



Daniel Stern · Martin Richter · Livia Schrick · Peter Lasch · Kathrin Keeren ·
 Angela Polleichtner · Karin Lemmer · Andreas Nitsche · Roland Grunow ·
 Christian Herzog · Brigitte G Dorner · Lars Schaade

Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene (ZBS), Robert Koch-Institut, Berlin,
 Deutschland

Vor-Ort-Nachweis bioterroristisch relevanter Agenzien

Schnelle Nachweismethoden für Viren, Bakterien und Toxine – Potenziale und Grenzen

Hintergrund

Terroristische Gruppierungen haben in der Vergangenheit äußerst selten biologische Agenzien im Rahmen von Anschlagsvorhaben eingesetzt [1]. Jedoch besteht bei bioterroristischen Anschlägen in Abhängigkeit des Szenarios ein potenziell hohes Risiko für die Gesundheit der Bevölkerung, was je nach freigesetztem Agens spezifische Schutz- und Gegenmaßnahmen erfordert [2]. Bioterroristisch relevante Agenzien umfassen eine breite Gruppe viraler oder bakterieller Erreger sowie Toxine, die bei intentionaler Freisetzung aufgrund ihrer Pathogenität erhebliche Auswirkungen auf das öffentliche Gesundheitssystem haben. Der primäre Nachweis bioterroristisch relevanter Agenzien muss die Abgrenzung natürlicher biologischer Stoffe von diesen pathogenen Agenzien beinhalten. Dies erfordert Detektionsverfahren, die entsprechende biologische Stoffgruppen erfassen und möglichst schnell eine spezifische Identifizierung der bioterroristisch relevanten pathogenen Agenzien ermöglichen. Zwar wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher Vor-Ort-Detektionssysteme entwickelt [3, 4], jedoch ist deren Einsatz aufgrund der spezifischen Anforderungen bisher nur eingeschränkt möglich, wie nachfolgend erläutert.

Messprinzipien von Vor-Ort-Detektionssystemen

Bei der Vor-Ort-Detektion muss deutlich zwischen der Mobilisierung von Standard-Labora-ausrüstungen und dezidiert für die Schnelldetektion entwickelten Systemen unterschieden werden [3]. Während Erstere als technische Einrichtung mobile Labore bestücken und daher ähnlich sensitiv und zuverlässig wie stationäre Labormethoden sein können, führen bei Letzteren spezifische Anforderungen wie die Einfachheit und die gewünschte Geschwindigkeit der Durchführung in der Regel zu einer Verringerung der Sensitivität. Kommerziell erhältliche Systeme zur Vor-Ort-Detektion lassen sich in drei Kategorien gliedern. Neben generischen Schnelldetektionssystemen, die biologische Moleküle oder Erreger mit offenem Blick detektieren, basieren die meisten spezifischen Nachweismethoden auf zwei Grundprinzipien: dem sogenannten immunologischen (Antikörper-basierten) Nachweis oder dem nukleinsäurebasierten Nachweis (Abb. 1).

Generische Schnelldetektionssysteme

Generische Detektionssysteme ermöglichen im Idealfall die Detektion einer Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Substanzklassen, ohne dass spe-

zifische Nachweisreagenzien, Marker, Label, Farbstoffe etc. eingesetzt werden müssen; sie zeichnen sich also durch den sogenannten „offenen Blick“ aus. Damit unterscheiden sich generische Detektionssysteme konzeptionell deutlich von immunologischen bzw. nukleinsäurebasierten Assays. Beispiele für generische Nachweissysteme sind bildgebende Verfahren (Mikroskopie, Elektronenmikroskopie) [5], Detektionssysteme für den massenspektrometrischen (MS) Nachweis [6], Spektroskopie-basierte Systeme (Abb. 1a; [7–9]) sowie der Nachweis vitaler Mikroorganismen mittels Biolumineszenz (Abb. 1b; [10]).

Während Bildgebungs- und MS-gestützte Detektionssysteme in der Praxis noch keine Bedeutung für die schnelle Vor-Ort-Detektion biologischer Agenzien zukommt, sind spektroskopische Systeme aufgrund ihrer kommerziellen Verfügbarkeit, einfachen Bedienung und des geringen Messaufwands bereits von einiger praktischer Relevanz. Insbesondere vibrationspektroskopische, d. h. Infrarot(IR)- und Raman-Spektroskopie-basierte mobile Geräte finden immer mehr Anwendung.

