

## **Selektiver Zytomegalievirusnachweis durch „in-situ“-Hybridisierung\* , \*\***

**U. Cremer**

Abteilung Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Pauwelsstrasse (Neuklinikum), D-5100 Aachen, Bundesrepublik Deutschland

### **The Selective Detection of Cytomegalovirus (CMV) by In Situ Hybridization**

**Summary.** In two SIDS autopsy cases, in situ hybridization with biotin-labeled DNA probes was used to demonstrate a specific cytomegalovirus (CMV) infection in paraffin-embedded tissue sections. This technique represents a rapid, specific, and highly sensitive tool for the detection of CMV infections and is recommended for routine examination in other suspected viral infections, particularly in cases connected with SIDS.

**Key words:** Cytomegalovirus – Hybridization, paraffin sections – SIDS, detection of cytomegalovirus

**Zusammenfassung.** An zwei SIDS-Fällen wird der spezifische Nachweis einer Zytomegalievirusinfektion durch „in-situ“-Hybridisierung an Paraffinschnitten erbracht. Die Hybridisierungstechnik mit Biotin-markierten Sonden stellt ein Verfahren von großer Sensitivität dar. Diese Technik erlaubt einen schnellen und spezifischen Nachweis einer Virusinfektion und empfiehlt sich für routinemäßige Untersuchungen bei Verdacht auf eine Virusinfektion, insbesondere bei der Ursachenerforschung des plötzlichen Kindstodes.

**Schlüsselwörter:** Zytomegalievirus – Hybridisierung, Paraffinschnitte – SIDS, Zytomegalievirusnachweis

Die hohe Frequenz histologisch nachweisbarer akuter respiratorischer Infekte bei plötzlichen Kindstodesfällen (Althoff 1969; Berg und Kijewski 1978; Valdes-

\*Herrn Prof. Dr. G. Dotzauer zu seinem 75. Geburtstag

\*\* Auszugsweise vorgetragen auf der 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Bonn im September 1987

Dapena 1986; Weyrich 1933) hat in letzter Zeit nicht nur zu Überlegungen über deren pathophysiologische Auswirkungen geführt, sondern auch Forschungen bezüglich der Ätiologie aktiviert, mit dem Ziel, die für solche respiratorischen Infekte ursächlichen Erreger nachzuweisen.

Da schon seit längerem ein Zusammenhang zwischen einem plötzlichen, unerwarteten Todeseintritt im Säuglingsalter und respiratorischer Virusinfekte vermutet wird (Althoff 1973, 1980, 1982; Dietzsch und Wunderlich 1986; Gillner et al. 1976; Gold et al. 1961; Janssen und Naeve 1975; Kelly und Shannon 1982; Nelson et al. 1975; Ricken 1958; Spann 1950; Williams et al. 1984) wurde mit verschiedenen Forschungsansätzen versucht, die Bedeutung von Infekten mit „respiratorischen Viren“ zu ermitteln (Aherne et al. 1970; Bergmann et al. 1972; Brandt et al. 1974; Ferris et al. 1973; Gardner 1983; Kingsbury und Falkow 1985; Mertens et al. 1985; Ray 1970; Scott et al. 1978; Valdes-Dapena 1967).

Aufgrund virologischer und klinischer Erfahrungen können viele Viren Atemwegsinfekte auslösen, wobei sich eine unterschiedlich lokalisierte Ansiedlung abgrenzen läßt.

Influenza- und Parainfluenza-Viren verursachen Krankheitsercheinungen in allen Stockwerken des Atemtraktes. Andere, wie das Respiratorisch-Syncytiale Virus, befallen vorwiegend die unteren, Adeno- und Coxsackieviren mehr die mittleren Abschnitte und Rhino- und Coronaviren siedeln sich fast ausschließlich im oberen Respirationstrakt an (Klenk 1981). Noch umstritten ist die Bedeutung und Frequenz von Zytomegalievirus-Infektionen bei plötzlichen Kindstodesfällen (Mahnke 1960; Molz et al. 1985; Müller und Hesse 1960; Seifert 1984).

Obwohl sich diese aus zytomegalen histomorphologisch erfaßbaren Veränderungen, etwa in den Kopfspeicheldrüsen ableiten lassen, ist dadurch aber noch nicht der sichere spezifische Virus-Nachweis geführt.

