

---

38. Jahrgang · Februar 1995 · Nummer 2 · Sonderdruck

Herausgegeben vom

Robert Koch-Institut – Bundesinstitut für Infektionskrankheiten und nicht übertragbare Krankheiten

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte

Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene (Umweltbundesamt)

# **BUNDESGESUNDHEITSBLATT**

## ***Sonderdruck***

---

### Standardisierung in der elektronenmikroskopischen Virusdiagnostik (Rapid Viral Diagnosis, Ringversuche)

Von S. R. Philipp und H. R. Gelderblom

Dieser Sonderdruck ist nicht im Buchhandel erhältlich

---

Carl Heymanns Verlag Köln Berlin Bonn München

Hoffmann, U.: Zum Aufbau einer nationalen Gesundheitsberichterstattung. *Wirtschaft und Statistik* (1993) Heft 1, 33–42.

Kirschner, W., und Hoeltz, J. (Hrsg.): *Epidemiologie und Gesundheitsforschung. Vorschlag für eine epidemiologische, umwelt- und sozialbezogene Gesundheitsberichterstattung. Konzeption für das Bundesland Berlin*, Berlin 1992.

Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales (Hrsg.): *Gesundheitsreport Nordrhein-Westfalen 1990*, Bielefeld 1991.

Ministerium für Arbeit, Soziales, Familie und Gesundheit (Hrsg.): *Gesundheitsberichterstattung Rheinland-Pfalz. Konzeption und Umsetzung*,

Schriftenreihe »Gesundheitswesen/Gesundheitsberichterstattung«, Mainz 1993.

Sachverständigenrat für die Konzertierte Aktion im Gesundheitswesen (Hrsg.): *Jahresgutachten. Baden-Baden* (ab 1978 fortlaufend).

Schräder, W.F., Häußler, B., und Hilke, W.: *Konzeption und statistische Materialien. Landesgesundheitsbericht Nordrhein-Westfalen, Gesundheitsberichterstattung Bd. 1*, Bielefeld 1987.

Senatsverwaltung für Gesundheit, Berlin (Hrsg.): *Jahresgesundheitsbericht 1991*, Berlin 1992.

Streich, W.: *Konzept und Realisierung eines neuen Gesundheitsberichts für das Land Nordrhein-West-*

falen. In: Laaser, U., Schwartz, F.W. (Hrsg.): *Gesundheitsberichterstattung und Public Health in Deutschland*, Berlin 1992.

Vogel, H.R., und Hässner, K. (Hrsg.): *Die Bedeutung von Planungs- und Orientierungsdaten im Gesundheitswesen*, Stuttgart/New York 1989.

Weber, I., et al.: *Dringliche Gesundheitsprobleme der Bevölkerung der BRD. Zahlen, Fakten, Perspektiven*, Baden-Baden 1990.

Anschrift des Verfassers:

RMD Dr. med. Dieter Borgers, Landesinstitut für den Öffentlichen Gesundheitsdienst, Westerfeldstr. 35, 33611 Bielefeld

# Standardisierung in der elektronenmikroskopischen Virusdiagnostik (Rapid Viral Diagnosis, Ringversuche) \*

Von S. R. Philipp und H. R. Gelderblom

## Einführung

Die Rolle der diagnostischen Elektronenmikroskopie (EM) in der Virologie war bis zur Ausrottung der Pocken im Jahr 1977 unbestritten: Die EM-Seuchenschnelldiagnostik aus den Vesikeln des Patienten ergab die morphologische Unterscheidung zwischen den differentialdiagnostisch wichtigen Herpes- und Orthopox-Viren [1–3]. Daneben wurde die EM in der klinischen Virologie seit den siebziger Jahren zunehmend zur Aufklärung von Diarrhoen – verursacht durch Rota-, Corona-, Calici- und Astroviren – genutzt [4–6]; Überblick bei [7–10]. Der Stellenwert der morphologischen Diagnostik ist – trotz aller technologischen Fortschritte – immer noch positiv zu sehen, auch wenn eine Virusschnelldiagnostik heute zum Teil schon von immunologischen und molekularbiologischen, auch von In-situ-Methoden geleistet wird (Überblick bei [11]). Ohne Frage: Wo verfügbar und gekonnt ausgeübt, führt die EM bei der Suche nach schwer oder gar nicht anzüchtbaren Agenzien aus allen Arten von menschlichem oder tierischem Untersu-