Das Prinzip einer IR- bzw. Raman-spektroskopischen Messung beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen eingestrahlttem Licht und Materie (Abb. 1a). Bei einer IR-Messung wird der Grad der Abschwächung des Lichts einer polychromatischen IR-Quel-

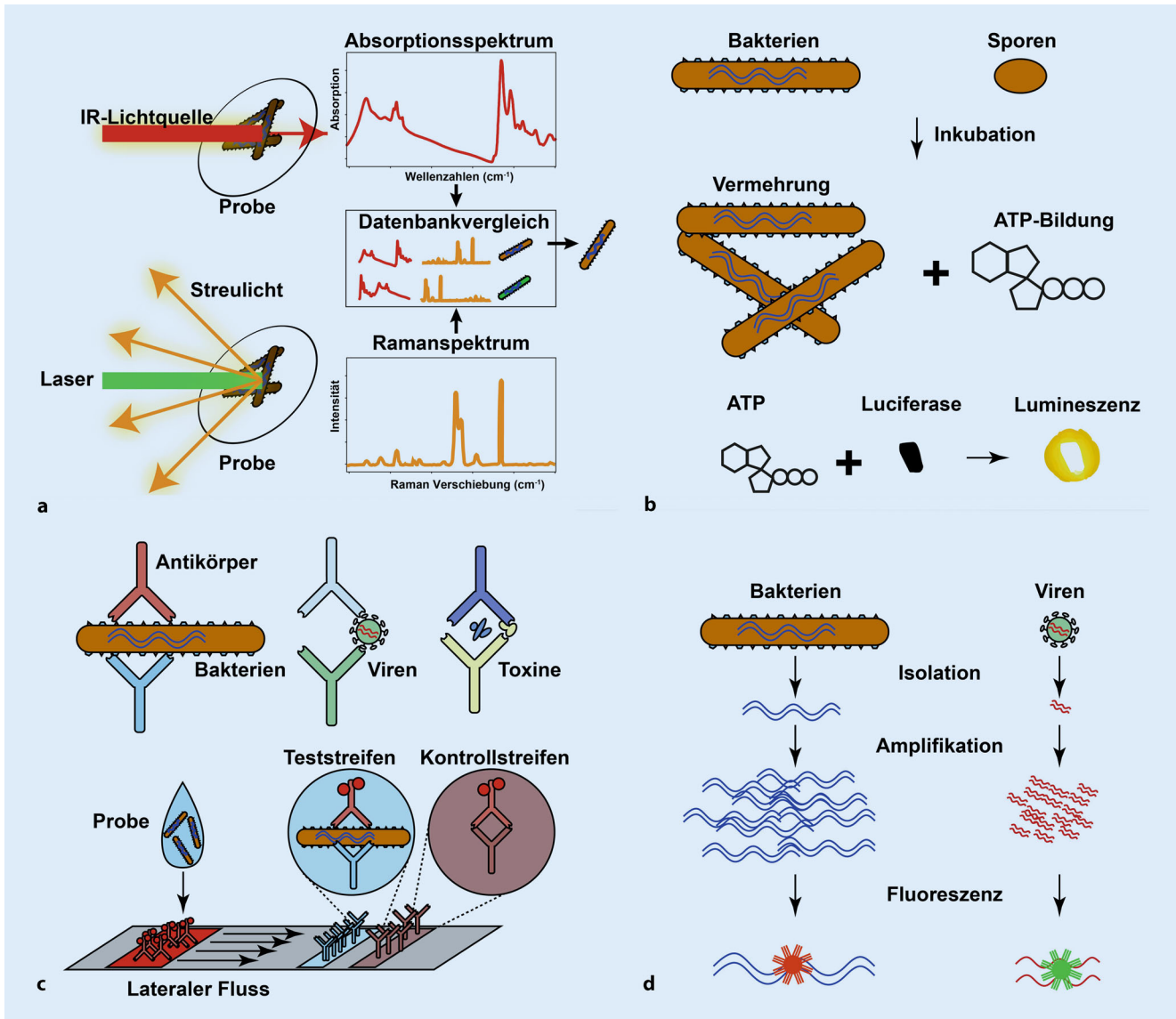


Abb. 1 ▲ Messprinzipien von Vor-Ort-Detektionssystemen. **a** Vibrationspektroskopische Verfahren wie die Infrarot(IR)-Spektroskopie (oben) oder die Raman-Spektroskopie (unten) können durch Vergleich spezifischer spektraler Muster unbekannte Substanzen durch Datenbankvergleich mit hinterlegten Referenzspektren identifizieren. **b** Vegetative Bakterien oder Sporen können durch das bei der Vermehrung bzw. bei beginnender Sporenkeimung gebildete Adenosintriphosphat (ATP) nach Inkubation im Nährmedium nachgewiesen werden. Der Nachweis beruht hierbei auf der Lumineszenz, die durch die Reaktion von Luciferase mit ATP entsteht. Der Nachweis ist nicht spezifisch und lässt keine Differenzierung zwischen pathogenen und apathogenen Bakterien bzw. -sporen zu. **c** In immunologischen Verfahren werden Paare von Antikörpern gegen Bakterien, Viren oder Toxine in Lateral Flow Assays (LFA) dazu verwendet, die Anwesenheit des Erregers oder Toxins durch Färbung eines Teststreifens anzuzeigen. **d** Nukleinsäurebasierte Verfahren beruhen auf der enzymatischen Amplifikation von Erbsubstanz. Die Detektion basiert auf der spezifischen Markierung der vermehrten Nukleinsäure durch Fluoreszenzfarbstoffe

le beim Durchtritt durch die Probe erfasst (Absorptionsanordnung). Im Gegensatz dazu wird in der Raman-Spektroskopie die probeninduzierte Frequenzverschiebung von Streulicht bezüglich einer monochromatischen Lichtquelle (Laser) aufgezeichnet (Streuanordnung). In beiden Fällen werden probenspezifische Bandenmuster erfasst, welche einerseits

