

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Institut für klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

**Evaluation kommerziell verfügbarer Lateral  
Flow Immunoassays von vier verschiedenen  
Herstellern zum Nachweis von *B. anthracis*, *F.  
tularensis* und *Y. pestis***

**Isabel Ziegler**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. Jürgen Schlegel
Prüfer der Dissertation:	1. Prof. Dr. Dirk Busch
	2. Prof. Dr. Markus Gerhard

Die Dissertation wurde am 24.08.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.12.2020 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1. <i>Geschichte des Einsatzes biologischer Agenzien in Konfliktsituationen</i> .....	8
1.2. <i>Medizinische B-Aufklärung</i> .....	10
1.3. <i>Y. pestis und Pest</i> .....	15
1.3.1.    Epidemiologie des Erregers .....	15
1.3.2.    Pest in der Geschichte .....	15
1.3.3.    Formen und Krankheitsbilder der Pest.....	16
1.3.4.    Einsatz von <i>Y. pestis</i> als biologisches Agens .....	18
1.3.5.    Therapie.....	20
1.4. <i>Francisella tularensis und Tularämie</i> .....	21
1.4.1.    Epidemiologie und Klassifikation des Erregers .....	21
1.4.2.    Einsatz von <i>F. tularensis</i> als biologisches Agens .....	23
1.4.3.    Virulenzfaktoren.....	24
1.4.4.    Formen und Krankheitsbilder der Tularämie .....	25
1.4.5.    Therapie.....	27
1.5. <i>Bacillus anthracis und Anthrax</i> .....	28
1.5.1.    Epidemiologie des Erregers .....	28
1.5.2.    Einsatz von <i>B. anthracis</i> als biologisches Agens .....	28
1.5.3.    Virulenzfaktoren.....	29
1.5.4.    Formen und Krankheitsbilder von Milzbrand.....	30
1.5.5.    Therapie.....	32
1.6. <i>Diagnostische Verfahren in der Mikrobiologie</i> .....	34
1.6.1. <i>Y. pestis</i> .....	34
1.6.2. <i>F. tularensis</i> .....	35
1.6.3. <i>B. anthracis</i> .....	35
1.7. <i>Spezifität und Sensitivität von diagnostischen Nachweisverfahren</i> .....	36
1.8. <i>Lateral Flow Immunoassays</i> .....	37
<b>2. Problemstellung</b> .....	<b>40</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>41</b>
3.1. <i>Material</i> .....	41
3.1.1.    Bakterienstämme.....	41
3.1.2.    Chemikalien und Medien .....	41
3.1.3.    DNA-Extraktions-Kits.....	43
3.1.4.    Desinfektion .....	43
3.1.5.    Verbrauchsmaterial .....	44
3.1.6.    Schnelltests .....	45
3.1.7.    Technische Ausstattung .....	47
3.2. <i>Methoden</i> .....	48
3.2.1.    Kulturelle Anzucht Übersicht .....	48
3.2.2.    Allgemeines Vorgehen Übersicht.....	48
3.2.3.    Kulturelle Anzucht.....	49
3.2.4.    Sporenerzeugung .....	49
3.2.5.    Vorbereitung der Proben zur Ermittlung der Nachweisgrenze.....	50
3.2.6.    Vorbereitung der Proben zur Matrixvalidierung.....	51
3.2.7.    Ermittlung der Nachweisgrenzen .....	51
3.2.8.    Matrixvalidierung.....	52

3.2.9.	Negativkontrollen Matrizes .....	52
3.2.10.	Quantifikation der Keimzahl und Sporenkonzentration.....	53
3.2.11.	Inaktivierung, Lyse und Nukleinsäureextraktion .....	54
3.2.12.	Digitale droplet PCR.....	55
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
4.1.	Quantifizierung mittels Rücktitration und Mikroskopieren .....	58
4.1.1.	<i>Y. pestis</i> .....	58
4.1.2.	<i>F. tularensis</i> .....	58
4.1.3.	<i>B. anthracis</i> .....	59
4.2.	Quantifizierung mittels digitaler droplet PCR.....	61
4.2.1.	Quantifizierung der nativen Verdünnungsreihen .....	61
4.2.2.	Ergebnis Verdünnungsreihen Matrixvalidierung .....	62
4.3.	Beschreibung der HHTKs .....	64
4.4.	Nachweisgrenzen .....	65
4.4.1.	Übersicht.....	65
4.4.2.	Nachweisgrenzen von <i>Y. pestis</i> .....	66
4.4.3.	Nachweisgrenzen von <i>F. tularensis</i> .....	66
4.4.4.	Nachweisgrenzen von <i>B. anthracis</i> Sporen .....	66
4.5.	Einfluss verschiedener Matrizes .....	67
4.5.1.	Negativkontrollen .....	67
4.5.2.	Eistee .....	69
4.5.3.	Joghurt-Salat-Soße .....	70
4.5.4.	Milch.....	71
4.5.5.	Bentonit.....	72
4.5.6.	Heroin .....	73
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
5.1.	Bewertung der Praktikabilität .....	75
5.2.	Nachweisgrenzen vorherigen Studien .....	76
5.3.	Matrixvergleich .....	84
5.3.1.	Auswahl der Matrizes .....	84
5.3.2.	Einfluss der Matrizes auf die DNA-Extraktion .....	86
5.3.3.	Einfluss der Matrizes auf die HHTKs.....	88
5.4.	Zusammenfassende Einschätzung der HHTKs.....	93
	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>100</b>
	<b>Dankwort .....</b>	<b>111</b>

## Abkürzungen

LOD	limit of detection
HHTK	Hand Held Testkit
LFIA	Lateral Flow Immunoassay
LFA	Lateral Flow Assay
CFU	colony forming units
KBE	Kolonie bildende Einheiten
ddPCR	digitale droplet Polymerase-Chain-Reaction
BTA	Biothreat Alert (Tetracore)
PES	Peressigsäure
CDC	Center of Disease Control and Prevention
WHO	World Health Organization
CFR	Case fatality rate
DIC	Disseminated intravascular coagulation (Disseminierte intravasale Gerinnung)
IMB	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
TTSS	Typ-3-Sekretionssystem
LPS	Lipopolysacharid
RKI	Robert-Koch-Institut
n.t.	not tested

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 Sandwich-Assay-Format. Übernommen von (InnovaBiosciences). a. Ein positives Ergebnis ist zu sehen, wenn das nachzuweisende Antigen an den Nachweisantikörper und an den an der Testlinie immobilisierten Antikörper gebunden wird. Der Antikörper, der an der Kontrolllinie immobilisiert wurde, erkennt den Nachweisantikörper und erzeugt eine farbige Linie, um anzuzeigen, dass der LFA korrekt abgelaufen ist. Das Antigen ist orange angefärbt. b. negatives Testergebnis bei Abwesenheit des zu detektierenden Antigens.....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 2 verwendete Schnelltestsysteme, von oben nach unten: miPROTECT®, BADD™, SMART II™, BioThreat Alert®.....</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 3 Übersicht allgemeines Vorgehen.....</i>	<i>48</i>
<i>Abb. 4: inaktivierte Bacillus anthracis Sporen mikroskopisch, 40fache Vergrößerung, die Sporen sind aufgereinigt und separiert. Es sind keine Reste vegetativer Zellen zu sehen. a. Ames, b. Vollum .....</i>	<i>60</i>
<i>Abb. 5 Bacillus anthracis Ames Sporen makroskopisch. Es zeigt sich eine trüb-milchige Sporensuspension bei einer Konzentration von <math>4,23 \times 10^9</math> Sporen pro ml.....</i>	<i>60</i>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Beispiele für Agenzien der Kategorien A, B, und C und deren Krankheitsbilder.....	12
Tabelle 2 Virulenz und Verteilung von <i>Francisella</i> . Abgewandelt nach (Oyston, 2008).....	22
Tabelle 3 Klinische Formen, Infektionsrouten und Symptome der Tularämie.....	26
Tabelle 4 Verwendete Bakterien.....	41
Tabelle 5 Verwendete Chemikalien.....	41
Tabelle 6 Verwendete Medien.....	42
Tabelle 7 Verwendete Extraktionskits.....	43
Tabelle 8 Verwendete Desinfektionsmittel.....	43
Tabelle 9 Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	44
Tabelle 10 Verwendete HHTKs.....	45
Tabelle 11 Technische Ausstattung.....	47
Tabelle 12 Übersicht kulturelle Anzucht.....	48
Tabelle 13 Primer- und SONDENSEQUENZEN der verwendeten PCR.....	56
Tabelle 14 Thermoprofil ddPCR <i>F. tularensis</i> , <i>B. anthracis</i> .....	56
Tabelle 15 Thermoprofil ddPCR <i>Y. pestis</i> .....	57
Tabelle 16 Mittelwerte der Rücktitration von <i>Y. pestis</i> .....	58
Tabelle 17 Mittelwerte der Rücktitration von <i>F. tularensis</i> .....	59
Tabelle 18 Mittelwerte der Quantifizierung der virulenten <i>B. anthracis</i> Sporen.....	59
Tabelle 19 Mittelwerte der mikroskopischen Zählung der inaktivierten <i>B. anthracis</i> Sporen.....	59
Tabelle 20 Ergebnis ddPCR Verdünnungsreihen <i>Y. pestis</i> und <i>F. tularensis</i> .....	61
Tabelle 21 Ergebnisse ddPCR <i>B. anthracis</i> Ames und Vollum in zweifachem Ansatz (A und B).....	61
Tabelle 22 Ergebnis Verdünnungsreihe ddPCR Matrixvalidierung <i>Y. pestis</i> .....	62
Tabelle 23 Ergebnis Verdünnungsreihe ddPCR Matrixvalidierung <i>F. tularensis</i> .....	63
Tabelle 24 Nachweisgrenzen der getesteten HHTKs.....	65
Tabelle 25 Negativkontrollen HHTKs Plague.....	68
Tabelle 26 Negativkontrollen HHTKs Tularemia.....	68
Tabelle 27 Negativkontrollen HHTKs Anthrax.....	68
Tabelle 28 Nachweisgrenzen Eistee.....	70
Tabelle 29 Nachweisgrenzen Joghurt-Salatsoße.....	71
Tabelle 30 Nachweisgrenzen Milch.....	72
Tabelle 31 Nachweisgrenzen Bentonit.....	73
Tabelle 32 Nachweisgrenzen Heroin.....	74
Tabelle 33 Metaanalyse Nachweisgrenzen.....	81
Tabelle 34 Zusammenfassung der Vor- und Nachteile von LFA.....	96

## 1. Einleitung

### 1.1. Geschichte des Einsatzes biologischer Agenzien in Konfliktsituationen

Der Einsatz von Krankheitserregern in Kriegshandlungen und Konflikten ist keine Erfindung der Neuzeit. Erste Hinweise auf den Einsatz von biologischen Agenzien gehen bis ins 14. Jahrhundert v. Chr. zurück, wo die Hethiter angeblich an Tularämie erkrankte Schafböcke gegen ihre Gegner eingesetzt haben sollen (Trevisanato, 2007). Im Jahr 1346 sollen die Mongolen Leichen von an Pest verstorbenen Menschen über die Stadtmauern von Kaffa katapultiert haben (Derbes, 1966). Die folgende Flucht der Genueser aus der Stadt zurück nach Italien wird als relevante Ausbreitung der Pest bis nach Europa diskutiert (Derbes, 1966; Wheelis, 2002). Diese und noch viele weitere Beispiele in der Geschichte der Menschheit belegen, dass die Idee der Verbreitung von Krankheiten als Mittel der Kriegsführung Jahrtausende zurückgeht und begann noch bevor der Auslöser solcher Infektionen bekannt war.

Mit der Entwicklung der modernen Mikrobiologie durch Robert Koch und Louis Pasteur und der Aufstellung der Koch'schen Postulate Ende des 19. Jahrhunderts brach eine neue Ära in der Erforschung von Infektionskrankheiten an. Dieser Durchbruch ermöglichte es Mikrobiologen, zum einen die Verbreitung von Krankheitserregern einzudämmen, zum anderen jedoch auch Bakterien gezielt zu isolieren, gegebenenfalls zu vermehren und genauer zu untersuchen.

So gibt es beispielsweise Belege, dass sich das deutsche Reich im Ersten Weltkrieg diese gezielte Isolierung zunutze machte und geheime Biowaffen-Programme vorantrieb, um die Bakterien *Bacillus anthracis* und *Burkholderia mallei* bewusst einzusetzen, um gegnerische Tiere außer Gefecht zu setzen (Robertson & Robertson, 1995).

Trotz des Inkrafttretens der Genfer Konventionen „zum Verbot der Verwendung von erstickenden, giftigen oder anderen Gasen sowie von bakteriologischen Mitteln im Kriege“ im Jahre 1925 wurde auch nach dem Ersten Weltkrieg die Forschung an biologischen Waffen von vielen Nationen vorangetrieben (Frischknecht, 2003). Sowohl Großbritannien als auch die USA fürchteten den Einsatz biologischer Waffen durch das Hitler-Regime und forschten somit selbst an potenziellen Erregern und deren Einsatzmöglichkeiten (Geissler & van Courtland Moon, 1999). Gruinard Island, eine Insel vor der Küste Schottlands, wurde bei dem Versuch, waffenfähige Anthrax-Sporen



zu testen, für mehrere Jahrzehnte kontaminiert und unbewohnbar gemacht (Manchee et al., 1981).

Das umfangreichste geheime Biowaffen-Programm wurde durch die japanische Regierung 1930 unter der Führung des japanischen Forschers Shiro Ishii in Auftrag gegeben. Während der folgenden Jahre wurden zahlreiche Erreger, darunter *Y. pestis*, *B. anthracis*, *F. tularensis*, *C. botulinum* und Pockenviren sowohl an Gefangenen erprobt als auch gegen chinesische Soldaten und die zivile Bevölkerung auf verschiedenen Wegen eingesetzt (Harris, 1992). Beispielsweise setzte diese Militärforschungseinheit („Einheit 731“) Pest-infizierte Flöhe gegen chinesische Truppen und die Bevölkerung ein (Proctor, 1996) oder verunreinigte Brunnen mit *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhi* (Barras & Greub, 2014; Frischknecht, 2003). Nach dem Ende des Zweiten Weltkrieges rückten mit Beginn des kalten Krieges abermals Erreger, welche potenziell als B-Kampfstoffe verwendet werden könnten, in den Fokus der Forschung - sowohl in den Vereinigten Staaten von Amerika (Hay, 1999) als auch in der ehemaligen Sowjetunion (Alibeck, 1999). Im Jahre 1979 kam es zu einer versehentlichen Freisetzung des Milzbranderreger aus einer Militärforschungseinrichtung in Sverdlovsk. In der Folge erkrankten mindestens 77 Personen an Milzbrand, von denen 66 starben (Meselson et al., 1994).

1975 trat das „Übereinkommen über das Verbot der Entwicklung, Herstellung und Lagerung bakteriologischer (biologischer) Waffen und von Toxinwaffen sowie über die Vernichtung solcher Waffen“ (BWÜ) in Kraft. Bis heute haben 182 Nationen unterzeichnet, darunter alle EU- und NATO-Mitglieder (Auswärtiges Amt).

Doch nicht nur Staaten haben in der Vergangenheit biologische Agenzien zur Bekämpfung oder Schwächung feindlicher Mächte eingesetzt bzw. den Einsatz erwogen. Auch radikale Gruppierungen oder Einzelpersonen haben durch den gezielten Einsatz von Krankheitserregern versucht, ihre politischen oder religiösen Ziele durchzusetzen und in der Bevölkerung Verunsicherung und Angst zu bewirken. Ein Beispiel hierfür ist die radikale Sekte Shree Rajneesh, die im Jahr 1984 in Oregon, USA mehrere Salatbuffets mit *Salmonella typhimurium* kontaminierte, um die Bevölkerung von den bevorstehenden Kommunalwahlen abzuhalten und das Ergebnis so für sich zu beeinflussen (Torok et al., 1997).

Eine andere Gruppierung, die Aum Shinrikyo Sekte, erlangte durch ihre kriminellen Aktionen in Japan in den Jahren um 1995 Aufmerksamkeit. Zum einen brachten sie den Nervenkampfstoff Sarin im U-Bahnsystem von Tokio aus, töteten so 12 Menschen und verursachten mindestens 3800 Verletzte. Zum anderen experimentierte die Sekte an Erregern und Toxinen wie Botulinumtoxin, *Bacillus anthracis* und *Coxiella burnetii*. Zwischen den Jahren 1990 und 1995 wurden zu mehreren Gelegenheiten Botulinumtoxin und Anthrax-Sporen mittels Aerosols ausgebracht. Der Einsatz beider Agenzien blieb aber folgenlos und verursachte weder Erkrankungen noch Todesfälle. (Olson, 1999)

Im Jahr 2001 wurden mehrere Briefe an Nachrichtenagenturen und Politiker gesendet, die Anthrax-Sporen beinhalteten. In Folge dessen kam es zu 22 Fällen von Milzbrand, darunter 11 Fälle von inhalativem und 11 von Haut-Milzbrand. Fünf Menschen starben an den Folgen der Erkrankung (Jernigan et al., 2002). Neben den teils fatalen Folgen für die Betroffenen hat dieser Angriff Panik und Verunsicherung innerhalb der Bevölkerung verursacht. Die sozioökonomischen Folgen dieses Vorfalls waren enorm und die Kosten für diagnostische Tests, Dekontaminationsmaßnahmen, Therapie und Postexpositiosprophylaxe betrugen Milliarden von Dollar (Cole, 2009; Heyman et al., 2002).

Diese Anthrax-Anschläge in den USA haben unterstrichen, dass der Einsatz von biologischen Kampfstoffen durch Einzelpersonen oder Gruppierungen durchaus möglich ist, Todes- und Erkrankungsfälle hervorrufen kann und weitreichende Konsequenzen hat.

## 1.2. Medizinische B-Aufklärung

Allgemein werden Erreger, die potenziell als biologische Kampfstoffe missbraucht werden können, von dem „Center for Disease Control and Prevention“ (CDC) in drei Kategorien (A, B, und C) eingeteilt.

Kategorie A-Erreger sind Agenzien, welche insbesondere aufgrund folgender Charakteristika als Bedrohung gelten: Sie können sich leicht verbreiten, sind von Mensch zu Mensch übertragbar, verursachen eine hohe Sterblichkeitsrate, haben erhebliche Auswirkung auf die öffentliche Gesundheit und können innerhalb der

Bevölkerung zu Panik und Verunsicherung führen. Sie haben somit im Kontext der Ausbringung als biologisches Agens die höchste Priorität.

Kategorie B-Erreger sind biologische Substanzen, die relativ leicht zu verbreiten sind, moderate Krankheitsbilder hervorrufen und niedrige Letalitätsraten aufweisen.

Die dritte Kategorie C mit der dritthöchsten Priorität sind Erreger, welche in der Zukunft zur Massenausbringung hergestellt werden könnten und aufgrund ihrer Verfügbarkeit und der potenziell hohen Mortalitätsrate eine Bedrohung darstellen. Beispiele hierfür sind Nipah- und Hantavirus (CDC, 2018).

Genauere Informationen zu Erregern der Klasse A, B und C und die dadurch verursachten Krankheiten können Tabelle 1 entnommen werden. Erreger, mit denen im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde, sind in Fett markiert.

Drei der Kategorie A-Erreger – *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* und *Francisella tularensis* – sind aufgrund ihrer Eigenschaften wie beispielsweise ihrer ausgeprägten Virulenz, der ausgelösten fulminanten Krankheitsbilder, dem natürlichen Vorkommen in der Umwelt in vielen Teilen der Welt und der relativ leichten Anzucht und Ausbringung besonders relevant für den medizinischen B-Schutz.

Im Falle eines ungeklärten Krankheitsausbruches und eines möglicherweise willentlichen Einsatzes eines biologischen Gefahrenstoffes ist es von fundamentaler Bedeutung, möglichst schnell eine Arbeitsdiagnose zu erhalten.

Da der Nachweis eines hochpathogenen Erregers oder eines Toxins auf operationaler, taktischer und strategischer Ebene weitreichende Konsequenzen hätte, hat die NATO zur sicheren Identifikation ein einheitliches Vorgehen für alle Mitgliedsstaaten festgelegt.

Hierfür bedarf es drei Identifizierungsstufen: die vorläufige, die bestätigte sowie die zweifelsfreie Identifizierung.

Für eine vorläufige Identifizierung ist die Erfüllung von einem der drei folgenden Kriterien notwendig: eine spezifische Antigenstruktur wird mittels eines immunologischen Tests detektiert, eine typische Nukleinsäuresequenz wird mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) nachgewiesen oder der Erreger wird mittels kultureller Anzucht angezogen.

Zur bestätigten Identifizierung bedarf es der Erfüllung von zwei der drei oben genannten Kriterien. Zusätzlich sind die Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen notwendig.

Die zweifelsfreie Identifizierung fordert eine Bestätigung aller drei Kriterien und zusätzlich eine im Tierversuch bestätigte Pathogenität des Erregers bzw. des Toxins.

Tabelle 1 Beispiele für Agenzien der Kategorien A, B, und C und deren Krankheitsbilder.

	<b>Erreger</b>	<b>Erkrankung</b>
<b>Kategorie A</b>	<b><i>Bacillus anthracis</i></b>	Anthrax
	<i>Clostridium botulinum</i> Toxin	Botulismus
	<b><i>Yersinia pestis</i></b>	Pest
	Variola major	Pocken
	<b><i>Francisella tularensis</i></b>	Tularämie
	Filoviren (Ebola, Marburg)	Virale hämorrhagische Fieber
	Arenaviren (Lassa, Machupo)	Virale hämorrhagische Fieber

<b>Kategorie B</b>	<i>Brucella</i> spp.	Brucellose
	<i>Burkholderia mallei</i>	Rotz
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidose
	<i>Coxiella burnettii</i>	Q-Fieber
	Staphylococcus Enterotoxin B	Lebensmittelvergiftung
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Fleckfieber

<b>Kategorie C</b>	Nipah Virus	Enzephalitis
	Hanta Virus	Hämorrhagisches Fieber mit Renalem Syndrom
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberkulose

In allen Stufen bis auf die vorläufige Identifizierung ist der Nachweis eines biologischen Agens sowohl mit aufwendigen Nachweisverfahren als auch mit dem Einsatz von ausgebildeten und fachspezifischen Arbeitskräften verbunden. Bei den genannten Identifizierungsverfahren wie PCR, kultureller Anzucht oder immunologischer Tests

wie ELISA handelt es sich um sehr spezifische und sensitive Verfahren und somit um die jeweiligen Goldstandard-Methoden. Allerdings sind diese Nachweismethoden an ein mobiles bzw. stationäres Labor gebunden und bedürfen bis zur Erlangung eines Ergebnisses teilweise mehrerer Stunden (PCR, ELISA) bis Tage (kulturelle Anzucht).

Sogenannte Lateral Flow Immunoassays bzw. Hand Held Test Kits (HHTKs) dienen Einsatzkräften vor Ort, beispielsweise eines Fundortes einer vermuteten Ausbringung eines biologischen Gefahrenstoffes, aber auch für die Arbeit in diagnostischen Laboratorien (stationär oder schnell verlegbar) als unmittelbares diagnostisches Werkzeug für den Erhalt einer vorläufigen Arbeitsdiagnose innerhalb kürzester Zeit. Hierbei handelt es sich um eine immunochromatographische Nachweismethode von Viren, Bakterien und Toxinen, welche in weniger als 15 Minuten die Anwesenheit eines biologischen Agens anzeigen kann. Diese Tests basieren auf einer Interaktion zwischen dem nachzuweisenden Antigen und spezifischen Antikörpern. Zahlreiche Hersteller, wie zum Beispiel Tetracore, Miprolab, New Horizons Diagnostics, bieten Lateral Flow Immunoassays zum Nachweis potenzieller B-Agenzien an. Aufgrund der einfachen Handhabung sind diese Schnelltests bei First-Respondern und diagnostischen Einrichtungen weltweit verbreitet.

Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass deren jeweilige Nachweisgrenzen nicht ausreichend erforscht und belegt sind. Zudem sind die Auswirkungen verschiedener relevanter Matrizes auf die Nachweisgrenze und auf den korrekten Ablauf der Tests bisher nicht ermittelt worden. Insbesondere Daten über die Nachweisgrenzen von Lateral Flow Immunoassays zur Detektion von *F. tularensis* und *Y. pestis* sind nur spärlich verfügbar. Eine Studie (Zasada et al. 2015) untersuchte die Nachweisgrenzen dieser Erreger zwar zum Teil, doch sollten diesbezüglich einige Faktoren kritisch betrachtet werden. So wurden beispielsweise die Bakterienkulturen vor der Untersuchung der Lateral Flow Immunoassays bei Zasada et al. für mindestens 22 Stunden bei 60°C inaktiviert. Die Sporen von *B. anthracis* wurden mit 1%iger Peressigsäure für 30 Minuten behandelt. Diese Methoden der Inaktivierung könnten Einfluss auf die Nachweisgrenzen haben, da eventuell die für die Antigen-Detektion relevanten Oberflächenstrukturen bei den Zielorganismen zerstört bzw. derart modifiziert werden, dass sie nicht mehr oder nur vermindert nachweisbar sind. Da im Falle eines realen Bedrohungsszenars lebende Erreger ausgebracht würden, spiegeln

Untersuchungen mit inaktiviertem Keimmateriel nicht die Realität wider. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung die Evaluation der eingesetzten Schnelltests mit nicht-inaktivierten Erregern durchzuführen.

Die Nachweisgrenzen der Schnelltests zur Detektion von *B. anthracis* Sporen sind insgesamt besser untersucht (vgl. z.B. (Bartholomew et al., 2017; King et al., 2003; Ramage et al., 2016; Zasada et al., 2015)). Doch auch hier zeigen sich innerhalb und zwischen den Studien Diskrepanzen. Vergleicht man zum Beispiel die Daten von Zasada et. al (Zasada et al., 2015) und King et al. (King et al., 2003), so fällt auf, dass bei der Untersuchung des Tests BADD (Advnt) bei King et al. die Nachweisgrenze bei  $10^5$  Sporen/ ml lag, bei Zasada et al. bei dem gleichen Test selbst eine Sporenkonzentration von  $10^8$ / ml kein positives Testergebnis erzielen konnte. Auch bei den anderen getesteten Kits BTA (Tetracore) und SMART II (New Horizons Diagnostics) zeigen sich solche Widersprüchlichkeiten. Eine Testung von nicht-inaktivierten BSL-3 *B. anthracis* Sporen wurde bislang nicht durchgeführt. Diese Faktoren verdeutlichen die Notwendigkeit einer systematischen vergleichenden Evaluation von LFIA mit virulenten, lebenden BSL-3 Stämmen der Bakterien *Y. pestis*, *F. tularensis* und *B. anthracis* Sporen.

In dieser Arbeit werden HHTKs von vier verschiedenen Herstellern (Advnt, Miprolab, Tetracore, New Horizons Diagnostics) für den Nachweis der Bakterien *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* und *Bacillus anthracis* Sporen auf ihre Nachweisgrenze und die Auswirkung von verschiedenen relevanten Matrices auf die Nachweisgrenzen sowie die Lauffähigkeit untersucht und miteinander verglichen. Hierfür wurden lebende BSL-3 Stämme der Bakterien verwendet. Als geeignete Matrices wurden für die Erreger *Y. pestis* und *F. tularensis* Eistee, Milch und Joghurt-Salatsoße, für *B. anthracis* Sporen Bentonit und Heroin benutzt.

### 1.3. *Y. pestis* und Pest

#### 1.3.1. Epidemiologie des Erregers

Das Bakterium *Yersinia pestis* gehört zum Genus *Yersinia* in der Gruppe der *Enterobacteriaceae*. Es ist ein kleines (1–2 µm × 0,5 µm), gramnegatives, unbewegliches und unbegeißeltes Stäbchen der Risikogruppe 3 nach BioStoffV und TRBA 466. Es ist fakultativ anaerob und nicht-sporenbildend (Rakin, 2003). Das natürliche Reservoir des Erregers sind Nagetierpopulationen (Präriehunde, Ratten, Hasen etc.) weltweit (Perry & Fetherston, 1997). Das Bakterium ist in vielen Ländern Afrikas, Amerikas und Asiens endemisch und wird über den Biss infizierter Flöhe, direkten Kontakt mit infiziertem Material und Körperflüssigkeiten oder über die Inhalation von erregerhaltigem Aerosol auf den Menschen übertragen (Inglesby et al., 2000). Auch eine Infektion über den Verzehr von infiziertem Fleisch bzw. Nahrungsmitteln ist möglich (Saeed et al., 2005).

#### 1.3.2. Pest in der Geschichte

Das Bakterium *Y. pestis* wird für drei große Pestpandemien verantwortlich gemacht: die justinianische Pest (531-580 n.Chr.), die Pest des 14. Jahrhunderts (der „Schwarze Tod“) und die dritte Pandemie (ab 1855).

Die justinianische Pest nahm ihren Ursprung in Konstantinopel und breitete sich bis nach Ägypten aus. Von dort gelang die Pest nach Europa. Damals kam es in Nordafrika, Europa und Zentral- und Südasien zu einem Populationsrückgang von 50 bis 60 % (Perry & Fetherston, 1997).

Die zweite Pestpandemie, auch bekannt als der „Schwarze Tod“, begann 1334 in China und breitete sich dann nach Westen, entlang der Handelsrouten aus. Diese Pandemie dauerte über 130 Jahre an und forderte allein in Europa 20-30 Millionen Menschenleben, etwa ein Drittel der gesamten Population (Slack, 1989).

Der dritte Ausbruch begann 1855 in China und breitete sich auf fast allen Kontinenten, mit Ausnahme von Australien, aus. In den frühen Jahren der dritten Pestpandemie kamen allein in Indien und China über 12 Millionen Menschen zu Tode (Perry & Fetherston, 1997). Als die Pandemie im Jahr 1894 Hong Kong erreichte, wurde Alexandre Yersin (1863-1943) von dem Französischen Kolonialminister damit beauftragt, den Krankheitsausbruch zu untersuchen und den Auslöser zu finden

(Yersin, 1894) . Zur selben Zeit wurde von Japan ein Forscherteam unter der Leitung von Shibasaburo Kitasato (1856–1931) mit der gleichen Mission beauftragt (Kitasato, 1894). Dies führte 1894 zur Entdeckung und Isolierung des Erregers *Yersinia* (früher *Pasteurella*) *pestis* aus Proben von toten Ratten und Menschen (Kitasato, 1894; Yersin, 1894).

Bis zum heutigen Tage kommt es regelmäßig zu Ausbrüchen von Infektionen mit *Y. pestis* weltweit. Beispielsweise wurden vom 1. August bis zum 22. November 2017 in Madagaskar insgesamt 2348 Erkrankungs- und 202 Todesfälle (CFR 8,6%) durch *Y. pestis* an die WHO gemeldet (WHO, 2017).

### 1.3.3. Formen und Krankheitsbilder der Pest

Je nach Infektionsweg tritt die Krankheit „Pest“ in unterschiedlichen klinischen Bildern und Ausprägungsformen zu Tage. Dabei werden grundsätzlich vier Formen unterschieden: die Beulenpest, die Pestseptikämie, die Pestpneumonie sowie die oropharyngeale Pest.

Die Beulenpest (regionale Lymphadenitis) ist die Form, welche am häufigsten unter natürlichen Umständen erworben wird. Sie entsteht in Folge des Bisses eines infizierten Flohs oder durch direkten Kontakt von offenen Hautstellen mit erregerrhaltigem Material. In beiden Fällen werden die Bakterien entlang der Lymphbahnen bis zu den nächstgelegenen Lymphknoten transportiert, welche infolge der Entzündungsreaktion schmerzhaft anschwellen (Bubonen). Es können prinzipiell alle Lymphknotenregionen betroffen sein. Nach einer Inkubationszeit von 2-8 Tagen können zusätzliche Symptome wie Cephalgien, Myalgien, Nausea, Emesis, Fieber, neurologische Störungen und ein allgemeines Krankheitsgefühl auftreten (Lindeke, 2018; WHO, 1999). Ausgehend von dem bzw. den betroffenen Lymphknoten kann eine Ausbreitung des Erregers in den Blutkreislauf erfolgen - es entsteht eine Bakteriämie. In 80% der Fälle kann diese anhand positiver Blutkulturen nachgewiesen werden (Conrad et al., 1968). Trotzdem entwickeln nur ¼ aller Patienten mit Beulenpest unbehandelt eine Sepsis (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, 2014). Bei adäquater und rechtzeitiger Antibiotikatherapie liegt die Letalität der Beulenpest bei 5-15%. Bei Ausbleiben einer solchen führt die Beulenpest in 50-60% innerhalb von 3-6 Tagen zum Tode (Friesecke et al., 2007). Die Todesursachen sind dann meist Herz-Kreislauf- und pulmonales Versagen.



Eine weitaus höhere Letalität von 100% hat die unbehandelte Pestseptikämie (Legters et al., 1970). Diese kann primär ohne erkennbaren Infektfokus oder sekundär infolge der Beulenpest oder der Lungenpest auftreten. Es ist eine schnell fortschreitende, fulminante Sepsis. Das Vorhandensein der gramnegativen Bakterien und deren Endotoxin im Blutkreislauf löst eine Immunkaskade aus, welche im septischen Schock enden kann (Albizo & Surgalla, 1970). Hinzu kommen Hämorrhagien, multiples Organversagen (MOV), disseminierte intravasale Gerinnung (DIC, disseminated intravascular coagulation) und ARDS (acute respiratory distress Syndrome) (Inglesby et al., 2000). Die disseminierte intravasale Gerinnung kann zu arteriellen Verschlüssen (akrale Nekrosen) und Hämorrhagien in Haut, Schleimhaut und Organen führen. Dabei treten charakteristische schwarz-bläuliche Einblutungen auf der Haut zu Tage (Rakin, 2003). Selbst bei unmittelbar verabreichter antibiotischer Therapie beträgt die Letalität noch 30-50% (Friesecke et al., 2007). Mögliche Komplikationen einer primären oder sekundären Pestseptikämie können die Streuung der Bakterien in verschiedene Organe sein. Dies kann zur sekundären Lungenpest oder zu Abszessen in Leber und Milz führen (Riedel, 2005).