chungsmaterial, wie Bläscheninhalt, Liquor, Stuhl, Urin, Organaufreibungen und diagnostischen Zellkulturen, zur diagnostischen Klärung [7–9, 12–15] – sofern bestimmte Partikelkonzentrationen nicht unterschritten sind. Durch Anreicherungsverfahren und/oder biospezifische Selektion kann die Sensitivität bis zu Partikelkonzentrationen von  $10^6$  Teilchen pro ml herunter erweitert werden [16–18]. Als »undeterminiertes«, offenes Detektionssystem ermöglicht die EM die Erkennung von Doppel- und Mehrfach-Infektionen – ein wichtiger Vorteil gegenüber allen anderen direkten oder indirekten »monospezifischen« Virusnachweissystemen. Über Prinzipien der EM-Virusdiagnostik und/oder die in der morphologischen Diagnostik genutzten Unterschiede in der Virusfeinstruktur informieren verschiedene ausgezeichnete Lehrbücher (unter anderen [19–22]). Im Rahmen der klassischen Virusdiagnostik eingesetzt, verkürzt die EM die notwendigen Abläufe erheblich [7, 10, 11, 23]: ein Zeitgewinn, der angesichts zunehmend verfügbarer antiviraler Therapie von wachsender Bedeutung sein kann. Und nicht zuletzt erfasst die morphologische Diagnose auch Virusgruppen und/oder Subgruppen, die aufgrund ungewöhnlicher Eigenschaften, wie untypischer zytopathogener Ef-

fekte, abweichender Antigen-Beschaffenheit und/oder hämagglutinierender Aktivität, mit der gängigen Methodik nicht erfasst werden [7–9].

Ein wesentlicher Nachteil der EM-Diagnostik liegt in ihrem geringen Probandendurchsatz, denn Probenvorbereitung und Auswertung können nicht automatisiert werden. Der relativ große personelle und apparative Aufwand macht einen gezielten Einsatz notwendig. Mit der Eradikation der Pocken, vor allem aber durch die Erweiterung des diagnostischen Repertoires mit molekularbiologischen und -genetischen Methoden und empfindlichen ELISA-Techniken, hat die EM-Diagnostik zwar an Bedeutung verloren, ihr methodisch andersartiger Ansatz erlaubt jedoch – besonders bei neuartigen Infektionserkrankungen – schnelle diagnostische Aussagen, die ihr einen sehr spezifischen Stellenwert im Konzert der Nachweismethoden sichern [7, 8, 11, 23].

## Zur Situation der EM-Virusdiagnostik in Deutschland: Warum Ringversuche?

Die Bedeutung der Elektronenmikroskopie für die Virusdiagnostik läßt sich heute allenfalls schätzen. Genauere Zahlen liegen aus England vor: Der Public

\* Abschlußbericht der Sonderaufgabe 657 des Bundesgesundheitsamtes (März 1993 bis Dezember 1994).