detaillierte Rückschlüsse auf die Struktur und molekulare Zusammensetzung der untersuchten Probe ermöglichen, andererseits aber auch als molekulare „Fingerprints“ interpretiert werden können. Für die mobile Diagnostik ist vor allem der zweite Ansatz von Interesse: moderne mobile IR- und Raman-Geräte ermöglichen zumeist einen schnellen Abgleich

aktueller Messdaten mit umfangreichen validierten Datenbanken mit oft mehreren tausend Spektreneinträgen. Mittels Berechnung von spektralen Distanzen können so vor Ort Reinsubstanzen durch Personen ohne spektroskopische Kenntnisse schnell und unkompliziert detektiert werden.

Vor-Ort-Nachweis bioterroristisch relevanter Agenzien. Schnelle Nachweismethoden für Viren, Bakterien und Toxine – Potenziale und Grenzen

Zusammenfassung

In Europa besteht eine abstrakte Gefährdungslage nicht nur für konventionell durchgeführte Anschläge mit Waffen oder Sprengstoffen, sondern auch für Anschläge, bei denen biologische Agenzien eingesetzt werden. Zur Gefahrenabwehr werden daher kontinuierlich schnelle und zuverlässige Nachweismethoden entwickelt und erprobt. Für die Anwendung im stationären Labor wurde für bioterroristisch relevante Agenzien bereits ein umfassendes Spektrum an Nachweismethoden etabliert. Für eine Vor-Ort-Detektion aus Umweltproben werden darüber hinaus von den Einsatzkräften zunehmend vergleichbar verlässliche mobile Nachweissysteme zur ersten Lagebewertung gewünscht.

Basierend auf den Funktionsprinzipien können generische, immunologische und nukleinsäurebasierte Vor-Ort-Detektionsverfahren unterschieden werden. Diese sollten einfach durchzuführen, schnell, sensitiv und spezifisch sein. Kommerziell erhältliche Vor-Ort-Detektionssysteme haben systembedingt häufig eine eingeschränkte Sensitivität und sind zumeist nicht von unabhängiger Seite validiert. Darüber hinaus stellt die Vielfalt an potenziell nachzuweisenden Agenzien in komplexen Umweltproben eine besondere Herausforderung dar. Daher ist detailliertes Wissen über Einsatzbereiche und Limitation der verwendeten Testsysteme zwingend erforderlich, um erhaltene Ergebnisse zielfüh-

rend bewerten und Handlungsempfehlungen ableiten zu können.