Die dritte Form der Pest, die Pestpneumonie, wird entweder durch hämatogene Streuung bei Beulenpest und Pestseptikämie oder primär durch die Inhalation erregerehaltigem Aerosol (primäre Pestpneumonie) verursacht (Rakin, 2003). Sie ist die fulminanteste Form der Pest. Sie beginnt mit dem plötzlichen Auftreten eines ausgeprägten allgemeinen Krankheitsgefühls mit Schüttelfrost, Fieber und Myalgien. Außerdem kommt es im Verlauf der Erkrankung zu Husten, Hämoptysen und Dyspnoe (Friesecke et al., 2007). Das zunächst viskös abgehustete Sekret wird im weiteren Verlauf der Infektion dünnflüssig und hellrot blutig tingiert (Rakin, 2003). Hierbei kann es zur Verbreitung feiner Tröpfchen in die Umgebung und somit zur Dissemination des Erregers kommen.

Die Pestpneumonie führt bei ausbleibender antibiotischer Therapie in 90-95% (Legters et al., 1970) bzw. 100% (Friesecke et al., 2007) zum Tode. Eine zunächst auf ein Segment begrenzte Pneumonie kann zu einer Lobärpneumonie fortschreiten und letztendlich zu einem bilateralen Lungenbefall führen. Komplizierend hinzukommen können beispielsweise lokalisierte Nekrosen und Kavernenbildung innerhalb der Lunge sowie Pleuraergüsse. Außerdem kann es zu einem ARDS kommen (Alsofrom, 1981; Florman et al., 1986).

Die oropharyngeale Form der Pest (Pharyngitis) resultiert aus dem Befall des Oropharynx mit dem Pesterreger. Insbesondere die Inhalation erregerehaltiger Tröpfchen ist hierbei ursächlich für dieses Krankheitsbild (LaForce et al., 1971). Neben den Infektionsrouten via Aerosol und über Vektoren kann eine Infektion auch über den Verzehr nicht ausreichend erhitzter Speisen und Getränke oder über die Verarbeitung infizierten Fleisches erfolgen (Gabastou et al., 2000; Saeed et al., 2005; von Reyn et al., 1976). Die vorsätzliche Ausbringung von *Salmonella typhimurium* durch eine religiös-extremistische Gruppe auf Salatbuffets in den USA hat gezeigt, wie anfällig Nahrungsmittel für Anschläge sind (Torok et al., 1997). Durchaus ist die Ausbringung auf eine ähnliche Art und Weise mit anderen, tödlicheren Erregern wie *Yersinia pestis* denkbar und muss in Erwägung gezogen werden. Diese Bedenken werden zusätzlich durch die Entdeckung antibiotika-resistenter Stämme von *Yersinia pestis* und die plasmidbasierte Übertragung von Resistenzen verschärft (Galimand et al., 1997). Das daraus resultierende, als oropharyngeale Pest bezeichnete Krankheitsbild, präsentiert sich ähnlich der viralen oder durch Streptokokken verursachten Pharyngitis. Die zervikale Lymphadenopathie ist dann allerdings stärker ausgeprägt und schmerzhafter (WHO, 1999).

#### 1.3.4. Einsatz von *Y. pestis* als biologisches Agens

Aufgrund verschiedener Faktoren wird *Y. pestis* von der CDC als Kategorie A Erreger eingestuft. Insbesondere durch seine weltweite Verfügbarkeit (endozootisch in Wildnager-Populationen), die Möglichkeit der Massenproduktion, die mögliche Verbreitung über Aerosol, die hohe Virulenz des Bakteriums (1-10 Bakterien reichen für die Infektion von Nagetieren aus) die hohe Sterblichkeitsrate der Lungenpest und die Übertragung von Mensch zu Mensch im Falle eines bioterroristischen Anschlags, machen den Erreger so gefährlich (Inglesby et al., 2000). Des Weiteren existiert bis heute weder ein wirksamer Impfstoff gegen Lungenpest, noch gibt es in der Bevölkerung eine natürliche Immunität gegen diesen Erreger. Das bedeutet, eine Reinfektion wäre jederzeit möglich (Rakin, 2003).

1970 veröffentlichte die WHO einen Bericht zum Thema Gesundheitsaspekte von chemischen und biologischen Waffen. Dort wird erläutert, dass es im Falle einer Ausbringung von 50 kg *Yersinia pestis* in Form eines Aerosols über einer Stadt mit 5 Millionen Einwohnern zu etwa 150.000 Fällen von Lungenpest mit 36.000 Todesfällen

kommen würde. Das nach Ausbringung etwa über eine Stunde lebensfähige Bakterium könnte als Aerosol etwa 10 km weit verbreitet werden. Bei dem Versuch der Bevölkerung zu fliehen, könnte es zu einer noch weiteren Verbreitung des Erregers kommen (WHO, 1970).

Die Pathogenität des Erregers beruht sowohl auf chromosomal als auch auf plasmid-kodierten Virulenzfaktoren. Als Virulenz im Allgemeinen wird die Infektionskraft bzw. der Ausprägungsgrad der pathogenen Potenz eines Erregers bezeichnet. Zur Virulenz tragen verschiedene Virulenzfaktoren (z.B. Toxine) bei.

Die Vollgenomsequenzierung von *Y. pestis* und deren nahen Verwandten (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) hat gezeigt, dass alle drei Bakterien ein 75-kb-großes Virulenzplasmid besitzen, welches für ein Typ III-Sekretionssystem kodiert (TTSS) (Parkhill et al., 2001). Dieses TTSS sondert mehrere antiphagozytäre und antiinflammatorische Toxine ab, um die extrazelluläre bakterielle Replikation in vivo zu fördern (Cornelis, 1998) und paralyisiert Makrophagen durch kontaktabhängige Injektion von Effektorproteinen (Hinnebusch, 2004).

Für *Y. pestis* spezifisch sind zwei weitere Plasmide: das 100 kb pMT1 und das 9,6 kb pPCP1 (Hinnebusch et al., 2002; Perry & Fetherston, 1997). Das Vorhandensein dieser beiden Plasmide verleiht dem Bakterium eine erhöhte Virulenz (pMT1, pPCP1) und ermöglicht die vektorbasierte Übertragung durch Flöhe (pMT1) (Hinnebusch et al., 2002; Perry & Fetherston, 1997).

Das erste der beiden Plasmide, pMT1, kodiert für ein Oberflächenprotein: das Fraktion-1-Kapsel-Antigen (F1). Dieses Glykoprotein wird bei Temperaturen über 33°C exprimiert und wirkt stark immunogen (Du et al., 2002). Es wird somit bei einer Infektion von Säugetieren (Körpertemperatur um die 37°C) gebildet und verhindert eine Phagozytose durch Makrophagen (Du et al., 2002). Darüber hinaus trägt das Plasmid pMT1 Gene für das sogenannte Yersinia-Murine-Toxin (Ymt), welche eine Phospholipase D (PLD) ist (Rudolph et al., 1999). Diese PLD soll *Y. pestis* durch die intrazelluläre Aktivität vor dem zytotoxischen Effekt von Blutplasma im Verdauungstrakt des Flohs schützen und ist somit für das Überleben des Bakteriums in dem Übertragungsvektor Floh bedeutsam (Hinnebusch, 2004; Hinnebusch et al., 2002). Damit *Y. pestis* vom Floh auf Ratten bzw. Menschen übertragen werden kann, vermehrt sich das Bakterium zunächst im Mitteldarm des Flohs und bildet dort

Aggregate. Die Bakterien verstopfen letztendlich den Proventriculus (Verbindung zwischen Speiseröhre und Mitteldarm) und blockieren die Blutaufnahme bei dem Versuch der Nahrungsaufnahme. Während der wiederholten Versuche der Blutaufnahme gelangen die Bakterien dann in die Bissstelle (Hinnebusch et al., 2002).

Das zweite 9,6-kb Plasmid pPCP1 kodiert für den Plasminogenaktivator (Pla), der bei 37°C Inkubationstemperatur fibrinolytische und bei 25°C Koagulase- Eigenschaften hat. Diese Protease ist für das Eindringen in die Haut und die Verbreitung innerhalb des Körpers bei einer Infektion durch Flohstiche wichtig (Sodeinde et al., 1992).

Es gibt allerdings Experimente, die nachgewiesen haben, dass auch pPCP- und pMT1- negative Stämme hochvirulent sein können und insbesondere via Aerosol mit der gleichen Effektivität wie der Wildtyp im Tierversuch Lungenpest verursachen können (Davis et al., 1996; Worsham & Roy, 2004).

#### 1.3.5. Therapie

Aufgrund der oben beschriebenen teilweise fulminanten Verläufe der Pest ist es von größter Bedeutung, schon beim klinischen Verdacht auf eine Infektion mit *Y. pestis* die antibiotische Therapie unverzüglich, am besten innerhalb der ersten 18 Stunden, einzuleiten (Perry & Fetherston, 1997). Wirksam gegen *Y. pestis* sind Aminoglykoside, Flourchinolone, Cotrimoxazol und Doxycyclin. Bei der Pestmeningoenzephalitis kann auf das sehr gut liquorgängige Antibiotikum Chloramphenicol zurückgegriffen werden. Penicilline und andere Beta-Lactam-Antibiotika sind wirkungslos (RKI, 2017). Da in der Vergangenheit bei Lungenpest-Ausbrüchen antibiotika-resistente Stämme isoliert wurden, ist es außerdem wichtig, ein Antibiogramm anzufertigen (Galimand et al., 1997). Patienten mit Lungen- oder Beulenpest sollten bis mindestens 2 Tage nach begonnener antibiotischer Therapie isoliert werden (Perry & Fetherston, 1997).

#### 1.4. *Francisella tularensis* und Tularämie

##### 1.4.1. Epidemiologie und Klassifikation des Erregers

*Francisella tularensis*, der Erreger der Tularämie, ist ein kleiner (0.2 µm x 0.2-0.7 µm) gramnegativer, pleomorpher Coccobacillus. Das Bakterium ist strikt aerob wachsend, von einer Kapsel umgeben, unbeweglich und fakultativ intrazellulär. Es ist zwar nicht in der Lage Sporen zu bilden, trotzdem ist es in der Umwelt sehr widerstandsfähig (Friesecke et al., 2007).

Zum ersten Mal wurde das Bakterium 1911 von G.W. McCoy in Tulare County, California, USA, aus Tieren isoliert, die an einer pestartigen Erkrankung gestorben waren (McCoy, 1912). Der zunächst als *Bacterium tularense* bezeichnete Erreger wurde zu Ehren von Edward Francis, ein Mikrobiologe, welcher die Forschung in diesem Bereich maßgeblich vorantrieb, in *Francisella tularensis* umbenannt (Dorofe'ev, 1947).

Es gehört den Gammaproteobakterien an und ist der Familie der Francisellaceae zugeordnet. Der Vergleich der 16S rRNA zeigt, dass *F. tularensis* nahe verwandt mit dem Zecken-Endosymbionten *Wolbachia persica* und nur fern verwandt mit den humanpathogenen Bakterien *Coxiella burnetii* und *Legionella* ist (Forsman et al., 1994).

Innerhalb des Genus *Francisella* lassen sich zwei Spezies unterscheiden: *tularensis* und *philomiragia* (Forsman et al., 1994; Hollis et al., 1989). Von *F. tularensis* existieren vier Subspezies: *tularensis* (Biovar Typ A), *holarctica* (Biovar Typ B), *novicida*, *mediasiatica* (Svensson et al., 2005). Von diesen vier sind lediglich zwei humanpathogen: *F. tularensis ssp. tularensis* (Typ A) und *F. tularensis ssp. holarctica* (Typ B). Ersterer ist ausschließlich in Nordamerika zu finden und kann molekulargenetisch nochmals in zwei Gruppen eingeteilt werden, Typ A 1 und Typ A 2 (Farlow et al., 2001). Die Beiden unterscheiden sich durch ihre geographische Verteilung und ihre Pathogenität: Typ A 1 ist hoch virulent und hauptsächlich in den zentral gelegenen Staaten wie Californien und Massachusetts, Typ A 2 in California und im Westen der Vereinigten Staaten von Amerika zu finden. Im Kontrast dazu ist *F. tularensis ssp. holarctica* in der gesamten nördlichen Hemisphäre (insb. Europa) endemisch (Oyston et al., 2004). In Skandinavien kommt es immer wieder zu Ausbrüchen mit mehreren hundert Fällen (Finnland 2016 699 bestätigte Fälle).

Infektionen mit dieser Subspezies werden oft mit der Aufnahme von erregerehaltigem Wasser aus Quellen, Seen und Flüssen in Verbindung gebracht. Die beiden Subspezies des Bakterium *F. tularensis holarctica* und *tularensis* werden aufgrund der unterschiedlichen Infektiosität nach der TRBA466 in die Risikogruppen 2 und 3 eingeteilt (Gemeinsames Ministerialblatt, 2015 ).

Tabelle 2 Virulenz und Verteilung von *Francisella*. Abgewandelt nach (Oyston, 2008)

<b>Francisella Spezies</b>	<b>Subspezies</b>	<b>Virulenz</b>	<b>Verteilung</b>
<i>F. philomiragia</i>		niedrig	Nördliche Hemisphäre
<i>F. tularensis</i>	- <i>tularensis</i> A 1	sehr hoch	Zentral und Ost-USA
	- <i>tularensis</i> A 2	moderat (niedriger als ssp. <i>holarctica</i> )	West-USA
	- <i>holarctica</i>	hoch	Nördliche Hemisphäre
	- <i>mediasiatica</i>	hoch	Zentralasien
	- <i>novicida</i>	niedrig	Global

Das natürliche Erregerreservoir von *Francisella tularensis* kann bis heute nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Der Erreger hat ein extrem breites Wirkspektrum und ist in der Lage, über 200 Tierarten zu infizieren. Unter anderem können Kleinsäuger und Nager wie Mäuse, Hasen, Kaninchen, aber auch Füchse, Bären, Kojoten, Huftiere, Fische, Amphibien und Vögel betroffen sein (Berdal et al., 1996; Tarnvik et al., 1996).

*Francisella tularensis* kann in der Umwelt für mehrere Wochen in kalter, feuchter Umgebung, wie z.B. Wasser, Erde, Heu, Stroh oder Tierkadavern, überleben (Francis, 1928; Hopla, 1974). Vor allem die geringe Infektionsdosis macht den Erreger so gefährlich: lediglich wenige Bakterien (10-50) reichen aus, um intrakutan oder inhalativ eine Infektion zu verursachen. Bei einer oralen Ingestion sind  $10^8$  Erreger notwendig (Friesecke et al., 2007).

Eine Übertragung auf den Menschen ist auf verschiedene Arten möglich: Über die Aufnahme von erregerehaltigen Nahrungsmitteln oder Wasser (Evans et al., 1985), über den Umgang mit infizierten Wild- oder Haustieren/ Tierkadavern (Young et al., 1969),

über Stiche von Arthropoden wie Zecken (Warring & Ruffin, 1946), Mücken oder Bremsen (Klock et al., 1973), über die Einatmung erregerhaltigen Aerosols und Staubs (Dahlstrand et al., 1971; Teutsch et al., 1979). Arthropoden dienen nur als vorübergehende Wirte, können aber während ihres gesamten Lebenszyklus das Bakterium übertragen und somit mehrere Infektionen verursachen (Hopla, 1955; Petrov, 1960). Neben Jägern, Farmern und Metzgern sind auch Laborarbeiter eine besondere Risikogruppe (Lake & Francis, 1922; Pike, 1976). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht dokumentiert, sollte aber aufgrund der geringen Infektionsdosis und der Anwesenheit des Erregers in Körperflüssigkeiten und in Ulzerationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

#### 1.4.2. Einsatz von *F. tularensis* als biologisches Agens

Eingestuft von CDC als Klasse A Erreger, birgt *F. tularensis* die Gefahr, aufgrund der geringen Infektionsdosis, der diversen Möglichkeiten der Ausbringung (über Aerosol oder auch über die Nahrungsmittelkette) und der teilweise fulminant verlaufenden Krankheitsbilder als biologisches Agens, im Kontext Bioterrorismus/ Biokriminalität, eingesetzt zu werden. Die hohe infektiöse Potenz von *F. tularensis* wurde in der Vergangenheit durch mehrere (natürliche) wasserassoziierte Ausbrüche in Europa und der Sowjetunion (Karpoff & Antonoff, 1936), Laborvorfälle (Pike, 1976) und Tierseuchen in den USA (Jellison & Kohls, 1955) unterstrichen.

In einer 1969 veröffentlichten Stellungnahme eines Expertengremiums der WHO wird erläutert, was für Konsequenzen ein absichtliches Ausbringen von 50 kg von *F. tularensis* in Aerosolform über einer Stadt mit 5 Millionen Einwohnern hätte: 250.000 Erkrankungsfälle, darunter 19.000 Todesfälle (WHO, 1970). Auch die finanziellen Folgen wären verheerend: 5,4 Milliarden Dollar/ 100.000 exponierte Personen (Kaufmann et al., 1997).

Bereits in der Vergangenheit wurde der Erreger als potenzieller biologischer Kampfstoff angesehen. So erforschte zwischen 1932 und 1945 die japanische Forschergruppe „Einheit 731“ deren Einsatz im Kriegsgeschehen (Harris, 1992). Das Auftreten von Tularämie bei Tausenden von Soldaten während der Belagerung von Stalingrad war möglicherweise durch ein bewusstes Ausbringen des Erregers hervorgerufen. Dies konnte allerdings nie bestätigt werden. Es könnte auch sein, dass

sich die Soldaten auf natürlichem Wege durch die Vermehrung von infizierten Mäusen und Ratten angesteckt haben (Alibeck, 1999).

Auch nach Ende des Zweiten Weltkrieges war der Auslöser der Tularämie Gegenstand von Forschung der ehemaligen Sowjetunion und den USA. Beide Länder stellten zwischen 1950 und 1960 Waffen her, welche *F. tularensis* als Aerosol hätten freisetzen können (Alibeck, 1999; Franz et al., 1997). Ein bewusster Einsatz zur biologischen Kriegsführung ist allerdings nicht bekannt.

#### 1.4.3. Virulenzfaktoren

*F. tularensis* war und ist aufgrund des intrazellulären Lebenszyklus, der Fähigkeit des Befalls von multiplen Wirten, des ausgesprochen langen Überlebens in der Umwelt und des Mangels an klassischen bakteriellen Virulenzfaktoren wie Exotoxinen oder eines TTSS Gegenstand der Forschung (Celli & Zahrt, 2013).

Stattdessen scheint die aus Polysachariden bestehende Kapsel von *F. tularensis* eine wichtige Rolle bei der Infektion zu spielen. Strukturell ist sie identisch mit dem O-Antigen. Sie hilft dem Bakterium dabei, der Erkennung durch die Wirtszelle zu entgehen. Kapsellose Stämme von *F. tularensis* Typ A zeigten im Tierversuch eine abgeschwächte Virulenz bei intraperitonealer Infektion von Meerschweinchen und bei intraperitonealer oder intranasaler Infektion von Mäusen (Hood, 1977). Außerdem soll die Kapsel die Bindung von IgM-Antikörpern und Komplementfaktoren auf der Bakterienoberfläche verhindern (Rowe & Huntley, 2015).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor scheint das LPS zu sein. Grundsätzlich ist das LPS Bestandteil der äußeren Zellmembran bei gramnegativen Bakterien. Es besteht aus drei Komponenten: O-Antigen, Core-Polysachharid und Lipid-A. Im Falle von *Francisella tularensis* ist das Lipid-A im Gegensatz zum Prototyp Lipid-A von *Escherichia coli* etwas abgewandelt (Vinogradov et al., 2002). Diese Modifikationen im LPS ermöglichen es dem Bakterium, eine Aktivierung bzw. Bindung von LPS-erkennenden Strukturen wie TLR4 (Hajjar et al., 2006), LPS-bindendes Protein und MD-2 zu verhindern und so der Immunreaktion bzw. der B-Zell Proliferation zu entgehen (Ancuta et al., 1996; Hajjar et al., 2006).



Eine weitere wichtige Rolle im Pathomechanismus von *F. tularensis* spielen Typ IV Pili. Diese Typ IV Pili bilden dünne Fasern oder hornartige Vorsprünge auf der Oberfläche von *F. tularensis* (Hager et al., 2006). Zwar konnte gezeigt werden, dass sie bezüglich der Virulenz durchaus eine wichtige Rolle spielen (Forslund et al., 2006), doch bedarf es weiteren Untersuchungen, um die genaue Funktionsweise herauszufinden.

Auch schafft es das Bakterium innerhalb der Wirtszelle, die Fusion von Phagolysosomen zu blockieren und dem Abbau im Phagosom zu entgehen. Hierbei scheinen verschiedene sekretierte Proteine von Bedeutung zu sein (Rowe & Huntley, 2015). Doch auch hier mangelt es an verlässlichen Informationen.

Diese und viele weitere Faktoren tragen zur vollen Ausprägung der Virulenz von *Francisella tularensis* bei, wobei insgesamt das Verständnis des komplexen Zusammenspiels aller Faktoren und deren Interaktion mit der Zielzelle noch weiter erforscht werden muss.

#### 1.4.4. Formen und Krankheitsbilder der Tularämie

Abhängig von der Eintrittspforte, der Virulenz und der Erregerdosis kann sich eine Infektion in unterschiedlichen klinischen Formen und Ausprägungsgraden präsentieren. Infektionen mit *F. tularensis ssp. holarctica* bleiben aufgrund der unspezifischen Symptome teilweise unentdeckt. Die Inkubationszeit dauert in der Regel zwischen drei und fünf Tage und Patienten entwickeln grippeähnliche Symptome (Evans et al., 1985). Im Gegensatz dazu verlaufen Infektionen mit *F. tularensis ssp. tularensis* fulminanter. Je nach primärem Infektionsort sind sieben Formen zu unterscheiden: ulzeroglandulär, glandulär, okkulo-glandulär, oropharyngeal, typhoidal, primär septisch und pulmonal (Evans et al., 1985; Francis, 1928; Pullen & Stuart, 1945; Simpson, 1928). Allen Arten der Tularämie ist ein akuter Beginn und das Auftreten von Allgemeinsymptomen wie hohem Fieber, Schüttelfrost, Cephalgien und Myalgien gemeinsam. Insgesamt kann jede Form der Tularämie kompliziert verlaufen: die Bakterien können hämatogen streuen und so sekundäre Lungeninfektionen, Sepsis und in seltenen Fällen auch Meningitis verursachen (Cross, 2000; Stuart & Pullen, 1945).

Spezifische Symptome der verschiedenen Arten der Tularämie sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3 Klinische Formen, Infektionsrouten und Symptome der Tularämie

Form	Infektionsroute	Symptome
Ulzeroglandulär	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kontakt zu infizierten Kadavern</li> <li>- Insektenbiss</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schmerzlose Ulzeration an der Eintrittsstelle</li> <li>- Geschwollene, schmerzhafte regionale Lymphknoten, evtl. eitrig-einschmelzende Lymphknoten</li> </ul>
Glandulär	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kontakt zu infizierten Kadavern</li> <li>- Insektenbiss</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Geschwollene, schmerzhafte Lymphknoten ohne sichtbare Eintrittsstelle/ Ulzer</li> </ul>
Okkulglandulär	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Direkter Kontakt von <i>F.tularensis</i> mit dem Auge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Konjunktivitis (Schmerzen, Schwellung, Fremdkörpergefühl)</li> <li>- Periaurikuläre Ödem</li> <li>- Eitriger Ausfluss</li> <li>- Evtl. Ulzeration am Augenlid</li> </ul>
Oropharyngeal/ gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ingestion erregerrhaltigen Essens oder Trinken</li> <li>- Inhalation erregerrhaltiger Stäube oder Aerosol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tonsillitis, Ulzerationen, gelbliche Pseudomembranen</li> <li>- Leichte Erbrechen, Diarrhoe bis hin zur Ulzeration des Darms</li> <li>- Evtl. zervikale/ mesenteriale Lymphadenopathie</li> </ul>
Pulmonal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhalation erregerrhaltiger Stäube oder Aerosol</li> <li>- Sekundär nach hämatogener Streuung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Halsschmerzen</li> <li>- Hiläre Lymphknotenschwellung</li> <li>- Plötzlicher Beginn</li> <li>- Zeichen einer Bronchopneumonie mit Brustschmerzen, Husten, Dyspnoe, Tachypnoe</li> <li>- Fieber, Schüttelfrost, Myalgien, Cephalgie, Arthralgien</li> <li>- Seltener pleurale Beteiligung mit Pleuritis und Pleuraergüssen</li> </ul>
Typhoidal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nicht näher bekannt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Allgemeine Krankheitssymptome ohne sichtbare Eintrittspforte oder lokale Symptome</li> <li>- Oft gastrointestinale Symptome wie Diarrhoe und Bauchschmerzen</li> </ul>
Septisch	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meist sekundär</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fulminanter Verlauf, evtl. tödlicher Ausgang</li> <li>- Allgemeinsymptome wie Fieber, Schüttelfrost, etc.</li> <li>- Verwirrung, Koma</li> <li>- Ohne antibiotische Therapie septischer Schock, ARDS, MOV, DIC</li> </ul>

Unbehandelt können die Symptome einer Infektion mit *F. tularensis ssp. holarctica* über mehrere Wochen und Monate persistieren, enden aber selten tödlich. Eine schwere Infektion (insbesondere bei der pulmonalen und der ausgeprägten systemischen Infektion) mit *F. tularensis ssp. tularensis* verläuft unbehandelt in bis zu 60% der Fälle tödlich. Bei adäquater antibiotischer Therapie kann die Letalität allerdings auf < 2% gesenkt werden (Dennis et al., 2001; Evans et al., 1985; Friesecke et al., 2007).

#### 1.4.5. Therapie

Als antibiotische Therapie wurden in der Vergangenheit Substanzen wie Aminoglykoside oder Chloramphenicol verwendet. Heutzutage wird der Gebrauch aufgrund des breiten Nebenwirkungsspektrums eher vermieden (Oto- und Nephrotoxizität bei Streptomycin, Hämatoxizität von Chloramphenicol) (Titball et al., 2007). Eine wirksame Alternative ist z.B. der Einsatz von Flourchinolonen (Johansson et al., 2001; Tarnvik & Chu, 2007). Insbesondere Ciprofloxacin stellt aufgrund der guten Bioverfügbarkeit und seiner bakteriziden Wirkung ein Mittel erster Wahl dar. Besonders bei leichten Formen der Tularämie kann dieses Antibiotikum in Monotherapie auch oral gegeben werden. Bei schweren Verläufen kann eine Kombination von Ciprofloxacin und Gentamicin eingesetzt werden (Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für hochkontagiöse und lebensbedrohliche Erkrankungen am Robert Koch-Institut, 2016). Trotzdem sollte der Einsatz von Flourchinolonen sorgfältig abgewogen werden. In einem aktuellen „Rote Hand Brief“ wird vor schwerwiegenden, den Bewegungsapparat und das Nervensystem betreffenden Nebenwirkungen gewarnt (Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2019).

Bei einer Anwendung von Tetrazyklinen (bevorzugt Doxycyclin) und Chloramphenicol wird aufgrund der bakteriostatischen Wirkung eine höhere Rückfallrate beobachtet (Enderlin et al., 1994). Sie sollten also nur als zweite Wahl in Erwägung gezogen werden. Penicilline und andere Beta-Laktam-Antibiotika sind wirkungslos (Friesecke et al., 2007). Eine antimikrobielle Empfindlichkeitstestung sollte, wenn möglich, immer erfolgen.

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *Francisella tularensis* war in der Vergangenheit und ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung (Post et al.,

2017). Aktuell ist allerdings bis jetzt in Deutschland kein Impfstoff zugelassen. Es existiert ein attenuierter *F. tularensis ssp. holarctica* Lebendimpfstamm (Live vaccine Strain LVS), welcher in der ehemaligen Sowjetunion entwickelt und später an die USA abgegeben wurde (Tigertt, 1962).

## 1.5. *Bacillus anthracis* und Anthrax

### 1.5.1. Epidemiologie des Erregers

*B. anthracis* ist ein grampositives, unbewegliches, aerob wachsendes Stäbchen aus der Familie der *Bacillaceae*, das in der Lage ist, Endosporen zu bilden (Gould, 1977). Im Vergleich zu anderen Bakterien sind die vegetativen Zellen mit einer Größe von 1-8  $\mu\text{m}$  x 1-1,5  $\mu\text{m}$  relativ groß (Friesecke et al., 2007). Die Sporen haben eine Größe von ungefähr 1  $\mu\text{m}$  (Gould, 1977). Sporen sind die Dauerformen von *Bacillus anthracis*, die es dem Bakterium ermöglichen, auch unter widrigen Umständen (Mangel an Nährstoffen, Hitze, Kälte, Austrocknung, etc.) über längere Zeit in der Umwelt zu überleben (Titball et al., 1991). Jede vegetative Zelle kann lediglich eine Spore bilden. Es ist also keine Art der Vermehrung, vielmehr eine Art, unter schlechten Bedingungen zu überdauern. Die Sporen sind resistent gegen viele Einflüsse, wie gängige Desinfektionsmittel, Bestrahlung, UV-Licht, Hitze, Kälte, usw. (Gould, 1977). In der Natur ist die Sporulation und das Überleben über Jahrzehnte hinweg abhängig von vielen Faktoren (pH- Wert, Vorhandensein von Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  etc.) (Dragon & Rennie, 1995).

Die Sporen, welche auch die infektiöse Form des Bakteriums sind, können weltweit in Erdproben nachgewiesen werden und fatale Infektionen bei wilden und domestizierten Tieren insbesondere Herbivoren auslösen. Anthrax ist in den meisten Ländern Afrikas und Asiens, in weiten Teilen Nord-und Südamerikas sowie in vielen Ländern Süd-/Osteuropas endozoonotisch (Gasper, 2001).

### 1.5.2. Einsatz von *B. anthracis* als biologisches Agens

Die Beschaffenheiten von *B. anthracis* und seiner Sporen, insbesondere das weltweite Vorkommen, die relativ leichte Herstellung bzw. Anzucht, das lange Überleben in der Umwelt und das hohe Krankheitspotential, machen den Erreger zu einem der bedeutendsten Gefahren im Kontext des medizinischen B-Schutzes. Verschiedene

Einsätze und Unfälle in der Vergangenheit haben dieses Potenzial und die davon ausgehende Gefahr gezeigt.

### 1.5.3. Virulenzfaktoren

Eine Vielzahl von Faktoren tragen zur Pathogenität von *B. anthracis* bei. Zum einen sind die vegetativen Zellen im Wirtsorganismus von einer aus Poly- $\gamma$ -D-Glutaminsäure bestehenden, antiphagozytär wirkenden Kapsel umgeben (Turnbull et al., 1991). Zum anderen ist das Bakterium in der Lage, drei Proteinkomponenten zu bilden: Protektives Antigen (protective antigen, PA), Letal-Faktor (lethal factor, LF) und Ödem-Faktor (edema factor, EF). Diese drei lassen sich zu zwei Toxinen kombinieren: Letal-Toxin (PA + LF) und Ödem-Toxin (PA + EF). Das protektive Antigen bindet an den Anthrax-Toxin-Rezeptor und ermöglicht so das Überwinden der Zellwand und das Eindringen von Letal- und Ödem-Faktor in die Zielzelle (Mattix et al., 2006). Der Ödem-Faktor ist eine Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase, welche die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht. Es bringt die Homeostase aus dem Gleichgewicht, was letztlich in einer für Anthrax charakteristischen Ödembildung resultiert (Leppla, 1982). Zusätzlich wurde eine in-vitro-Hemmung von neutrophilen Granulozyten beschrieben (O'Brien et al., 1985).

Der Letal-Faktor ist eine Zink-Metalloprotease (Klimpel et al., 1994) und spaltet in vitro in der Zielzelle die MAP-Kinasen 1-4,6 und 7 (Bradley et al., 2001). Er nimmt so Einfluss auf verschiedene Signalwege, die der Regulation und der Proliferation des Zellzyklus sowie der Immunreaktion dienen (Moayeri & Leppla, 2009). Er verursacht eine Ausschüttung von Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) und Interleukin-1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) aus Makrophagen. Dies führt zur lokalen Nekrose der Gewebezellen und zur Apoptose von Granulozyten und trägt zumindest teilweise zum Tod bei systemischen Anthrax-Infektionen bei (Logan et al., 2011). Auch wird das Gerinnungssystem durch die Toxine beeinträchtigt, was häufig in einer disseminierten intravasalen Koagulopathie endet (Stearns-Kurosawa, et al., 2006).

Sowohl die Kapsel als auch die Exotoxine sind plasmidkodiert: die Kapsel auf dem Plasmid pXO2, die Toxine auf dem Plasmid pXO1. Lediglich die Stämme von *B. anthracis*, welche beide Virulenzplasmide besitzen, zeigen volle Pathogenität. Dem *B. anthracis* Stamm „Sterne“, ein attenuierter *B. anthracis* Stamm, fehlt beispielsweise das Plasmid pXO1 (Turnbull et al., 1991). Dieser Stamm wird zur Impfung von

Masttierbeständen verwendet (Mattix et al., 2006). Auch gab es in der Vergangenheit Fälle von milzbrandähnlichen Krankheitsfällen bei Tieren und Menschen in West- und Zentralafrika (Hoffmaster et al., 2004). Als Auslöser wurde in mehreren Fällen ein *B. cereus* Stamm identifiziert, welcher beide Virulenz-Plasmide pXO1 und pXO2 aufwies (Brezillon et al., 2015; Klee et al., 2010).

Es wird vermutet, dass es neben den genannten Pathogenitätsfaktoren auch noch weitere gibt (Schmid & Kaufmann, 2002).