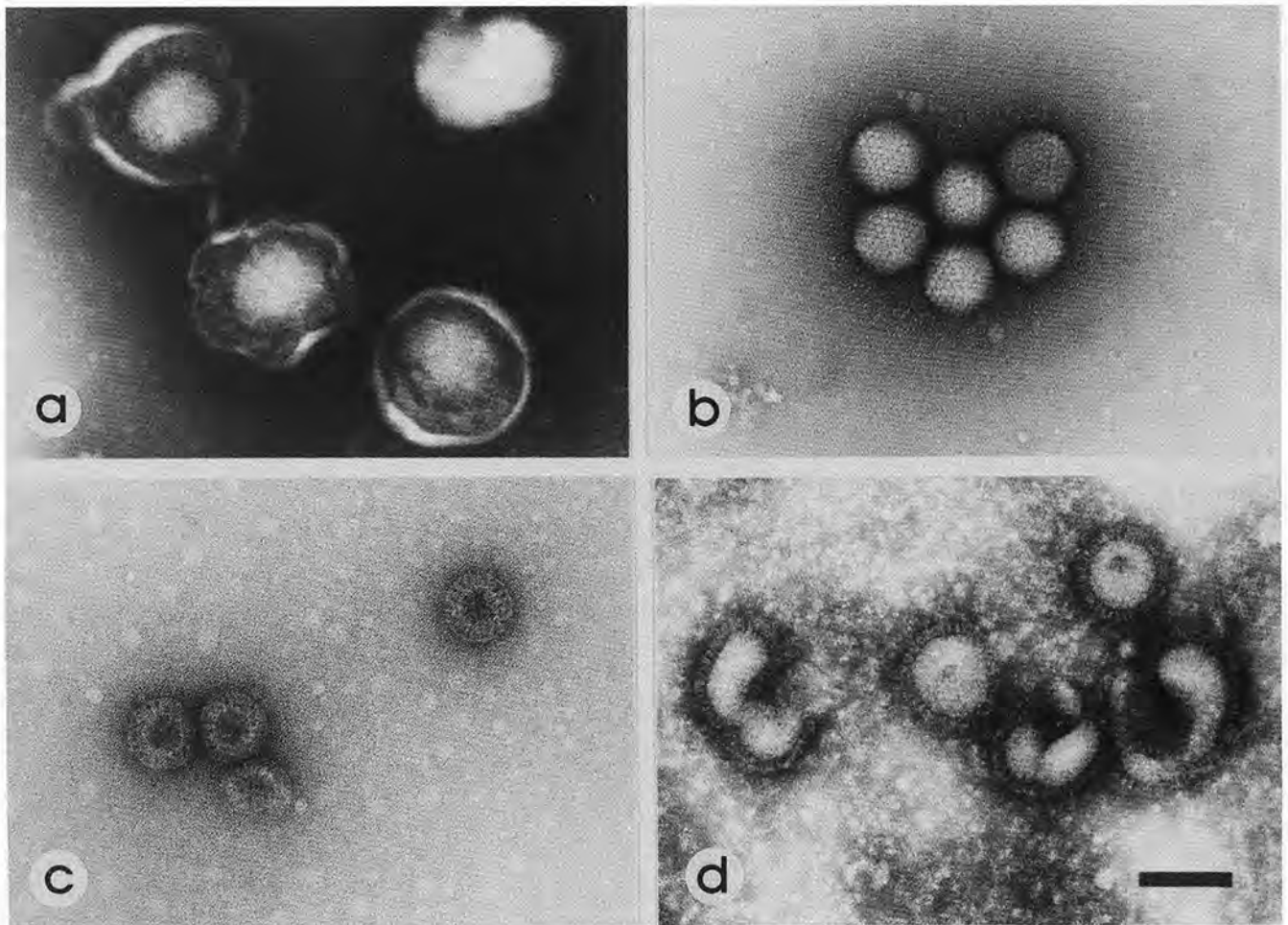


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Präparate aus dem ersten Ringversuch nach Negativkontrastierung mit Phosphor-Wolframsäure. Die Viren wurden bei 40 000facher Primärvergrößerung aufgenommen und für den Druck dreimal nachvergrößert. Unterschiede im Partikeldurchmesser erlauben zusammen mit den spezifischen Strukturmerkmalen die diagnostische Unterscheidung in: a) Viren der Herpesvirusfamilie, b) Adenoviren, c) Rotaviren und d) Paramyxoviren. Balken = 100 nm.

Health Laboratory Service hat die EM im Jahr 1989 60 000mal zur Virus-Diagnostik eingesetzt. In England wurde auch über Jahrzehnte eine externe Qualitätskontrolle der EM-Diagnostik durch freiwillige Ringversuche durchgeführt. An den unter der Ägide des United Kingdom National External Quality Assessment Scheme For Medical Microbiology durchgeführten Ringversuchen nahmen 1986 64 und 1993 immerhin noch 58 Laboratorien teil (persönliche Mitteilung von Judith Hawkins, PHLS, London, Oktober 1994).