Die in den letzten Jahren erfolgte Weiterentwicklung virologischer Techniken eröffnet erfolgsversprechende Wege eines Virus-Nachweises auch an post-mortalem Material.

Die Identifizierung von Viren durch Virusisolierung – ein sehr zeitaufwendiges Verfahren – gelingt meist nur in der akuten Phase der Erkrankung, die bei plötzlichen Todesfällen schon abgelaufen sein kann.

Neben einem immunhistologischen Nachweis spezifischer viraler Antigene mit Hilfe mono- und polyclonaler Antikörper, kann auch ein indirekter serologischer Nachweis einer frischen Virusinfektion, etwa durch erhöhte IgM-Titer wie von Zink (1986) bei Infektionen mit Influenza-A-Viren vorgestellt, geführt werden. Dieses Verfahren ist jedoch durch die Unsicherheit geprägt, daß in der Regel kein Vergleichstiter aus einer Zeitphase vor dem Tode zur Verfügung steht.

Als ein weiteres spezifisches Nachweisverfahren wird seit einiger Zeit die Nukleinsäurehybridisierung angewendet. Mit dieser Technik kann der signifikante Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen „in situ“, d.h. direkt in Zellen oder in Gewebeproben erfolgen (Neumann 1987).

Da diese Nachweisttechnik auch an bereits in Formol fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material erfolgreich sein soll (Brigati et al. 1983; Löning et al. 1986; Myerson et al. 1984; Seifert et al. 1984), wird der Frage nachgegangen, ob

derartige Untersuchungen unter Berücksichtigung des technischen und zeitlichen Aufwandes für systematische Untersuchungen bei Kindstodesfällen zweckmäßig und erfolgreich sind.

### Material und Methodik

Es wurden zwei Kindstodesfälle ausgewählt, bei denen neben ausgedehnten unspezifischen Atemwegsinfekten die Glandula parotis auf eine zusätzliche ZMV-Infektion hinweisende Zellveränderungen aufwies. Es handelte sich um zwei männliche Säuglinge im Alter von 5 und 6 Monaten (Abb. 1).

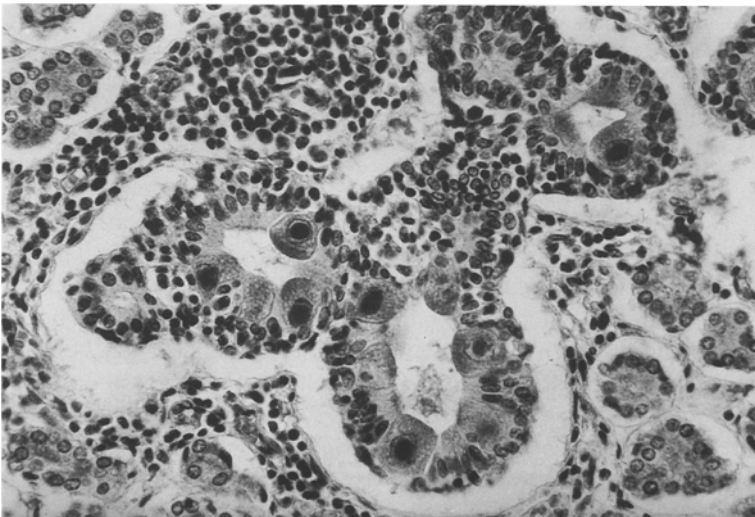
Von dem im Formol fixierten und in Paraffin eingebetteten Drüsengewebe wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Hybridisierung erfolgte wie von Brigati et al. (1983) beschrieben.

Zum Virusnukleinsäurenachweis wurde eine Biotin-markierte, spezifische ZMV-DNA-Sonde (Zytomegalievirus Bioprobe™, Enzo, New York, USA) verwendet.