#### 1.5.4. Formen und Krankheitsbilder von Milzbrand

Die Krankheit Milzbrand, die von *B. anthracis* verursacht wird, ist in ihrer Erscheinung vielseitig und abhängig von der Eintrittspforte. Eine Übertragung auf den Menschen kann prinzipiell auf drei Wegen passieren: über die Inhalation von sowie über Hautexposition mit *B. anthracis* Sporen (Friebeck et al., 2007). Außerdem ist eine Übertragung über die Ingestion von erregerrhaltigem Material, wie unzureichend erhitztem oder rohem Fleisch infizierter Tiere, möglich (Sirisanthana & Brown, 2002). Die Krankheitsbilder werden demnach als kutaner, oropharyngealer, gastrointestinaler und inhalativer Milzbrand bezeichnet. Eine Sonderform stellt der Injektionsanthrax dar. Bei der Infektion via Inhalation und Hautexposition sind die Sporen die infektiöse Form, bei gastrointestinaler Infektion wird vermutet, dass eine Aufnahme von vegetativen Bakterien Voraussetzung ist (Inglesby et al., 2002). Beim Injektionsanthrax wird eine Übertragung von Sporen über die Injektion von verunreinigtem Heroin vermutet (Hicks et al., 2012).

Die häufigste Form von unter natürlichen Umständen auftretendem Milzbrand ist der kutane Anthrax (Logan et al., 2011), meist infolge von Kontakt mit infizierten Tierkadavern und durch das Eindringen der Sporen über kleine Hautverletzungen (Mwenye et al., 1996; Pile et al., 1998). Insbesondere exponierte Körperpartien wie die Arme, Hände, Hals und das Gesicht sind betroffen (Turnbull, 2008). Die Sporen keimen nahe der Eintrittsstelle aus und die vegetativen Zellen beginnen mit der Toxinproduktion - es entsteht eine initial juckende Papel, umgeben von einem ausgeprägten lokalen Ödem. Nach 1-2 Tagen weitet sich der Befund zu einer runden Ulzeration aus, welche von einzelnen mit seröser, erregerrhaltiger Flüssigkeit gefüllten Vesikeln umgeben ist. In den folgenden Tagen trocknet der Befund zu einem schwarzen, schmerzlosen kohleschwarzen Eschar ein. Zusätzlich kann es zu einer

begleitenden regionalen Lymphadenopathie und Allgemeinsymptomen, im schlimmsten Fall zu einem septischen Krankheitsbild kommen. Eine antibiotische Therapie scheint den Verlauf des lokalen Primärbefundes nicht zu beeinflussen, doch verhindert sie in den meisten Fällen ein systemisches Fortschreiten der Erkrankung (Inglesby et al., 2002) und senkt die Mortalitätsrate auf <1% (Turnbull, 2008), welche ohne antibiotische Therapie in der Literatur zwischen 10-20% (Logan et al., 2011) und 10-40% (Turnbull, 2008) angegeben wird.

Die zweite Form von Milzbrand, der gastrointestinale Milzbrand, tritt nach oraler Aufnahme von vegetativen Bakterien etwa in nicht ausreichend erhitztem oder rohem Fleisch auf. Die Inkubationszeit dauert in der Regel zwischen 1 und 6 Tagen (Beatty et al., 2003). Diese Form äußert sich entweder im Befall des Oropharynx oder des Darms. Bei der oropharyngealen Form kommt es zur Ausbildung eines oralen oder oesophagealen Ulkus, einer regionalen Lymphadenopathie, eines ausgeprägten Ödems und führt letztendlich zur Sepsis (Sirisanthana et al., 1984; Sirisanthana et al., 1988). Klinische Symptome sind neben dem allgemeinen Krankheitsgefühl Dysphagie und Halsschmerzen. Ein Befall des unteren Gastrointestinaltrakts (insbesondere des terminalen Ileums oder Zäkum) äußert sich in Nausea, Emesis sowie einem ausgeprägten Krankheitsgefühl. Letztendlich kommt es zu einem akuten Abdomen mit Aszites, blutiger Diarrhoe und Sepsis (Dutz et al., 1970). Aufgrund der anfangs zunächst unspezifischen Symptome des oropharyngealen und gastrointestinalen Anthrax ist die korrekte Diagnose häufig verzögert. Der gastrointestinale Anthrax hat bei ausbleibender Behandlung eine infauste Prognose. Bei rechtzeitiger Therapie kann die Mortalitätsrate auf etwa 30 % gesenkt werden (Friesecke et al., 2007).

Der inhalative Anthrax tritt unter natürlichen Umständen sehr selten auf. Ausgelöst wird die Erkrankung durch die Inhalation von 1-5 µm großen Sporenpartikeln, welche bis in die Alveolen gelangen (Druett et al., 1953; Hatch, 1961). Dort werden die Sporen von Makrophagen aufgenommen und in die mediastinalen Lymphknoten transportiert. In den mediastinalen Lymphknoten angekommen, beginnen die Sporen nach einer möglichen Ruhephase auszukeimen (Lincoln et al., 1965; Ross, 1957). Die Anthrax-Toxine führen zur hämorrhagischen mediastinalen Lymphadenitis, Mediastinitis und Nekrose (Smith & Keppie, 1954). Kurz nach Befall der mediastinalen Lymphknoten kommt es zu Bakteriämie und Sepsis sowie zur hämatogenen Streuung in Milz, Leber oder auch ins zentrale Nervensystem. Symptome sind hohes Fieber, Schüttelfrost,

Stridor und eine respiratorische Insuffizienz, die innerhalb von 36-48 Stunden zum Tode führen kann (Friesecke et al., 2007). Unbehandelt endet der inhalative Milzbrand immer letal (Friesecke et al., 2007). Selbst bei adäquater antibiotischer und intensivmedizinischer Therapie ist die Letalitätsrate, insbesondere bei verspäteter Administration einer antibiotischen Therapie, sehr hoch (Holty et al., 2006).

Eine vierte und vergleichsweise neue Form von Milzbrand ist der Injektions-Anthrax bei Heroinabhängigen. Diese Form der Erkrankung wird durch die intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Injektion von mit *B. anthracis* Sporen kontaminierten Drogen verursacht. Das Krankheitsbild äußert sich in einem ausgeprägten Ödem um die Injektionsstelle und führt nicht selten zu einem Kompartmentsyndrom oder einer nekrotisierenden Fasziiitis (Grunow et al., 2012; Jallali et al., 2011; Ramsay et al., 2010). Bisher gab es drei Ausbrüche dieses Krankheitsbildes. Erstmals beschrieben wurde der Injektionsanthrax im Jahr 2000 bei einem Heroinabhängigen in Norwegen (Ringertz et al., 2000). In den Jahren von 2009 bis 2010 erkrankten 119 Menschen nach intravenösem Heroinmissbrauch in Schottland, es folgten fünf weitere Fälle in England und drei in Deutschland (Radun et al., 2010; Ramsay et al., 2010). Der dritte Ausbruch war charakterisiert durch 13 Fälle in Deutschland, Frankreich, UK und Dänemark. Fünf der 13 Patienten starben infolge der Infektion. Da ausschließlich Heroinabhängige betroffen waren, ist die wahrscheinlichste Ursache der Infektionen mit Anthrax-Sporen kontaminiertes Heroin.

#### 1.5.5. Therapie

Aufgrund der oben beschriebenen fulminanten Krankheitsbilder ist es von höchster Bedeutung, eine antibiotische Therapie möglichst schnell, innerhalb von wenigen Stunden, zu beginnen. Bei unter natürlichen Umständen erworbenen Fällen von kutanem Anthrax ist Penicillin G das Mittel der Wahl, da Resistenzen dagegen selten auftreten. In milden, unkomplizierten Fällen kann auf die intramuskuläre Injektion von Procain-Benzylpenicillin für 3-7 Tage zurückgegriffen werden (Turnbull, 2008). Die Therapie beeinflusst zwar die Dauer der Heilung und den Verlauf des Hautbefundes nicht (Gold, 1955), doch verhindert sie das systemische Fortschreiten der Erkrankung (Inglesby et al., 2002). Sollte eine intramuskuläre Applikation vom Patienten nicht erwünscht sein, könnte eine per os Therapie mit Penicillin V oder Amoxicillin erfolgen (Turnbull, 2008). Bei einer systemischen Infektion bei inhalativem oder



gastrointestinalen Milzbrand sowie bei Zeichen einer Meningoenzephalitis oder einer Sepsis sollte eine antibiotische Therapie immer intravenös appliziert werden. Mittel der Wahl ist hierbei Penicillin G. Bei fulminanten Verläufen und ZNS-Beteiligung kann Penicillin G mit einer weiteren Substanz wie Chloramphenicol kombiniert werden, die sich durch eine gute Liquorgängigkeit auszeichnet hat (Friesecke et al., 2007).

Im Falle eines bioterroristischen Anschlags empfiehlt die „Working Group on Civilian Biodefense“ in einer Stellungnahme aus dem Jahr 2002 Folgendes: Da in einem bioterroristischen Kontext primär von Resistenzen des ausgebrachten Milzbranderreger gegen Penicilline und Tetracycline ausgegangen werden sollte, wird empfohlen, beim inhalativen Anthrax bis zum Erhalt eines Antibiotogramms initial eine intravenöse Therapie mit Ciprofloxacin oder Doxycyclin plus ein bis zwei weiteren Substanzen (Rifampicin, Vancomycin, Penicillin, Ampicillin, Clindamycin, Clarithromycin) zu beginnen. Diese Substanzen haben sich zumindest in vitro als wirksam erwiesen und sollten lediglich zur Augmentation oder bei Kontraindikationen gegen die beiden Substanzen eingesetzt werden. Wenn es der klinische Verlauf erlaubt, können Ciprofloxacin oder Doxycyclin oralisiert werden. Die Therapie sollte für mindestens 60 Tage aufrechterhalten werden. Beim kutanen Anthrax können die gleichen Substanzen per os für mindestens 60 Tage verabreicht werden. Wenn möglich, sollte immer eine antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung durchgeführt werden, um die antibiotische Therapie bei möglichen Resistenzen anzupassen.

Das gleiche Therapieregime wie beim inhalativen Anthrax kann als Postexpositionsprophylaxe bei bioterroristischen Anschlägen und Verbreitung von *Bacillus anthracis* Sporen via Aerosol verwendet werden. (Inglesby et al., 2002)

Aufgrund der potenziell schwerwiegenden Nebenwirkungen von Fluorchinolonen auf das Nervensystem und den Bewegungsapparat (Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2019) sollte die Indikation streng gestellt und die Anwendung immer abgewogen und an den Einzelfall angepasst werden.

Bei inhalativem Anthrax kann eine Behandlung mit Raxibacumab, einem humanen IgG-Antikörper gegen das Protektive Antigen in Erwägung gezogen werden. Im Tierversuch war nach Behandlung von inhalativem Anthrax mit Raxibacumab die Überlebensrate signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Migone et al., 2009).

Präexpositionell existieren zwei Vakzine: Das in den USA zugelassene AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed) und das in Großbritannien zugelassene AVP (Anthrax Vaccine Precipitated). Beide basieren auf dem immunogen wirkenden Protektiven Antigen. AVP beinhaltet zusätzlich andere Antigene von *Bacillus anthracis* wie den Letal- und Ödem-Faktor (Baillie et al., 2003; Turnbull, 1991; Whiting et al., 2004) und soll eine bessere Immunität bieten (Baillie et al., 2004).

## 1.6. Diagnostische Verfahren in der Mikrobiologie

Zur Diagnostik bakterieller Erreger stehen verschiedene Nachweisverfahren zur Verfügung. Dabei unterscheidet man zunächst zwischen dem direkten Erregernachweis, zum Beispiel über Erregeranzucht, molekularen Erbgut (PCR)- oder Antigennachweis (oder Lateral Flow Immunoassays - LFIA) und indirekter Diagnostik mittels serologischem Antikörpernachweis im Patientenblut. Bei dem Erregernachweis mittels kultureller Anzucht handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren. Es bietet die Möglichkeit, den Erreger für weitere Untersuchungen und Typisierungen zu benutzen. Allerdings ist diese Methode im Vergleich zur PCR oder LFIA wesentlich zeitintensiver und benötigt mindestens 24-48 h. Eine weitere Herausforderung für die kulturelle Anzucht ist eine Kontamination durch Begleitflora der Probe. Sollte eine antibiotische Therapie bereits vor Probeentnahme erfolgt sein, kann die kulturelle Anzucht erschwert sein.

PCR-basierte Nachweisverfahren haben sich in den letzten Dekaden zu einer wichtigen, spezifischen und hochsensitiven Methode in der mikrobiellen Diagnostik entwickelt (Yang, 2004). Allerdings nimmt das PCR-Verfahren mehrere Stunden in Anspruch und ist an ein Labor gebunden und somit nicht dezentral durchführbar. Der indirekte Erregernachweis über die Detektion erregerspezifischer Antikörper im Patientenblut kann aufgrund der für die Serokonversion benötigten Zeit von mindestens 5 Tagen erst verzögert erfolgen und ist daher für die Akutdiagnostik ungeeignet.

Im Folgenden werden die gängigsten Diagnostikverfahren für die in der vorliegenden Arbeit behandelten Erreger zusammengefasst.

### 1.6.1. *Y. pestis*

Die kulturelle Anzucht von *Yersinia pestis* kann aus Patientenproben wie Blut, Sputum oder Bubonenmaterial gelingen. Ein Wachstum ist frühestens nach 24-48 Stunden zu

erwarten und ist für die dringend notwendige Akutdiagnostik daher oft ungeeignet. Für *Y. pestis* steht dafür ein LFIA zur Verfügung, der zur klinischen Diagnostik zugelassen ist, allerdings hat dieser Test sowohl Sensitivitäts- als auch Spezifitätsprobleme (Rajerison, 2020).

Des Weiteren kann für den direkten Erregernachweis die Darstellung der Gramfärbung mittels Lichtmikroskopie erfolgen. Hierbei können gramnegative, bipolare, kokkoide Stäbchen gesehen werden.

Eine weitere wichtige Methode für den direkten Nachweis von *Y. pestis* ist die PCR. Hier können beispielsweise Genabschnitte, die für das F1-Antigen oder den Plasminogenaktivator kodieren verwendet werden.

Retrospektiv kann ein Antikörpertiteranstieg um das Vierfache eine durchgemachte Infektion anzeigen. (Inglesby et al., 2000; Rakin, 2003)

#### 1.6.2. *F. tularensis*

Der Goldstandard zum Nachweis von *Francisella tularensis* ist die kulturelle Anzucht. Geeignete Proben sollten vor Beginn einer antibiotischen Therapie entnommen werden und können im Falle einer pulmonalen Tularämie beispielsweise Sputum, bronchoalveoläre Lavage oder Magenaspirate sein. Geeignete Anzuchtmedien sind Cystein-angereicherte bluthaltige Nährmedien, beispielsweise Cystein-Herz-Blutagar. Die Inkubation sollte bei 37°C und für mindestens 10 Tage erfolgen, wobei nach 24-48 h Wachstum zu erwarten wäre. (Dennis et al., 2001; Robert-Koch-Institut, 2016)

Des Weiteren können für den direkten Erregernachweis PCR-Methoden sowie eine Antigendetektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie oder ELISA genutzt werden. Indirekt kann eine Infektion mittels Antikörperbestimmung detektiert werden. Ein Titeranstieg in einem Serumpaar (akute Infektion sowie in der Rekonvaleszenzphase) um das Vierfache, ebenso wie ein einmalig hoher Titer gelten hierbei als beweisend. Da die Serokonversion mehrere Tage bis Wochen in Anspruch nimmt ist diese Methode wie bereits erwähnt nicht für die akute Diagnostik geeignet. (Friesecke, 2007)

#### 1.6.3. *B. anthracis*

Ebenso wie bei *F. tularensis* und *Y. pestis* ist zum direkten Nachweis von *B. anthracis* die kulturelle Anzucht der Goldstandard. Hierzu können sowohl Umweltproben (z.B. Pulverproben) als auch Patientenmaterial (z.B. Blutkulturen oder Flüssigkeit aus

Vesikeln) verwendet werden. Ebenso richtungsweisend können eine Gramfärbung (grampositive Stäbchen bspw. im Blutaussstrich) oder der Nachweis mittels PCR sein. Ein Nachweis von Antikörpern gegen das Protektive Antigen (PA) dient nicht der Akut-Diagnostik, sondern wird eher retrospektiv für epidemiologische Zwecke eingesetzt. (Inglesby et al., 2002)

### 1.7. Spezifität und Sensitivität von diagnostischen Nachweisverfahren

Spezifität und Sensitivität sind entscheidende Kriterien eines jeden diagnostischen Nachweisverfahrens. Die Spezifität beschreibt dabei Fähigkeit eines Tests ausschließlich Zielerreger in einer Probe korrekt nachzuweisen und dabei nicht auf Nicht-Zielerreger anzusprechen. Je spezifischer ein Test ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Probe ohne den nachzuweisenden Zielerreger als (falsch)positiv erkannt wird.

Bzgl. der Sensitivität eines diagnostischen Testverfahrens muss zwischen der analytischen Sensitivität und der klinischen Sensitivität unterschieden werden. Die klinische Sensitivität beschreibt, wie gut ein Test in der Lage ist, den Zielerreger in klinisch relevanten Proben von erkrankten Patienten korrekt nachzuweisen, also die entsprechende Krankheit korrekt zu diagnostizieren. Ein wenig sensitiver Test führt also zu falsch negativen Untersuchungsergebnissen.

Die analytische Sensitivität eines diagnostischen (mikrobiologischen) Testverfahrens gibt an, bei welchem Prozentsatz erregerehaltiger Proben die jeweiligen positiven Proben durch die Anwendung des Tests tatsächlich erkannt werden, d.h. ein positives Testresultat auftritt.

Der Ausdruck analytische Sensitivität wird oft synonym mit der Nachweisgrenze oder Limit of Detection (LOD) eines Tests verwendet (Paul-Ehrlich-Institut, 2020). Auch wenn dies streng wissenschaftlich betrachtet nicht ganz korrekt ist (Lozano, 1997), hat sich die synonyme Verwendung von analytischer Sensitivität und Nachweisgrenze eines Tests bei der Betrachtung von diagnostischen in-vitro Tests inzwischen etabliert (Die Kommission der europäischen Gemeinschaften, 2009). Es handelt es sich hierbei um die geringste Menge eines Analyts, die unter optimalen Laborbedingungen vom Hintergrund unterschieden werden kann. Meist wird dabei eine Wahrscheinlichkeit von 95% angegeben. Da die in dieser Arbeit untersuchten LFIA ausschließlich zur Untersuchung von Umweltproben und nicht für Patientenmaterial zugelassen sind, wird hier lediglich die analytische Sensitivität bzw. Nachweisgrenze betrachtet.

## 1.8. Lateral Flow Immunoassays

Ein Immunoassay ist eine bioanalytische Nachweismethode, die auf dem Prinzip der Interaktion von Antikörper und dem zu untersuchenden Antigen beruht. Zu den bekanntesten Immunoassays zählen unter anderem der Western-Blot und der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Auch Lateral Flow Immunoassays, bekannt als immunochromatographische Assays oder Hand Held Test Kits (HHTKs), gehören der Gruppe der Immunoassays an. Sie bieten in zahlreichen Bereichen ein diagnostisches Instrument, das bei minimalem logistischem Aufwand in wenigen Minuten ein Ergebnis liefert (Koczula & Gallotta, 2016). Häufig werden diese LFA in der Point-of-Care Diagnostik in Krankenhäusern, Arztpraxen und Laboratorien in der Patientenversorgung angewendet (Koczula & Gallotta, 2016). Hier können beispielsweise beta-HCG, welches im frühen Stadium einer Schwangerschaft im Urin gefunden werden kann oder Herzenzyme, die im Falle eines Herzinfarktes im Blut ansteigen, nachgewiesen werden (Sajid et al., 2015). Auch in der Diagnostik von Infektionskrankheiten wie zum Beispiel Hepatitis B oder Influenza kommen sie zum Einsatz (Sajid et al., 2015). Ein weiteres Einsatzgebiet für LFA ist die Lebensmittelhygiene. Hier werden schnelle und möglichst genaue Methoden benötigt, um potenziell gesundheitsschädliche Substanzen in Nahrungsmitteln wie Botulinum Neurotoxin (BoNT) oder *Salmonella enteritidis* oder Listerien zu detektieren (O'Farrell et al., 2009; Sajid et al., 2015). Zwar werden hier auch der konventionelle kulturelle und molekularbiologische Nachweis angestrebt, doch benötigt dies im Vergleich zum LFA sehr viel mehr Zeit (Gracias & McKillip, 2004; Sajid et al., 2015). In der Veterinärmedizin sind die Tests eine wichtige Methode, um beispielsweise Schwangerschaften bei Kühen, Pferden etc. oder Infektionskrankheiten zu detektieren (O'Farrell et al., 2009).

Ein weiteres sehr wichtiges Einsatzgebiet ist die Detektion von hochpathogenen Erregern wie *Y. pestis*, *F. tularensis* oder *B. anthracis* Sporen. Hier bieten HHTKs im Kontext der medizinischen B-Aufklärung den Vorteil, dass sie im Feld, das heißt am mutmaßlichen Ausbringungsort, angewendet werden können, keine weitere Ausrüstung benötigt wird (minimaler logistischer Aufwand), relativ leicht zu bedienen sind und schon in wenigen Minuten zu einer vorläufigen Arbeitsdiagnose führen können.

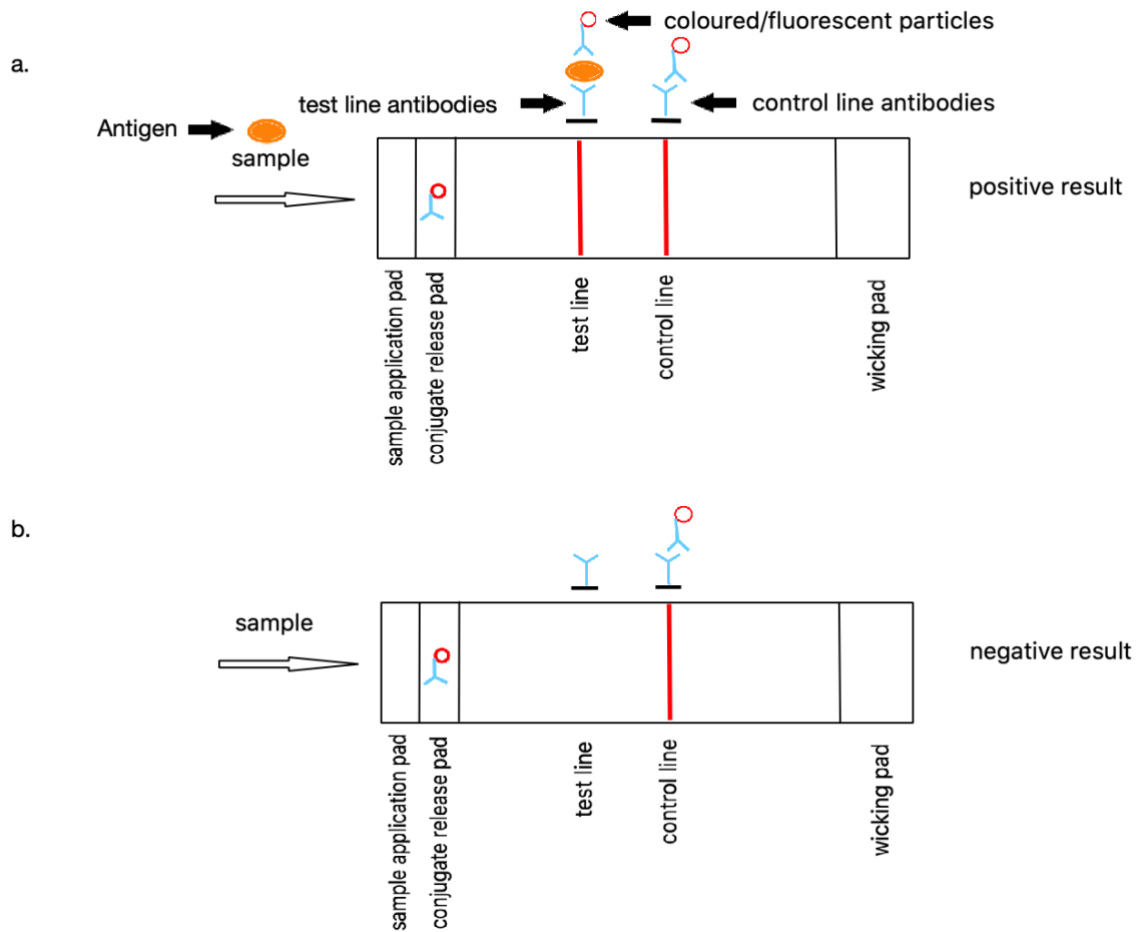


Abb. 1 Sandwich-Assay-Format. Abgewandelt nach (InnovaBiosciences, 2012). a. Ein positives Ergebnis ist zu sehen, wenn das nachzuweisende Antigen an den Nachweisantikörper und an den an der Testlinie immobilisierten Antikörper gebunden wird. Der Antikörper, der an der Kontrolllinie immobilisiert wurde, erkennt den Nachweisantikörper und erzeugt eine farbige Linie, um anzuzeigen, dass der LFA korrekt abgelaufen ist. Das Antigen ist orange angefärbt. b. negatives Testergebnis bei Abwesenheit des zu detektierenden Antigens

Prinzipiell funktionieren LFIA nach dem folgenden Prinzip: Die zu untersuchende Probe wird auf das „Sample Pad“ aufgetragen. Dort wird die Probe aufgenommen und die Beschaffenheit der Flüssigkeit an den Test angepasst (Filtern von Störpartikeln, pH-Wertänderung, etc.) (O’Farrell et al., 2009). Das Probenfeld muss aus einem Material gefertigt sein, welches in der Lage ist, die Probe schnell weiter zu leiten. Gängige hierfür verwendete Materialien sind Cellulose, Glasfasern, Rayon oder andere Filtrationsmedien (O’Farrell et al., 2009). Die Flüssigkeit wandert entlang der Flussrichtung und trifft zunächst auf das „Conjugate Pad“ (typischerweise aus Glasfasern, Polyester oder Viskose). Hier wurden mit Gold- oder Latexpartikeln, gekoppelt an einen fluoreszierenden Farbstoff versetzte Antikörper (für das gesuchte

Antigen spezifisch), immobilisiert. Das „Conjugate Release Pad“ muss die Antikörper gleichmäßig und effizient freisetzen. Dies ist für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse wichtig (Zasada et al., 2015). Nach der Bindung der Antikörper an das Antigen bewegen sich die Antigen-Antikörper-Komplexe weiter auf eine Membran aus Nitrocellulose zu. Auf dieser wurden Antikörper immobilisiert. Typischerweise sind diese in zwei Streifen angeordnet: in Teststreifen und in Kontrollbande. Auf dem Teststreifen sind antigenspezifische Antikörper angebracht. Die Aufgabe dieser Membran besteht darin, die Antikörper bis zum Gebrauch stabil und funktionstüchtig zu erhalten, die Probe zusammen mit den Antikörpern des „Conjugate Release Pads“ aufzunehmen und gleichmäßig zu den immobilisierten Antikörper-Streifen weiterzuleiten. Erfolgt eine Bindung des Antigens auf dem Teststreifen, entsteht ein sogenannter Sandwich-Komplex. Durch das am ersten Antikörper gebundene Nanogold oder Latexpartikel plus Farbstoff wird diese Bindung visualisiert. Der Kontrollstreifen dient dazu, den regelrechten Ablauf bzw. die Validität des Tests anzuzeigen. Hier werden die überschüssigen Antikörper des „Conjugate Pads“ gebunden, welche zuvor kein Antigen gebunden haben. Im darauffolgenden „Absorbent Pad“ werden die überschüssige Flüssigkeit, die verbleibenden Antikörper sowie Antigen aufgesaugt. Es dient dazu, die aufgetragene Flüssigkeit anzusaugen und anschließend sicherzustellen, dass diese dort aufgehalten wird und nicht etwa in die entgegengesetzte Richtung zurückfließt.

Das Ablesen des Testergebnisses ist relativ simpel: Im Falle eines ordnungsgemäß abgelaufenen Schnelltests erscheint eine Kontrollbande an zweiter Stelle. Sie zeigt an, dass das Ergebnis valide ist. Sollte das nachzuweisende Agens in der Probe enthalten sein, erscheint eine zusätzliche Bande, die sogenannte Testbande. Bei Abwesenheit der Testbande ist das Agens entweder nicht vorhanden oder in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

Sowohl das Layout als auch das Handling der verschiedenen Tests hat Einfluss auf die Verwendbarkeit im Feld. Hierauf wird in den Kapiteln 4.3 sowie 5.4 näher eingegangen.

## 2. Problemstellung

Sollte der Verdacht auf die willentliche Ausbringung der oben genannten Erreger im Kontext des medizinischen B-Schutzes bestehen, ist es von größter Bedeutung, dies möglichst schnell aufzuklären. Vor allem für „First Responder“, wie Polizei, Feuerwehr, spezialisierte Einsatzkräfte, etc., sind Lateral Flow Immunoassays ein wichtiges Mittel, einen ersten Anhaltspunkt zu erhalten und eine vorläufige Arbeitsdiagnose zu erhalten. Daher ist es von fundamentaler Bedeutung zu wissen, wie verlässlich diese Tests sind. Hierzu sind unter anderem klare Aussagen bezüglich der Nachweisgrenze und der Auswirkung verschiedener Ausbringungs-Matrizes auf die Test-Performance notwendig.

Zunächst sollen in der vorliegenden Arbeit LFA von vier verschiedenen Herstellern hinsichtlich ihres Handlings und Layouts untersucht werden. Anschließend sollen die jeweiligen Nachweisgrenzen für die drei Erreger *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* und *Bacillus anthracis* determiniert werden. Abschließend soll der Einfluss exemplarisch ausgewählter relevanter Matrizes auf die genannten Tests untersucht werden. Die folgenden zwölf Tests wurden evaluiert: Biothreat Alert (Tetracore) Tularemia, Plague, Anthrax; BADD (Biowarfare Agent Detection Devices, Advnt) Tularemia, Plague, Anthrax Test Device; miPROTECT (Miprolab) Tularemia, Plague, Anthrax; SMART II (New Horizons Diagnostics) Tularemia, Plague, Anthrax.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Bakterienstämme

Die in Tabelle 4 aufgeführten Erreger wurden zur Testung der LFIA verwendet.

Tabelle 4 Verwendete Bakterien

Genus	Spezies	Subspezies	Stamm	Bezugsquelle
<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i>		NCTC5923, ATCC19428	Stammsammlung IMB
<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A1	FSC237, Schu4	Stammsammlung IMB
<i>Bacillus</i>	<i>anthracis</i>		Ames	Stammsammlung IMB
<i>Bacillus</i>	<i>anthracis</i>		Vollum	Stammsammlung IMB

##### 3.1.2. Chemikalien und Medien

Die in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführten Chemikalien und Medien wurden in der vorliegenden Arbeit benutzt.

Tabelle 5 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/ Bezugsquelle
Wofasteril, Desinfektions-Peressigsäure	Kesla Pharma Wolfen
Ethanol absolute	Merck
Natrium-Thiosulfat Pentahydrat	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich
NaCl 0,9%	Merck (1064040500)
Bentonite	Sigma-Aldrich
Heroin	IMB

Tabelle 6 Verwendete Medien

Medium	Inhaltsstoffe	Hersteller
LB-Bouillon	LB-Bouillon Trockensubstanz (Merck 1.005.470.500) Aqua dest.	IMB
LB-Agar	LB-Agar Trockensubstanz (Merck 1.102.830.500) Aqua dest.	IMB
HC-Agar	HCA-Base (Inverness Medical) Schafsblut, steril (Oxoid) Aqua dest.	IMB
Müller Hinton II+ Iso X	MH-II Kationen optimiertes Medium (Becton & Dickinson 12322) 1M NaOH (Merck 6462) IsoVitaleX (Becton & Dickinson 211876) Aqua dest.	IMB
Malvar Agar	Nutrient Broth (Merck, 1.05443.0500) MnCl 0,01 M (Roth) CaCl <sub>2</sub> 1M (Merck) MgCl <sub>2</sub> 1M (Merck) Agar-Agar (Roth 6494.2)	IMB
Thioglycollate-Bouillon	Pankreatisch abgebautes Casein L-Cystin Dextrose (Anhydrid) Hefeextrakt Natriumchlorid Natriumthioglykolat Resazurin Agar	BD
Columbia-Agar mit 5% Schafsblut	Pankreatisch abgebautes Casein Peptisch abgebautes Tiergewebe Hefeextrakt Rindfleischextrakt Maisstärke Agar-Agar Defibriertes Schafblut	BD

### 3.1.3. DNA-Extraktions-Kits

Folgende Kits wurden für die Extraktion der DNA aus den Zielerreger verwendet (s. Tabelle 7)

Tabelle 7 Verwendete Extraktionskits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen
QIAamp DNA Investigator Kit	Qiagen

### 3.1.4. Desinfektion

Die Desinfektion wurde bei Arbeit mit den Erregern *Y. pestis* und *F. tularensis* mit Pursept A Xpress durchgeführt. Für *B. anthracis* und dessen Sporen wurde 4% Terralin PAA benutzt (s. Tabelle 8)

Tabelle 8 Verwendete Desinfektionsmittel

<b>Desinfektionsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Terralin PAA	Schülke
Pursept A Xpress	Schülke

### 3.1.5. Verbrauchsmaterial

In Tabelle 9 ist das Verbrauchsmaterial aufgelistet.