Ziel dieses Artikels ist es, einen Überblick über die Messprinzipien von Vor-Ort-Detektionssystemen für bioterroristisch relevante Viren, Bakterien und Toxine sowie Vor- und Nachteile der Testsysteme zu geben. Trotz vielversprechender Entwicklungen sind derzeit erhältliche Testsysteme zur Vor-Ort-Detektion noch beschränkt aussagekräftig. Deshalb sind Expertenlabore zur gesicherten Befundung von Umweltproben weiterhin einzubeziehen.

Schlüsselwörter

Vor-Ort-Detektion · Schnelldetektion · Viren · Bakterien · Toxine

On-site detection of bioterrorism-relevant agents. Rapid detection methods for viruses, bacteria and toxins – capabilities and limitations

Abstract

In Europe, besides the threat of terrorist attacks involving conventional methods such as explosive devices and automatic weapons, there is also a potential threat of terrorist groups using non-conventional material like biological agents in the scope of future attacks. Consequently, rapid and reliable detection systems for biological agents are being developed and tested continuously to inform crisis management. For environmental detection, a broad spectrum of different laboratory-based techniques has been developed for relevant biological agents. However for environmental samples, fast and reliable on-site detection methods are desired by first responders for rapid assessment.

Based on different functional principles, generic, immunological and nucleic-acid-based on-site detection methods can be distinguished. Those should be facile, fast, sensitive, and specific. However, commercially available kits usually have limited sensitivity and often have not been validated independently. Furthermore in this context, the multitude of relevant biological agents that potentially have to be considered present in complex environmental matrices poses a serious challenge for reliable detection. Therefore, detailed knowledge of the specific scope of applications and the limitations of different analytical systems is necessary to evaluate the results obtained purposefully.

The aim of this article is to provide an overview of the analytical principles, benefits and limitations of prevailing on-site environmental detection systems for bioterrorism-relevant viruses, bacteria and toxins. Despite promising developments the informative value of currently available on-site tests is still limited. Thus, expert laboratories have to conduct confirmatory testing.

Keywords

On-site detection · Rapid detection · Viruses · Bacteria · Toxins

Spezifische Schnelldetektionssysteme

Immunologische Schnelldetektionssysteme

Immunologische Schnelldetektionsverfahren basieren auf Bindungsmolekülen, meist Antikörpern, die hochspezifisch an Oberflächenstrukturen von Viren, Bakterien oder Toxinen binden (Abb. 1c). Paare von Antikörpern gegen unterschiedliche Strukturen eines Erregers

oder Toxins werden häufig in sogenannten Lateral Flow Assays (LFA) eingesetzt [11]. Hierbei wird die erreger- oder toxinhaltige Probe auf einen Teststreifen getropft, der im Startfenster farbstoffmarkierte Antikörper enthält. Ein Teil dieser Antikörper bindet an den Erreger/das Toxin und wandert zusammen mit der Flüssigkeit der Probe durch Kapillarkräfte im Trägermaterial über einen Test- und Kontrollstreifen. Im Teststreifen befindliche, auf einer querliegenden

Linie immobilisierte Antikörper binden den Komplex aus Erreger/Toxin und farbstoffmarkiertem Antikörper und lassen diese Linie sichtbar werden. Die dahinter liegende Kontrolllinie enthält Antikörper, die direkt an die freien, farbstoffmarkierten Antikörper binden und somit durch Färbung die korrekte Durchführung des Tests anzeigen.

Tab. 1 Bioterroristisch relevante Erreger und Toxine (nach [13])

Krankheit	Erreger	Art des Agens	Kategorie ^a
Pocken	Variola major	Virus	A
Milzbrand	Bacillus anthracis	Bakterium	A
Pest	Yersinia pestis	Bakterium	A
Botulismus	Clostridium botulinum	Toxin	A
Tularämie	Francisella tularensis	Bakterium	A
VHF ^b	Filo- oder Arenaviren	Virus	A
VE ^c	Alphaviren	Virus	B
Q-Fieber	Coxiella burnetii	Bakterium	B
Brucellose	Brucella ssp.	Bakterium	B
Rotz	Burkholderia mallei	Bakterium	B
Melioidose	Burkholderia pseudomallei	Bakterium	B
Psittakose	Chlamydia psittaci	Bakterium	B
Rizintoxin	Ricinus communis ^d	Toxin	B
Typhus	Salmonella thyphimurium	Bakterium	B
Cholera	Vibrio cholerae	Bakterium	B
Shigellose	Shigella ssp.	Bakterium	B