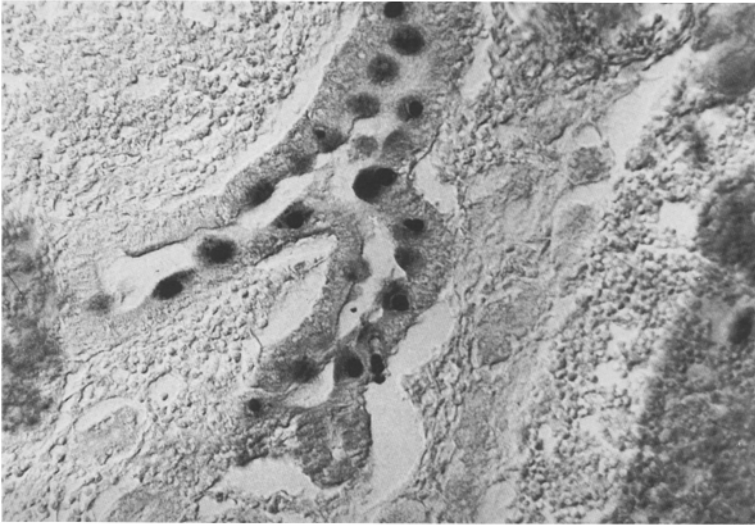
Das Testprinzip basiert auf der spezifischen Bindung von Virus-DNA-Sequenzen im Untersuchungsmaterial mit der zugegebenen DNA-Sonde. Durch Hitzeeinwirkung (Denaturierung) wird die Doppelstrang-DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Mit der einzelsträngig vorliegenden Erreger-DNA-Sequenz kommt es durch komplementäre Basenpaarung zur Ausbildung eines Hybrids aus Virus-Nukleinsäure und markierter Gensonde. Nach Zugabe eines Streptavidin-Enzymkomplexes, der eine Bindung mit der Biotin-markierten Gensonde eingeht, erfolgt die Sichtbarmachung der Virus-DNA-Sequenz durch die Enzymreaktion, bei der Chromogene farbige Niederschläge ausbilden, die lichtoptisch an den Stellen sichtbar werden, an denen sich ein Hybrid aus der Gensonde und der gesuchten Virus-DNA-Sequenz ausgebildet hat (Abb. 2).

### Ergebnisse und Diskussion

In beiden untersuchten Fällen gelang es mit der vorgestellten Methodik der spezifische Nachweis von ZMV-Virus-DNA-Sequenzen. Die Riesenzellen mit



**Abb. 1.** Glandula parotis: Sialadenitis mit lympho- und plasmazellulärer Infiltration des Interstitiums und zahlreichen zytomegalen Riesenzellen im Gangepithel; H.E.-Färbung; 400 ×



**Abb. 2.** Glandula parotis: In situ Hybridisierung: Nachweis von ZMV-DNA in zytomegalen Riesenzellen der Gangepithelien; 400 ×

Kern- und Zytoplasmaeinschlüssen färben sich isoliert braun an und lassen sich von den umgebenden Gewebekonturen deutlich abgrenzen.

Trotz eingehender lichtmikroskopischer Auswertung fanden wir neben den typischen Zytomegaliezellen keine weiteren virusinfizierten Zellen wie von Löning et al. (1986) vorgestellt, z.B. Pneumozyten, Endothelzellen und intravasculär lokalisierte Leukozyten.

Die Autoren haben allerdings die Technik durch eine zusätzliche Antigen-Antikörper-Methode modifiziert, die eine verstärkte Nachweissensitivität besitzen soll.

Denkbar wäre auch, daß bei den von uns untersuchten SIDS-Fällen eine zur Elimination von Virusmaterial notwendige optimale Immunantwort durch Kooperation des T-Lymphozyten- und Makrophagensystems (Zinkernagel 1981) nicht zustande gekommen ist.

Die erzielten Ergebnisse belegen, daß die Hybridisierungstechnik als ein spezifisches Virus-Nachweisverfahren auch an postmortalem, in Paraffin eingebettetem Gewebematerial erfolgreich durchgeführt werden kann, wobei eine genaue Lokalisation von Virus-DNA in intaktem Zellmaterial möglich ist. Diese selektive Virusnachweisteknik ist der Elektronenmikroskopie überlegen, mit der z.B. integrierte Virus-DNA nicht erfaßbar ist. Auch ergeben sich Vorteile gegenüber den sehr aufwendigen Gewebekulturtechniken, bei denen zum Positiv-Nachweis intakte virale Erreger vorliegen müssen (Lee et al. 1978; Gregory und Menegues 1983). Auch bei einer Viruslatenz mit fehlender Replikation können mit der vorgestellten Hybridisierungstechnik positive Resultate erbracht werden (Wolf 1981).

