüberwachung, das Erkennen BT-trächtiger Aerosole ist kaum flächendeckend möglich. Deshalb wird erst die Diagnostik der Proben von einem – hoffentlich früh erkannten – Indexpatienten einen Anschlag ausschließen oder nahe legen. Weitere Informationen und Details zur Gewinnung und Präparation von Proben aus Patienten oder aus der Umwelt finden sich bei Hazelton, Gelderblom [10], Miller [12] sowie auf der Homepage des RKI [17] und der CDC [27, 18].

**Danksagung** Für präzise experimentelle Zusammenarbeit im Labor seien Andrea Männel, für die Vorbereitung der Abbildungen Bärbel Jungnickl und Hans-G. Bredow herzlich bedankt.

### Literatur

1. Koch R, Schwalbe J (1912) Gesammelte Werke von Robert Koch. Thieme, Leipzig
2. Ivanovski, 1892 (siehe [6])
3. Beijerinck MV (1898) Over een contagium vivum fluidum als oorzaak van de vleksiekte der tabaksbladen. Versl. Gew. Verg., Wiss. En Natuurk. Afd. Kon. Aka. Wetenschapt., Amsterdam 7:229–235
4. Loeffler F, Frosch P (1898) Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche beim Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. Centralbl Bakt Parasitenk Infektionskrankh Abt I, 23:371–391
5. Abbe E (1873) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. M. Schultzes Arch Microsc Anat 9:413–468
6. Krüger DH, Schneck P, Gelderblom HR (2000) Helmut Ruska and the visualization of viruses. Lancet 355:1713–1717
7. von Borries B, Ruska E, Ruska H (1938) Bakterien und Virus in übermikroskopischer Aufnahme. Klin Wochenschr 17:921–925

8. Geuze HJ (1999) A future for electron microscopy in cell biology. Trends Cell Biol 9:92–93
9. Gelderblom HR, Renz H, Özel M (1991) Negative staining in diagnostic virology. Micron Microsc Acta 22:435–447
10. Hazelton PR, Gelderblom HR (2003) Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. Emerg Inf Dis 9:294–303
11. Madeley CR (2003) Diagnosing smallpox in possible bioterrorist attack. Lancet 361:97–98
12. Miller S (2003) Bioterrorism and electron microscopic differentiation of poxviruses from herpesviruses: dos and don'ts. Ultrastr Pathol 27:133–140
13. Breman JG, Henderson DA (2002) Diagnosis and management of smallpox. N Engl J Med 346:1300–1308
14. Long GW, Noble J, Murphy FA et al. (1970) Experience with electron microscopy in the differential diagnosis of smallpox. Appl Microbiol 20:497–504
15. <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/diagnosis/evalposter.asp>
16. Biel SS, Gelderblom HR (1999) Electron microscopy of viruses. In: Cann AJ (ed) Virus culture – a practical approach. Oxford University Press, Oxford, pp 111–147
17. [www.rki.de/INFEKT/CONSUL/EM-DIAG.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/CONSUL/EM-DIAG.HTM)
18. [www.bt.gov/labissues/index.asp](http://www.bt.gov/labissues/index.asp) (klick weiter auf: Negative Staining Electron Microscopic Protocol for Rash Illness)
19. Gelderblom HR (2001) Electron microscopy in diagnostic virology. BIOforum int 5:64–67
20. <http://www.labtestonline.org/lab/network.html>
21. Schroeder JA, Voelkl E, Hofstaedter F (2001) Ultrastructural telepathology – remote EM-diagnostic via Internet. Ultrastruct Pathol 25:301–307
22. Lane HC, LaMontagne J, Fauci AS (2001) Bioterrorism: a clear and present danger. Nature Med 7:1271–1273
23. O'Toole T (1999) Smallpox: an attack scenario. Emerg Inf Dis 5:540–546
24. Brumfield G (2003) Still out in the cold. Nature 423:678–680
25. Jackson RJ, Ramsay AR, Christensen CD et al. (2001) Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. J Virol 75:1205–1210
26. Cello J, Paul AV, Wimmer E (2002) Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science 297:1016–1018
27. [www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing](http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing) (klick weiter: Specimen Collection Guidelines)