Tabelle 9 Verwendetes Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
C-Chip Einweg-Zählkammer	Neubauer improved
Eppendorf Tubes	Eppendorf
Falcon-Röhrchen	Falcon
Einmal-Spatel, L-Form	VWR
PARAFILM® M	Parafilm
Pipettenspitzen	Eppendorf
ddPCR Supermix for Probes	Biorad
ddPCR EvaGreen Supermix	Biorad
Droplet Generation Oil for Probes	Biorad
Droplet Generation for Eva Green	Biorad
Droplet Generator Cartridges	Biorad
96-Well Platten	Biorad
Eistee	Nestea
Milch 1,5% Fett	Rewe
Joghurt-Salatsoße	Rewe

### 3.1.6. Schnelltests

In Tabelle 10 und Abb. 2 sind die verwendeten HHTKs der Hersteller Miprolab, Advnt Biotechnologies, New Horizons Diagnostics Inc., und Tetracore Inc. aufgelistet und dargestellt.

Tabelle 10 Verwendete HHTKs

Name	Hersteller
miPROTECT® Plague	Miprolab
miPROTECT® Tularemia	Miprolab
miPROTECT® Anthrax	Miprolab
BADD™ Biowarfare Agent Detection Device Plague	Advnt Biotechnologies
BADD™ Biowarfare Agent Detection Device Tularemia	Advnt Biotechnologies
BADD™ Biowarfare Agent Detection Device Anthrax	Advnt Biotechnologies
SMART II™ Tularemia	New Horizons Diagnostics Inc.
SMART II™ Yersina Pestis (F1)	New Horizons Diagnostics Inc.
SMART II™ Anthrax (Spore)	New Horizons Diagnostics Inc.
Plague <i>BioThreat Alert</i> ® Kit	Tetracore Inc.
Tularemia <i>BioThreat Alert</i> ® Kit	Tetracore Inc.
Anthrax <i>BioThreat Alert</i> ® Kit	Tetracore Inc.



Abb. 2 verwendete Schnelltestsysteme, von oben nach unten: miPROTECT®, BADD™, SMART II™, BioThreat Alert®

### 3.1.7. Technische Ausstattung

Die in Tabelle 11 aufgelistete technische Ausstattung wurde für diese Arbeit verwendet.

Tabelle 11 Technische Ausstattung

<b>Gerät</b>	<b>Model</b>	<b>Hersteller</b>
Thermomixer	Thermomixer comfort	eppendorf
Thermomixer	Thermo Inkubator MKR13	ITABIS
Zentrifuge	Centrifuge 5424 R	eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	eppendorf
Werkbank	MARS PRO Scanlaf	Labogene
Werkbank	HERASAFE KS	Thermo Scientific
Pipetten	research	eppendorf
Vortexer	Vortex-Gen 2	Scientific industries
Mikroskop	Axioskop 2 plus	Zeiss
Mikroskop	EL6000	Leica
QX100 Droplet Generator		BioRad
QX100 Droplet Reader		BioRad
PCR Gerät	Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Kulturelle Anzucht Übersicht

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Anzuchtbedingungen- und Medien der verschiedenen Erreger.

Tabelle 12 Übersicht kulturelle Anzucht

Bakterien		Anzuchtmedien	Anzuchtbedingungen
<i>Yersinia pestis</i>		LB-Bouillon, LB-Agar, Columbia- Agar	37°C 48 Stunden
<i>Francisella tularensis ssp. tularensis</i>		Müller Hinton + Isovitale X HC-Agar	37°C 48 Stunden 5% CO <sub>2</sub>
<i>Bacillus anthracis</i>	Vegetative Zellen	LB-Bouillon, LB-Agar	37°C 24 Stunden
	Sporulations-Medium	Malvar-Agar	37°C mind. 7 Tage

#### 3.2.2. Allgemeines Vorgehen Übersicht

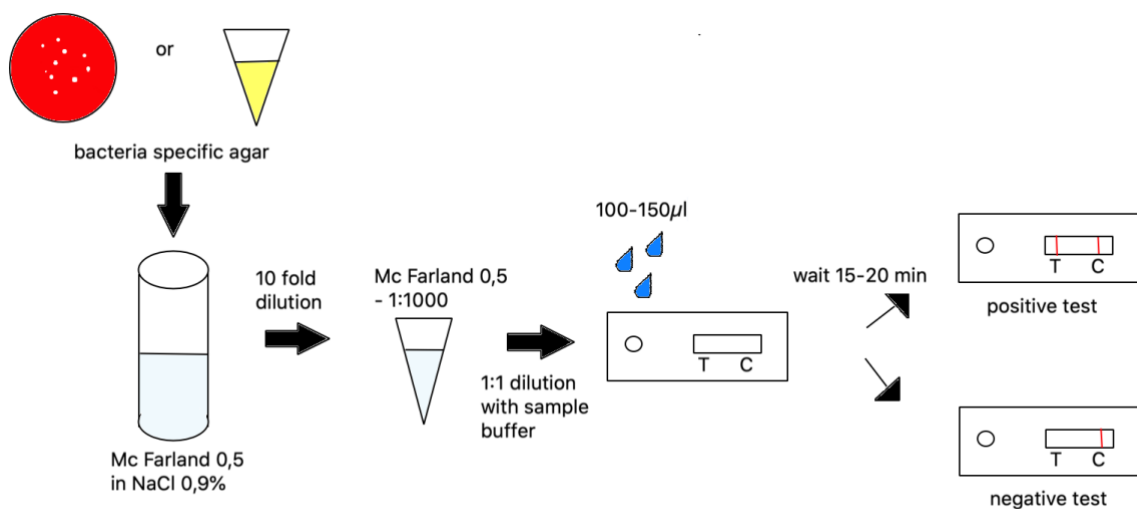


Abb. 3 Übersicht allgemeines Vorgehen



### 3.2.3. Kulturelle Anzucht

Die Anzucht von und die Arbeit mit *Y. pestis* und *F. tularensis* erfolgten in einer mikrobiologischen Werkbank der Klasse II im BSL3-Labor. *B. anthracis* und dessen Sporen wurden in einer mikrobiologischen Werkbank der Klasse III im BSL3-Labor bearbeitet.

Zur kulturellen Anzucht von *Francisella tularensis ssp. tularensis* aus der Mikrobank/Kryosystem wurde ein Kügelchen auf HC-Agar im Drei-Ösen-Ausstrich ausgestrichen und für 48 Stunden bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Zur Anzucht von *Yersinia pestis* wurde ein Kügelchen aus der Mikrobank/Kryosystem in LB-Bouillon für 48 Stunden bei 37°C kultiviert.

Zur kulturellen Anzucht von *B. anthracis* wurde ein Kügelchen aus der Mikrobank über Nacht in LB-Bouillon bei 37°C inkubiert.

### 3.2.4. Sporenerzeugung

Um die vegetativen Zellen von *Bacillus anthracis* Vollum und Ames zum Sporulieren zu bringen, wurden am folgenden Tag jeweils 100 µl der Übernachtskultur auf Malvar-Agar ausplattiert und für mindestens 7 Tage bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Sporulation (Überprüfung mittels Durchlichtmikroskopie) erfolgte die Sporenaufreinigung.

Zur Herstellung hochkonzentrierter, reiner Sporensuspensionen wurden die Sporen beider Stämme zunächst mit sterilem Wasser vom Malvar-Agar abgenommen und in Eppendorf Tubes überführt. Es erfolgte ein fünfzehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm in einem aerosoldichten Rotor. Zur Entfernung von Resten vegetativer Zellen wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit den Sporen in sterilem Wasser resuspendiert. Diese Schritte wurden einmal wiederholt.

Die Arbeit mit und die Lagerung von virulenten Sporen von *B. anthracis* erfolgte ausschließlich unter BSL3-Bedingungen. Insbesondere die Präparation und die Arbeit mit den Sporensuspensionen erfolgte ausnahmslos in einer mikrobiologischen Werkbank der Klasse III im BSL3-Labor. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einem aerosoldichten Rotor innerhalb einer mikrobiologischen Werkbank der Klasse II im BSL3-Labor durchgeführt. Alle Arbeitsflächen und Arbeitsmaterialien wurden nach und

während der Arbeit mit 4%iger Peressigsäure (Terralin PAA) desinfiziert. Das benutzte Material wurde vor dem Ausschleusen aus der Handschuhbox für 15 Minuten in mit 4% Terralin PAA getränkten Tüchern gewickelt.

Die Lagerung der Sporen erfolgte bis zum Gebrauch im BSL3-Labor bei 5°C in wässriger Lösung.

### 3.2.5. Vorbereitung der Proben zur Ermittlung der Nachweisgrenze

Um eine von Medienrückständen befreite Probe zu bekommen, wurde das Kulturmaterial (in LB-Medium) von *Y. pestis* zunächst für 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in steriler Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 14000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in NaCl 0,5% resuspendiert.

Das Kulturmaterial von *F. tularensis* wurde mit Hilfe einer Öse in sterile Kochsalzlösung überführt. Es wurde durch Vortexen eine homogene Suspension hergestellt.

Um für folgende Experimente Proben mit vergleichbarer Anzahl an Erregern zu erhalten, wurde sowohl für *Y. pestis* als auch für *F. tularensis* ein McFarland-Standard von 0,5 mit Hilfe eines Densitometers eingestellt.

Der McFarland-Standard ist ein in der Mikrobiologie gebräuchlicher Referenzwert, welcher dazu verwendet wird, die Trübungen von Bakteriensuspensionen so anzupassen, dass die Anzahl der Bakterien in einem bestimmten Bereich liegt. Dies ist unter anderem zur Standardisierung mikrobieller Tests notwendig. Für die in dieser Arbeit verwendeten Erreger *Y. pestis* und *F. tularensis* liegt der McFarland-Standard von 0,5 zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Bakterien/ml (Tscherne pers. Komm.).

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden Verdünnungsreihen der Proben mit sterilem NaCl 0,9%, ausgehend vom McFarland-Standard 0,5 bis zu einem Verdünnungsfaktor von  $10^{-5}$ , hergestellt.

Von den *B. anthracis* Ames und Vollum Sporensuspensionen wurden, ausgehend von einer Konzentration von ca.  $10^9$  Sporen/ml, Verdünnungsreihen mit sterilem Wasser bis zu einem Verdünnungsfaktor von  $10^{-3}$  hergestellt.

### 3.2.6. Vorbereitung der Proben zur Matrixvalidierung

Um den Einfluss kommerziell erhältlicher und zur potentiellen Ausbringungsart der jeweiligen Erreger passender Substanzen auf die LFIA für die Erreger *F. tularensis* und *Y. pestis* zu untersuchen, wurden Eistee, Joghurt-Salatsoße und Milch gewählt. Bei den Sporen von *B. anthracis* wurde als Matrix Bentonit und Heroin-Pulver benutzt. Die Proben wurden, wie unter 3.2.5 erläutert, vorbereitet. Die auf einen McFarland-Standard 0,5 eingestellten Bakteriensuspensionen von *Y. pestis* und *F. tularensis* wurden 1:1 mit der jeweiligen Matrix (Eistee, Joghurt-Salatsoße oder Milch) gemischt. Bei der Validierung der Matrizes Heroin und Bentonit im Zusammenhang mit *B. anthracis* Sporen wurden 30 mg der jeweiligen Pulver-Matrix mit 1500 µl der Verdünnungsreihe der Sporen vermengt (Endkonzentration von 20mg/ml). Bei allen Erregern wurde anschließend wie unter 3.2.8 weiterverfahren.

### 3.2.7. Ermittlung der Nachweisgrenzen

Alle in dieser Arbeit validierten Lateral Flow Immunoassays wurden stets in dreifacher Ausführung getestet und das Ergebnis von zwei unabhängigen Beobachtern ausgewertet und dokumentiert.

Zur Feststellung der Nachweisgrenzen der Schnelltestsysteme: „F.tularenis“ und „Yersinia pestis SMART II (New Horizons) Lateral Flow Assay Device“, BADD (Advnt) Plague, Tularemia und Anthrax Test Device, Tularemia, Plague und Anthrax Biothreat Alert (Tetracore), miPROTECT Tularemia, Plague und Anthrax (Miprolab) wurden Verdünnungsreihen vom McFarland-Standard 0,5 bis zu einem Verdünnungsfaktor von  $10^{-5}$  getestet, um mindestens ein eindeutig negatives Ergebnis zu erhalten. Vor dem Auftragen auf das Testfeld wurden die Proben 1:1 mit dem durch den jeweiligen Hersteller gelieferten Probenpuffer versetzt. Es wurden dann 100 µl (Miprolab, Advnt, New Horizons) bzw. 150 µl (Tetracore) der jeweiligen Probe nach Herstellerangaben auf das Probenfeld aufgetragen. Beim SMART II Test wurde die Probe ohne vorherige Verdünnung mit Probenpuffer aufgetragen. Nach drei Minuten wurden hier zwei Tropfen des Probenpuffers hinzugegeben. Die Ergebnisse wurden nach 15 bzw. 20 Minuten (Miprolab) ausgewertet und dokumentiert.

### 3.2.8. Matrixvalidierung

Nachdem die Proben, wie unter Kapitel 3.2.6 beschrieben, vorbereitet wurden, erfolgte die Überprüfung der verschiedenen Matrizes. Mit Ausnahme des „F.tularensis“ und „Yersinia pestis SMART II (New Horizons) Lateral Flow Assay Device“ (direktes Auftragen der mit Matrix versetzten Probe auf das Probenfeld, Zugabe von 2 Tropfen Probenpuffer nach 3 Minuten), wurden alle mit Eistee, Joghurt-Salatsoße und Milch versetzten Verdünnungsreihen von *Y.pestis* und *F.tularensis* mit dem durch den jeweiligen Hersteller gelieferten Probenpuffer 1:1 gemischt. Es wurde analog zur Ermittlung der Nachweisgrenze von Reinkulturen unter Punkt 3.2.7 verfahren. Da Joghurt-Salatsoße als Probenmatrix sehr viskös ist, wurde bei Bedarf zusätzlich Probenpuffer aufgetragen, um das adäquate Ablaufen der Tests zu ermöglichen.

Die Verdünnungsreihen von *B. anthracis* wurden wie unter Punkt 3.2.6 vorbereitet. Die mit Bentonit und Heroin versetzten Proben wurden ausgiebig durchmischt und dann 1:1 mit dem jeweiligen Probenpuffer versetzt. Bevor die Proben auf das Testfeld aufgetragen wurden, wurde 5 Minuten gewartet, um eine partielle Sedimentierung zu erreichen. Es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

### 3.2.9. Negativkontrollen Matrizes

Zur Beurteilung der Auswirkung von verschiedenen Matrizes auf die Nachweisgrenze der verschiedenen Lateral Flow Immunoassays ist es notwendig, die jeweiligen Matrizes auch ohne Erreger als Negativkontrollen laufen zu lassen. Hierzu wurden die Matrizes Eistee, Milch und Joghurt-Salat-Soße 1:1 mit NaCl 0,9% vermischt. Danach wurden die Proben analog zur Vorbereitung der Verdünnungsreihen von *Y. pestis* und *F. tularensis* zur Matrixvalidierung bearbeitet. Proben für die Tests BADD, BTA und miPROTECT wurden 1:1 mit dem durch den jeweiligen Hersteller gelieferten Probenpuffer versetzt. Bei der Testung des SMART II wurde die Probe ohne Probenpuffer verwendet, der Testpuffer erst danach aufgetragen (s. oben).

Die Negativkontrollen zu den Testkits zur Detektion von *B. anthracis* Sporen wurden wie folgt getestet: Jeweils 30 mg der Matrizes Bentonit und Heroin wurden mit 1500 µl sterilem Wasser versetzt und gevortext. Anschließend wurden die Proben für die Tests

BTA, BADD und miPROTECT 1:1 mit dem jeweiligen Probenpuffer versetzt. Vor dem Auftragen auf das Testfeld wurde fünf Minuten gewartet, um eine partielle Sedimentierung zu erreichen. Die Probe für SMART II wurde nach den fünf Minuten direkt aufgetragen, der Probenpuffer nach weiteren drei Minuten hinzugegeben.

### 3.2.10. Quantifikation der Keimzahl und Sporenkonzentration

Die Quantifikation von *Y. pestis* und *F. tularensis* wurde mit zwei, die von *B. anthracis* mit drei Methoden durchgeführt:

Bei allen Ziel-Erregern erfolgte die Rücktitration durch Ausplattieren. *Y. pestis* und *B. anthracis* wurden auf LB-Agar, *F. tularensis* auf HC-Agar ausplattiert. Im Falle von *Y. pestis* wurden die Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  ausplattiert, um auszählbare cfu/ml zu erreichen. Bei *F. tularensis* wurden die Verdünnungen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  gewählt. Die Inkubationszeit für *Y. pestis* und *F. tularensis* betrug mindestens 48 Stunden bei 37°C. Die Bebrütung von *F. tularensis* erfolgte zusätzlich unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Alle Platten wurden im Dreifachansatz angelegt.

Die *B. anthracis*-Sporen wurden neben der Quantifikation mittels Rücktitration auf LB-Agar in den Verdünnungen  $10^{-3}$  -  $10^{-6}$  auch in der Einmal-Neubauer-C-Chip-Zählkammer mittels Durchlichtmikroskopie ausgezählt. Die Platten wurden im Zweifachansatz angelegt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Arbeit mit den drei Erregern erfolgte ausschließlich im BSL-3-Labor. *Y. pestis* und *F. tularensis* wurden hierbei in einer mikrobiologischen Werkband der Klasse II im BSL3-Labor bearbeitet. Zum zusätzlichen Schutz erfolgte die Arbeit mit den Sporen von *B. anthracis* innerhalb des BSL-3-Labors in einer mikrobiologischen Werkband der Klasse III.

Alle Erreger wurden zudem mittels digitaler droplet PCR (ddPCR) quantifiziert. Dazu wurden die Proben aller drei Erreger im BSL-3-Labor inaktiviert und anschließend ausgeschleust. Unter BSL-2-Bedingungen wurde die DNA extrahiert und anschließend aufgereinigt. Mittels ddPCR wurde anschließend die genaue Anzahl von Genomäquivalenten determiniert.

### 3.2.11. Inaktivierung, Lyse und Nukleinsäureextraktion

Die Lyse der Proben von *Y. pestis* und *F. tularensis* wurde in einer mikrobiologischen Werkband der Klasse II im BSL3-Labor durchgeführt. 160 µl der jeweiligen Probe wurde mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K versetzt und für 30 Minuten bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 10 Minuten bei 100°C.

Nach vollständiger Lyse wurden die Proben von *Y. pestis* und *F. tularensis* aus dem BSL-3-Labor ausgeschleust und unter BSL-2-Bedingungen weiterbearbeitet. Zunächst erfolgte eine Zugabe von 200 µl Ethanol zu den Proben, dann wurde die DNA-Aufreinigung nach Herstellerangaben (Qiagen) durchgeführt.

Für die DNA-Extraktion der Proben von *Y. pestis* und *F. tularensis* wurde das DNEasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben benutzt.

Die Inaktivierung der Sporen von *B. anthracis* wurde mit einer Kombination aus 0,25%iger Peressigsäure und 80%igem Ethanol durchgeführt. Zunächst wurden 500µl der jeweiligen Sporensuspension mit 500µl PES (0,25%) und Ethanol (80%) versetzt. Es folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt unter Schütteln. Um den Inaktivierungsprozess zu beenden, wurden 100 µl 1M Thiosulfat-Lösung hinzugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Nun wurde die inaktivierte Probe gewaschen: Zentrifugation für 15 Minuten bei 14000 rpm in einem aerosoldichten Rotor, Abnahme des Überstandes, Lösen des Pellets in sterilem Wasser. Abermals Zentrifugation für 15 Minuten bei 14000 rpm, Abnahme des Überstandes und Resuspension in sterilem Wasser. Um eine sichere Inaktivierung der Sporen zu erzielen, wurde die Probe erneut mit 500µl 80%igem Ethanol und 1% PES versetzt und für weitere 75 Minuten inkubiert. Die oben beschriebenen Schritte folgten.

Um die Inaktivierung der Sporen zu überprüfen, wurden Sterilkontrollen angelegt. Dies erfolgte im Dreifachansatz sowohl auf LB-Agar als auch in Thioglycollate-Bouillon. Es wurden jeweils 10µl der jeweiligen inaktivierten Sporensuspension auf LB-Agar ausplattiert und 25µl in Thioglycollate Bouillon gegeben. Beide Ansätze wurden bei 37°C für mindestens 10 Tage inkubiert. Es wurden mindestens alle drei Tage Wachstumskontrollen durchgeführt. Bei ausbleibendem Wachstum in beiden Ansätzen wurden die Flüssigkulturen in Thioglycollate-Bouillon nach 10 Tagen abermals im Dreifachansatz im Dreiösenausstrich auf LB-Agar ausgestrichen und für

weitere 10 Tage unter gleichen Bedingungen bebrütet. Bei weiterhin ausbleibendem Wachstum konnten die inaktivierten Sporen ausgeschleust und unter BSL-2-Bedingungen weiterbearbeitet werden. Die Sporen wurden lysiert, die DNA extrahiert und der ddPCR zugeführt.

Die inaktivierten *B. anthracis* Sporen wurden anhand eines in-house-Protokolls IMB nach Knüpfer *et al.* aufgeschlossen und die DNA mit dem QIAmp DNA Investigator Kit 50 (Qiagen) extrahiert und aufgereinigt.

### 3.2.12. Digitale droplet PCR

Zur absoluten Quantifizierung der verwendeten Bakteriensuspensionen auf molekularer Ebene wurde die digitale droplet PCR gewählt. Hierbei handelt es sich um eine Abwandlung der PCR, die es durch die Aufteilung der DNA-Moleküle in bis zu 20.000 Tröpfchen ermöglicht, durch die Berechnung mittels Poisson-Verteilung die Kopienanzahl der Zielsequenz pro  $\mu\text{l}$  ohne Eichgrade zu bestimmen. Die PCR-Reaktionen für die Quantifikation von *B. anthracis* und *F. tularensis* waren Taq-Man-Sonden basiert. Bei der PCR von *Y. pestis* wurde der interkalierende Farbstoff EvaGreen gewählt. Die für die PCRs verwendeten Primer- und SONDENSEQUENZEN sind in Tabelle 13 aufgelistet. Bei der PCR für *B. anthracis* handelt es sich um eine in-house PCR (dhp 61) nach Antwerpen *et al.* (Antwerpen *et al.*, 2008), bei der für *F. tularensis* um eine 16S PCR. Die yp48-PCR zum Nachweis und zur Quantifikation von *Y. pestis* wurde nach Chase *et al.* (Chase *et al.*, 2005) durchgeführt.

Wie auch in der real-time PCR wird zunächst der Mastermix hergestellt und anschließend zu der Probe hinzugegeben. Zusammen mit einem Wasser-Öl-Gemisch werden mit Hilfe des Droplet-Generators bis zu 20.000 nanolitergroße Tropfen erzeugt. Hierbei werden die in der Probe vorhandenen DNA-Fragmente auf die einzelnen Tropfen aufgeteilt.

Die generierten Tropfen werden anschließend in eine 96-Well-Platte überführt und in einen PCR-Cycler gegeben. Die jeweiligen Temperaturprofile für die verwendeten PCRs sind Tabelle 14 und Tabelle 15 zu entnehmen. Die einzelnen Tropfen fungieren dabei als eigene Reaktionsgefäße: in jedem einzelnen läuft die PCR-Reaktion ab. Nach abgelaufener PCR-Reaktion werden die Tröpfchen mit Hilfe eines Readers in

PCR-positive (=1) und PCR-negative (=0) separiert und aufgeteilt. Sprich, es werden diejenigen Tröpfchen identifiziert, welche anfangs die Target-DNA beinhaltet haben und welche nicht. Mit Hilfe der Poisson-Verteilung wird eine Kopienzahl pro  $\mu$ l Ausgangs-DNA-Probe berechnet.

Tabelle 13 Primer- und Sondensequenzen der verwendeten PCR

Bakterium	Forward-Primer	Reverse-Primer	Sonde	Referenz
<i>B. anthracis</i>	dhp61_183-113F 5'- CgTAAGgACAATAAA AgCCgTTgT-3'	dhp61_183- 208R 5'- CgATACAgAC ATTTATTggg AACTACAC-3'	TaqMan®-probe dhp61_183-208R-FAM 6-FAM- TgCAATCgATgAgCTA ATgAACAATgACCCT- BHQ1	(Antwerpen et al., 2008)
<i>F. tularensis</i>	Fran_F 5'- gAgCgCAACCCCTAT TgATA	Fran_R 5'- TTTTTgAgTT TCgCTCCA gC T	Fran_TM 5'-6FAM- CTATTgAgACTgCCgC TgACAAGgC--BBQ	(Knüpfer et al., 2020)
<i>Y. pestis</i>	Yp48-F763 5'- gCAggAAATgCgCAAT gC	Yp48-R850 5'- gggCggATCC CCACTTTA	Entfällt (EvaGreen)	(Chase et al., 2005)

Tabelle 14 Thermoprofil ddPCR *F. tularensis*, *B. anthracis*

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit
Aktivierung	95	1	00:10:00
Denaturierung	94	40	00:00:30
Annealing/ Extension	58		00:01:00
Enzym Deaktivierung	98	1	00:10:00
Kühlen	4°C	1	hold



Tabelle 15 Thermoprofil ddPCR *Y.pestis*

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit
Aktivierung	95	1	00:05:00
Denaturierung	95	40	00:00:30
Annealing/ Extension	60		00:01:00
Enzym Deaktivierung	90	1	00:05:00
Kühlen	4°C	1	hold

Bei der anschließenden Berechnung der Kopienanzahl/ml ist es wichtig, Target-Sequenzen in der PCR zu verwenden, welche standardmäßig nur einmal bzw. regelmäßig in einer bestimmten Anzahl im Genom des jeweiligen Bakteriums vorhanden sind. Im Falle von *Y. pestis* wurde die Sequenz yp48 gewählt. Diese befindet sich nicht auf der DNA von den im Erbgut von *Y. pestis* enthaltenen Plasmiden sondern auf dem Genom selber und ist ein sogenanntes „Single-copy-Gen“ (Chase et al., 2005). Ebenso verhält es sich bei der dhp61- PCR von *B. anthracis* (Antwerpen et al., 2008). Bei *F. tularensis* ist die die Teilsequenz der verwendeten 16S PCR dreimal pro Genom vorhanden (Stoddard et al., 2015). Dies wurde in der folgenden Rückrechnung der Anzahl von Kopien/µl berücksichtigt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Quantifizierung mittels Rücktitration und Mikroskopieren

Für jede Versuchsreihe (Nachweisgrenzen der HHTKs sowie Matrixvalidierung) wurden für *Y. pestis* und *F. tularensis* immer frische Kulturen verwendet und anschließend quantifiziert. Für die Versuche mit den Sporen von *B. anthracis* wurde darauf verzichtet, da Sporensuspensionen in flüssiger Lösung bei 4°C lagerungsfähig sind und sich die Sporenkonzentration auch über Wochen nicht verändert.

#### 4.1.1. *Y. pestis*

In Tabelle 16 sind die Werte der Rücktitration mittels Ausplattieren dargestellt. Alle Werte beziehen sich auf den Mc Farland 0,5 (KBE/ml). Bei der Matrixvalidierung erfolgte die Ausplattierung mit der Ausgangsverdünnungsreihe ohne Matrix.

Tabelle 16 Mittelwerte der Rücktitration von *Y. pestis*

Verdünnungsreihen	Mc Farland 0,5 (KBE/ml)
Nachweisgrenze	$2,77 \times 10^5$ /ml
Matrixvalidierung Eistee	$4,33 \times 10^5$ /ml
Matrixvalidierung Joghurt-Salatsoße	$3,71 \times 10^5$ /ml
Matrixvalidierung Milch	$1,9 \times 10^4$ /ml

#### 4.1.2. *F. tularensis*

Die Ausplattierung der Verdünnungsreihen von *F. tularensis* erfolgte sowohl bei den Versuchen zur Ermittlung der Nachweisgrenze als auch bei der Validierung verschiedener Matrices. Die Mittelwerte beider sind in Tabelle 17 zusammengefasst und stellen die KBE pro ml im McFarland 0,5 dar.

Tabelle 17 Mittelwerte der Rücktitration von *F. tularensis*

Verdünnungsreihen	Mc Farland 0,5 (KBE/ml)
Nachweisgrenze	2,17 x 10 <sup>8</sup> /ml
Matrixvalidierung Eistee	3,9 x 10 <sup>8</sup> /ml
Matrixvalidierung Joghurt-Salatsoße	2,27 x 10 <sup>8</sup> /ml
Matrixvalidierung Milch	2,19 10 <sup>8</sup> /ml

#### 4.1.3. *B. anthracis*

Die Quantifizierung der *B. anthracis* Sporen mittels Ausplattieren auf LB-Agar und mikroskopischem Zählen erfolgte im BSL-3 Labor. Die Ergebnisse beider Stämme, Ames und Vollum, sind in Tabelle 18 dargestellt und beziehen sich auf Sporen/ml.

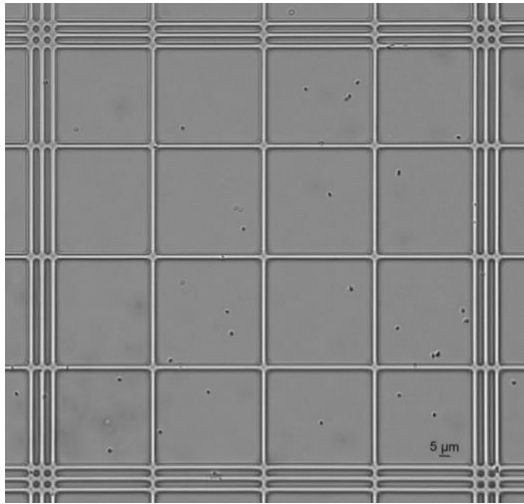
Nach der Inaktivierung und dem Ausschleusen aus dem BSL3-Labor erfolgte eine weitere mikroskopische Auszählung der Sporenpräps. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 18 Mittelwerte der Quantifizierung der virulenten *B. anthracis* Sporen

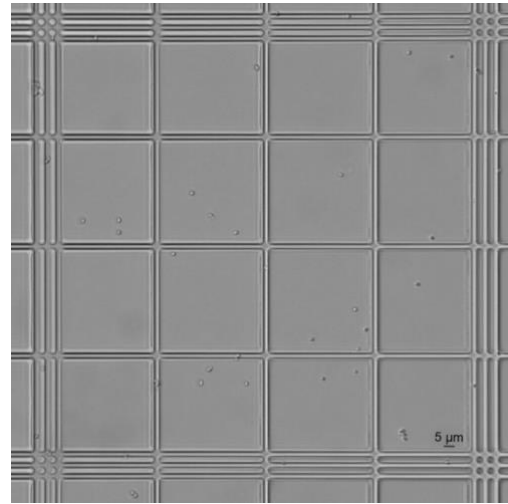
<i>B. anthracis</i> Stamm	Zählkammer	Rücktitration
Vollum	2,34 x 10 <sup>9</sup> /ml	2,39 x 10 <sup>9</sup> /ml
Ames	4,23 x 10 <sup>9</sup> /ml	4,17 x 10 <sup>9</sup> /ml

Tabelle 19 Mittelwerte der mikroskopischen Zählung der inaktivierten *B. anthracis* Sporen

<i>B. anthracis</i> Stamm	Zählkammer
Vollum	1,95 x 10 <sup>9</sup> /ml
Ames	1,99 x 10 <sup>9</sup> /ml



a.



b.

Abb. 4: *inaktivierte Bacillus anthracis Sporen mikroskopisch, 40fache Vergrößerung, die Sporen sind aufgereinigt und separiert. Es sind keine Reste vegetativer Zellen zu sehen. a. Ames, b. Vollum*

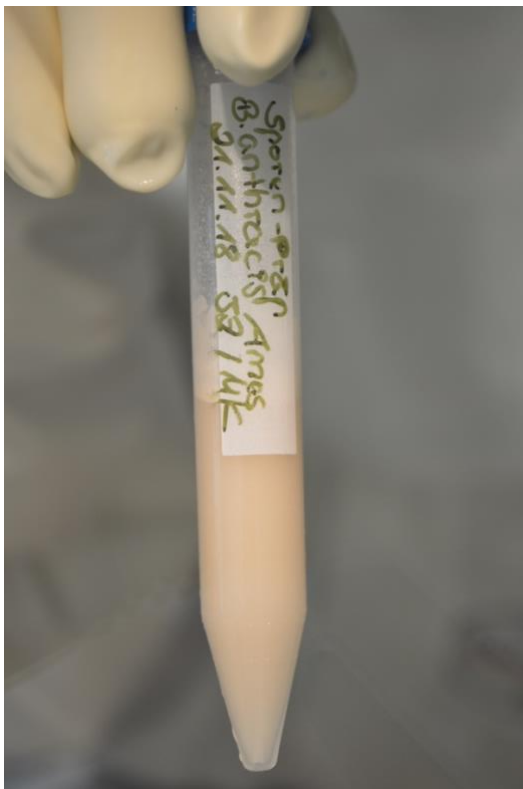


Abb. 5 *Bacillus anthracis Ames Sporen makroskopisch. Es zeigt sich eine trüb-  
milchige Sporensuspension bei einer Konzentration von  $4,23 \times 10^9$  Sporen pro ml.*

#### 4.2. Quantifizierung mittels digitaler droplet PCR

##### 4.2.1. Quantifizierung der nativen Verdünnungsreihen

Die Ergebnisse der digitalen droplet PCR für *Y.pestis* und *F. tularensis* und *B. anthracis* sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 dargestellt und in Kopien/ml angegeben. Die ddPCR von *B. anthracis* wurde mit den inaktivierten, ausgeschleusten Sporensuspensionen durchgeführt.

Tabelle 20 Ergebnis ddPCR Verdünnungsreihen *Y. pestis* und *F. tularensis*

Bakterium	Verdünnung	ddPCR
<i>Y. pestis</i>	McFarland 0,5	$1,37 \times 10^7$
	1:10	$4,6 \times 10^6$
	1:100	$9,6 \times 10^4$
<i>F. tularensis</i>	McFarland 0,5	$3,02 \times 10^8$
	1:10	$7,68 \times 10^6$
	1:100	$8,24 \times 10^5$

Tabelle 21 Ergebnisse ddPCR *B. anthracis* Ames und Vollum in zweifachem Ansatz (A und B)

	Eingesetzt (Sporen/ml)		Kopien pro Ansatz	DNA- Extraktionseffizienz
<i>B. anthracis</i> Ames	$8,12 \times 10^6$	A	$2,81 \times 10^6$	37,68%
	$8,12 \times 10^6$	B	$3,06 \times 10^6$	34,62 %
<i>B. anthracis</i> Vollum	$7,40 \times 10^6$	A	$1,35 \times 10^6$	18,18%
	$7,40 \times 10^6$	B	$1,88 \times 10^6$	25,44%

#### 4.2.2. Ergebnis Verdünnungsreihen Matrixvalidierung

Die Ergebnisse der Quantifizierung mittels ddPCR der Validierung verschiedener Matrizes sind für *Y. pestis* in Tabelle 22, für *F. tularensis* in Tabelle 23 dargestellt. Es wurde jeweils sowohl die Ausgangsverdünnungsreihe als auch die mit Matrix versetzte Verdünnungsreihe getestet. Die Werte beziehen sich auf die Kopienanzahl pro ml. Die Differenzen ergeben sich zum einen durch die 1:1 Verdünnung der Verdünnungsreihe mit der jeweiligen Matrix, zum anderen durch die Schwierigkeit der DNA-Extraktion mit verschiedenen Matrizes.

Tabelle 22 Ergebnis Verdünnungsreihe ddPCR Matrixvalidierung *Y. pestis*

Matrix	Verdünnung	Ergebnis
Eistee	McFarland 0,5	$4,17 \times 10^6$
	1:10	$3,04 \times 10^5$
	1:100	$2,24 \times 10^4$
Ohne Eistee	McFarland 0,5	$1,00 \times 10^7$
	1:10	$1,23 \times 10^6$
	1:100	$1,3 \times 10^5$
Milch	McFarland 0,5	$4,62 \times 10^6$
	1:10	$5,5 \times 10^5$
	1:100	$1,05 \times 10^5$
Ohne Milch	McFarland 0,5	$1,76 \times 10^7$
	1:10	$1,85 \times 10^6$
	1:100	$4,66 \times 10^4$
Joghurt-Salat-Soße	McFarland 0,5	$5,52 \times 10^6$
	1:10	$6,71 \times 10^5$
	1:100	$6,66 \times 10^4$
Ohne Joghurt-Salat-Soße	McFarland 0,5	$2,77 \times 10^7$
	1:10	$3,03 \times 10^6$
	1:100	$2,7 \times 10^5$

Tabelle 23 Ergebnis Verdünnungsreihe ddPCR Matrixvalidierung *F. tularensis*

Matrix	Verdünnung	Ergebnis
Eistee	McFarland 0,5	$4,8 \times 10^7$ (rechnerisch)*
	1:10	$4,8 \times 10^6$
	1:100	$7 \times 10^5$
Ohne Eistee	McFarland 0,5	$1,4 \times 10^8$ (rechnerisch)*
	1:10	$1,4 \times 10^7$ (rechnerisch)*
	1:100	$1,4 \times 10^6$
	1:1000	$1,8 \times 10^5$
Milch	McFarland 0,5	$7,1 \times 10^7$ (rechnerisch)*
	1:10	$7,1 \times 10^6$
	1:100	$9,3 \times 10^5$
	1:1000	$8,6 \times 10^4$
Ohne Milch	McFarland 0,5	$2,4 \times 10^8$ (rechnerisch)*
	1:10	$2,4 \times 10^7$
	1:100	$1,9 \times 10^6$
	1:1000	$2,11 \times 10^5$
Joghurt-Salat-Soße	McFarland 0,5	$4,3 \times 10^7$ (rechnerisch)*
	1:10	$4,3 \times 10^6$
	1:100	$5 \times 10^5$
	1:1000	$7 \times 10^4$
Ohne Joghurt-Salat-Soße	McFarland 0,5	$7,9 \times 10^7/\text{ml}$ (rechnerisch)*
	1:10	$7,9 \times 10^6$
	1:100	$7,7 \times 10^5$
	1:1000	$6,8 \times 10^4$

\*Anmerkung: Da die unverdünnten DNA-Konzentrate (und teilweise die 1:10 Verdünnungen) in der ddPCR aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen nicht auswertbar waren, wurde ausgehend von der nächstniedrigeren Verdünnung hochgerechnet.

### 4.3. Beschreibung der HHTKs

Hinsichtlich der äußeren Beschaffenheit (Größe, Form, Beschriftung, etc.) gibt es wichtige Unterschiede zwischen den getesteten HHTKs.

Vom Hersteller New Horizons Diagnostics wurde mit den SMART II HHTKs ein sehr kleines Format gewählt. Die Verpackung ist sehr kompakt und von außen mit nachzuweisendem Agens, Seriennummer und Haltbarkeitsdatum beschriftet. Auch auf dem Test selbst befindet sich ein Aufkleber mit der Information, welcher Erreger mit dem Test nachgewiesen werden kann. Das Ablesefeld der Test- und Kontrollbande ist dabei relativ klein. Ein Feld für die Beschriftung der Tests ist nicht vorhanden.

Auch der Hersteller Tetracore hat ein eher kleineres Format gewählt. Auf der äußeren Verpackung befinden sich Seriennummer, Haltbarkeitsdatum und der nachzuweisende Erreger. Auf dem Test selber ist der Erreger abermals benannt und zusätzlich eine Chargennummer angegeben. Bei diesen Tests findet man außerdem ein kleines Feld, das für Beschriftungen vorgesehen ist.

Bei den BADD Tests von AdVnt Biotechnologies gibt es ein geriffeltes Feld zum Anfassen. Anders als bei den beiden bereits genannten HHTKs läuft die Probe hier von rechts nach links. Die äußere Verpackung enthält Beschriftung bzgl. Agens, Haltbarkeitsdatum und Seriennummer. Die Verpackung an sich ist verhältnismäßig groß. Innerhalb der ersten Verpackung befindet sich sowohl ein Materialbegleitschein als auch eine weitere, nicht beschriftete Verpackung, in der sich der Test befindet. Anders als bei den drei anderen Herstellern sind die Tests nicht beschriftet, sondern lediglich farblich kodiert: Gelb für Tests für den Nachweis von *F. tularensis*, lila für *Y. pestis* und blau für *B. anthracis*.

Der größte der vier Tests ist der miPROTECT von Miprolab. Wie auch bei den bereits beschriebenen Tests ist die äußere Verpackung mit Seriennummer, Haltbarkeitsdatum und Erreger beschriftet. Auch auf dem Test selber erhält der Benutzer Auskunft über das nachzuweisende Agens. Es gibt ein großes Feld für Beschriftungen und geriffelte Einkerbungen für den Gebrauch mit Handschuhen. Die Tests besitzen ein übersichtliches Ablesefeld. Auch das Feld für das Auftragen der Probe ist groß. Wie auch bei dem BADD Test fließt die Probe von rechts nach links.



Bezüglich der Lagerung ist es ausreichend, die Tests bei Raumtemperatur zu lagern. Alle Tests sind bis zu zwei Jahre haltbar. Die BTA (Tetracore)-Tests sollten zwischen 15-30°C, SMART II (New Horizons) zwischen 2-30°C, miPROTECT (MiproLab) zwischen 4-30°C und BADD (Advnt) zwischen 4-32°C gelagert werden.

#### 4.4. Nachweisgrenzen

##### 4.4.1. Übersicht

Die Nachweisgrenzen aller drei Erreger sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Werte für *F. tularensis* und *Y. pestis* sind dabei basierend auf den Ergebnissen der digitalen droplet PCR. Bei den Stämmen Ames und Vollum von *B. anthracis* basieren die Werte auf der mikroskopischen Auszählung der Ausgangssuspensionen im BSL-3-Labor. Wenn nicht anders angegeben, haben alle drei von drei getesteten LFIA ein positives Ergebnis an der jeweiligen Nachweisgrenze gezeigt.

Tabelle 24 Nachweisgrenzen der getesteten HHTKs

(++ = stark positiv, + = positiv, +/- = schwach positiv, - = negativ)

Bakterium HHTK	<i>Francisella tularensis</i> FSC-237	<i>Yersinia pestis</i> NCTC5923	<i>Bacillus anthracis</i> Ames spores	<i>Bacillus anthracis</i> Vollum spores
BioThreat Alert® Tetracore	$3 \times 10^8$ +/-	$9,62 \times 10^4$ +/-	$4,23 \times 10^9$ ++	$2,34 \times 10^9$ +
BADD™ Advnt	$7,68 \times 10^6$ +/-	$9,62 \times 10^4$ +/-	$4,23 \times 10^7$ +	$2,34 \times 10^7$ +/-
SMART II™ New Horizons Diagnostics	$7,68 \times 10^6$ +	$9,62 \times 10^4$ ++	$4,23 \times 10^7$ ++	$2,34 \times 10^7$ +
miPROTECT® MiproLab	$7,68 \times 10^6$ ++	$9,62 \times 10^4$ +	$4,23 \times 10^9$ – (negativ auch in höchster getesteter Konzentration)	$2,34 \times 10^9$ – (negativ auch in höchster getesteter Konzentration)

#### 4.4.2. Nachweisgrenzen von *Y. pestis*

Die Nachweisgrenzen von *Y. pestis* sind in Tabelle 24 dargestellt.

*Y. pestis* wurde von allen getesteten HHTKs in einer Konzentration von  $9,62 \times 10^4$  Bakterien/ml detektiert. Die Testbanden bei BADD Und BTA waren dabei nur schwach sichtbar, bei miPROTECT war ein eindeutig sichtbares und bei SMART II ein sehr deutliches Signal zu sehen.

#### 4.4.3. Nachweisgrenzen von *F. tularensis*

Die Nachweisgrenzen von *F. tularensis* sind in Tabelle 24 dargestellt.

Die HHTKs von Miprolab (miPROTECT), Advnt (BADD) und New Horizons Diagnostics (SMART II) haben  $7,68 \times 10^6$  Bakterien pro ml nachgewiesen. Das deutlichste Ergebnis zeigte dabei der miPROTECT Test. Der SMART II zeigte ein etwas schwächeres, jedoch deutlich sichtbares Ergebnis, die Testbande bei BADD war gerade noch sichtbar. Der BTA von Tetracore zeigte bei  $3 \times 10^8$  ein schwaches Signal.

#### 4.4.4. Nachweisgrenzen von *B. anthracis* Sporen

Da laut Literatur für unterschiedliche *B. anthracis* Stämme unterschiedliche Nachweisgrenzen beschrieben wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Stämme getestet: Die BSL-3 Stämme Ames und Vollum. Die Sporen von *B. anthracis* Ames wurden von BTA (Tetracore) in einer Konzentration von  $4,23 \times 10^9$ , die von Vollum bei  $2,34 \times 10^9$  Sporen pro ml detektiert. BADD und SMART II wiesen die Sporen bei  $4,23 \times 10^7$  für den Stamm Ames,  $2,34 \times 10^7$  Sporen pro ml für den Stamm Vollum nach. Die Testbande bei Letzterem war dabei nur schwach sichtbar. Bei beiden BSL-3-Stämmen Ames und Vollum war das Detektionslimit für miPROTECT größer als jeweils  $4,23 \times 10^9$  bzw.  $2,34 \times 10^9$  Sporen pro ml. Selbst bei diesen hohen Konzentrationen zeigte der Test keine Testbande.

#### 4.5. Einfluss verschiedener Matrices

##### 4.5.1. Negativkontrollen

In Tabelle 25 und Tabelle 26 sind die Ergebnisse der Negativkontrollen der für die Tests zur Detektion von *Y. pestis* und *F. tularensis* verwendeten Matrices aufgeführt. Auffällig verhielt sich die Matrix Eistee bei der Testung der SMART II Plague und miPROTECT Plague Testkits. Bei beiden konnte ein schwach falsch positives Ergebnis dokumentiert werden. Des Weiteren zeigte der SMART II Tularemia Test bei Joghurt-Soße eine schwache falsch positive Testbande.

Trotz Zugabe von zusätzlichem Probenpuffer konnten die Tests BTA Tularemia und Plague nicht zum adäquaten Ablauf des Tests gebracht werden.

Alle anderen getesteten HHTKs zeigten keine falsch positiven Ergebnisse.

Die Negativkontrollen für die Testkits für die Detektion von *B. anthracis* sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Keine der beiden Matrices produzierte in den verwendeten Tests falsch positive Ergebnisse.

Tabelle 25 Negativkontrollen HHTKs Plague

HHTK	<i>BioThreat Alert®</i> Plague Tetracore	BADD™ Plague AdVnt	SMART II™ Plague New Horizons Diagnostics	miPROTECT® Plague MiproLab
Matrix				
Eistee	-	-	+/-	+/-
Joghurt-Salat- Soße	Nicht valide	-	-	-
Milch	-	-	-	-

Tabelle 26 Negativkontrollen HHTKs Tularemia

HHTK	<i>BioThreat Alert®</i> Tularemia Tetracore	BADD™ Tularemia AdVnt	SMART II™ Tularemia New Horizons Diagnostics	miPROTECT® Tularemia MiproLab
Matrix				
Eistee	-	-	-	-
Joghurt-Salat- Soße	Nicht valide	-	+/-	-
Milch	-	-	-	-

Tabelle 27 Negativkontrollen HHTKs Anthrax

HHTK	<i>BioThreat Alert®</i> Anthrax Tetracore	BADD™ Anthrax AdVnt	SMART II™ Anthrax New Horizons Diagnostics	miPROTECT® Anthrax MiproLab
Matrix				
Bentonit	-	-	-	-
Heroin	-	-	-	-

#### 4.5.2. Eistee

In Tabelle 28 sind die Nachweisgrenzen von Eistee mit *Y. pestis* und *F. tularensis* abgebildet. Zunächst ist festzustellen, dass Eistee keinen Einfluss auf die Lauffähigkeit aller Tests hatte. Die acht evaluierten Tests zum Nachweis von *F. tularensis* und *Y. pestis* liefen direkt nach Auftragen der Probe.

Sowohl der SMART II als auch der miPROTECT Test zur Detektion von *Y. pestis* zeigten in Verbindung mit Eistee falsch positive Ergebnisse. Selbst bei einer 1:10.000 Verdünnung war eine Testbande sichtbar. Der BADD Plague wies mit Eistee versetzt  $6,15 \times 10^5$  Bakterien pro ml nach. Verglichen mit der Nachweisgrenze ohne Matrix ( $9,62 \times 10^4$  +/-) war hier eine Verschlechterung bzw. eine höhere Nachweisgrenze zu vermerken. Gleiches gilt für den BTA Plague von Tetracore. Hier lag die Nachweisgrenze von *Y. pestis* mit Eistee bei  $6,15 \times 10^5$ , wobei die Testbande am Detektionslimit stärker ausgeprägt war als bei BADD. Vergleicht man diese Nachweisgrenze mit der ohne Matrix ( $9,62 \times 10^4$  +/-) ist hier auch eine höhere Nachweisgrenze festzustellen als ohne Eistee.

Die Nachweisgrenzen der HHTKs BTA und BADD zum Nachweis von *F. tularensis* lag jeweils bei  $7 \times 10^7$ . Die Nachweisgrenze von BTA ohne Matrix ( $3 \times 10^8$  +/-) lag höher als die Testung mit Eistee.

Vergleicht man die Nachweisgrenzen beim BADD Tularemia mit und ohne Eistee ( $7,68 \times 10^6$  +/-) miteinander, sieht man, dass sich die Nachweisgrenze nach Zugabe von Eistee von etwa einer Log-Stufe verschlechtert hat.

Die Lateral Flow Immunoassays SMART II und miPROTECT detektierten in Verbindung mit Eistee jeweils  $7 \times 10^6$  Bakterien pro ml. Verglichen mit der Nachweisgrenze von SMART II und miPROTECT ohne Eistee ( $7,68 \times 10^6$ + bzw.  $7,68 \times 10^6$ ++) zeigt sich, dass Eistee bei beiden Testeinheiten keinen relevanten Einfluss auf die Nachweisgrenze ausübt.

Tabelle 28 Nachweisgrenzen Eistee

<b>Eistee</b>	<i>BioThreat Alert</i> ® Tetracore	BADD™ AdVnt	SMART II™ New Horizons Diagnostics	miPROTECT® Miprolab
<b><i>Y. pestis</i></b>	6,15 x 10 <sup>5</sup> ++	6,15 x 10 <sup>5</sup> +	Falsch positiv	Falsch positiv
<b><i>F. tularensis</i></b>	7 x 10 <sup>7</sup> + (rechnerisch)	7 x 10 <sup>7</sup> + (rechnerisch)	7 x 10 <sup>6</sup> (rechnerisch)	7 x 10 <sup>6</sup> (rechnerisch)

#### 4.5.3. Joghurt-Salat-Soße

In Tabelle 29 sind die Nachweisgrenzen von mit *Y. pestis* und *F. tularensis* versetzter Salatsoße abgebildet.

Da Joghurt-Salatsoße eine sehr visköse Matrix darstellt, wurden die Proben für die Validierung des BTA Tetracore Tests für den Nachweis von *Y. pestis* und *F. tularensis* neben der 1:1 Verdünnung mit Probenpuffer zusätzlich mit bis zu 3 Tropfen Probenpuffer versetzt, um die Schnelltests zum adäquaten Ablaufen zu bringen. Weder die BTA Tularemia noch die BTA Plague- Tests konnten unter diesen Umständen zum adäquaten Ablaufen gebracht werden.

Bei den drei Tests BADD Plague, SMART II sowie miPROTECT Test zum Nachweis von *Y. pestis* zeigte sich in Verbindung mit Joghurt-Salatsoße eine Nachweisgrenze von 1,35 x 10<sup>5</sup> Bakterien/ml. Im Vergleich mit der Nachweisgrenze ohne Matrix (bei allen drei Testsystemen 9,62 x 10<sup>4</sup>) wurde ersichtlich, dass die Joghurt-Salatsoße auf die drei Tests maximal einen sehr geringen Einfluss hat.

Bei der Validierung der Schnelltests zur Detektion von *F. tularensis* zeigt sich, dass die Auswirkung von Joghurt-Salatsoße auf die Nachweisgrenze für BADD und miRPOTECT Tularemia so stark ist, dass trotz validen Abläufen selbst die höchste Konzentration von 3,95 x 10<sup>7</sup> Bakterien pro ml nicht erkannt wird. Anders verhielt es sich bei dem SMART II Tularemia. Hier zeigten sich falsch positive Testbanden bis zur höchsten Verdünnungsstufe. Die Negativkontrolle (nur Joghurt-Salatsoße) bestätigte dieses Ergebnis und zeigte eine schwach positive Testbande (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 29 Nachweisgrenzen Joghurt-Salatsoße

Joghurt-Salat-Soße	BioThreat Alert® Tetracore	BADD™ AdVnt	SMART II™ New Horizons Diagnostics	miPROTECT® Miprolab
<b><i>Y. pestis</i></b>	Nicht valide	1,35 x 10 <sup>5</sup> +	1,35 x 10 <sup>5</sup> +	1,35 x 10 <sup>5</sup> +/-
<b><i>F. tularensis</i></b>	Nicht valide	3,95 x 10 <sup>7</sup> -	Falsch positiv	3,95 x 10 <sup>7</sup> -

#### 4.5.4. Milch

In Tabelle 30 sind die Nachweisgrenzen der getesteten HHTKs zum Nachweis von *Y. pestis* und *F. tularensis* nach Zugabe von Milch abgebildet.

Beim BTA Plague zeigte sich bei der höchsten Konzentration von  $8,8 \times 10^6$  Bakterien/ml nur bei einem von drei Tests ein schwach positives Ergebnis. Die Auswirkung der Milch war in diesem Fall stark: Im Vergleich der Nachweisgrenze ohne Matrix ( $9,62 \times 10^4$  pro ml) zeigte sich eine um mindestens 2 log Stufen höhere Nachweisgrenze.

Bei den drei weiteren Tests BADD, SMART II und miPROTECT konnte *Y. pestis* bis zu einer Konzentration von  $9,3 \times 10^5$ /ml detektiert werden. miPROTECT und SMART II zeigten dabei ein eindeutig positives Ergebnis, BADD wies eine schwach positive Testbande auf. Bei allen drei Tests bewirkte die Zugabe von Milch eine Erhöhung der Nachweisgrenze um etwa eine Log-Stufe (Vgl. Nachweisgrenzen von alle drei HHTKs ohne Matrix  $9,62 \times 10^4$ /ml).

Der BTA Tularemia Test wies in Verbindung mit Milch eine Nachweisgrenze von  $1,2 \times 10^8$  Bakterien/ml auf. Im Vergleich mit der Nachweisgrenze ohne Milch ( $3 \times 10^8$ /ml) zeigt sich, dass in diesem Fall Milch keinen Einfluss auf die Nachweisgrenze hat.

Die drei Tests BADD, SMART II und miPROTECT hatten eine Nachweisgrenze von  $1,2 \times 10^7$ /ml. Bei allen drei Tests verschob sich die Nachweisgrenze gering nach oben (vgl.  $7,68 \times 10^6$ /ml ohne Matrix).

Tabelle 30 Nachweisgrenzen Milch

Milch	BioThreat Alert®	BADD™	SMART II™	miPROTECT®
	Tetracore	AdVnt	New Horizons Diagnostics	Miprolab
<b><i>Y. pestis</i></b>	8,8 x 10 <sup>6</sup> (1/3) +/-	9,3 x 10 <sup>5</sup> +/-	9,3 x 10 <sup>5</sup> +	9,3 x 10 <sup>5</sup> +
<b><i>F. tularensis</i></b>	1,2 x 10 <sup>8</sup> + (rechnerisch)	1,2 x 10 <sup>7</sup> +/-	1,2 x 10 <sup>7</sup> +	1,2 x 10 <sup>7</sup> +

#### 4.5.5. Bentonit

Um den Einfluss von Bentonit auf die Schnelltests zu überprüfen, wurden jeweils 30 mg Bentonit mit 1500 µl der jeweiligen Verdünnung vermengt (Endkonzentration von 20mg/ml). Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 für beide Stämme Ames und Vollum dargestellt.

Beim BTA (Tetracore) zum Nachweis von *B. anthracis* zeigte sich, dass Bentonit, getestet mit dem Stamm Ames, keinen Einfluss auf das Detektionslimit hat (vgl. Detektionslimit 4,23 x 10<sup>9</sup>). Die Testbande war bei der Testung mit Bentonit lediglich schwächer als bei der Testung ohne Matrix.

Beim BADD Test von AdVnt hat sich die Nachweisgrenze von *B. anthracis* Ames mit Bentonit um eine Log-Stufe von 4,23 x 10<sup>7</sup> auf 4,23 x 10<sup>8</sup> Sporen pro ml nach oben verschoben.

Beim SMART II konnte bei einer Konzentration von *B. anthracis* Ames von 4,23 x 10<sup>8</sup>/ml ein stark positives Ergebnis erzielt werden. Bei 4,23 x 10<sup>7</sup> Ames Sporen pro ml wurde nur einer der im Triplikat getesteten Tests positiv. Hier ist anzunehmen, dass Bentonit die Detektionsgrenze wie bei BADD nach oben verschiebt. Ebenso wie bei der Testung ohne Matrix konnten die Sporen von dem Stamm Ames mit einer Konzentration von 4,23 x 10<sup>9</sup> Sporen/ml von miPROTECT nicht erkannt werden.

Bei der Testung des *B. anthracis* Vollum Stammes wurde eine Konzentration von 2,34 x 10<sup>9</sup>/ml nur von einem der in Triplikat getesteten BTA Tetracore Tests erkannt.

Ebenso verhielt es sich beim SMART II Test. Hier wurden die Vollum Sporen von 2,34 x 10<sup>8</sup>/ml nur von einem der drei Tests erkannt, bei 2,34 x 10<sup>9</sup>/ml erschien ein eindeutig



positives Ergebnis. Der Einfluss von Bentonit bedingt hier eine Verschiebung des Detektionslimits um mindestens eine Log-Stufe. Sowohl BADD als auch miPROTECT konnten eine Konzentration von  $2,34 \cdot 10^9$ /ml Vollum-Sporen nicht erkennen. Das Detektionslimit von BADD hat sich somit um mindestens zwei log-Stufen verschlechtert.

Tabelle 31 Nachweisgrenzen Bentonit

<b>Bentonit</b>	<i>BioThreat Alert®</i>	BADD™	SMART II™	miPROTECT®
	Tetracore	AdVnt	New Horizons Diagnostics	Miprolab
<b><i>B. anthracis</i> Ames</b>	$4,23 \cdot 10^9$ +/-	$4,23 \cdot 10^8$ +	$4,23 \cdot 10^8$ ++ $4,23 \cdot 10^7$ (1/3) +	$4,23 \cdot 10^9$ -
<b><i>B. anthracis</i> Vollum</b>	$2,34 \cdot 10^9$ (1/3) +	$2,34 \cdot 10^9$ -	$2,34 \cdot 10^8$ (1/3) +	$2,34 \cdot 10^9$ -

#### 4.5.6. Heroin

Da es in der Vergangenheit zu Fällen von Milzbrand-Infektionen bei Heroinsüchtigen gekommen ist, stellt Heroin eine relevante Substanz dar, welche Einfluss auf das Testergebnis von HHTKs haben könnte. Wie auch Bentonit ist Heroin eine pulverartige Matrix und könnte die Poren des sample pads verstopfen. Bei Bedarf wurde hier durch Umrühren innerhalb des sample pads nachgeholfen.

Der Einfluss der Matrix Heroin wurde anhand beider in dieser Arbeit verwendeten *B. anthracis* Stämmen Ames und Vollum untersucht.

Es wurden jeweils 30 mg Heroin mit 1500 µl der jeweiligen Verdünnung vermengt (Endkonzentration von 20 mg/ml) und anschließend auf die Tests aufgetragen.

Bei allen getesteten Herstellern zeigte sich, dass Heroin bei beiden getesteten Stämmen keinen relevanten Einfluss auf die Nachweisgrenze hat. Lediglich die Testbande zeigte sich bei BTA (Tetracore) und SMART II (New Horizons Diagnostics) bei der Testung von Ames etwas schwächer als ohne Heroin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32 Nachweisgrenzen Heroin

<b>Heroin</b>	<i>BioThreat Alert</i> ® Tetracore	BADD™ AdVnt	SMART II™ New Horizons Diagnostics	miPROTECT® Miprolab
<b><i>B. anthracis</i> Ames</b>	4,23 x 10 <sup>9</sup> +	4,23 x 10 <sup>7</sup> +	4,23 x 10 <sup>7</sup> +	4,23 x 10 <sup>9</sup> -
<b><i>B. anthracis</i> Vollum</b>	2,34 x 10 <sup>9</sup> +	2,34 x 10 <sup>7</sup> +/-	2,34 x 10 <sup>7</sup> +	2,34 x 10 <sup>9</sup> -

## 5. Diskussion

### 5.1. Bewertung der Praktikabilität

Zwar funktionieren grundsätzlich alle evaluierten Lateral Flow Immunoassays nach dem gleichen Prinzip, allerdings unterscheiden sie sich deutlich hinsichtlich ihrer äußeren Beschaffenheit in Größe, Form, Farbe und Verpackung.

Für die Beurteilung und Bewertung der jeweiligen Beschaffenheit ist es von Bedeutung, sich des primären Einsatzgebietes der HHTKs bewusst zu sein. Sie werden von zivilen und militärischen Einsatzkräften oder „Sampling Teams“ vieler Nationen für den Gebrauch im Feld, z.B. einer potenziellen Gefahrenlage bei Verdacht auf Einsatz eines biologischen Kampfstoffes, verwendet. Die Tests sind explizit für den Gebrauch von Umweltproben und nicht für Patientenmaterial vorgesehen. Einsatzkräfte dieser Art tragen in der Regel einen schweren Schutzanzug und können eine nur begrenzte Auswahl an Probenahme-Material und Ausrüstung in die sogenannte „Hot Zone“ (den potenziell kontaminierten Bereich) mitnehmen. Das bedeutet, dass es von Vorteil ist, wenn die HHTKs klein, leicht, und mit geringem Volumen verpackt sind. Auf der anderen Seite erfolgt der Gebrauch in großen Butylhandschuhen, so dass das Handling von tendenziell größeren Tests leichter ist. Die vier hier getesteten Schnelltestmodelle unterscheiden sich deutlich in Bezug auf diese Aspekte.

Das sehr kleine Format der Tests vom Hersteller New Horizons Diagnostics (SMARTII) ist ambivalent zu bewerten. Einerseits spart es durch die kompakte Verpackung und die kleinen Tests Platz, auf der anderen Seite könnte das Handling, wie oben beschrieben, durch den Gebrauch von dicken Butylhandschuhen deutlich erschwert sein. Des Weiteren ist das Ablesefeld der Test- und Kontrollbande relativ klein und unter Umständen bei widrigen Lichtverhältnissen schwer abzulesen. Sollte es beim Einsatz im Feld mehrere zu testende Umweltproben geben, könnte es sich auch nachteilig auswirken, dass es kein Feld zur Beschriftung gibt.

Hier grenzen sich die Tests von Tetracore ab. Zwar sind die Tests an sich auch eher klein, doch gibt es ein Feld, das für Beschriftungen vorgesehen ist und so die Möglichkeit bietet, mehrere Proben im Feld parallel und geordnet zu testen.

Ein Vorteil der BADD Tests von Advnt Biotechnologies ist, dass sich auf den Tests ein geriffeltes Feld zum Anfassen befindet. Die Tatsache, dass die Tests zur Detektion der verschiedenen Erreger nur farblich kodiert sind, könnte zu Verwechslungen und Fehlern führen. Außerdem wird durch die doppelte Verpackung viel Müll produziert, der im Einsatzfall als potenziell kontaminiert angesehen und somit vorschriftsgemäß entsorgt werden muss.

Insgesamt sind die miPROTECT-Tests von MiproLab hinsichtlich der äußeren Beschaffenheit hervorzuheben. Die Größe der Tests erleichtert das Arbeiten deutlich. Folgende Faktoren tragen besonders dazu bei: das große Feld für Beschriftungen, die geriffelte Einkerbung für den Gebrauch mit Handschuhen, das große übersichtliche Ablesefeld und das große „Sample pad“ zum Auftragen der Proben.

Betrachtet man lediglich die äußere Beschaffenheit und das Handling, sind die Tests von MiproLab den anderen Tests vorzuziehen.

Insgesamt müssen aber alle genannten Vor- und Nachteile der Beschaffenheit und Verpackung mit den Nachweisgrenzen und den Ergebnissen in Bezug auf verschiedene Matrizes der jeweiligen Tests abgewogen werden.

## 5.2. Nachweisgrenzen vorherigen Studien

Zusammengefasst in Tabelle 33 sind die Nachweisgrenzen der vorhergehenden Veröffentlichungen im Vergleich mit den in dieser Arbeit erzielten Daten. Der Vergleich der Literatur zeigt, dass sich bereits mehrere Veröffentlichungen mit der Nachweisgrenze von HHTKs zur Detektion von *B. anthracis* Sporen beschäftigt haben (Bartholomew et al., 2017; King et al., 2003; Peckham et al., 2013; Ramage et al., 2016; Zasada et al., 2015).

Bezüglich der Evaluation der Tests zum Nachweis von *F. tularensis* und *Y. pestis* gibt es keine klare Datenlage. Zwar wurden von Zasada et al. Tests von drei verschiedenen Herstellern (Tetracore, New Horizons Diagnostics, AdvNt) zum Nachweis von *Y. pestis* und von zwei verschiedenen Herstellern (Tetracore, New Horizons Diagnostics) zum Nachweis von *F. tularensis* hinsichtlich der Nachweisgrenze untersucht, doch wurden hier die benutzten Bakteriensuspensionen vor Gebrauch inaktiviert. Das Kulturmaterial

von *Y. pestis* und *F. tularensis* wurde dabei für mindestens 22 Stunden auf 60°C erhitzt. *B. anthracis* wurde mit 1%iger Peressigsäure für 30 Minuten inaktiviert (Zasada et al., 2015).

Diese Inaktivierungsprozesse können die Oberflächenproteine der Bakterien, welche durch die spezifischen Antikörper der LFA detektiert werden, verändern. Ob sie verändert werden und wenn ja, wie stark, hängt dabei von der jeweiligen Oberflächenstruktur ab.

Bei den Tests zur Detektion von *Y. pestis* werden Antikörper gegen das F1-Antigen verwendet. Bei dem F1-Antigen, welches Teil der Kapsel ist, handelt es sich um ein Oberflächenpolymer, welches aus mehreren Caf1-Protein-Untereinheiten besteht und auf dem 100 kb-Plasmid pMT1 codiert ist (Du et al., 2002). Verglichen mit den Ergebnissen von Zasada et al. sind die Nachweisgrenzen für Tests zum Nachweis von *Y. pestis* mit den lebenden BSL-3 Stämmen bei BTA (Tetracore) und SMART II (New Horizons Diagnostics) um mindestens 2 Log-Stufen, beim BADD (AdVnt) um 3 Log-Stufen niedriger. Zwar konnten Chalton et al. (Chalton et al., 2006) zeigen, dass das F1-Antigen erst bei Temperaturen um die 80°C anfängt, sich zu entfalten, doch könnte es durchaus sein, dass es sich auch nach 22 Stunden langer Einwirkung von 60°C verändert und zumindest teilweise entfaltet. Die dadurch veränderten Epitope könnten so nicht mehr adäquat von den Antikörpern der Schnelltests erkannt werden. Die Unterschiede in den in dieser Arbeit erzielten Nachweisgrenzen zu den von Zasada et al. könnten zumindest teilweise durch diesen Effekt verursacht sein. Um dies mit abschließender Sicherheit zu verifizieren, könnte in zukünftigen Studien die Validierung der benutzten Schnelltests mit hitzeinaktivierten Bakteriensuspensionen im direkten Vergleich mit lebenden Bakteriensuspensionen gleicher Konzentration durchgeführt werden. Zusammenfassend ist eine Untersuchung der Schnelltests mit nicht-inaktivierten Erregern näher an der Realität und somit immer der Testung mit inaktiviertem Material vorzuziehen. In einem Bedrohungsszenario würden lebende, virulente Erreger ausgebracht werden. Dies sollte somit unbedingt in vorhergehenden Untersuchungen abgebildet sein.