Die Verwendung Biotin-markierter Gensonden empfiehlt sich für routinemäßige Anwendungen, da hierbei im Gegensatz zu isotonenmarkierten Gen-

sonden keine Sicherheits- und Abfallprobleme auftreten und die Markierung auch nicht im Laufe der Zeit durch Zerfall verloren geht.

Mit dieser Hybridisierungstechnik läßt sich somit bei einer hohen Sensitivität ein spezifischer Nachweis und eine Lokalisation von ZMV-Virus-DNA bei intaktem Gewebematerial erbringen.

Bei relativ geringem finanziellen und apparativen Aufwand lassen sich derartige Untersuchungen auch im Rahmen routinemäßiger histologischer und histochemischer Diagnostik in Routinelabors durchführen. Es ist abzusehen, daß mit weiteren zunehmend verfügbaren Sonden neben dem jetzt schon sicher möglichen ZMV-Nachweis auch andere Viren erfaßt werden können, wodurch sich das Spektrum der Kindstodesforschung entscheidend erweitern wird.

*Danksagung.* Der Autor dankt FrI. Sylvia Seegers für ihre hervorragende technische Hilfe.

## Literatur

- Aherne W, Bird T, Court SDM, Gardner PS, McQuillin J (1970) Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 23: 7-18
- Althoff H (1969) Der forensische Beweiswert histopathologischer Bronchien- und Lungenveränderungen beim plötzlichen Kindstod. *Beitr Gerichtl Med* 25: 253-263
- Althoff H (1973) Der plötzliche und unerwartete Tod von Säuglingen und Kleinkindern. Fischer, Stuttgart
- Althoff H (1980) Sudden infant death syndrome (S.I.D.S). Fischer, Stuttgart
- Althoff H (1982) Praxisorientierte Erfahrungen über plötzliche Todesfälle. *Zentralbl Rechtsmed* 24: 79-83
- Berg S, Kijewski S (1978) Histologische Befunde an 224 Fällen von plötzlichem Säuglingstod im norddeutschen Raum. *Beitr Gerichtl Med* 36: 153-160
- Bergmann AB, Ray CG, Pomeroy MA, Wahl PW, Beckwith JB (1972) Studies of the sudden infant death syndromes in King county, Washington. III. *Epidemiology. Pediatrics* 49: 860-870
- Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalholz B, Travis SZ, Fong CKY, Hsiung GD, Ward DC (1983) Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* 126: 32-50
- Dietzsch HJ, Wunderlich P (1986) Bronchopulmologie und Oto-Rhino-Laryngologie. In: Grossmann P, Plenert W (Hrsg) *Pädiatrie*, Bd 3. VEB Georg Thieme, Leipzig, S 1196-1271
- Ferris JAJ, Aherne WA, Locke WS, McQuillin J, Gardner PS (1973) Sudden and unexpected deaths in infants: histology and virology. *Br Med J* 2: 439-442
- Gardner PS (1983) Identification of viruses. *Histochem J* 15: 613-620
- Güllner E, Lignitz E, Rittner Ch (1976) Der plötzliche Tod aus natürlicher Ursache. In: Prokop P, Göhler W (Hrsg) *Forensische Medizin*. Fischer, Stuttgart New York, 3. Aufl, S 85-102
- Gold E, Carver DH, Heineberg H, Adelson L, Robbins FC (1961) Viral infection. A possible cause of sudden, unexpected death in infants. *N Engl J Med* 264: 53-60
- Gregory WW, Menegues MA (1983) Practical protocol for cytomegalovirus isolation: use of MRC-5 cell monolayers incubated for two weeks. *J Clin Microbiol* 17: 605-609
- Jannsen W, Naeve W (1975) Der plötzliche Tod aus natürlicher Ursache. In: Müller B (Hrsg) *Gerichtliche Medizin*. Springer, Berlin Heidelberg New York, Bd 1, 2. Aufl, S 248-304
- Kelly DH, Shannon DC (1982) Sudden infant death syndrome and near sudden infant death syndrome: A review of the literature, 1964 to 1982. *Pediatr Clin North Am* 29: 1241-1261
- Kingsbury DT, Falkow St (eds) (1985) *Rapid detection and identification of infectious agents*. Academic Press, New York