Auch in Deutschland konzentriert sich die EM-Virusdiagnostik auf wenige, vielleicht 35 bis 45 Zentren. Zur Bestimmung der Situation in Deutschland und zugleich zur Evaluierung der EM-Diagnostik wurde im März 1993 im Robert Koch-Institut des Bundesgesundheits-

amtes die Sonderaufgabe »Standardisierung in der elektronenmikroskopischen Virusdiagnostik (Rapid Viral Diagnosis, Ringversuche)« mit einer Laufzeit bis Dezember 1994 eingerichtet. Nach Abstimmung und Koordination mit der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten, Münster (DVV), der Gesellschaft für Virologie, Erlangen (GfV), und dem Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium, Düsseldorf (INSTAND), wurden 471 Laboratorien mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens nach dem Einsatz der EM in der Virusdiagnostik gefragt. Dabei wurden auch Untersuchungs-Methodik und -Häufigkeit und die subjektive Einschätzung der Bedeutung, Qualität und Effizienz der EM-Diagnostik und die Bereitschaft zu einer freiwilligen Teilnahme an Ringversuchen erfaßt.

### Beteiligte Laboratorien

Von den 471 angeschriebenen Einrichtungen waren 419 human- und 52 veterinärmedizinisch ausgerichtet; im Rücklauf gaben 19 der 419 humanmedizinischen Laboratorien an, eigenständig EM-Virusdiagnostik zu betreiben, davon waren 16 an Ringversuchen interessiert. Alle 14 der 52 Veterinär-Institutionen mit EM-Virusdiagnostik waren zur Teilnahme bereit. Zusätzlich teilten uns 36 der 471 befragten Laboratorien mit, daß sie Proben zur EM-Untersuchung an insgesamt 24 externe Kooperationspartner senden.

Das EM-Probenaufkommen variiert von Labor zu Labor zwischen 2–3 pro Jahr und 100–300 pro Monat. Üblicherweise nach Negativ-Kontrastierung werden mit fallender Häufigkeit folgende Proben untersucht: diagnostische Zell-

kulturen, Stuhlproben, Zerebro-Spinal- und Bläschen-Flüssigkeit. Aus den anonymisierten Befragungsdaten hochgerechnet, werden in Deutschland insgesamt etwa 22 000 Präparate pro Jahr mit Hilfe der EM untersucht.

### In den Ringversuchen eingesetztes Untersuchungsmaterial

Die folgenden Modellviren wurden vermehrt und unterschiedlich hoch gereinigt: Adenoviren (humanes Adenovirus Typ 2, AV 2), Caliciviren (Felines Calicivirus, FCV), Herpesviren (Herpes-simplex-Virus Typ 1, HSV-1), Paramyxoviren (Sendai-Virus und Newcastle Disease Virus, NDV), Rhabdoviren (Vesikuläres Stomatitis-Virus, VSV) und Togaviren (Semliki Forest Virus, SFV). Rotaviren wurden aus Human-Stuhl gewonnen. Die Viren wurden durch Sedimentation konzentriert und zur Vermeidung von Infektionsrisiken mit Paraformaldehyd oder Glutaraldehyd fixiert. Die damit auch längerfristig morphologisch stabilen Virussuspensionen mit  $10^{10}$  bis  $10^{11}$  Teilchen pro ml wurden in bisher zwei Ringversuchen nach Negativ-Kontrastierung auf Trägernetzen oder als Suspension versandt, nachdem eine Vorab-Überprüfung durch vier erfahrene Referenz-Laboratorien in Berlin, Gießen, Hamburg und Münster die gute Erkennbarkeit für alle Präparate ergeben hatte.

### Ergebnisse des 1. Ringversuches

Mit der ersten Aussendung vom Juni 1994 sollte der »diagnostische Blick« der 30 freiwilligen Teilnehmer überprüft werden. Um mögliche Unterschiede in der Präparationsqualität der einzelnen Untersucher auszuschließen, wurden dafür bereits fertig kontrastierte AV2-, HSV-1-, NDV- und Rotavirus-Trägernetze kodiert verschickt (Abb. 1). Die Ergebnisse aus 28 der 30 Einrichtungen konnten ausgewertet werden: HSV-1 wurde von allen 28 Untersuchern richtig diagnostiziert, Adenovirus von 25, Rotavirus von 27 und Paramyxovirus von 23 der 28 Teilnehmer.

Im Rücklauf wurden zusätzlich auch Angaben über laboreigene Partikelanreicherungs- und allgemeine Präparationsverfahren erhalten. Danach setzen alle Laboratorien, bei Bedarf jeweils variierte, Standardmethoden für die Auswertung von Stuhlproben und für diagnostische Zellkulturen ein, während Anreicherungsverfahren, im allgemei-

nen die Sedimentation in der Ultrazentrifuge, von etwa der Hälfte der Befragten eingesetzt werden.