^aKategorisierung wurde auf 4 Kriterien basierend vorgenommen: 1) Einfluss auf die öffentliche Gesundheit bezüglich Erkrankungen und Todesfällen. 2) Potenzial, das Agens mit großen Bevölkerungsgruppen in Kontakt zu bringen, basierend auf der Stabilität, der Möglichkeit zur Massenproduktion, des Verteilungspotenzials sowie der potenziellen Mensch-zu-Mensch-Übertragung des Agens. 3) Öffentliche Wahrnehmung in Bezug auf Angst und Panik. 4) Anforderungen an das öffentliche Gesundheitssystem bezüglich des Vorsorgebedarfs, verstärkter Überwachung und des diagnostischen Bedarfs. Kategorie A: Potenziell größten negativen Einfluss auf die öffentliche Gesundheit und höchste Anforderungen an den Vorsorgebedarf sowie mittleres bis hohes Potenzial zur Ausbringung in großem Maßstab oder hohes Panikpotenzial. Kategorie B: Ebenfalls Potenzial zur Ausbringung in großem Maßstab, aber geringere Pathogenität, weswegen die Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit geringer ausfallen würden

^bVirale hämorrhagische Fieber. Erreger z. B. Ebolavirus, Marburg-Virus, Lassa-Virus

^cVirale Enzephalitis. Erreger z. B. Pferdeenzephalomyelitis-Erreger

^dHier produzierende Stammpflanze nicht Erreger

Nukleinsäurebasierte Nachweis-systeme

Nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren detektieren pathogenspezifische Erbsubstanz (■ **Abb. 1d**). In der Regel sind das Bakterien oder Viren, nicht aber Toxine. Die Erbsubstanz muss meist zunächst aus den Proben isoliert werden, wonach die enzymatische Vermehrung (Amplifikation) spezifischer Abschnitte der Nukleinsäure durch eine sogenannte Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) stattfindet. Hierbei binden fluoreszenzmarkierte Reporter-moleküle sequenzspezifisch an die amplifizierte Nukleinsäure, wodurch sich bei Anwesenheit der Erregererbsubstanz diese nachweisen lässt [12].

Herausforderungen beim Einsatz von Schnelldetektionsverfahren

Komplexität bioterroristisch relevanter Agenzien

Der Nachweis bioterroristisch relevanter Agenzien muss letztlich zwingend spezifisch erfolgen. Da jedoch im Anschlagfall das freigesetzte Agens zuerst unbekannt sein dürfte, muss in Abhängigkeit des Szenarios eine Vielzahl verschiedener bioterroristisch relevanter Viren, Bakterien und Toxine nachgewiesen werden können. Zur Eingrenzung werden in zahlreichen Staaten durch die nationalen Gesundheits- und Sicherheitsbehörden bioterroristisch relevante Agenzien kategorisiert (■ **Tab. 1**; [13]). Jedoch umfasst allein die hierbei erstellte Liste der Kategorie A, die die gefährlichsten Agenzien

enthält, zahlreiche virale und bakterielle Erreger sowie ein Toxin (Botulinum-Neurotoxin), die darüber hinaus in einer Reihe von Varianten, Sero- oder Subtypen vorkommen [14–16]. Allein aufgrund dieser Problematik kann ein negatives Ergebnis in spezifischen Tests keinen Ausschluss aller in Frage kommenden Agenzien gewährleisten.

Zusätzlich müssen diese zur Entfaltung ihrer schädlichen Wirkung im Organismus biologisch aktiv sein. Spektroskopische, immunologische und nukleinsäurebasierte Detektionsverfahren reagieren unter Umständen positiv mit inaktiven Erregern oder Toxinen oder können systembedingt keine Aussagen zur biologischen Aktivität liefern. Daher bedeutet ein positives Ergebnis nicht zwangsläufig, dass von den nachgewiesenen Agenzien tatsächlich eine Gesundheitsgefahr ausgeht. Deshalb sollte die Gefährdungsbeurteilung möglichst auch die frühzeitige Abschätzung der Vitalität und Pathogenität bakterieller und viraler Agenzien und der biologischen Aktivität von Toxinen umfassen [17, 18].