Ein weiterer Faktor, der bei den unterschiedlichen Nachweisgrenzen von *Y. pestis* von Bedeutung sein könnte, ist die quantitativ unterschiedliche F1-Antigen-Produktion

durch verschiedene Stämme. Dies zeigt sich auch daran, dass die Kolonien verschiedener Stämme unterschiedlich lange Fäden an der Impföse ziehen. In der Folge würde das bedeuten, dass ein Stamm, welcher quantitativ mehr F1-Antigen produziert, eine niedrigere Nachweisgrenze hat als ein solcher, welcher insgesamt weniger davon produziert. Auch dies könnte in zukünftigen Studien in direkter Gegenüberstellung von verschiedenen Stämmen überprüft werden. Aufgrund der Neuartigkeit der Datenerhebung habe ich mich für die Evaluierung zunächst auf nur einen Typstamm der ATCC beschränkt.

Anders verhielt es sich bei *F. tularensis*. Hier waren sowohl beim BTA Tularemia (Tetracore) als auch beim SMART II (New Horizons Diagnostics) die Nachweisgrenzen vergleichbar mit denen von Zasada et al. (Vgl. Tabelle 33).

Zwar gibt es von den Herstellern keine Informationen darüber, welches Antigen detektiert wird, doch ist davon auszugehen, dass es sich dabei um das LPS von *F. tularensis* handelt. Das LPS, bestehend aus O-Antigen, Core-Polysaccharid und Lipid-A, ist Bestandteil der äußeren Zellmembran (Miller et al., 2005) und ist maßgeblich an der Ausbildung einer Immunität von Mäusen gegen Infektionen mit *F. tularensis* beteiligt (Fulop et al., 1995). Für die Ausbildung eines (Impf-)Schutzes von Säugetieren gegen den Erreger nach LPS-Gabe ist es von fundamentaler Bedeutung, dass die Antigenstruktur des eingesetzten LPS der realen Struktur entspricht. Mehrere Studien, die sich mit der immunogenen Wirkung von reinem LPS beschäftigt haben (Dreisbach et al., 2000; Fulop et al., 1995), benutzten zur Aufreinigung des LPS von *F. tularensis* die „hot phenol“-Methode von Westphal und Luderitz. Bei dieser Methode werden Temperaturen von 65-68°C angewendet, um das LPS zu extrahieren und aufzubereiten (Westphal, 1952). Da in den Studien von Dreisbach et al. und Fulop et al. gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit auf diese Art und Weise aufgereinigtem LPS Immunität gegen Infektionen mit *F. tularensis* bietet, ist somit indirekt bewiesen, dass LPS auch bei Temperaturen von bis zu 68°C stabil bleibt. Es ist also nicht überraschend, dass die Nachweisgrenzen für Tests zur Detektion von *F. tularensis* von Zasada et al. mit den Nachweisgrenzen aus dieser Untersuchung vergleichbar sind.

Bezüglich des detektierten Antigens zum Nachweis von *B. anthracis* Sporen gibt es durch die Hersteller oder in der Literatur keine Daten. Prinzipiell sind die Sporen von

*B. anthracis* von innen nach außen in den folgenden Schichten aufgebaut: das Innere besteht aus dem Kern („core“). Hier befindet sich das Erbgut, welches durch die darauffolgenden Schichten geschützt wird. Die ihn direkt umgebende Schicht aus Peptidoglykan („Cortex“) spielt in der Resistenz gegen Hitze eine Rolle. Die darauffolgende Schicht („Coat“) besteht hauptsächlich aus Proteinen und ist ebenso für die Beständigkeit gegen widrige Einflüsse unabdingbar (Nicholson et al., 2000; Nicholson, 2004). Die äußerste Schicht der Sporen des Milzbranderreger ist das sogenannte Exosporium. Es handelt sich um eine lockere, die Spore ballonartig umgebende Schicht (Aronson, 1976; Chada et al., 2003; Giorno et al., 2007; Holt & Leadbetter, 1969). Sie ist untergliedert in eine Basal- und in eine faserige Glykoproteinschicht (Beaman et al., 1972; DesRosier & Lara, 1981; Gerhardt & Ribi, 1964). Die Fasern dieser äußersten Schicht bestehen aus multiplen kollagenartigen Glykoproteineinheiten (BclA) (Sylvestre et al., 2003). Verbunden mit den Proteineinheiten ist das Oligosaccharid Anthrose. Dieses für den Milzbranderreger spezifische Molekül hat im Tierversuch bei Hasen immunogene Eigenschaften gezeigt (Mehta, 2006). Da Anthrose sowohl für *B. anthracis* spezifisch ist (Mehta, 2006) als auch Teil der äußersten Schicht der Spore ist, ist es denkbar, dass es sich hier um das durch die Schnelltests detektierte Antigen handelt. Die Struktur des Exosporiums (Henriques & Moran, 2007) und die Länge der Fasern aus BclA - somit auch die Anzahl der Anthrose Moleküle - variiert zwischen den Stämmen von *B. anthracis* deutlich (Castanha, 2006; Sylvestre et al., 2003). Dies könnte für die in der Literatur beschriebenen, teilweise starken Unterschiede der Nachweisgrenzen zwischen verschiedenen Stämmen verantwortlich sein. Sowohl der Hersteller AdVnt als auch verschiedene vorhergehende Veröffentlichungen beschreiben solche Unterschiede (Bartholomew et al., 2017; Ramage et al., 2016). So liegt zum Beispiel die Nachweisgrenze bei BTA (Tetracore) von *B. anthracis* Ames 35 bei  $10^8$  (Bartholomew et al., 2017), während der gleiche Test beim Stamm Pasteur (CDC BC3132)  $10^6$  nachweist (King et al., 2003). Um diese Unterschiede zu verifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene BSL-3 Stämme, Ames und Vollum, hinsichtlich der Nachweisgrenze untersucht. Anders als Bartholomew et al. und Ramage et al. konnten wir für keinen der getesteten Schnelltests Unterschiede zwischen den beiden Stämmen feststellen. Denkbar ist deshalb, dass diese beiden Stämme einen sehr ähnlichen Aufbau des Exosporiums besitzen. Es wäre wichtig, die Länge der BclA-Fasern zwischen den verschiedenen für die Schnelltest-Validierung eingesetzten

Stämmen von *B. anthracis* in zukünftigen Studien eingehend zu untersuchen, um den beschriebenen Effekt weiter aufklären zu können.

Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass die äußere Beschaffenheit von Sporen auch von äußeren Einflüssen wie Hydratation oder Anzuchtbedingungen der Sporen abhängig sein kann (Chalton et al., 2006; Melly et al., 2002). Da in den verschiedenen Veröffentlichungen auch unterschiedliche Medien verwendet wurden, kann auch dies ein Faktor sein, der bei den variierenden Nachweisgrenzen eine Rolle spielen könnte. In folgenden Untersuchungen könnte durch direkten Vergleich unterschiedlich angezogener Sporen der Einfluss der Anzuchtbedingungen und Anzuchtmedien auf die Nachweisgrenzen weiter untersucht werden.

Um einen möglichen Einfluss von Inaktivierungschemikalien wie Peressigsäure auszuschalten, sollten solche Untersuchungen entweder mit lebenden Sporen durchgeführt werden oder zumindest solche Inaktivierungsmethoden gewählt werden, die keine Veränderung der Moleküle des Exosporiums verursachen. Als in vorhergehenden Studien bewährte Methode sei hier die Inaktivierung von Sporen durch Bestrahlung erwähnt (Hilsen et al., 2005).



Tabelle 33 Metaanalyse Nachweisgrenzen

Bakterium	Quelle/ Stamm	1.Inaktivierung 2.Quantifizierung	BTA	BADD	SMART II	miPROTECT
<i>Y. pestis</i>	Herstellerangaben/ k.A.	k.A.	k.A.	1 x 10 <sup>5</sup> cfu/ml	k.A.	k.A.
	Zasada et al. EV 76 (Zasada et al., 2015)	1. Ja 2. Zählkammer, real-time PCR	10 <sup>7</sup> /ml (+/-)	10 <sup>8</sup> /ml (+)	10 <sup>6</sup> /ml (+/-)	n.t.
	Prentice et al. (Prentice et al., 2019) CO99-3015 A1122	1. Nein 2. Ausplattieren und OD	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> *	nt	nt	nt
	IMB	1. Nein 2. ddPCR	9,62 x 10 <sup>4</sup> +/-	9,62 x 10 <sup>4</sup> +/-	9,62 x 10 <sup>4</sup> ++	9,62 x 10 <sup>4</sup> +
<i>F. tularensis</i>	Herstellerangaben	1. k.A. 2. k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
	Zasada et al ATCC 6223 (F. tul. tul) (Zasada et al., 2015)	1. Ja 2. Zählkammer, real-time PCR	10 <sup>8</sup> /ml (+/-)	n.t.	10 <sup>7</sup> /ml (+/-)	n.t.
	IMB	1. Nein 2. Ausplattieren, ddPCR	3 x 10 <sup>8</sup> +/-	7,68 x 10 <sup>6</sup> +/-	7,68 x 10 <sup>6</sup> +	7,68 x 10 <sup>6</sup> ++
<i>B. anthracis</i> Sporen	Herstellerangaben BADD: Vollum, Ames, Sterne, New Hampshire	1. k.A. 2. k.A.	k.A.	1.5 x 10 <sup>4</sup> - 8.3 x 10 <sup>8</sup> /ml	k.A.	k.A.
	Zasada et al UD III/7 (Zasada et al., 2015)	1. Ja 2. Zählkammer, real-time PCR	10 <sup>8</sup> /ml (+/-)	10 <sup>8</sup> /ml (- )	10 <sup>8</sup> /ml (+/-)	n.t.
	King et al Pasteur (CDC BC 3132) (King et al., 2003)	1. Nein BSL-2 Stamm 2. Ausplattieren	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	n.t.
	Bartholomew et al 34F2 Ames35 Weybridge (Bartholomew et al., 2017)	1. Nein Nur BSL-2 Stämme 2. Ausplattieren	10 <sup>8</sup> (2/3) 10 <sup>8</sup> (3/3) 10 <sup>8</sup> (1/3)	10 <sup>8</sup> (3/3) 10 <sup>7</sup> (3/3) >10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup> (3/3) 10 <sup>7</sup> (3/3) 10 <sup>7</sup> (1/3); 10 <sup>8</sup> (0/3)	n.t.
	Ramage et al Sterne  Ames (Ramage et al., 2016)	1. Nein Nur BSL-2 Stämme 2. Ausplattieren	4,3 x 10 <sup>5</sup> cfu/ml 1,4 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	n.t.	n.t.	n.t.
	Peckham et al Sterne (Peckham et al., 2013)	1. Nein BSL-2 Stamm 2. Ausplattieren	5 x 10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	n.t.
	IMB Ames  Vollum	1. Nein 2. Ausplattieren, Mikroskopieren, ddPCR	4,23x10 <sup>9</sup> ++ 2,34x10 <sup>9</sup> +	4,23x10 <sup>7</sup> + 2,34x10 <sup>7</sup> +/-	4,23x10 <sup>7</sup> ++ 2,34x10 <sup>7</sup> +	4,23 x 10 <sup>9</sup> -  2,34 x 10 <sup>9</sup> -

\* Abhängig vom analysierten Stamm. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines Auslesegeräts erzielt, was normalerweise zu besseren Nachweisgrenzen führte.

Ein weiterer Punkt, der entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse hat, ist die Art und Weise der Quantifizierung der verwendeten Bakterien/ Sporensuspensionen. Prinzipiell ist eine Quantifizierung von Zellzahlen auf verschiedene Weisen denkbar. Zum einen ist hier die Quantifizierung mittels Rücktitration auf Agarplatte zu nennen. Diese Methode stellt in der Mikrobiologie eine weit verbreitete und bewährte Methode der Quantifizierung dar. Jedoch werden dabei nur diese Bakterien erfasst, welche wachstumsfähig sind. Solche, die zwar von den Schnelltests detektiert wurden und somit zu der eigentlichen Nachweisgrenze beigetragen haben, aber nicht mehr in der Lage sind, sich zu vermehren, werden bei dieser Methode nicht mitquantifiziert.

Eine andere Möglichkeit der Quantifizierung stellt die quantitative PCR mit Eichkurve sowie die ddPCR dar. Beide Methoden haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität. Insbesondere ist hierbei die digitale droplet PCR hervorzuheben. Im Vergleich zur real time PCR ist die Anfertigung einer Eichgerade mit dieser Methode nicht notwendig und eine Quantifizierung erfolgt durch Berechnung mithilfe der Poisson-Verteilung. Zwar sind die Ergebnisse mittels dieser Methode sehr genau, doch hängt das Ergebnis dabei stark von der Effizienz der DNA-Extraktion ab. Insbesondere bei den Sporen grampositiver Bakterien (hier *B. anthracis*) ist eine Extraktion der DNA herausfordernd (Coyne et al., 2004). Dies wird auch durch die Ergebnisse der ddPCR von *B. anthracis* Ames und Vollum unterstrichen. Zwar wurden bei der DNA-Extraktion  $7,4 \times 10^6$  (Ames) bzw.  $8,12 \times 10^6$  (Vollum) Sporen in der ddPCR eingesetzt, doch konnten nach dem Versuch des Crushens der Sporen und der DNA-Extraktion nach einem hausinternen Protokoll nach Knüpfer et al. lediglich  $2,81 \times 10^6$  (A) bzw.  $3,06 \times 10^6$  (B) (Ames) bzw.  $1,35 \times 10^6$  (A) bzw.  $1,88 \times 10^6$  (B) (Vollum) Kopien nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Extraktions-Effizienz von nur 37,68% (A) bzw. 34,63% (B) (Ames) bzw. 18,18% (A) bzw. 25,44% (B) (Vollum). Hier zeigt sich, wie unzulänglich das in-house Verfahren/ Protokoll bislang ist und wie wichtig weitere Forschung in diesem Bereich ist.

Prinzipiell sollte die Quantifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Erreger auf zwei voneinander unabhängigen Methoden erfolgen.

Bei *F. tularensis* und *Y. pestis* erfolgte die Quantifizierung einerseits über die Rücktitration auf Platte, andererseits mittels digitaler droplet PCR. Die Werte bei *F. tularensis* für den McFarland 0,5 weichen zwischen Rücktitration auf HC-Agar und

digitaler droplet PCR nur geringfügig voneinander ab (Vgl. Tabelle 17, Tabelle 20). Die koloniebildenden Einheiten der Rücktitration in der Versuchsreihe der Nachweisgrenze lag hier bei  $2,17 \times 10^8/\text{ml}$ , die der ddPCR bei  $3,02 \times 10^8$  Genomäquivalente/ml. Bei der Versuchsreihe mit Eistee lag die Rücktitration bei  $3,9 \times 10^8/\text{ml}$ , bei der mit Joghurt-Salatsoße bei  $2,27 \times 10^8/\text{ml}$ , mit Milch bei  $2,19 \times 10^8/\text{ml}$ . Die Werte der ddPCR betragen bei Eistee  $1,4 \times 10^8/\text{ml}$ , Joghurt-Salatsoße  $7,9 \times 10^7/\text{ml}$ , bei Milch  $2,4 \times 10^8/\text{ml}$ . Die in der ddPCR zum Teil etwas niedrigeren Werte können zum Beispiel dadurch bedingt sein, dass bei der Zelllyse bzw. der Nukleinsäure-Aufreinigung DNA verloren geht oder dass die Effizienz der Zelllyse nicht bei 100% lag.

Anders verhält es sich mit *Y. pestis*. Wie aus den genannten Tabellen (Tabelle 16, Tabelle 20, Tabelle 22) hervorgeht, sind die Werte der Rücktitration auf LB-Agar um etwa zwei Log-Stufen niedriger als bei der ddPCR. Der McFarland 0,5 lag in der Rücktitration der Versuchsreihe „Nachweisgrenze“ bei  $2,77 \times 10^5/\text{ml}$ , in der ddPCR bei  $1,37 \times 10^7/\text{ml}$ . Gleiches gilt für die folgenden Experimente der Matrixvalidierung von Eistee, Joghurt-Salatsoße und Milch. Die im Vergleich zur ddPCR niedrigeren Werte könnten eine Folge der F1-Antigen-Expression sein. Das F1-Antigen ist Teil der Kapsel von *Y. pestis* und ist auf dem 100-kb großen Virulenzplasmid pMT1 codiert. Es wird bei  $37^\circ\text{C}$  exprimiert und ist mitverantwortlich für die antiphagozytären Eigenschaften von *Y. pestis* (Du et al., 2002). Es ist ein gelartiges Glykoprotein, welches das Bakterium als eine Art Kapsel umgibt (Baker et al., 1952; Brubaker, 1972; Vorontsov et al., 1990). Das F1-Antigen lagert sich bei Raumtemperatur zu Aggregaten zusammen (Vorontsov et al., 1990) und kann so ein Verklumpen der einzelnen Bakterien verursachen. Diese Verklumpungen von *Y. pestis*-Einzelzellen könnte ein Grund für die falsch-niedrigen KBE in der Rücktitration auf Platte sein.

In diesem Fall bietet die ddPCR eine sehr viel genauere und korrektere Methode der Quantifizierung, obwohl selbstverständlich auch DNA bei der Extraktion bzw. Aufreinigung verloren geht.

Bei den *B. anthracis* Sporen wurde zur primären Quantifizierung auf die Rücktitration und die Mikroskopie innerhalb des BSL-3 Labors zurückgegriffen. Die quantitative Lyse der BSL-3 Sporen ist sehr aufwendig und es geht verhältnismäßig viel DNA verloren.

Sowohl das Ausplattieren, als auch die mikroskopische Zählung erfolgt mit der originalen Sporensuspension. Durch die Mikroskopie mittels Einmal-Neubauer-Zählkammern kann die Sporenkonzentration sehr genau bestimmt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass man durch diese Methode auch den Verklumpungszustand und die Reinheit der Sporen (Abwesenheit von vegetativen Zellen) beurteilen kann. Des Weiteren werden bei dieser Methode auch solche Sporen miterfasst, die zwar zum Testergebnis des Schnelltests beitragen, jedoch nicht mehr in der Lage sind, bei der Rücktitration auszukeimen. Zwar stimmen die Ergebnisse beider Methoden für die zwei getesteten Stämme nahezu überein (Vgl. Tabelle 18), was auf eine hohe Aussagekraft der Methoden hindeutet, doch wurde bei den Werten zur Bestimmung der Nachweisgrenzen aufgrund der beschriebenen Tatsache auf die Ergebnisse der Mikroskopie zurückgegriffen.

Nach einem aufwendigen Inaktivierungsprotokoll erfolgte abermals das mikroskopische Zählen der inaktivierten Sporen im BSL-2 Bereich sowie die ddPCR. Aufgrund der mehrmaligen Waschschriffe innerhalb des Inaktivierungsprotokolls und besonders aufgrund der darauffolgenden Lyse gehen viele Sporen bzw. DNA verloren. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen der Mikroskopie und der ddPCR wider. Diese Ergebnisse unterstreichen, wie sinnvoll es ist, zur genauen Quantifizierung Methoden zu wählen, die von einer Inaktivierung/ Lyse der Sporen unabhängig sind.

### 5.3. Matrixvergleich

#### 5.3.1. Auswahl der Matrices

Um den Einfluss verschiedener Matrices auf die Tests und deren Auswirkung auf die Nachweisgrenze zu untersuchen, wurden für *Y. pestis* und *F. tularensis* Eistee, Joghurt-Salatsoße und Milch exemplarisch getestet. Ein Ausbringen dieser Erreger im Kontext Bioterrorismus ist auf mehrere Wege denkbar. Im Vordergrund steht die Verbreitung mittels Aerosols. Die dadurch ausgelösten Krankheitsbilder pulmonale Tularämie und Lungenpest sind die Formen, die besonders fulminant verlaufen und vor allem unbehandelt eine sehr hohe Letalität aufweisen. In diesem Falle wird nicht unbedingt eine Trägersubstanz zur Ausbringung benötigt. Da beide Erreger allerdings auch gastrointestinale bzw. oropharyngeale Krankheitsbilder verursachen können, ist eine Ausbringung über die Nahrungsmittelkette durchaus ebenso denkbar. Vor allem wenn das primäre Ziel des Anschlags nicht unbedingt ist, das Leben möglichst vieler Menschen zu nehmen, sondern durch Krankheitsbilder mittlerer Ausprägung über

lange Zeit das Gesundheitssystem zu belasten und Panik innerhalb der Bevölkerung zu verbreiten (Hall et al., 2003; Schäfer, 2017). Milch, Eistee und Joghurt-Salatsoße stellen gängige, weit verbreitete Nahrungsmittel/ Getränke dar und wurden deswegen repräsentativ zur Matrixvalidierung genutzt. Des Weiteren wurden die Matrizes ausgewählt, um die diagnostischen Methoden unter herausfordernden Bedingungen (pH-Wert, Konsistenz, Fettgehalt) zu vergleichen. Eistee sticht dabei durch den sauren pH-Wert heraus. Milch und Joghurt-Salatsoße sind besonders proteinreich und somit für den Ablauf der HHTKs herausfordernd. Joghurt-Salatsoße ist außerdem besonders viskös und fetthaltig, was zusätzlich eine Herausforderung darstellt.

Auch bei *B. anthracis* stellt das durch Inhalation der infektiösen Sporen hervorgerufene Krankheitsbild das bedeutendste und tödlichste dar. Doch anders als bei *F. tularensis* oder *Y. pestis* müssen die Sporen von *B. anthracis* aufgrund ihrer elektrostatischen Eigenschaften verarbeitet und an Trägersubstanzen gekoppelt werden. Es ist bekannt, dass Additive wie Bentonit oder Silika zugesetzt werden können, um ein elektrostatisches Zusammenklumpen von Milzbrandsporen zu verhindern und Sporenpartikel leichter lungengängig zu machen (Koblentz & Tucker, 2010; Velsko, 2005). Auch während der Ermittlungen um die Briefanschläge 2001 in Amerika stand der Einsatz eines solchen Zusatzes zur Debatte (Velsko, 2005). Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, den Einfluss solcher Matrizes auf HHTKs zu testen. Als repräsentative Matrix wurde für diese Arbeit Bentonit gewählt. Die Zugabe eines solchen Pulvers zu flüssigen Sporensuspensionen ist vereinfacht und artifiziell, da in einem realistischen Bedrohungsszenario, wie bei den Anthrax-Briefanschlägen in den USA in 2001, bereits in Pulverform gebrachte, an die jeweilige Trägersubstanz gekoppelte Sporen zu finden wären. Trotzdem ist diese Vorgehensweise ausreichend, um den Einfluss dieser Matrix auf Lateral Flow Immunoassays zu untersuchen. Der durch die Inhalation von Anthraxsporen verursachte Lungenmilzbrand ist aber nicht die einzige Form der Erkrankung, an die bei Pulverproben gedacht werden muss. Zusätzlich ist es in der jüngeren Vergangenheit zu Milzbrand-Infektionen bei Heroinabhängigen gekommen. Als Ursache für die benannten Infektionen wird verunreinigtes Heroin angenommen (Hanczaruk et al., 2014). Zwar konnten die aus mehreren betroffenen Patienten isolierten Stämme genetisch auf einen Ursprung der Kontaminationen zurückgeführt werden, allerdings konnten bislang in keiner der untersuchten Heroin-Proben Milzbrand-Sporen nachgewiesen werden (Hanczaruk et al., 2014).

In einer Studie von Grass et al. (Grass et al., 2016) wurden 82 Proben von ungestrecktem Heroin (beschlagnahmte durch das Bundeskriminalamt zwischen 2000 und 2014) sowohl mittels kulturellem Nachweis als auch mittels PCR untersucht. Zur Extraktion von *B. anthracis* Sporen aus Heroin wurde ein Protokoll etabliert, das es ermöglichte, mit einer Effizienz von 84-98% *B. anthracis* Sporen aus artifiziell gespicktem Heroin zu isolieren. Hierzu wurden 10 µl Sporen (entsprach  $10^4$  Sporen) mit 500 µg Heroin vermengt und weiterprozessiert (Grass et al., 2016). Dies entspricht einer Sporenkonzentration von  $10^8$  pro Gramm.

Aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaft von Heroin war die kulturelle Anzucht aus Heroin heraus, wie zu erwarten, negativ. Bei der Untersuchung des durch das Bundeskriminalamt in der Zeitperiode der aufgetretenen Fälle von Injektions-Milzbrand-Fällen konfiszierten Heroins konnten zwar andere sporenbildende Bakterien aus den untersuchten Heroinproben von jeweils 1g isoliert werden, Sporen von *B. anthracis* wurden allerdings nicht gefunden (Grass et al., 2016). Dies unterstreicht die Vermutung, dass es sich um extrem geringe Sporenmengen innerhalb des womöglich kontaminierten Heroins gehandelt haben müsste.

Diese Überlegungen und die Tatsache, dass das Detektionslimit von Anthrax-Sporen in Heroin bei den evaluierten Schnelltests bei etwa  $10^7$  Sporen/ml lag, verdeutlichen, dass das primäre Ziel der vorliegenden Untersuchung nicht war, geringste Sporenmengen zu detektieren, sondern allgemein zu prüfen, inwieweit Heroin Auswirkungen auf den korrekten Ablauf und auf die ohnehin schon hohen Nachweisgrenzen der LFIA hat.

### 5.3.2. Einfluss der Matrizes auf die DNA-Extraktion

Die verschiedenen Matrizes hatten nicht nur unterschiedlichsten Einfluss auf die Nachweisgrenzen und den korrekten Ablauf der HHTKs sondern auch auf die Effizienz der Extraktion der DNA. Eistee, welcher insbesondere durch den sauren pH Schwierigkeiten verursachen könnte, hatte bei der Extraktion bzw. der Aufreinigung der DNA von *F. tularensis* und *Y. pestis* keinen oder nur geringen Einfluss. Vergleicht man die 1:100 Verdünnung von *F. tularensis* mit und ohne Eistee, so spiegelt sich die gleiche Konzentration wider ( $1,4 \times 10^6$  unverdünnt –  $7 \times 10^5$  1:1 mit Eistee verdünnt). Das Gleiche trifft beispielsweise bei den McFarland 0,5 von *Y. pestis* mit ( $4,17 \times 10^6$ ) und ohne Eistee ( $1 \times 10^7$ ) zu.

Joghurt-Salatsoße beeinflusst die Extraktion der DNA deutlich mehr. In der ddPCR von *Y. pestis* konnten folglich weniger Kopien/ml festgestellt werden als in der Verdünnungsreihe ohne Matrix. Dies fällt zum Beispiel bei der Betrachtung des McFarland 0,5 mit und ohne Joghurt-Salatsoße auf: unverdünnt waren  $2,77 \times 10^7$  Kopien/ml enthalten, 1:1 mit Joghurt-Salatsoße waren es lediglich  $5,52 \times 10^6$ .

Erstaunlicherweise konnte beim Vergleich der ddPCRs von *F. tularensis* in den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 in der Verdünnungsreihe mit Joghurt-Salatsoße mehr Kopien/ml detektiert werden als in der ohne Matrix (unter der Beachtung der 1:1 Verdünnung mit der Matrix). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die homogene Mischung von Bakteriensuspensionen in einer solch viskösen Matrix schwierig ist. Sollte eine ungleichmäßige Verteilung des Erregers innerhalb der Matrix erfolgt sein und die 160 µl für die DNA-Extraktion aus einem Bereich entnommen worden sein, welcher eine höhere Dichte an Bakterien aufwies, spiegelt sich das selbstverständlich auch in der digitalen droplet PCR wider. Des Weiteren könnte hier ein geringfügiger Carrier-Effekt eine Rolle spielen. Das bedeutet, dass die co-extrahierte autochthone DNA zu einer insgesamt höheren Aufreinigungseffizienz geführt hat. Beides ist umso wahrscheinlicher als der beobachtete Effekt ja nur bei den höheren Verdünnungen (also der niedrigeren Bakterienkonzentration) auftrat.

Wie auch Joghurt-Salatsoße beeinflusst Milch die DNA-Extraktion von *Y. pestis* und *F. tularensis* negativ. (z.B.: *Y. pestis* mit ( $5,5 \times 10^5$ ) und ohne Milch ( $1,85 \times 10^6$ )). Dies könnte unter anderem auf den hohen Fett- und Proteingehalt von Milch und deren Interaktion mit den Säulen, die bei der Extraktion der DNA verwendet werden, zurückgeführt werden. Der Grund, weswegen bei der ddPCR von *Y. pestis* in der 1:100 Verdünnung in der Verdünnungsreihe mit Milch mehr Kopien nachgewiesen werden konnten als in der ohne Matrix, könnte ein ähnlicher sein wie bei der ddPCR von *F. tularensis* beschriebene Effekt mit Joghurt-Salatsoße.

Da es einerseits sehr zeitaufwendig ist, lebende BSL-3 Milzbrand-Sporen für die Lyse und DNA-Extraktion außerhalb des BSL-3 Labors zu inaktivieren und es außerdem keine ausreichend zufriedenstellenden Extraktions-Verfahren gibt, um BSL3-Sporen von *B. anthracis* von komplexen Matrices wie Bentonit oder Heroin zu befreien und anschließend aufzubrechen und zu lysieren, wurde darauf in dieser Arbeit verzichtet.

Zwar existiert das Extraktionsprotokoll von Grass et. al zur Extraktion von *B. anthracis* Sporen aus Heroin. Dieses wies aber lediglich eine Effizienz von 84-98% auf. Diese doch relativ großen Schwankungen innerhalb der Effizienz zeigen die Unzulänglichkeit solcher Protokolle zur genauen Quantifizierung von Sporen aus komplexen Matrices wie Heroin oder Bentonit und verdeutlichen, warum deswegen darauf verzichtet wurde.

### 5.3.3. Einfluss der Matrices auf die HHTKs

Alle für die Validierung der Schnelltests gewählten Matrices sind sehr anspruchsvoll. Für die Bewertung und Beurteilung der erzielten Ergebnisse ist zunächst eine eingehende Betrachtung der Negativkontrollen notwendig. Hier erwies sich die Matrix Eistee teilweise als problematisch. Da diese in den beiden Schnelltests miPROTECT und SMART II zur Detektion von *Y. pestis* schwach positive Ergebnisse verursachte, ist beim Einsatz dieser Tests im Zusammenhang mit vergleichbaren Proben besondere Vorsicht geboten. Soll die Anwesenheit von *Y. pestis* in ähnlichen Proben ausgeschlossen werden, ist es unbedingt notwendig, direkt spezifischere Methoden (wie z.B. PCR) für den Nachweis zu wählen. Die Nachweisgrenzen bzw. den Einfluss von Eistee auf die Nachweisgrenzen für die zwei Tests miPROTECT und SMART II konnte aufgrund der falsch-positiven Ergebnisse nicht eruiert werden. Somit ist es eine wichtige Herausforderung, diese und ähnliche Matrices in zukünftigen Untersuchungen zu testen und deren Einfluss auf HHTKs tiefergehend zu bestimmen. Um den Grund der falsch positiven Ergebnisse herauszufinden, sind weitere Untersuchungen nötig. Eine mögliche Erklärung könnte der niedrige pH-Wert des Eistees sein. Um dies von einer spezifischen Bindung einer möglicherweise im Eistee enthaltenen Substanz zu unterscheiden, könnte der Eistee neutralisiert, parallel steril filtriert und im direkten Vergleich auf die betroffenen Schnelltests gegeben werden.

In den übrigen getesteten Schnelltests (BADD und BTA) zum Nachweis von *Y. pestis* konnten keine falsch-positiven Testergebnisse im Zusammenhang mit Eistee festgestellt werden. Bei beiden Tests zeigte sich ein durch Eistee verursachter negativer Effekt auf die Nachweisgrenze: Für ein positives Testergebnis war eine größere Menge an *Y. pestis*-Bakterien notwendig. Erscheint eine Testbande, ist dies ein Hinweis darauf, dass *Y. pestis* in hoher Konzentration vorhanden ist. Bei einem negativen Ergebnis muss allerdings sorgfältig abgewogen werden. Es bedeutet dann im Zusammenhang mit vergleichbaren Proben nicht, dass *Y. pestis* nicht enthalten ist.



Vielmehr ist es dann von großer Bedeutung, ein negatives Testergebnis nochmals mit sensitiveren Methoden (z.B. PCR) zu bestätigen. Trotzdem sind die beiden Tests BADD und BTA von den vier evaluierten Tests bei Benutzung im Zusammenhang mit vergleichbaren flüssigen Matrices mit niedrigem pH vorzuziehen. Der Grund für die etwas schlechtere Performance dieser zwei Tests könnte der niedrige pH von Eistee sein. Es ist durchaus möglich, dass dieser niedrige pH-Wert bewirkt, dass die im Konjugatpad immobilisierten spezifischen Antikörper im Schnelltest durch den niedrigen pH-Wert denaturiert werden und demnach nicht zur adäquaten Bindung des F1-Antigens zur Verfügung stehen. Somit werden falsch hohe Nachweisgrenzen verursacht.

Bei den Tests zum Nachweis von *F. tularensis* fiel überraschenderweise auf, dass der BTA (Tetracore) zusammen mit der Matrix Eistee weniger Bakterien detektieren konnte als ohne Matrix, also etwas besser war. Zwar konnte in der Negativkontrolle (nur Eistee) keine falsch-positive Testbande gesehen werden, doch ist es durchaus möglich, dass Eistee durch den geringen pH-Wert das detektierte LPS von *F. tularensis* so verändert, dass das Epitop für den im Schnelltest verwendeten Antikörper besser zugänglich gemacht wird und somit die Nachweisgrenze gering niedriger erscheinen zu lassen. Dass dieser Effekt nicht bei allen Schnelltests zum Vorschein kommt, könnte der Tatsache geschuldet sein, dass nicht alle Hersteller denselben monoklonalen Antikörper verwenden.