### Ergebnisse des 2. Ringversuches

An der zweiten Aussendung im September 1994 beteiligten sich 28 Laboratorien. Hier wurden zusätzlich zu kodierten, bereits mit Virus beschickten Trägernetzen auch drei selbst zu präparierende Suspensionen versandt: HSV-1, Sendai-Virus und eine virusfreie Kontrolle.

Die kodierten Trägernetze wurden, wie bei der ersten Aussendung, überwiegend richtig erkannt (Paramyxovirus 24/28, Rhabdovirus 28/28, Leerkontrolle 28/28). Aus den selbst zu präparierenden Proben wurden Herpesviren von 27 der 28 Teilnehmer richtig diagnostiziert, während das offenbar schwieriger darzustellende Sendai-Virus nur von 11 der 28 Teilnehmer als Paramyxovirus erkannt wurde: Hier wurde 15mal Myxovirus genannt, wohl begünstigt durch die Aldehyd-Vorbehandlung der Suspension. In der virusfreien Suspension hatten 4 der 28 Untersucher Partikeln mit spezifischer Virusmorphie beschrieben.

### Zusammenfassende Bewertung der Ringversuche

In Deutschland wird die EM gegenwärtig in mindestens 30 Laboratorien selbstständig als diagnostische Methode eingesetzt und von 36 weiteren Institutionen »extern« genutzt. Das Probenaufkommen wird auf 22 000 pro Jahr geschätzt. Der im diagnostischen Methodenspektrum einzigartige Ansatz der EM, der morphologische Direktnachweis, sichert ihr dabei in virologischen Untersuchungszentren einen festen Stellenwert.

Nach den Ergebnissen der zwei Aussendungen erfolgt die morphologische Diagnostik für die häufigsten Viren recht zuverlässig; gravierende Fehler ergaben sich bei dem standardisierten Material (fertig präparierte und kontrollierte EM-Trägernetze und Virussuspensionen hoher Partikelkonzentration) nur vereinzelt. Fehldiagnosen können deutlich auf den geringen Übungsgrad einzelner Untersucher zurückgeführt werden. Entsprechend werden Adeno-, Herpes-, Rota- und andere häufiger vorkommende Viren schneller und mit größerer Sicherheit erkannt als die selteneren Calici- und Paramyxoviren.

Besonders Teilnehmer mit geringem Probenaufkommen bewerteten die Ringversuche als hilfreich, und vier Institutionen haben bisher das Angebot genutzt, am Robert Koch-Institut ihre EM-Virusdiagnostik qualitativ zu überarbeiten. Diese positive Resonanz ist zusätzliche Motivation für die Fortsetzung der Ringversuche.

### Ausblick: Perspektive für weitere Ringversuche?

Analog zu den Verhältnissen in der sonstigen mikrobiologischen und virologischen Diagnostik erscheinen Ringversuche als externe Qualitätskontrolle auch im Bereich der EM-Virusdiagnostik notwendig. Auf der Basis freiwilliger Teilnahme sollen wie bisher den Teilnehmern ein- bis zweimal im Jahr standardisierte, kodierte Proben zur Überprüfung von Methodik und diagnostischer Sicherheit vorgelegt werden. Die Ziele der weiteren Ringversuche sind:

- die Erhöhung der diagnostischen Sicherheit für weniger häufig auftretende und/oder morphologisch »schwierige« Viren wie Astro-, Calici-, Ortho- und Para-Pox-, Papova- und Parvoviren. Die morphologisch richtige Diagnose ist, besonders aus Patientenmaterial, nicht immer einfach und sollte am fertigen Trägernetz exemplarisch geübt werden.
- Die Präparationsqualität der einzelnen Untersucher soll mit einheitlichen, auf definierte Partikelkonzentration eingestellten Virussuspensionen quantitativ erfaßt und gegebenenfalls verbessert werden.
- Über die regelmässigen Aussendungen sollen methodische und diagnostische Erfahrung gewährleistet werden.

Die Ringversuche sollen im Frühsommer 1995 mit den 30 bisherigen Teilnehmern fortgesetzt werden. Darüber hinaus wird jedoch eine möglichst vollständige Rekrutierung der EM-Virusdiagnostik betreibenden Laboratorien angestrebt.