- Klenk HD (1981) Virusinfektionen des Respirationstraktes. *Verh Dtsch Ges Pathol* 65: 103–106
- Lee FK, Nahmias AJ, Stagno S (1978) Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in infants by electron microscopy. *N Engl J Med* 299: 1266–1270
- Löning TH, Milde K, Foss H-D (1986) In situ hybridization for the detection of cytomegalovirus (CMV) infection. *Virchows Arch* 409: 777–790
- Mahnke P-F (1960) Zytomegalie und plötzlicher Tod im Kindesalter. *Frankf Z Pathol* 70: 621–629
- Mertens T, Eis A-M, Blume C, Oehmichen M (1985) Virusisolierungsversuche bei Kindern nach plötzlichem Kindstod (SIDS). *Zentralbl Rechtsmed* 27: 877
- Molz G, Hartmann HP, Michels L (1986) Plötzlicher Kindstod: Histologische Befunde in den Kopfspeicheldrüsen. *Pathologie* 6: 8–12
- Müller G, Hesse R (1960) Cytomegalie und plötzlicher Kindstod. *Frankf Z Pathol* 70: 409–416
- Myerson D, Hackman RC, Nelson JA, Ward DC, McDougall JK (1984) Widespread Presence of Histologically Occult Cytomegalovirus. *Hum Pathol* 15: 430–439
- Nelson KE, Greenberg MA, Mufson MA, Moses VK (1975) The sudden infant death syndrome and epidemic viral disease. *Am J Epidemiol* 101: 423–430
- Neumann R (1987) Die Technik der Nukleinsäurehybridisierung und ihre Bedeutung für diagnostische Fragestellungen. *Naturwissenschaften* 74: 125–133
- Ray CG (1970) The role of viruses in sudden infant death syndrome. In: Bergmann AB, Beckwith JB, Ray CG (eds) *Sudden infant death syndrome*. University of Washington Press, Seattle London, pp 145–155
- Ricken D (1958) Desquamativpneumonie als Ursache plötzlichen Todes im Säuglingsalter. *Frankf, Z Pathol* 69: 314–323
- Scott DJ, Gardner PS, McQuillin J, Stanton AN, Downham MAPS (1978) Respiratory viruses and cot death. *Br Med J* 2: 12–13
- Seifert G (1984) Virale Erkrankungen der Speicheldrüsen. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir* 8: 187–194
- Seifert G, Löning TH, Hoepfner I (1984) Morphologische Diagnostik bei Virusinfektionen. *Pathologie* 5: 326–342
- Spann W (1959) Der plötzliche Tod aus natürlicher Ursache im Säuglings- und Kleinkinderalter. *Münch Med Wochenschr* 21: 929–933
- Valdes-Dapena MA (1967) Sudden and unexpected death in infancy: A review of the world literature 1954–1966. *Pediatrics* 39: 123–138
- Valdes-Dapena MA (1986) Sudden infant death syndrome. Morphology update for forensic pathologists – 1985. *Forens Sci Int* 30: 177–186
- Weyrich G (1933) Erfahrungen über den plötzlichen Tod aus innerer Ursache bei Kindern und Jugendlichen. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 22: 116–149
- Williams AL, Uren EC, Bretherton L (1984) Respiratory viruses and sudden infant death. *Br Med J* 288: 1491–1493
- Wolf H (1981) Die Verwendung verschiedener Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken am Beispiel von Epstein-Barr-Virus korrelierter Erkrankungen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 65: 47–57
- Zink P (1986) Pathologisch-anatomische Befunde bei plötzlichem, unerwartetem Tod von Kindern und Erwachsenen mit Influenza-A-Infektion. *Z Rechtsmed* 97: 165–184
- Zinkernagel RM (1981) Die Bedeutung virusinduzierter zellulärer Immunreaktionen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 65: 11–14

Eingegangen am 20. Oktober 1987