Die Nachweisgrenze des BADD (AdVnt) Tests verschlechterte sich um eine Log-Stufe. Dies muss, wie oben erläutert, bei einem negativen Testergebnis bedacht werden. Auch hierfür könnte, wie oben beschrieben, der niedrige pH-Wert von Eistee und die damit zusammenhängende mangelhafte Antikörper-Antigen-Bindung verantwortlich sein. Da bei den anderen beiden Tests SMART II und miPROTECT Eistee keinen Einfluss auf das Detektionslimit von *F. tularensis* hatte, ist der Gebrauch dieser Tests im Zusammenhang mit mit Eistee vergleichbaren Matrices unbedenklich. Die hier erzielten Ergebnisse unterstreichen die Empfehlung, dass diese beiden Tests (SMART II und BADD) bei der Untersuchung von Eistee-ähnlichen-Proben auf *F. tularensis* geeignet und den anderen Tests vorzuziehen sind.

Bei der Untersuchung von Joghurt-Salatsoße wurde in dem Test der Firma New Horizons Diagnostics (SMARTII) zum Nachweis von *F. tularensis* ein schwaches

falsch-positives Testergebnis erzielt. Hier verhält es sich wie oben beschrieben. Bei Verdacht auf mit *F. tularensis* kontaminierten fetthaltigen viskösen Matrices, wie Joghurt-Salatsoße, sollte der Einsatz dieses Tests vermieden werden. In einem solchen Fall sollte eine Untersuchung der Verdachtsprobe mit anderen Nachweismethoden in Betracht gezogen werden. Insbesondere konnten für diesen Test keine verlässlichen Nachweisgrenzen für *F. tularensis* mit Joghurt-Salatsoße bestimmt werden. Es ist somit von der Benutzung dieses Tests in diesem Zusammenhang abzuraten.

Insgesamt hat die Validierung von Joghurt-Salatsoße gezeigt, dass es sich um eine äußerst anspruchsvolle Matrix für labordiagnostische Verfahren handelt. Durch den hohen Fettanteil und die Viskosität kann es leicht passieren, dass die Poren des „Sample pads“ verstopfen und der Test nicht adäquat ablaufen kann. So konnten selbst nach zusätzlicher Zugabe von Probenpuffer und durchmengen innerhalb des „Sample pads“ die Tests BTA (Tetracore) für beide Erreger *Y. pestis* und *F. tularensis* nicht zum Laufen gebracht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Tests für eine Untersuchung von Proben mit viskösen, stark fetthaltigen Matrices bei einem Einsatz im Feld ungeeignet sind.

Zum Nachweis von *Y. pestis* innerhalb der Matrix Joghurt-Salatsoße haben drei der vier Tests (BADD, miPROTECT, SMART II) im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Matrix nahezu keine Einbußen gezeigt. Bei allen drei musste bis zu drei Tropfen zusätzlichem Probenpuffer hinzugegeben werden, doch stieg die Nachweisgrenze lediglich von  $9,62 \times 10^4$  auf  $1,35 \times 10^5$  Erreger/ ml an. Alle drei Tests könnten also verwendet werden.

Die Tests miPROTECT und BADD zum Nachweis von *F. tularensis* zeigten mit Joghurt-Salatsoße nach zusätzlicher Zugabe vom jeweiligen Probenpuffer zwar valide Läufe an (die Kontrollbanden erschienen), doch konnten beide Tests selbst die höchste Konzentration von  $3,95 \times 10^7$  Erreger/ml nicht detektieren. In der Zusammenschau der Ergebnisse bezüglich der Testung von viskösen, fetthaltigen Matrices wie Joghurt-Salatsoße und den HHTKs zum Nachweis von *F. tularensis* kann keine Empfehlung abgegeben werden. In zukünftigen Untersuchungen ist es also unbedingt notwendig, geeignete Schnelltest-Verfahren für solche Situationen zu entwickeln und anschließend systematisch zu validieren.

Insgesamt ist Joghurt-Salatsoße eine sehr anspruchsvolle Matrix, die unterschiedliche Auswirkungen auf die getesteten Kits hat. Insbesondere stellt die Verstopfung der Poren des „sample-pads“ ein Problem dar. Der adäquate Ablauf des Tests ist somit nicht mehr gewährleistet. Des Weiteren könnte sich der hohe Fettgehalt solcher Matrices negativ auf die Antikörper-Antigen Bindung innerhalb des Tests auswirken. Trifft ein Probenahme-Team auf eine derartige Probe, muss zum einen vorsichtig abgewogen werden, wie stark die Ausgangsprobe verdünnt werden muss um den Test zum Laufen zu bringen. Zwar ermöglicht eine Probenverdünnung die Durchführung des Tests, allerdings wird damit auch die Zielerreger-Konzentration reduziert. Bei den ohnehin bereits hohen Nachweisgrenzen ist diese kritisch und könnte falsch negative Tests zur Folge haben. Gerade bei solch schwierigen und komplexen Proben-Matrices sollte stets eine Folgeuntersuchung mit spezifischeren und sensitiveren Methoden im mobilen oder stationären Labor durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit, um den Einfluss stark fetthaltiger Substanzen untersuchen zu können, wäre der Einsatz von bzw. die Vorbehandlung der Proben mit Probenpuffern mit ausgeprägten tensidischen Eigenschaften. Dies könnte beispielsweise in einem Folgeprojekt untersucht werden.

Neben Eistee und Joghurt-Salatsoße stellt auch Milch eine komplexe Matrix dar. Durch den relativ hohen Fettgehalt und die in der Milch enthaltenen Proteine kann es zu Schwierigkeiten beim Ablauf der Tests und zu einer Interaktion der Proteine mit den Antikörpern kommen. So zeigte sich beim BTA Tetracore Test zum Nachweis von *Y. pestis* in nur einem von drei Tests bei einer Konzentration von  $8,8 \times 10^6$  Bakterien/ml ein positives Ergebnis. Diese inkonsistente Nachweisgrenze war um fast zwei Log-Stufen höher als die ohne Matrix und zeigt wie unverlässlich sich dieser Test bei einer Untersuchung von flüssigen, protein- und fetthaltigen Matrices wie Milch verhält. Im Gegensatz dazu stehen die drei weiteren evaluierten Tests (BADD, SMART II, miPROTECT). Die Nachweisgrenze verschlechterte sich bei allen drei Tests nach Zugabe von Milch zwar um eine Log-Stufe, doch wurden konsistente Ergebnisse erzielt. Dies könnte wie bei der Matrix Joghurt-Salatsoße daran liegen, dass der hohe Fettgehalt eine adäquate Bindung der Antikörper an das spezifische Antigen erschwert. Alle drei Tests könnten für Untersuchungen von flüssigen, protein- und fetthaltigen Matrices wie Milch im Feld verwendet werden.

Da sich die Nachweisgrenzen von *F. tularensis* im Zusammenhang mit Milch entweder gar nicht (BTA Tetracore) oder nur geringfügig verschlechtert haben (BADD, SMART II, miPROTECT) und es weder Probleme bei der Lauffähigkeit noch falsch-positive Ergebnisse gab, können für diesen Zweck alle Tests herangezogen werden. Da die Nachweisgrenzen der drei letzteren allerdings insgesamt niedriger waren (also weniger Bakterien nachgewiesen werden konnten), sind diese besonders hervorzuheben und zu empfehlen.

Dass die kleinen Partikel des Bentonit die Poren des „sample pads“ verstopfen und zu Problemen beim Ablauf des Testes führen können, zeigte sich beim SMART II Test daran, dass am Detektionslimit von  $4,23 \times 10^7$  Ames Sporen/ml nur einer von drei Tests ein positives Ergebnis zeigte. Eine Log-Stufe höher konnte dieser Test, ebenso wie der BADD, aber bei allen drei von drei Tests die Sporen nachweisen. Auch bei der Testung von Vollum-Sporen waren beim SMART II inkonsistente Ergebnisse zu vermerken. Hier konnte nur einer von drei Tests die Konzentration von  $2,34 \times 10^8$  Sporen/ml nachweisen.

Zwar veränderte sich die Nachweisgrenze durch Zugabe von Bentonit zu den Ames-Sporen beim Tetracore-Test nicht, doch zeigten sich auch hier inkonsistente Ergebnisse bei der Testung der Vollum-Sporen. Nur einer der drei Tests detektierte  $2,34 \times 10^9$  Sporen/ml. Der BADD Test war nicht in der Lage die höchste Konzentration von Vollum-Sporen zu detektieren.

Insgesamt stellte die Matrix Bentonit alle Tests vor Schwierigkeiten. In der Zusammenschau der Ergebnisse der Sporen beider Stämme kann bei der Testung Bentonit-ähnlicher Substanzen der SMART II Test am ehesten empfohlen werden. Aufgrund der teilweise inkonsistenten Ergebnisse sollte im Einsatzfall die Probe trotzdem immer umgehend mit weiteren sensitiveren Methoden untersucht werden.

Auch Heroin stellt aus oben genannten Gründen eine relevante Matrix dar. Zwar ist es ebenso wie Bentonit eine Pulvermatrix und könnte somit die Poren des „sample pads“ verstopfen, doch zeigten sich bei der Validierung nahezu keine Einschränkungen. Dies könnte vor allem daran liegen, dass Heroin sehr viel grobkörniger ist als Bentonit und somit schon auf der Membran des „sample pad“ aufgehalten wird und dieses aufgrund der Grobkörnigkeit nicht verstopft. Das pulverige Heroin, das im Aussehen Ähnlichkeit mit braunem Zucker aufweist, löst sich nur bedingt in Wasser, es bildet sich in kurzer

Zeit ein Niederschlag. Für die Evaluation der Schnelltests wurde der Überstand benutzt. Es könnte durchaus sein, dass die zugegebenen Sporen im Überstand gelöst bleiben, das Heroin an sich keinen Einfluss auf die Lauffähigkeit und Nachweisgrenzen ausübt und sich somit die gleichen Ergebnisse wie ohne Matrix ergeben. Empfehlungen für die Benutzung der Schnelltests im Zusammenhang mit Heroin-Proben sind demnach analog zu den oben erwähnten und diskutierten Tests.

#### 5.4. Zusammenfassende Einschätzung der HHTKs

Insgesamt waren die gefundenen Nachweisgrenzen, wie oben erläutert, für alle drei Erreger relativ hoch. Dies muss bei der Benutzung der Tests beachtet werden.

Für die Detektion von *F. tularensis* erzielte der miPROTECT Tularemia (Miprolab) Test an der Nachweisgrenze von  $7,68 \times 10^6$  das eindeutigste Ergebnis. Zudem hebt sich dieser Test durch die äußere Beschaffenheit, insbesondere das übersichtliche Ablesefeld, das Beschriftungsfeld und die Griffe für die Benutzung mit Handschuhen ab.

Für die Detektion von *Y. pestis* zeigten alle evaluierten Tests zwar das gleiche Detektionslimit von  $9,62 \times 10^4$  Bakterien/ml, doch zeigte der SMART II Test die am stärksten ausgeprägten Testbande. Da dieser Test wie oben erläutert relativ klein und somit schwierig im Handling ist und im Zusammenhang mit der Matrixvalidierung ambivalente Ergebnisse lieferte, muss der Einsatz sorgfältig abgewogen werden und gegebenenfalls auf einen der anderen Tests zurückgegriffen werden.

Für den Nachweis der Sporen von *B. anthracis* hoben sich im direkten Vergleich zwei Tests ab: der SMART II (New Horizons Diagnostics) und der BADD (AdVnt). Beide Tests können für diesen Gebrauch am ehesten empfohlen werden. Von der Benutzung der Miprolab Tests für den Nachweis von Sporen von *B. anthracis* ist gänzlich abzuraten, da bei beiden BSL3-Stämmen selbst bei den höchsten getesteten Konzentrationen nicht erkannt werden konnten.

Vergleicht man die Performance von Lateral Flow immunoassays mit der einer anderen Testmethode, so fällt zunächst der zeitliche Aspekt ins Auge. Verglichen mit der immunologischen Nachweismethode ELISA oder mit der Polymerase-Chain-Reaction (PCR), wo ein Ergebnis erst nach mehreren Stunden (2-3 Stunden) verfügbar ist, hat man ein solches bei LFAs schon nach wenigen Minuten (15-20 Minuten). Auch sind bei den genannten anderen Methoden mehrere Teil- und Inkubationsschritte

vonnöten. Bei den HHTKs wird lediglich die Probe mit dem Testpuffer vermengt und auf das „Sample pad“ aufgetragen.

Der Goldstandard der mikrobiologischen Diagnostik, die kulturelle Anzucht, braucht bis zum Erhalt eines Ergebnisses deutlich länger (je nach Erreger bis zu 48h). Außerdem bedarf es hierfür eines stationären (ggf. BSL-3-) Labors. Aus oben genannten Gründen kommen diese Methoden für einen Einsatz im Feld nicht in Frage. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass die HHTKs bis auf den vom Hersteller bereitgestellten Puffer weder Hilfsmittel noch Auswerteeinheiten benötigen und somit minimalen Aufwand bedeuten. Gerade für die Benutzung durch Einsatzkräfte im Feld sind diese Faktoren von großer Bedeutung und es gibt kein vergleichbar unkompliziertes diagnostisches Mittel für diesen Zweck.

Neben diesen Punkten sprechen auch noch weitere Faktoren für den Einsatz der Schnelltests. Hier ist unter anderem die lange Haltbarkeit aufzuführen: die Tests sind bei Raumtemperatur bis zu zwei Jahre haltbar. Die Tatsache, dass eine Kühlung der Tests nicht notwendig ist, ist für die Vorbereitung und den Einsatz im Feld besonders wichtig.

Nichtsdestotrotz sollten sich die Anwender der Limitationen von HHTKs bewusst sein. Vor allem wenn man die infektiöse Dosis der drei Erreger betrachtet, wird die limitierte Aussagekraft der Tests deutlich. So wird für *F. tularensis* in der Literatur die ID<sub>50</sub>, also die Dosis, die bei 50% der Individuen eine Infektion hervorruft, für die Infektionsroute via Inhalation teilweise mit einem einzelnen Bakterium angegeben (Jones et al., 2005). Andere Quellen geben die minimale infektionsauslösende Dosis von *F. tularensis* inhalativ oder intrakutan mit 10-50 Bakterien, oral mit 10<sup>8</sup> Bakterien an (Frießecke et al., 2007). Verglichen mit dem in dieser Arbeit gefundenem Detektionslimit von 7,68 x 10<sup>6</sup> Bakterien/ml für den BADD, SMART II und miPROTECT Test wird klar, dass mit diesen HHTKs nur sehr viel höhere Bakterien-Konzentrationen detektiert werden können. Im Falle eines Ausbringens dieses Erregers mittels Aerosols in einer Konzentration unterhalb des Detektionslimits der HHTKs müsste bei dem Nachweis direkt auf sensitivere Methoden, wie z.B. PCR, zurückgegriffen werden.

Hinsichtlich der minimalen infektionsauslösenden Dosis von *Y. pestis* gibt es keine Daten für den Menschen. Bei Primaten schwanken die Angaben in der Literatur zwischen 1-10 und 100-500 Erreger (Frießecke et al., 2007). Die LD<sub>50</sub>, also die Dosis, die bei 50% zum Tod führt, liegt bei Applikation via Aerosol für Mäuse und Affen bei

<10<sup>4</sup> KBE, intravenös, subkutan und intranasal bei nur 10-100 Bakterien (Friesecke et al., 2007). Auch hier sind die minimalen infektiösen Dosen durch die Nachweisgrenzen der vier getesteten HHTKs (9,62 x 10<sup>4</sup> Bakterien/ml) nicht abgedeckt. Ein weiterer Punkt, der bei der Evaluation von Testkits zum Nachweis von *Y. pestis* berücksichtigt werden muss, ist, dass das durch diese Tests nachzuweisende Antigen, das F1-Antigen, von den Bakterien lediglich bei einer Inkubationstemperatur von 37°C exprimiert wird (Konkel & Tilly, 2000). Da *Yersinia spp.* aber durchaus auch bei niedrigeren Temperaturen Wachstum zeigen und zwischen 25-28°C ihr Wachstumsoptimum haben (Tschäpe et al., 2009), sind unter solchen Bedingungen angezogene Bakterien nicht mittels HHTK nachweisbar.

Bei der Inhalation von *B. anthracis* Sporen wurde die LD<sub>50</sub> in einer Untersuchung von Makakenaffen bei 6,18 x 10<sup>4</sup> cfu angegeben (Vasconcelos et al., 2003). Andere Quellen geben die mittlere infektiöse Dosis für den Menschen zwischen 2,5 x 10<sup>3</sup> und 5 x 10<sup>4</sup> Sporen an (Friesecke et al., 2007). Da die zwei Tests mit der geringsten Nachweisgrenze von *B. anthracis* Sporen lediglich eine Konzentration von 4,23 x 10<sup>7</sup> Sporen/ml detektieren konnten, fällt auch hier auf, wie limitiert die Tests zum Nachweis von *B. anthracis* sind.

Anhand der Untersuchungsergebnisse infolge der Briefanschläge mit Anthrax-Sporen im Jahr 2001 wird vermutet, dass es sich bei dem Pulver aus den Briefen an die Senatoren Leahy und Daschle um Konzentrationen von bis zu 10<sup>9</sup> Sporen pro mg gehandelt haben könnte (Koblentz & Tucker, 2010). In einem solchen Fall, wäre eine so hohe Sporenlast durch zumindest drei der vier Tests abgedeckt. Die Tests von der Firma MiproLab waren noch nicht einmal in der Lage, die höchsten getesteten Sporenkonzentrationen von 2,34 (Vollum) bzw. 4,23 (Ames) x 10<sup>9</sup>/ml nachzuweisen und sind somit für die Felddiagnostik gänzlich ungeeignet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Lateral Flow immunoassays für die Detektion von potenziellen B-Agenzien für die Vor-Ort-Diagnostik ein wichtiges Werkzeug sind. Gerade durch das einfache Handling, den kleinen Aufwand und der kurzen Inkubationszeit bieten sie für die erste vorläufige und richtungsweisende Arbeitsdiagnose ein wichtiges Standbein der medizinischen B-Aufklärung. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch nicht so trivial wie oft behauptet wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus Zeitgründen bewusst darauf verzichtet, neben der Nachweisgrenze auch die Spezifität der Tests zu validieren. Jedoch ist bekannt, dass HHTKs – gerade bei der Analyse komplexer Proben-Matrizes – auch falsch positive Ergebnisse liefern können. Daher bedürfen positive Ergebnisse immer einer endgültigen Bestätigung mittels aufwendigerer und spezifischerer Methoden (i.e. PCR) in einer mobilen oder stationären Laboreinheit. Viel schwerwiegender ist jedoch die Tatsache, dass die Untersuchungen dieser Arbeit erneut gezeigt haben, dass ein negatives Testergebnis eines HHTKs keinesfalls bedeutet, dass das nachzuweisende Agens nicht oder in subinfektiösen Dosen vorhanden ist. Hier müssen die ausgebildeten Einsatzkräfte/ Probenahme-Teams auch bei negativen HHTK-Ergebnissen sinnvolle Proben nehmen, welche in einem zweiten Schritt eingehend mit sensitiven Nachweismethoden von einem stationären oder mobilen Labor untersucht werden müssen. Das Stufenschema zur sicheren Diagnostik von Proben muss hierbei unbedingt eingehalten werden.

Tabelle 34 Zusammenfassung der Vor- und Nachteile von LFA

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringes Probevolumen (100-150µl)</li> <li>• Schnelles Ergebnis (15-20 Minuten)</li> <li>• Relativ simples Handling, wenige Arbeitsschritte</li> <li>• Relativ leichte Interpretation des Ergebnisses</li> <li>• Geringe oder keine Vorbehandlung von flüssigen Proben</li> <li>• Lange Haltbarkeit (bis zu 2 Jahren) bei Raumtemperatur (ungefähr 2-30°C)</li> <li>• Keine Ausleseeinheit notwendig</li> <li>• Qualitatives Ergebnis</li> <li>• Einsatz im Feld</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorbehandlung von viskösen Proben</li> <li>• Zeit bis zum Ergebnis abhängig von der Viskosität der Probe</li> <li>• Abhängig von Hersteller und nachzuweisendem Antigen hohe Nachweisgrenzen</li> <li>• Nur vorläufiges Ergebnis, Bestätigung mit anderen Methoden immer notwendig</li> </ul>



## Zusammenfassung

Immunchromatographische Schnelltests, auch als Hand Held Test Kits (HHTKs) bezeichnet, sind die wichtigste verfügbare erstorientierende diagnostische Methode, um ein biologisches Agens bereits am Ort der Ausbringung oder Auffindung nachzuweisen. Im Kontext des medizinischen B-Schutzes haben *Y. pestis*, *F. tularensis* und *B. anthracis* hier eine besondere Relevanz. Vergleichende Untersuchungen zu den Nachweisgrenzen verschiedener HHTKs für diese drei Agenzien sind jedoch bisher überwiegend nur für inaktivierte, somit in ihrer Oberflächenstruktur möglicherweise veränderte Erreger und ohne Darstellung etwaiger Probenmatrix-Effekte verfügbar. Darüber hinaus kamen die bisher auf diesem Gebiet veröffentlichten Studien zu teils eklatant widersprüchlichen Ergebnissen. Insgesamt ist die Datenlage bezüglich der Nachweisgrenzen kommerziell erhältlicher HHTKs also absolut unzureichend (King et al., 2003; Prentice et al., 2019; Zasada et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nachweisgrenzen von HHTKs vier verschiedenen Hersteller zur Detektion der drei genannten Erreger (Advnt, MiproLab, Tetracore, New Horizons Diagnostics) ohne deren vorherige Inaktivierung im BSL3-Labor ermittelt. Zudem wurde betrachtet, wie sich verschiedene relevante Probenmatrizes auf diese Nachweisgrenzen auswirken. Grundlage dafür war eine präzise Quantifizierung der verwendeten Ausgangskulturen. Hierfür wurden für jeden Erreger jeweils zwei Verfahren kombiniert: Für *Y. pestis* und *F. tularensis* kamen die digitale droplet PCR sowie die kulturbasierte Quantifizierung über koloniebildende Einheiten zum Einsatz, die Quantifizierung von *B. anthracis* Sporen erfolgte neben der Kultivierung auch mikroskopisch. Als relevante Matrizes wurden für *Y. pestis* und *F. tularensis* Eistee, Milch und Joghurt-Salatsoße ausgewählt, für *B. anthracis* Sporen Bentonit und Heroin.

Tabelle 1 fasst die wichtigsten Ergebnisse zusammen. Für *Y. pestis* zeigte sich, dass die Nachweisgrenzen aller getesteten HHTKs nahezu identisch waren. Für *F. tularensis* zeigten sich jedoch zum Teil relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen HHTKs. Die Arbeiten für *B. anthracis* erfolgten, aufgrund von in der Literatur beschriebenen abweichenden Nachweisgrenzen zwischen verschiedenen Stämmen, mit zwei BSL-3 Stämmen: Ames und Vollum. Auch hier konnten zwischen den verschiedenen Tests z.T. deutliche Unterschiede demonstriert werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der ermittelten Nachweisgrenzen.

Bakterium HHTK	<i>Francisella tularensis</i> FSC-237	<i>Yersinia pestis</i> NCTC5923	<i>Bacillus anthracis</i> Ames spores	<i>Bacillus anthracis</i> Vollum spores
<b>BioThreat Alert®</b> Tetracore	3 x 10 <sup>8</sup> +/-	9,62 x 10 <sup>4</sup> +/-	4,23 x 10 <sup>9</sup> ++	2,34 x 10 <sup>9</sup> +
<b>BADD™</b> AdVnt	7,68 x 10 <sup>6</sup> +/-	9,62 x 10 <sup>4</sup> +/-	4,23 x 10 <sup>7</sup> +	2,34 x 10 <sup>7</sup> +/-
<b>SMART II™</b> New Horizons Diagnostics	7,68 x 10 <sup>6</sup> +	9,62 x 10 <sup>4</sup> ++	4,23 x 10 <sup>7</sup> ++	2,34 x 10 <sup>7</sup> +
<b>miPROTECT®</b> MiproLab	7,68 x 10 <sup>6</sup> ++	9,62 x 10 <sup>4</sup> +	4,23 x 10 <sup>9</sup> – (negativ auch in höchster getesteter Konzentration)	2,34 x 10 <sup>9</sup> – (negativ auch in höchster getesteter Konzentration)

Im Vergleich zu vorherigen Arbeiten mit inaktivierten Erregern zeigten sich die Nachweisgrenzen der HHTKs zum Nachweis von *Y. pestis* mit nicht-inaktivierten BSL-3 Stämmen um zwei bis drei Log-Stufen niedriger. Auch bei nicht-inaktivierten Sporen von *B. anthracis* ließen sich niedrigere Nachweisgrenzen ermitteln. Anders verhielt es sich bei *F. tularensis*, hier ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede zu vorherigen Untersuchungen.

Die Daten zu den Nachweisgrenzen der HHTKs in den verschiedenen Matrices, ergaben deutliche Matrixeffekte mit unterschiedlichen Ergebnissen. So zeigten sich bei einigen Matrices (z.B. Eistee) falsch-positive Ergebnisse, bei anderen wurde, mutmaßlich aufgrund deren Beschaffenheit die Lauffähigkeit der Schnelltests im Sinne eines falsch-negativen Ergebnisses gänzlich behindert (z.B. Joghurt-Salatsoße).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HHTKs für die Detektion von B-Agenzien für die "Point of Incidence"-Diagnostik ein elementarer und momentan alternativloser Baustein sind. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch unmittelbar und massiv beeinflusst von der Kenntnis um Nachweisgrenzen und Matrixeffekte. Diese Arbeit ermöglicht nun erstmalig, die Qualität der untersuchten HHTKs einzuschätzen. Obwohl mit den hier ermittelten Daten eine valide Grundlage zur Interpretation der

HHTK-Ergebnisse vorliegt, muss immer eine direkt angeschlossene endgültige Bestätigung mittels aufwändigerer und spezifischerer Methoden (i.e. PCR) in einer mobilen oder stationären Laboreinheit erfolgen. Dies ist vor allem hinsichtlich der hier beobachteten Matrixeffekte (falsch positiv bzw. negativ) von großer Bedeutung.

## Literatur

- Albizo, J. M., & Surgalla, M. J. (1970). Isolation and Biological Characterization of *Pasteurella pestis* Endotoxin. *Infect Immun*, 2(3), 229-236.
- Alibek, K. (1999). Biohazard. Abgerufen von [https://www.nlm.nih.gov/nichsr/esmallpox/biohazard\\_alibek.pdf](https://www.nlm.nih.gov/nichsr/esmallpox/biohazard_alibek.pdf) am 15.08.2019
- Alsofrom, D. J., Mettler, F. A., & Mann, J. M. (1981). Radiographic manifestations of plague in New Mexico, 1975–1980. *Radiology* 139, 561-565.
- Ancuta, P., Pedron, T., Girard, R., Sandstrom, G., & Chaby, R. (1996). Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. *Infect Immun*, 64(6), 2041-2046.
- Antwerpen, M. H., Zimmermann, P., Bewley, K., Frangoulidis, D., & Meyer, H. (2008). Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*, 22(5-6), 313-315.
- Aronson, A. I., & Fitz-James, P. (1976). Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriol Rev*, 40(2), 360.
- Auswärtiges Amt (2020). Übereinkommen über das Verbot biologischer Waffen (BWÜ) [Webpage]. Abgerufen von [https://www.auswaertiges-amt.de/de/aussenpolitik/themen/abruestung-ruestungskontrolle/uebersicht-bcwaffen-node/verbotbiowaffen-bwue-node\\_am](https://www.auswaertiges-amt.de/de/aussenpolitik/themen/abruestung-ruestungskontrolle/uebersicht-bcwaffen-node/verbotbiowaffen-bwue-node_am) 15.02.2020
- Baillie, L., Hebdon, R., Flick-Smith, H., & Williamson, D. (2003). Characterisation of the immune response to the UK human anthrax vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36(1-2), 83-86.
- Baillie, L., Townend, T., Walker, N., Eriksson, U., & Williamson, D. (2004). Characterization of the human immune response to the UK anthrax vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 42(2), 267-270.
- Baker, E. E., Sommer, H., Foster, L. E., Meyer, E., & Meyer, K. F. (1952). Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *J Immunol*, 68(2), 131-145.
- Barras, V., & Greub, G. (2014). History of biological warfare and bioterrorism. *Clin Microbiol Infect*, 20(6), 497-502.
- Bartholomew, R. A., Ozanich, R. M., Arce, J. S., Engelmann, H. E., Heredia-Langner, A., Hofstad, B. A., Bruckner-Lea, C. J. (2017). Evaluation of Immunoassays and General Biological Indicator Tests for Field Screening of *Bacillus anthracis* and Ricin. *Health Secur*, 15(1), 81-96.
- Beaman, T. C., Pankratz, H. S., & Gerhardt, P. (1972). Ultrastructure of the exosporium and underlying inclusions in spores of *Bacillus megaterium* strains. *J Bacteriol*, 109(3), 1198-1209.
- Beatty, M. E., Ashford, D. A., Griffin, P. M., Tauxe, R. V., & Sobel, J. (2003). Gastrointestinal anthrax: review of the literature. *Arch Intern Med*, 163(20), 2527-2531.
- Berdal, B. P., Mehl, R., Meidell, N. K., Lorentzen-Styr, A. M., & Scheel, O. (1996). Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 13(3), 191-195.
- Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte. (2019). Rote-Hand-Brief zu Fluorchinolone-Antibiotika: Schwerwiegende und anhaltende, die Lebensqualität beeinträchtigende und möglicherweise irreversible Nebenwirkungen [Webpage]. Abgerufen von [https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2019/rhb-fluorchinolone.pdf;jsessionid=B0D11C5D5B92B24BC747C970B9407487.2\\_cid354?\\_\\_blob=publicationFile&v=3](https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2019/rhb-fluorchinolone.pdf;jsessionid=B0D11C5D5B92B24BC747C970B9407487.2_cid354?__blob=publicationFile&v=3) am 10.07.2019
- Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J., & Young, J. A. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, 414(6860), 225-229.
- Brezillon, C., Haustant, M., Dupke, S., Corre, J. P., Lander, A., Franz, T., Monot, M., Couture-Tosi, E., Jouvion, G., Leendertz, F., Grunow, R., Mock, M., Klee, S., Goossens, P. L. (2015). Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar anthracis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(4), e0003455.

- Brubaker, R. R. (1972). The Genus *Yersinia*: Biochemistry and Genetics of Virulence With 3 Figures. *Curr Top Microbiol Immunol*, 57(111-158).
- Castanha, E. R., Swiger, R. R., Senior, B., Fox, A., Waller, L. N., & Fox, K. F. (2006). Strain discrimination among *B. anthracis* and related organisms by characterization of *bclA* polymorphisms using PCR coupled with agarose gel or microchannel fluidics electrophoresis. *J Microbiol Methods*, 64(1), 27-45.
- Centers for Disease Control and Prevention (2018). Bioterrorism Agents/Diseases [Webpage]. Abgerufen von <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> am 15.08.2019
- Celli, J., & Zahrt, T. C. (2013). Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(4), a010314.
- Chada, V. G., Sanstad, E. A., Wang, R., & Driks, A. (2003). Morphogenesis of bacillus spore surfaces. *J Bacteriol*, 185(21), 6255-6261.
- Chalton, D. A., Musson, J. A., Flick-Smith, H., Walker, N., McGregor, A., Lamb, H. K., Williamson, E.D., Miller, J., Robinson, J.H., Lakey, J. H. (2006). Immunogenicity of a *Yersinia pestis* vaccine antigen monomerized by circular permutation. *Infect Immun*, 74(12), 6624-6631.
- Chase, C. J., Ulrich, M. P., Wasieloski, L. P., Jr., Kondig, J. P., Garrison, J., Lindler, L. E., & Kulesh, D. A. (2005). Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. *Clin Chem*, 51(10), 1778-1785.
- Cole, L. A. (2009). *The Anthrax Letter: A Bioterrorism Expert Investigates The Attack That Shocked America*. New York: Skyhorse Publishing Inc.
- Conrad, F. G., LeCocq, F. R., & Krain, R. (1968). A recent epidemic of plague in Vietnam. *Arch Intern Med*, 122(3), 193-198.
- Cornelis, G. R. (1998). The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol*, 180(21), 5495-5504.
- Coyne, S. R., Craw, P. D., Norwood, D. A., & Ulrich, M. P. (2004). Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode Stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4859-4862.
- Dahlstrand, S., Ringertz, O., & Zetterberg, B. (1971). Airborne tularemia in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 3(1), 7-16.
- Davis, K. J., Fritz, D. L., Pitt, M. L., Welkos, S. L., Worsham, P. L., & Friedlander, A. M. (1996). Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch Pathol Lab Med*, 120(2), 156-163.
- Dennis, D. T., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A. D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S. R., McDade, J. E., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Tonat, K., & Working Group on Civilian Biodefense. (2001). Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *Jama*, 285(21), 2763-2773.
- Derbes, V. J. (1966). De Mussis and the great plague of 1348. A forgotten episode of bacteriological warfare. *Jama*, 196(1), 59-62.
- DesRosier, J. P., & Lara, J. C. (1981). Isolation and properties of pili from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 145(1), 613-619.
- Die Kommission der europäischen Gemeinschaften (2009). Zur Änderung der Entscheidung 2002/364/EG über Gemeinsame Technische Spezifikationen für In-vitro-Diagnostika [Webpage]. Abgerufen von <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009D0108&from=EN> am 04.03.2021
- Dorofe'ev, K. A. (1947). Classification of the causative agent of tularemia. In *Symposium Research Works Institute Epidemiology and Microbiology Chita*. Vol. 1, 170-180.
- Dragon, D. C., & Rennie, R. P. (1995). The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can Vet J*, 36(5), 295-301.
- Dreisbach, V. C., Cowley, S., & Elkins, K. L. (2000). Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect Immun*, 68(4), 1988-1996.