#### Literatur:

- [1] Nagler, F. P. O., and Rake, G.: The use of the electron microscope in diagnosis of variola, vaccinia and varicella. *J. Bacteriol.* 55 (1948) 45-51.
- [2] Peters, D., Nielsen, G., und Bayer, M. E.: Variola: die Zuverlässigkeit der elektronenmikroskopischen Schnelldiagnostik. *Dtsch. med. Wschr.* 87 (1962) 2240-2246.
- [3] Long, G. W., Noble, J. Jr., Murphy, F. A., Herrmann, K. L., and Lourie, B.: Experience

- with electron microscopy in the differential diagnosis of smallpox. *Applied Microbiol.* **20** (1970) 497–504.
- [4] Flewett, T. H., Bryden, A. S., and Davies, H.: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* **II** (1973) 1497.
- [5] Madeley, C. R., and Cosgrove, B. P.: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* **II** (1975) 451–452.
- [6] Madeley, C. R.: Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of faeces by electron microscopy. *J. Inf. Dis.* **139** (1979) 519–523.
- [7] Kjeldsberg, E.: Application of electron microscopy in viral diagnosis. *Path. Res. Pract.* **167** (1980) 3–21.
- [8] Almeida, J. D.: Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Current Topics Microbiol. Immun.* **104** (1983) 147–157.
- [9] Fong, C. K. Y.: Electron microscopy for the rapid detection and identification of viruses from clinical specimens. *Yale J. Biol. Med.* **62** (1989) 115–130.
- [10] Gelderblom, H. R., Renz, H., and Özel, M.: Negative staining in diagnostic virology. *Micron Microsc. Acta* **22** (1991) 435–447.
- [11] Svensson, L.: Viral gastroenteritis. *Europ. Group for Rapid Viral Diagnosis. Newsletter* **27** (1994) 18–29.
- [12] Baumeister, H. G., Balks, H. G., und Maas, G.: Elektronenmikroskopischer Direktnachweis von Viruspartikeln bei Gastroenteritis im Säuglings- und Kleinkindalter. *Klin. Wochenschr.* **54** (1976) 445–448.
- [13] Gelderblom, H., und Özel, M.: Zur Virusdiagnostik mit dem Elektronenmikroskop. *Kleintierpraxis* **28** (1983) 39–45.
- [14] Schulze, P.: Aussagemöglichkeit elektronenmikroskopischer Untersuchungen in der virologischen Diagnostik. *Z. ges. Hyg.* **36** (1990) 250–254.
- [15] Reckling, K. F.: Elektronenmikroskopische Virusdiagnostik in einem veterinärmedizinisch-diagnostischen Institut – ein Erfahrungsbericht. *Tierärztl. Umschau* **46** (1991) 718–728.
- [16] Gelderblom, H., and Reupke, H.: Rapid viral diagnosis using the Airfuge. *Den Haag: Proc. IV. Intern. Congress Virology 1978*, W 50 A/9, p630.
- [17] Müller, G., Gelderblom, H., and Nielsen, G.: Zur Effektivität von Airfuge und Poly-L-Lysin in der elektronenmikroskopischen Präparation von Virussuspensionen. *GIT Fachz. Lab.* **25** (1981) Suppl. *Mikroskopie/Elektronenmikroskopie*, 7–11.
- [18] Hammond, G. W., Hazelton, P. R., Chuang, I., and Klisko, B.: Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J. Clin. Microb.* **14** (1981) 210–221.
- [19] Palmer, E. L., and Martin, M. L.: *An Atlas of Mammalian Viruses*. Boca Raton, Florida: CRC Press 1982.
- [20] Doane, F. W., and Anderson, N.: *Electron Microscopy in Diagnostic Virology: A Practical Guide and Atlas*. Cambridge/London/Sydney: Cambridge University Press 1987.
- [21] Madeley, C. R., and A. M. Field: *Virus Morphology*. 2nd Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988.
- [22] Nermut, M. V., and Stevens, A.C.: *Animal Virus Structure*. Amsterdam-New York-Oxford: Elsevier 1989.
- [23] Gardner, P. S.: Rapid virus diagnosis. *J. Gen. Virol.* **36** (1977) 1–29.

Anschrift der Verfasser:

Susanne R. Philipp und Dir. u. Prof. Dr. Hans R. Gelderblom, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin