Elektronenmikroskopischer Direktnachweis von Viruspartikeln bei Gastroenteritis im Säuglings- und Kleinkindesalter*

H.G. Baumeister, H.G. Balks und G. Maass

Institut für Virusdiagnostik am Hygienisch-bakteriologischen Landesuntersuchungsamt „Westfalen“ in Münster/Westfalen

Electronmicroscopic Visualization of Virusparticles in Cases of Gastroenteritis of Infants and Children

Summary. In 72 faecal extracts examined from babies and infants with an acute gastroenteritis, virus particles were found in 29 cases. These particles could be classified as reovirus-like in 16 cases, coronaviruses in 11 cases and adenoviruses in 2 cases. The electron microscopic investigation of 11 faecal extracts from healthy babies did not show any of these particles. Comparative studies on the concentration methods were performed.

Key words: Gastroenteritis — Reovirus — Coronavirus — Adenovirus.

Zusammenfassung. Bei elektronenmikroskopischer Direktuntersuchung von 72 Stuhlproben von Säuglingen und Kleinkindern mit akuter Gastroenteritis konnten in 29 Stuhlproben Viruspartikel nachgewiesen werden, die entweder als Reovirus-ähnlich (16 Stuhlproben), als Coronavirus (11 Stuhlproben) oder als Adenovirus (2 Stuhlproben) eingeordnet werden konnten. Die elektronenmikroskopische Untersuchung von 11 Stuhlproben gesunder Säuglinge zeigte diese Viruspartikel nicht. Zur Untersuchungsmethode werden vergleichende Untersuchungen angestellt.

Schlüsselwörter: Gastroenteritis — Reovirus — Coronavirus — Adenovirus.

meist ungeklärt bleibt [5]. Neben enteropathogenen Bakterien, die nur bei einem Teil der Erkrankungsfälle als Ursache gefunden werden, können nach kürzlich veröffentlichten Befunden [1–4, 6, 8–11] aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Stuhlsuspensionen Viren als ätiologisches Agens in Betracht kommen. Während der akuten Krankheitsphase konnten von verschiedenen Untersuchungsgruppen zumindest 2 verschiedene Partikelformen nachgewiesen werden; eine dritte Art von Viruspartikeln wurde dagegen bisher nur bei Erwachsenen gefunden, während eine vierte Gruppe bislang nur bei Gastroenteritis von Säugetieren gefunden wurde.

Die bei der akuten Gastroenteritis der Säuglinge und Kleinkinder elektronenmikroskopisch nachweisbaren ca. 60 nm großen Partikel werden von einzelnen Untersuchern als Reovirus-ähnlich [3, 8, 9] bezeichnet oder zur Gruppe der Orbiviren [1, 10] gerechnet; andere Untersucher ordnen diese Viruspartikel in eine neue hierzu geschaffene Virusgruppe ein, die sie als Duoviren [2] oder Rotaviren [11] bezeichnen. Als zweite Virusart werden gelegentlich in den Stuhlproben erkrankter Säuglinge und Kleinkinder Adenoviren gefunden, von denen allerdings gegenwärtig nicht gesagt werden kann, ob es sich um das ätiologische Agens oder um einen Zufallsbefund handelt [4]. Als dritte Virusgruppe, die als Ursache von Gastroenteriserkrankungen angeschuldigt wird, sind 20–30 nm große Partikel zu nennen, die einzelne Untersucher aufgrund ihrer Struktur zu den Picornaviren rechnen [6]. Diese Partikel, die auch als „Norwalk-Agent“ bezeichnet werden [6], konnten bisher allerdings nur bei entsprechenden Erkrankungen Erwachsener gefunden werden. Viruspartikel der vierten Gruppe, die aufgrund ihrer Morphologie als Coronaviren einzuordnen sind, konnten als Ursache von Gastroenteritis-Erkrankungen bei verschiedenen Nutz-

Die akute Gastroenteritis ist eine häufige Erkrankung im Säuglings- und Kleinkindesalter, deren Ätiologie

* Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Haas zur Vollendung seines 65. Lebensjahres gewidmet

tieren gefunden werden [12, 13], und es wird vermutet, daß ihnen auch für den Menschen pathogene Bedeutung zukommen könnte [9]. Eine Vermehrung dieser verschiedenen Viruspartikel in Zellkulturen gelang bisher — mit Ausnahme der Adenoviren — nicht; lediglich in Organkulturen aus menschlichem fetalem Intestinum konnte eine Vermehrung der Reovirus-ähnlichen Partikel beobachtet werden [9]. Aus diesem Grund ist die elektronenmikroskopische Untersuchung der Stuhlprobe aus der akuten Krankheitsphase das einzige, z.Z. zur Verfügung stehende Nachweisverfahren, das praktisch anwendbar ist.

In einer Untersuchungsserie soll festgestellt werden, mit welcher relativen Häufigkeit die verschiedenen Partikelformen in den Stuhlproben von Säuglingen und Kleinkindern mit einer Gastroenteritis gefunden werden, und es soll ferner untersucht werden, ob andere — weniger aufwendige — Konzentrierungsverfahren als die Ultrazentrifugation bei diesen Untersuchungen angewendet werden können.

Um terminologische Schwierigkeiten zu vermeiden, werden im folgenden die Viren der ersten, oben beschriebenen Gruppe als Reovirus-ähnlich, die der zweiten als Adenoviren, die der dritten als Picornavirus-ähnlich und die der vierten als Coronaviren bezeichnet.

Material und Methoden

Stuhlproben

Von 72 Erkrankten wurden während des akuten Stadiums einer Gastroenteritis jeweils eine Stuhlprobe gesammelt. Diese Stuhlproben wurden bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung bei -20°C gelagert. Das Alter dieser Kinder betrug 0–10 Jahre, 66 Kinder waren 0–4 Jahre alt.

In gleicher Weise wurden von 11 gesunden Säuglingen je eine Stuhlprobe entnommen.

Viruskonzentrierung (Methode 1)

Von den Stuhlproben wurde eine ca. 10%ige Suspension in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) unter Zusatz von 100 E Penicillin/ml und 50 gamma Streptomycin/ml hergestellt. Diese Suspension wurde 30 min lang bei 4000 U/min (1000 g) zentrifugiert und der Überstand 90 min lang in einer Spinco-Ultrazentrifuge in einem Rotor 60 Ti bei 35000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1 ml Aqua bidest aufgenommen.

Ein Tropfen des durch Ultrazentrifugation gewonnenen Sediments wurde entsprechend der Methode von Kelen et al. [7] auf eine Agarplatte (0,8% Ionagar (Fa. Difco) in Veronal-Puffer pH 8,1) gegeben. Auf diesen Tropfen wurde das, mit einer Formvar-Folie (3,5% Formvar in Chloroform) bespannte Kupfernetz aufgelegt. Nach etwa 20 min war der Flüssigkeitstropfen in den Agar eingedrungen; das Netz wurde abgehoben und mit Phosphorwolframsäure (1,6% in Aqua bidest) 30 sec lang kontrastiert.

Viruskonzentrierung (Methode 2)

Diese Methode unterschied sich von der Methode 1 durch das Fehlen der Ultrazentrifugation; die Stuhlsuspensionen wurden 4 min lang bei 4000 UpM (1000 g) zentrifugiert. Die anderen Präparationsschritte unterschieden sich nicht von den oben genannten.

Elektronenmikroskopie

Die Präparate wurden in einem Elmiskop 101 bei einer Spannung von 80 KV bei einer Vergrößerung von 60000 untersucht. Eine Stuhlprobe galt als negativ, wenn bei Untersuchung von mindestens 2 Netzen nach insgesamt 30–45 min Suchzeit keine Viruspartikel gefunden wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Alle 72 untersuchten Stuhlproben von Kranken waren — wie eine vorausgegangene bakteriologische Untersuchung ergab — frei von enteropathogenen Bakterien. Die bei elektronenmikroskopischer Untersuchung dieser Stuhlproben erhobenen Befunde sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die beiden verwendeten Konzentrierungsverfahren, die sich lediglich durch das Fortfallen der Ultra-

Tabelle 1. Elektronenmikroskopischer Nachweis von Viruspartikeln in Stuhlproben von Kindern mit akuter Gastroenteritis und von Gesunden mit verschiedenen Untersuchungsmethoden (siehe Text)

Untersuchungs- material von	Unter- suchungs- methode	n	Ergebnis				
			Reovirus- ähnlich	Adeno- virus	Picornavirus- ähnlich	Corona- virus	Negativ
Gastroenteritis (Kinder 0–4 Jahre)	1	56	9	1	0	9	39
	2	56	9	1	0	9	39
Gastroenteritis (Kinder 0–10 Jahre)	2	16	7	1	0	2	6
Gesunde (Kinder 0–1 Jahr)	1	11	0	0	0	0	11
	2	11	0	0	0	0	11

Abb. 1. (a) Nachweis von Reovirus-ähnlichen Partikeln in einer Stuhlprobe eines Patienten mit akuter Gastroenteritis. 200000:1. (b) Nachweis von Coronaviren in einer Stuhlprobe eines Patienten mit akuter Gastroenteritis. 200000:1

zentrifugation und eine verkürzte vorausgegangene Zentrifugation unterschieden, während die durch die Agardiffusion erzielte Viruskonzentrierung [7] bei beiden Verfahren vorgenommen wird, ergaben gleiche Resultate. Aus diesem Grund wurde nach Untersuchung von 56 Stuhlproben bei weiteren 16 Stuhlproben auf die zusätzliche Durchführung des Konzentrierungsverfahrens 1 verzichtet.