- Druett, H. A., Henderson, D. W., Packman, L., & Peacock, S. (1953). Studies on respiratory infection. I. The influence of particle size on respiratory infection with anthrax spores. *J Hyg (Lond)*, *51*(3), 359-371.
- Du, Y., Rosqvist, R., & Forsberg, A. (2002). Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun*, *70*(3), 1453-1460.
- Dutz, W., Saidi, F., & Kohout, E. (1970). Gastric anthrax with massive ascites. *Gut*, *11*(4), 352-354.
- Enderlin, G., Morales, L., Jacobs, R. F., & Cross, J. T. (1994). Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis*, *19*(1), 42-47.
- Evans, M. E., Gregory, D. W., Schaffner, W., & McGee, Z. A. (1985). Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine*, *64*(4), 251-269.
- Farlow, J., Smith, K. L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M., & Keim, P. (2001). *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol*, *39*(9), 3186-3192.
- Florman, A. L., Spencer, R. R., & Sheward, S. (1986). Multiple lung cavities in a 12-year-old girl with bubonic plague, sepsis, and secondary pneumonia. *Am J Med*, *80*(6), 1191-1193.
- Forslund, A. L., Kuoppa, K., Svensson, K., Salomonsson, E., Johansson, A., Bystrom, M., Oyston, P. C., Michell, S. L., Titball, R. W., Noppa, L., Frithz-Lindsten, E., Forsman, M., Forsberg, A. (2006). Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol Microbiol*, *59*(6), 1818-1830.
- Forsman, M., Sandstrom, G., & Sjostedt, A. (1994). Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol*, *44*(1), 38-46.
- Francis, E. (1928). A summary of present knowledge of tularemia. *Medicine*, *7*(4), 411-432.
- Franz, D. R., Jahrling, P. B., Friedlander, A. M., McClain, D. J., Hoover, D. L., Bryne, W. R., Pavlin, J. A., Christopher, G. W., Eitzen, E. M., Jr. (1997). Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *Jama*, *278*(5), 399-411.
- Friesecke, I., Biederbick, W., Boecken, G., Gottschalk, R., Koch, H., Peters, G., Peters, S., Sasse, J., Stich, A. (2007). *Biologische Gefahren II - Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage*. Bonn: Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe und Robert-Koch-Institut.
- Frischknecht, F. (2003). The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century. *EMBO reports*, *4*(S1), 47-52.
- Fulop, M., Manchee, R., & Titball, R. (1995). Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, *13*(13), 1220-1225.
- Gabastou, J. M., Proano, J., Vimos, A., Jaramillo, G., Hayes, E., Gage, K., Chu, M., Guarner, J., Zaki, S., Bowers, J., Guillemard, C., Tamayo, H., & Ruiz, A. (2000). An outbreak of plague including cases with probable pneumonic infection, Ecuador, 1998. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *94*(4), 387-391.
- Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S., Carniel, E., & Courvalin, P. (1997). Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med*, *337*(10), 677-680.
- Gasper, P.W. & Watson, R. P. (2001). Plague and Yersiniosis, In E. S. Williams, & I. K. Barker (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Mammals Third Edition* (pp 313-329). Ames: Iowa State University Press.
- Geissler, E., & van Courtland Moon, J. E. (1999). *Biological and Toxin Weapons: Research, Development and Use from the Middle Ages to 1945*. Oxford: Oxford University Press.
- Gerhardt, P., & Ribí, E. (1964). Ultrastructure of the Exosporium Enveloping Spores of *Bacillus Cereus*. *J Bacteriol*, *88*(6), 1774-1789.
- Giorno, R., Bozue, J., Cote, C., Wenzel, T., Moody, K. S., Mallozzi, M., Ryan, M., Wang, R., Zielke, R., Maddock, J. R., Friedlander, A., Welkos, S., & Driks, A. (2007). Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *J Bacteriol*, *189*(3), 691-705.

- Gemeinsames Ministerialblatt (2015). TRBA 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen" [Webpage]. Abgerufen von [https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile) am 15.08.2019
- Gold, H. (1955). Anthrax; a report of one hundred seventeen cases. *AMA Arch Intern Med*, 96(3), 387-396.
- Gould, G. W. (1977). Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores. *J Appl Bacteriol*, 42(3), 297-309.
- Gracias, K. S., & McKillip, J. L. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol*, 50(11), 883-890.
- Grass, G., Ahrens, B., Schleenbecker, U., Dobrzykowski, L., Wagner, M., Kruger, C., & Woelfel, R. (2016). Technical Note: Simple, scalable, and sensitive protocol for retrieving *Bacillus anthracis* (and other live bacteria) from heroin. *Forensic Sci Int*, 259, 32-35.
- Grunow, R., Verbeek, L., Jacob, D., Holzmann, T., Birkenfeld, G., Wiens, D., von Eichel-Streiber, L., Grass, G., & Reischl, U. (2012). Injection anthrax--a new outbreak in heroin users. *Dtsch Arztebl Int*, 109(49), 843-848.
- Hager, A. J., Bolton, D. L., Pelletier, M. R., Brittnacher, M. J., Gallagher, L. A., Kaul, R., Skerrett, S. J., Miller, S. I., & Guina, T. (2006). Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol*, 62(1), 227-237.
- Hajjar, A. M., Harvey, M. D., Shaffer, S. A., Goodlett, D. R., Sjostedt, A., Edebro, H., Forsman, M., Bystrom, M., Pelletier, M., Wilson, C. B., Miller, S. I., Skerrett, S. J., & Ernst, R. K. (2006). Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect Immun*, 74(12), 6730-6738.
- Hall, M. J., Norwood, A. E., Ursano, R. J., & Fullerton, C. S. (2003). The psychological impacts of bioterrorism. *Biosecur Bioterror*, 1(2), 139-144.
- Hanczaruk, M., Reischl, U., Holzmann, T., Frangoulidis, D., Wagner, D. M., Keim, P. S., Antwerpen, M. H., Meyer, H., & Grass, G. (2014). Injectional anthrax in heroin users, Europe, 2000-2012. *Emerg Infect Dis*, 20(2), 322-323.
- Harris, S. (1992). Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics. *Ann N Y Acad Sci*, 666(1), 21-52.
- Hatch, T. F. (1961). Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract. *Bacteriol Rev*, 25(3), 237-240.
- Hay, A. (1999). A magic sword or a big itch: an historical look at the United States biological weapons programme. *Med Confl Surviv*, 15(3), 215-234.
- Henriques, A. O., & Moran, C. P., Jr. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol*, 61, 555-588.
- Heyman, D., Achterberg, J., & Laszlo, J. (2002). *Lessons from the Anthrax Attacks: Implications for US Bioterrorism Preparedness*. Washington D.C.: Center for Strategic and International Studies and the Defense Threat Reduction Agency.
- Hicks, C. W., Sweeney, D. A., Cui, X., Li, Y., & Eichacker, P. Q. (2012). An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Med*, 38(7), 1092-1104.
- Hilsen, R. E., Kournikakis, B., Ford, B., & DRDC Suffield (2005). Inactivation of Microorganisms by Gamma Irradiation *Defence Research and Development Canada*. Technical Memorandum DRDC Suffield TM 2005-236.
- Hinnebusch, B. J. (2004). Transmission Factors: *Yersinia pestis* Genes Required to Infect the Flea Vector of Plague. In B. J. A. Skurnik M. & K. Granfors (Eds.), *The Genus Yersinia. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 529, pp. 55-62). Boston: Springer.
- Hinnebusch, B. J., Rudolph, A. E., Cherepanov, P., Dixon, J. E., Schwan, T. G., & Forsberg, A. (2002). Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*, 296(5568), 733-735.

- Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A., Chapman, G. D., Chute, M. D., Marston, C. K., De, B. K., Sacchi, C. T., Fitzgerald, C., Mayer, L. W., Maiden, M. C., Priest, F. G., Barker, M., Jiang, L., Cer, R. Z., Rilstone, J., Peterson, S. N., Weyant, R. S., Galloway, D. R., Read, T. D., Popovic, T., & Fraser, C. M. (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(22), 8449-8454.
- Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Wenger, J. D., Moss, C. W., & Brenner, D. J. (1989). *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol*, *27*(7), 1601-1608.
- Holt, S. C., & Leadbetter, E. R. (1969). Comparative ultrastructure of selected aerobic spore-forming bacteria: a freeze-etching study. *Bacteriol Rev*, *33*(2), 346-378.
- Holty, J. E., Bravata, D. M., Liu, H., Olshen, R. A., McDonald, K. M., & Owens, D. K. (2006). Systematic review: a century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005. *Ann Intern Med*, *144*(4), 270-280.
- Hood, A. M. (1977). Virulence factors of *Francisella tularensis*. *J Hyg (Lond)*, *79*(1), 47-60.
- Hopla, C. E. (1955). The multiplication of tularemia organisms in the lone star tick. *Am J Hyg*, *61*(3), 371-380.
- Hopla, C. E. (1974). The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med*, *18*(0), 25-53.
- Inglesby, T. V., Dennis, D. T., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Friedlander, A. M., Hauer, J., Koerner, J. F., Layton, M., McDade, J., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Schoch-Spana, M., Tonat, K., & Working Group on Civilian Biodefense (2000). Plague as a biological weapon: medical and public health management. *Jama*, *283*(17), 2281-2290.
- Inglesby, T. V., O'Toole, T., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Friedlander, A. M., Gerberding, J., Hauer, J., Hughes, J., McDade, J., Osterholm, M. T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Tonat, K., & Working Group on Civilian Biodefense (2002). Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *Jama*, *287*(17), 2236-2252.
- InnovaBiosciences (2012). Guide to Lateral Flow Immunoassays. Abgerufen von [https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS\\_A\\_guide\\_to\\_lateral\\_flow\\_immunoassays.pdf](https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS_A_guide_to_lateral_flow_immunoassays.pdf) am 15.08.2019
- Jallali, N., Hettiaratchy, S., Gordon, A. C., & Jain, A. (2011). The surgical management of injectional anthrax. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *64*(2), 276-277.
- Jellison, W. L., & Kohls, G. M. (1955). Tularemia in sheep and in sheep industry workers in western United States. *Public Health Monogr*, *28*(28), 1-19.
- Jernigan, D. B., Raghunathan, P. L., Bell, B. P., Brechner, R., Bresnitz, E. A., Butler, J. C., Cetron, M., Cohen, M., Doyle, T., Fischer, M., Greene, C., Griffith, K. S., Guarner, J., Hadler, J. L., Hayslett, J. A., Meyer, R., Petersen, L. R., Phillips, M., Pinner, R., Popovic, T., Quinn, C. P., Reefhuis, J., Reissman, D., Rosenstein, N., Schuchat, A., Shieh, W. J., Siegal, L., Swerdlow, D. L., Tenover, F. C., Traeger, M., Ward, J. W., Weisfuse, I., Wiersma, S., Yeskey, K., Zaki, S., Ashford, D. A., Perkins, B. A., Ostroff, S., Hughes, J., Fleming, D., Koplan, J. P., Gerberding, J. L., & National Anthrax Epidemiologic Investigation Team (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis*, *8*(10), 1019-1028.
- Johansson, A., Berglund, L., Sjostedt, A., & Tarnvik, A. (2001). Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clin Infect Dis*, *33*(2), 267-268.
- Jones, R. M., Nicas, M., Hubbard, A., Sylvester, M. D., & Reingold, A. (2005). The infectious dose of *Francisella tularensis* (tularemia). *Applied Biosafety*, *10*(4), 227-239.
- Karpoff, S. P., & Antonoff, N. I. (1936). The spread of tularemia through water, as a new factor in its epidemiology. *Journal of Bacteriology*, *32*(3), 243.
- Kaufmann, A. F., Meltzer, M. I., & Schmid, G. P. (1997). The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis*, *3*(2), 83-94.



- King, D., Luna, V., Cannons, A., Cattani, J., & Amuso, P. (2003). Performance assessment of three commercial assays for direct detection of *Bacillus anthracis* spores. *J Clin Microbiol*, *41*(7), 3454-3455.
- Kitasato, S. (1894). The bacillus of bubonic plague. *The Lancet*, *144*(3704), 428-430.
- Klee, S. R., Brzuszkiewicz, E. B., Nattermann, H., Bruggemann, H., Dupke, S., Wollherr, A., Franz, T., Pauli, G., Appel, B., Liebl, W., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Meyer, F. D., Leendertz, F. H., Ellerbrok, H., Gottschalk, G., Grunow, R., & Liesegang, H. (2010). The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLOS ONE*, *5*(7), e10986.
- Klimpel, K. R., Arora, N., & Leppla, S. H. (1994). Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Molecular microbiology*, *13*(6), 1093-1100.
- Klock, L. E., Olsen, P. F., & Fukushima, T. (1973). Tularemia epidemic associated with the deerfly. *Jama*, *226*(2), 149-152.
- Knüpfer, M., Braun, P., Baumann, K., Rehn, A., Antwerpen, M., Grass, G., & Wölfel, R. (2020). Evaluation of a highly efficient DNA extraction method for *Bacillus anthracis* endospores. *Microorganisms*, *8* (5), 763.
- Koblentz, G. D., & Tucker, J. B. (2010). Tracing an attack: the promise and pitfalls of microbial forensics. *Survival: Global Politics and Strategy*, *52*(1), 159-186.
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays Biochem*, *60*(1), 111-120.
- Konkel, M. E., & Tilly, K. (2000). Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect*, *2*(2), 157-166.
- LaForce, F. M., Acharya, I. L., Stott, G., Brachman, P. S., Kaufman, A. F., Clapp, R. F., & Shah, N. K. (1971). Clinical and epidemiological observations on an outbreak of plague in Nepal. *Bull World Health Organ*, *45*(6), 693-706.
- Lake, G. C., & Francis, E. (1922). Tularaemia Francis 1921: VII. Six Cases of Tularaemia Occurring in Laboratory Workers. *Public Health Reports (1896-1970)*, *37*(8), 392-413.
- Legters, L. J., Cottingham, A. J., & Hunter, D. H. (1970). Clinical and epidemiologic notes on a defined outbreak of plague in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*, *19*(4), 639-652.
- Leppla, S. H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci*, *79*(10), 3162-3166.
- Lincoln, R. E., Hodges, D. R., Klein, F., Mahlandt, B. G., Jones, W. I., Jr., Haines, B. W., Rhian, M. A., & Walker, J. S. (1965). Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis*, *115*(5), 481-494.
- Lindeke, E. A. (2018). *Textbooks of Military Medicine: Medical Aspects of Biological Warfare*. Fort Sam Houston: Office of The Surgeon General Borden Institute, US Army Medical Department Center and School Health Readiness Center of Excellence.
- Logan, N. A., Hoffmaster, A. R., Shadomy, S. V., & Stauffer, K. E. (2011). *Bacillus* and Other Aerobic Endospore-forming Bacteria, In J. Versalovic, K. Carroll, G. Funke, J. Jorgensen, M. Landry & D. Warnock (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology ASM, 10th Edition* (pp. 381-402), Washington D.C.: ASM Press.
- Lozano, D., & Cantero, M. (1997). Difference between analytical sensitivity and detection limit. *Am J Clin Pathol*, *107*(5), 619-620.
- Manchee, R. J., Broster, M. G., Melling, J., Henstridge, R. M., & Stagg, A. J. (1981). *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Nature*, *294*(5838), 254-255.
- Mattix, M. E., Zeman, D. H., Moeller, R., Jackson, C., & Larsen, T. (2006). Clinicopathologic aspects of animal and zoonotic diseases of bioterrorism. *Clin Lab Med*, *26*(2), 445-489.
- McCoy, G. W., & Chapin, C. W. (1912). Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularense*. *J Infect Dis*, *10*(1), 61-72.
- Mehta, A. S., Saile, E., Zhong, W., Buskas, T., Carlson, R., Kannenberg, E., Reed, Y., Quinn C.P., & Boons, G. J. (2006). Synthesis and antigenic analysis of the BclA glycoprotein oligosaccharide from the *Bacillus anthracis* exosporium. *Chem Eur J*, *12*(36), 9136-9149.

- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., & Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J Appl Microbiol*, *92*(6), 1105-1115.
- Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., & Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science*, *266*(5188), 1202-1208.
- Migone, T. S., Subramanian, G. M., Zhong, J., Healey, L. M., Corey, A., Devalaraja, M., Lo, L., Ullrich, S., Zimmerman, J., Chen, A., Lewis, M., Meister, G., Gillum, K., Sanford, D., Mott, J., & Bolmer, S. D. (2009). Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *N Engl J Med*, *361*(2), 135-144.
- Miller, S. I., Ernst, R. K., & Bader, M. W. (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*, *3*(1), 36-46.
- Moayeri, M., & Leppla, S. H. (2009). Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med*, *30*(6), 439-455.
- Mwenye, K. S., Siziya, S., & Peterson, D. (1996). Factors associated with human anthrax outbreak in the Chikupo and Ngandu villages of Murewa district in Mashonaland East Province, Zimbabwe. *Cent Afr J Med*, *42*(11), 312-315.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev*, *64*(3), 548-572.
- Nicholson, W. L. (2004) Ubiquity, Longevity, and Ecological Roles of *Bacillus* Spores, In E. Ricca, A. O. Henriques & S.M. & Cutting (Eds.). *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* (pp. 1-15). London: Horizon Scientific Press.
- O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J., & Leppla, S. (1985). Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun*, *47*(1), 306-310.
- O'Farrell, B., Rosen, S., Ponti, J., Brown, M., Mansfield, M., Jones, K., Tisone, T., Faulstich, K., Gruler, R., Eberhard, M., Lentzsch, D., Haberstroh, M., Tse, H. J., Wong, R. C., & Chun, P. (2009). *Lateral Flow Immunoassay*. Totowa: Humana Press.
- Olson, K. B. (1999). Aum Shinrikyo: once and future threat? *Emerg Infect Dis*, *5*(4), 513-516.
- Oyston, P. C. (2008). *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J Med Microbiol*, *57*(Pt 8), 921-930.
- Oyston, P. C., Sjostedt, A., & Titball, R. W. (2004). Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol*, *2*(12), 967-978.
- Paul-Ehrlich-Institut. (2020). Anforderungen an die Validierung bzw. den Routinebetrieb von Nukleinsäure AmplifikationsTechniken (NATs) zum Nachweis von Virusnukleinsäuren in Spenderblut [Webpage]. Abgerufen von [https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/regulation/blut/spendertestung/pei-anforderungen-validierung-nat.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=3](https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/regulation/blut/spendertestung/pei-anforderungen-validierung-nat.pdf?__blob=publicationFile&v=3) am 04.03.2021
- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T., Prentice, M. B., Sebahia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S. D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A. M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R. M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P. C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., & Barrell, B. G. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, *413*(6855), 523-527.
- Peckham, G. D., Hew, B. E., Waller, D. F., Holdaway, C., & Jen, M. (2013). Amperometric Detection of *Bacillus anthracis* Spores: A Portable, Low-Cost Approach to the ELISA. *Int J Electrochem*, *2013*, 1-6.
- Perry, R. D., & Fetherston, J. D. (1997). *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*, *10*(1), 35-66.
- Petrov, V. G. (1960). Experimental Study of *Dermacentor marginatus* Sulz. and *Rhipicephalus rossicus* Jak. et K. Jak. Ticks as Vectors of Tularemia. *J Parasitol*, *46*(6), 877-884.

- Pike, R. M. (1976). Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. *Health Lab Sci*, 13(2), 105-114.
- Pile, J. C., Malone, J. D., Eitzen, E. M., & Friedlander, A. M. (1998). Anthrax as a Potential Biological Warfare Agent. *Arch Intern Med*, 158(5), 429-434.
- Post, D. M. B., Slutter, B., Schilling, B., Chande, A. T., Rasmussen, J. A., Jones, B. D., D'Souza, A. K., Reinders, L. M., Harty, J. T., Gibson, B. W., & Apicella, M. A. (2017). Characterization of Inner and Outer Membrane Proteins from *Francisella tularensis* Strains LVS and Schu S4 and Identification of Potential Subunit Vaccine Candidates. *mBio*, 8(5), e01592-01517.
- Prentice, K. W., DePalma, L., Ramage, J. G., Sarwar, J., Parameswaran, N., Petersen, J., Yockey, B., Young, J., Joshi, M., Thirunavvukarasu, N., Singh, A., Chapman, C., Avila, J. R., Pillai, C. A., Manickam, G., Sharma, S. K., Morse, S. A., Venkateswaran, K. V., Anderson, K., Hodge, D. R., & Pillai, S. P. (2019). Comprehensive Laboratory Evaluation of a Lateral Flow Assay for the Detection of *Yersinia pestis*. *Health Secur*, 17(6), 439-453.
- Proctor, R. N. (1996). Factories of Death: Japanese Biological Warfare, 1932-45, and the American Cover-up. *Jama*, 275(10), 808-809.
- Pullen, R. L., & Stuart, B. M. (1945). Tularemia: analysis of 225 cases. *Jama*, 129(7), 495-500.
- Radun, D., Bernard, H., Altmann, M., Schoneberg, I., Bochat, V., van Treeck, U., Rippe, R. M., Grunow, R., Elschner, M., Biederbick, W., & Krause, G. (2010). Preliminary case report of fatal anthrax in an injecting drug user in North-Rhine-Westphalia, Germany, December 2009. *Euro Surveill*, 15(2), 298-298.
- Rakin, A. (2003). *Yersinia pestis*. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 46(11), 949-955.
- Rajerison, M., Melocco, M., Andrianaivoarimanana, V., Rahajandraibe, S., Rakotoarimanana, F., Spiegel, A., Ratsitorahina, M., & Baril, L. (2020). Performance of plague rapid diagnostic test compared to bacteriology: a retrospective analysis of the data collected in Madagascar. *BMC Infect Dis*, 20(1), 90.
- Ramage, J. G., Prentice, K. W., DePalma, L., Venkateswaran, K. S., Chivukula, S., Chapman, C., Bell, M., Datta, S., Singh, A., Hoffmaster, A., Sarwar, J., Parameswaran, N., Joshi, M., Thirunavvukarasu, N., Krishnan, V., Morse, S., Avila, J. R., Sharma, S., Estacio, P. L., Stanker, L., Hodge, D. R., & Pillai, S. P. (2016). Comprehensive Laboratory Evaluation of a Highly Specific Lateral Flow Assay for the Presumptive Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious White Powders and Environmental Samples. *Health Secur*, 14(5), 351-365.
- Ramsay, C. N., Stirling, A., Smith, J., Hawkins, G., Brooks, T., Hood, J., Penrice, G., Browning, L. M., Ahmed, S., Nhs, G. G. C., & Scottish National Outbreak Control (2010). An outbreak of infection with *Bacillus anthracis* in injecting drug users in Scotland. *Euro Surveill*, 15(2), 19465.
- Riedel, S. (2005). Plague: from natural disease to bioterrorism. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 18(2), 116-124.
- Ringertz, S. H., Hoiby, E. A., Jensenius, M., Maehlen, J., Caugant, D. A., Myklebust, A., & Fossum, K. (2000). Injective anthrax in a heroin skin-popper. *Lancet*, 356(9241), 1574-1575.
- Robert-Koch-Institut (2017). Pest RKI-Ratgeber [Webpage]. Abgerufen von [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Pest.html#doc10166986bodyText12](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Pest.html#doc10166986bodyText12) am 15.08.2019
- Robert-Koch-Institut (2016). Tularämie RKI-Ratgeber [Webpage]. Abgerufen von [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tularaemie.html;jsessionid=C5468DAAC37F77529597339DC136AD84.internet102#doc2398238bodyText11](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tularaemie.html;jsessionid=C5468DAAC37F77529597339DC136AD84.internet102#doc2398238bodyText11) am 02.03.2021
- Robertson, A. G., & Robertson, L. J. (1995). From asps to allegations: biological warfare in history. *Mil Med*, 160(8), 369-373.
- Ross, J. M. (1957). The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J Pathol*, 73(2), 485-494.
- Rowe, H. M., & Huntley, J. F. (2015). From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 94.

- Rudolph, A. E., Stuckey, J. A., Zhao, Y., Matthews, H. R., Patton, W. A., Moss, J., & Dixon, J. E. (1999). Expression, Characterization, and Mutagenesis of the Yersinia pestis Murine Toxin, a Phospholipase D Superfamily Member. *J Biol Chem*, 274(17), 11824-11831.
- Saeed, A. A. B., Al-Hamdan, N. A., & Fontaine, R. E. (2005). Plague from Eating Raw Camel Liver. *Emerg Infect Dis*, 11(9), 1456-1457.
- Sajid, M., Kawde, A. N., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *J Saudi Chem Soc*, 19(6), 689-705.
- Schäfer, A. (2017). *Bioterrorismus und Biologische Waffen*. Berlin: Verlag Dr. Köster.
- Schmid, G., & Kaufmann, A. (2002). Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clin Microbiol Infect*, 8(8), 479-488.
- Simpson, W. M. (1928). Tularemia (Francis' Disease): A Clinical and Pathological Study of Forty-Eight Non-Fatal Cases and One Rapidly Fatal Case, with Autopsy, Occurring in Dayton, Ohio. *Ann Intern Med*, 1(12), 1007-1059.
- Sirisanthana, T., & Brown, A. E. (2002). Anthrax of the gastrointestinal tract. *Emerg Infect Dis*, 8(7), 649-651.
- Sirisanthana, T., Navachareon, N., Tharavichitkul, P., Sirisanthana, V., & Brown, A. E. (1984). Outbreak of oral-oropharyngeal anthrax: an unusual manifestation of human infection with Bacillus anthracis. *Am J Trop Med Hyg*, 33(1), 144-150.
- Sirisanthana, T., Nelson, K. E., Ezzell, J. W., & Abshire, T. G. (1988). Serological studies of patients with cutaneous and oral-oropharyngeal anthrax from northern Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 39(6), 575-581.
- Slack, P. (1989). The black death past and present. 2. Some historical problems. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 83(4), 461-463.
- Smith, H., & Keppie, J. (1954). Observations on experimental anthrax; demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by Bacillus anthracis. *Nature*, 173(4410), 869-870.
- Sodeinde, O. A., Subrahmanyam, Y. V., Stark, K., Quan, T., Bao, Y., & Goguen, J. D. (1992). A surface protease and the invasive character of plague. *Science*, 258(5084), 1004-1007.
- Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für hochkontagiöse und lebensbedrohliche Erkrankungen am Robert Koch-Institut. (2016). Hinweise zur Therapie der Tularämie [Webpage]. Abgerufen von [https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Stakob/Stellungnahmen/Stellungnahmen\\_node.html](https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Stakob/Stellungnahmen/Stellungnahmen_node.html) am 15.08.19
- Stearns-Kurosawa, D. J., Lupu, F., Taylor, F. B., Jr., Kinaseswitz, G., & Kurosawa, S. (2006). Sepsis and pathophysiology of anthrax in a nonhuman primate model. *Am J Pathol*, 169(2), 433-444.
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res*, 43(D1), D593-598.
- Stuart, B. M., & Pullen, R. L. (1945). Tularemic Meningitis: Review of the Literature and Report of a Case with postmortem Observations. *Arch Intern Med*, 76(3), 163-166.
- Svensson, K., Larsson, P., Johansson, D., Bystrom, M., Forsman, M., & Johansson, A. (2005). Evolution of subspecies of Francisella tularensis. *J Bacteriol*, 187(11), 3903-3908.
- Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., & Mock, M. (2003). Polymorphism in the collagen-like region of the Bacillus anthracis BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *J Bacteriol*, 185(5), 1555-1563.
- Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., & Mock, M. (2003). A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the Bacillus anthracis exosporium. *Mol Microbiol*, 45(1), 169-178.
- Tarnvik, A., & Chu, M. C. (2007). New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1105(1), 378-404.
- Tarnvik, A., Sandstrom, G., & Sjostedt, A. (1996). Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931-1993. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 13(3), 201-204.
- Teutsch, S. M., Martone, W. J., Brink, E. W., Potter, M. E., Eliot, G., Hoxsie, R., Craven, R. B., & Kaufmann, A. F. (1979). Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N Engl J Med*, 301(15), 826-828.

- Tigertt, W. D. (1962). Soviet viable *Pasteurella tularensis* vaccines. A review of selected articles. *Bacteriol Rev*, 26(3), 354-373.
- Titball, R. W., Sjostedt, A., Pavelka, M. S., Jr., & Nano, F. E. (2007). Biosafety and selectable markers. *Ann N Y Acad Sci*, 1105(1), 405-417.
- Titball, R. W., Turnbull, P. C., & Hutson, R. A. (1991). The monitoring and detection of *Bacillus anthracis* in the environment. *Soc Appl Bacteriol Symp*, 20, 9S-18S.
- Torok, T. J., Tauxe, R. V., Wise, R. P., Livengood, J. R., Sokolow, R., Mauvais, S., Birkness, K. A., Skeels, M. R., Horan, J. M., & Foster, L. R. (1997). A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. *Jama*, 278(5), 389-395.
- Trevisanato, S. I. (2007). The 'Hittite plague', an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare. *Med Hypotheses*, 69(6), 1371-1374.
- Tschäpe, H., Reissbrodt, R., & Prager, R. (2009). *Yersinia* spp. In B. Neumeister, Geiss, H. K., Braun, R., & Kimmig, P. (Eds.), *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie* (pp. 454-457). Leipzig: Georg Thieme Verlag.
- Turnbull, P. C. (1991). Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*, 9(8), 533-539.
- Turnbull, P. C. (2008). *Anthrax in humans and animals Fourth Edition*. Genf: World Health Organization.
- Turnbull, P. C. & Kramer, J. M., (1991). *Bacillus*. In A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg & H. J. Shadomy (Eds.), *Manual of clinical microbiology* Vol. 5 (pp. 296-303). Washington: American Society for Microbiology.
- United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (2014). *USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties Handbook 8th Edition*. Fort Detrick Frederick: U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases.
- Vasconcelos, D., Barnewall, R., Babin, M., Hunt, R., Estep, J., Nielsen, C., Carnes, R., & Carney, J. (2003). Pathology of inhalation anthrax in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Lab Invest*, 83(8), 1201-1209.
- Velsko, S. P. (2005). Physical and Chemical Analytical Analysis: A key component of Bioforensics. In *AAAS Annual Conference 15.02.2005*, Washington D.C.
- Vinogradov, E., Perry, M. B., & Conlan, J. W. (2002). Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*, 269(24), 6112-6118.
- von Reyn, C. F., Barnes, A. M., Weber, N. S., & Hodgkin, U. G. (1976). Bubonic plague from exposure to a rabbit: a documented case, and a review of rabbit-associated plague cases in the United States. *Am J Epidemiol*, 104(1), 81-87.
- Vorontsov, E. D., Dubichev, A. G., Serdobintsev, L. N., & Naumov, A. V. (1990). Association-dissociation processes and supermolecular organisation of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis*. *Biomed Sci*, 1(4), 391-396.
- Warring, W. B., & Ruffin, J. S., Jr. (1946). A tickborne epidemic of tularemia. *N Engl J Med*, 234, 137-140.
- Westphal, O., Lüderitz, O., & Bister, F. (1952). Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 7(3), 148-155.
- Wheelis, M. (2002). Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 971-975.
- Whiting, G. C., Rijpkema, S., Adams, T., & Corbel, M. J. (2004). Characterisation of adsorbed anthrax vaccine by two-dimensional gel electrophoresis. *Vaccine*, 22(31-32), 4245-4251.
- World Health Organisation (1970). *Health aspects of chemical and biological weapons*. Genf: World Health Organization.
- World Health Organisation (1999). *Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control*. Genf: World Health Organization.
- World Health Organisation (2017). Plague – Madagascar, Disease outbreak news [Webpage]. Abgerufen von <https://www.who.int/csr/don/27-november-2017-plague-madagascar/en/> am 15.08.2019

- Worsham, P. L., & Roy, C. (2004). Pestoides F, a *Yersinia pestis* Strain Lacking Plasminogen Activator, is Virulent by the Aerosol Route. In M. Skurnik, J. A. Bengoechea & K. Granfors (Eds.), *The Genus Yersinia. Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 529 (pp. 129-131). Boston: Springer.
- Yang, S., Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*, 4(6), 337-348.
- Yersin, A. (1894). La peste bubonique à Hong-Kong. *Ann Inst Pasteur* 2, 428-430.
- Young, L. S., Bicknell, D. S., Archer, B. G., Clinton, J. M., Leavens, L. J., & Feeley, J. C. (1969). Tularemia Epidemic: Vermont, 1968: Forty-Seven Cases Linked to Contact with Muskrats. *N Engl J Med*, 280(23), 1253-1260.
- Zasada, A. A., Forminska, K., Zacharczuk, K., Jacob, D., & Grunow, R. (2015). Comparison of eleven commercially available rapid tests for detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Lett Appl Microbiol*, 60(5), 409-413.

## **Dankwort**

Ich möchte mich herzlich bei dem Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Dirk Busch für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Markus Gerhard für die Übernahme der Mentorenschaft dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt dem ehem. Leiter des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr, Herrn Prof. Dr. med. Lothar Zöller für die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut.

Weiterhin danke ich von ganzem Herzen Herrn Dr. rer. nat. Kilian Stoecker und Herrn Dr. med. Patrick Vollmar für ihre zuverlässige Betreuung, die stetige Unterstützung, die vielfältigen Erfahrungen und für das weit über das normale Maß hinausgehende Engagement.

Dem gesamten Team der TE50 und den Mitgliedern des KB1, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben, danke ich sehr herzlich für die freundliche Unterstützung bei Fragen, Problemen und Hilfestellungen während der Promotion. Außerdem gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Mandy Knüpfer, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir stets zur Seite standen und mich auf dem Weg der Promotion begleitet haben. Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern sowie meinem Lebensgefährten.