Sensitivität und Spezifität

Spektroskopische Verfahren

Die analytische Sensitivität vibrations-spektroskopischer, d. h. IR- und Raman-basierter Vor-Ort-Nachweissysteme ist gegenüber laborgestützten Messanordnungen oft deutlich reduziert. Während mit stationären Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR)-Mikroskopen bzw. konfokalen Raman-Mikrospektrometern Probenmengen im niedrigen einstelligen Nanogramm-bereich untersucht werden können, benötigen mobile Spektroskopiesysteme Materialmengen im Milligrammbereich. Ein weitaus größeres Problem beim Einsatz spektroskopischer Methoden an Einsatzorten stellt jedoch die Tatsache dar, dass in den uns bekannten kommerziellen Datenbanken lediglich Spektren von Reinsubstanzen hinterlegt sind, die zu untersuchenden Realproben jedoch häufig komplexe Mischungen verschiedener Komponenten darstellen. Da Softwarealgorithmen zum Entmischen („spectral unmixing“) von überlagerten IR- und Raman-Spektren auch unter idealen

Bedingungen nur eingeschränkt erfolgreich sind, kann die Zusammensetzung von Mischproben nur bei Vorliegen von nur wenig kontaminierten Reinproben, beispielsweise von mit Staub versetztem Zucker oder Mehl, als klassische Trittbrettfahrersubstanzen aufgedeckt werden.

Immunologische Schnell-detektionsverfahren

Da Schnelldetektionsverfahren für den Einsatz vor Ort schnell und einfach durchführbar sein müssen, wurden die Systeme auf Kosten der Empfindlichkeit so einfach wie möglich gehalten. Während mit Labormethoden beispielsweise Toxine im ein- bis zweistelligen Picogramm-pro-Milliliter-Bereich nachgewiesen werden können [19], sind kommerzielle Lateral Flow Assays (LFA) um einen Faktor 1000 weniger empfindlich und benötigen bestenfalls wenige Nanogramm pro Milliliter für den Toxin-nachweis [20]. Der Hauptgrund hierfür liegt im direkten Nachweis der Antikörperbindung, wohingegen bei Labormethoden enzymatische Signalamplifikationsschritte zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität führen [21]. Zwar existieren auch deutlich empfindlichere Varianten immunologischer Schnelltests wie die Immunfiltration [22], aufgrund des erhöhten Präparationsaufwands wird die Durchführung dieser Tests jedoch häufig von Einsatzkräften als zu komplex empfunden. Schwerwiegender als die systembedingten Einschränkungen der Sensitivität von LFA ist jedoch, dass kommerziell erhältliche LFA-Tests entweder gar nicht funktional waren oder die in unabhängigen Validierungen bestimmten Empfindlichkeiten deutlich oberhalb der Herstellerangaben lagen [23–25].

Neben diesen Einschränkungen bei der Sensitivität besteht bei LFAs durch die Verwendung von Antikörpern die Gefahr unspezifischer Erkennung eng verwandter Stoffe [26]. Noch bedenklicher jedoch ist, wenn die eingesetzten Antikörper gar nicht das Toxin selbst, sondern lediglich mit dem Toxin in Verbindung vorliegende Proteine erkennen, wie dies für LFA zum Nachweis von Botulinum-Neurotoxin gezeigt werden kann-

te [27]. Hierdurch war gereinigtes Toxin, das weiterhin toxisch ist, nicht nachweisbar, da die in ungereinigten Präparationen ebenfalls vorhandenen Proteine durch den Reinigungsschritt entfernt wurden. Solch falsch-negative Ergebnisse können ebenfalls bei Toxinvarianten auftreten, falls Antikörper hoher Spezifität Varianten aufgrund von Veränderungen an der Antikörper-Bindungsstelle nicht mehr binden können [28, 29].