Viruspartikel konnten bei 29 von 72 untersuchten Stuhlproben Kranker nachgewiesen werden (=39%). In einer Stuhlprobe fanden sich stets nur Viruspartikel einer der oben genannten Gruppen; die Zuordnung der nachgewiesenen Partikel zu diesen Gruppen bereitete nach einer Einarbeitungszeit keine Schwierigkeiten. Die von uns als Reovirus-ähnlich eingeordneten Viruspartikel besaßen einen Durchmesser von etwa 60–65 nm; auf ihrer Oberfläche konnte eine deutliche Substruktur erkannt werden (Abb. 1a). Die Coronaviren waren in ihrer Form sehr variabel, die Größe der Partikel betrug etwa 80–100 nm. Als Charakteristikum dieser Viren wurden die blattförmigen Fortsätze auf der Virusoberfläche gewertet (Abb. 1b). Die Erkennung und Einordnung der Adenoviren in den Stuhlproben bereitete keine Schwierigkeiten.

Picornavirus-ähnliche Partikel konnten in keiner Stuhlprobe nachgewiesen werden. Diese Viren wurden bisher ausschließlich bei Erwachsenen kurzfristig nach Krankheitsbeginn gefunden [6]. Die von uns untersuchten Stuhlproben waren zumeist erst 1–2 Tage nach Einsetzen des akuten Krankheitsbildes gewonnen worden, so daß die Untersuchung aus diesem Grunde vielleicht negativ verlief.

In den 11 Stuhlproben von gesunden Säuglingen konnten keine Viruspartikel nachgewiesen werden.

In fast allen untersuchten Stuhlproben – sowohl von Kranken als auch von Gesunden – fanden sich

Bakteriophagen, die jedoch aufgrund ihrer charakteristischen Struktur von den anderen Viruspartikeln ohne Schwierigkeiten zu unterscheiden waren.

Das häufige Vorkommen der charakteristischen Reovirus-ähnlichen Partikel bei Kranken und ihr Fehlen bei Gesunden kann als Hinweis auf eine mögliche ätiologische Bedeutung dieser Viren für die genannte Erkrankung gedeutet werden. Zu gleichen Schlußfolgerungen kommen andere Untersucher [1–4, 6, 8–10]. Ähnliches gilt für die Coronavirus-Partikel, deren Bedeutung als Ursache von Gastroenteritis bei Nutztieren bekannt ist [8]. Hier kann die vorliegende Untersuchung als weiterer Hinweis auf einen möglichen ätiologischen Zusammenhang zu Gastroenteritis-Erkrankungen von Kleinkindern gedeutet werden. Ob es sich bei den Adenoviren um ein zufälliges Zusammentreffen zwischen Isolierung und einem, hiervon unabhängigen Krankheitsbild handelt, kann nach unseren Befunden nicht gesagt werden.

Ob diese verschiedenen Viren auch die Ursache entsprechender Krankheitsbilder bei älteren Kindern und Erwachsenen sind, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Herrn Prof. Dr. Ritzfeld danken wir für die Überlassung der Stuhlproben und der entsprechenden bakteriologischen Untersuchungsbefunde.

Literatur

1. Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., Ruck, B.J.: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1974, I, 149 (1974)
2. Davidson, G.P., Bishop, R.F., Townley, R.R.W., Holmes, I.H., Ruck, B.J.: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1975, I, 242 (1975)

3. Flewett, T.H., Davies, H., Bryden, A.S., Robertson, M.J.: Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J. clin. Path.* **27**, 603 (1974)
4. Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H.: Epidemics viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1975, **I**, 4 (1975)
5. Harnack, G.A. von: *Kinderheilkunde*, 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 1971
6. Kapician, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M.: Visualization by Immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**, 1075 (1972)
7. Kelen, A.E., Hathaway, A.E., McLeod, D.A.: Rapid detection of Australia/SH antigen and antibody by a simple and sensitive technique of immunoelectronmicroscopy. *Canad. J. Microbiol.* **17**, 993 (1970)
8. Konno, T., Suzuki, H., Ishida, N.: Reovirus-like agent in Japanese infants with gastroenteritis. *Lancet* 1975, **I**, 918 (1975)
9. The Lancet Editorial: Rotaviruses of man and animals. *Lancet* 1975, **I**, 257 (1975)
10. Middleton, P.J., Szymanski, M.T., Abbot, G.D., Bortolussi, R., Hamilton, J.R.: Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* 1974, **I**, 1241, (1974)
11. Thornton, A., Zuckerman, A.J.: The virus of acute diarrhoea. *Nature* **254**, 557 (1975)

Dr. H.G. Baumeister
 Institut für Virusdiagnostik
 am Hygienisch-bakteriologischen
 Landesuntersuchungsamt „Westfalen“
 von-Stauffenberg-Straße 36
 D-4400 Münster
 Bundesrepublik Deutschland