Bei Bakterien ergibt sich das Problem, dass eng verwandte Spezies und Subspezies, die eine sehr unterschiedliche Virulenz aufweisen können, nicht in allen Fällen mit immunologischen Markern zu unterscheiden sind [25]. Für *Yersinia pestis* wird zur immunologischen Unterscheidung von anderen *Yersinien* das F1-Kapselantigen verwendet [30]. Dieses Antigen wird allerdings nur bei 37 °C exprimiert und kann auch bei bestimmten Mutanten ganz fehlen, sodass hier falsch-negative Resultate zu berücksichtigen sind. Die Virulenzmarker für *Bacillus anthracis* werden durch Gene auf zwei Plasmiden exprimiert, die nur in vegetativen Zellen aktiv sind [31]. Bei Sporen können diese Marker nicht herangezogen werden, und bisher ist als einziger spezifischer immunologischer Marker das Zuckermolekül Anthrose bekannt [32]. Für *Francisella tularensis* ist immunologisch das Lipopolysaccharid (LPS) spezifisch, wogegen es hochaffine Antikörper gibt. Deshalb sind die besten LFAs bisher gegen *Francisella tularensis* erzeugt worden [33].

Für virale hochpathogene Erreger wurden bisher nur vereinzelt immunologische Schnelldetektionsverfahren beschrieben, wobei das wesentliche Problem in der mangelnden Sensitivität besteht. Für einen zuverlässigen Nachweis benötigt ein LFA für Pockenviren eine Virusmenge von 10^7 infektiösen Partikeln in der Probe [34]. Darüber hinaus erlauben immunologische Schnelldetektionsverfahren üblicherweise keine Unterscheidung zwischen dem Erreger der Humanpocken und nah verwandten, aber weniger pathogenen Pockenviren [35]. Ein Schnelldetektionsverfahren für Ebolaviren erzielte zwar in einer Feldstudie gute Sensitivitäten [36], jedoch

wurden nur stark positive Proben mit dem Schnelldetektionssystem analysiert.

Nukleinsäurebasierte Schnell-detektionsverfahren

Nukleinsäurebasierte Detektionsverfahren sind bekannt für ihre äußerst hohe Sensitivität. Oft sind weniger als 10 Kopien des genetischen Materials für den Nachweis erforderlich. Auch die Spezifität, die durch die Wahl der zur Amplifikation und Detektion genutzten Erbgutabschnitte im jeweiligen Assay bestimmt wird, ist in diesen Verfahren sehr hoch. Sensitivität und Spezifität stellen bei nukleinsäurebasierten Schnelldetektionsverfahren in der Regel keine unüberwindbaren Hindernisse dar, sondern vielmehr die Probenaufarbeitung, erforderliche komplexe Messgeräte und mit klassischen Schnelltests vergleichsweise lange Inkubationsdauern. Daher wird dieses Nachweisverfahren derzeit eher im Rahmen von mobilen Laboren durchgeführt, bei denen eine Laborinfrastruktur verfügbar ist. Es ist ein erstes vielversprechendes System für den Vor-Ort-Einsatz erhältlich, das jedoch Limitationen aufweist und weiter validiert werden muss [37]. Nukleinsäurebasierte Vor-Ort-Schnelldetektionsverfahren mit integrierten Messgeräten, die teilweise ganz auf die Probenvorbereitung (Extraktion) verzichten, nehmen zumeist einen erheblichen Verlust von Sensitivität beim Agensnachweis in Kauf und sind daher besonders kritisch im Hinblick auf die Aussagefähigkeit zu prüfen.

Nachweis aus komplexen Umweltproben

Eine besondere Schwierigkeit bei der Schnelldetektion bioterroristisch relevanter Agenzien liegt in der Notwendigkeit, empfindliche biologische Moleküle in komplexen Umweltproben nachzuweisen. Komplexe Umweltproben sind häufig Mischproben, die diverse klassische Mikroorganismen der Umwelt (Boden, Luft, Gewässer) als Beimaterial enthalten. Da die pathogenspezifischen Nachweismethoden ebenfalls auf biologischen Molekülen wie Nukleinsäuren, Antikörpern oder Enzymen basieren, kann die Zusammensetzung der Um-

Tab. 2 Exemplarische Ergebnisse zur Verschlechterung der Nachweisgrenzen für den Rizin-Nachweis aus komplexen Umweltprobenmittels LFA

Umweltprobe	Getestete Verdünnung der Probe und Rizinkonzentration ^a		
	1:10, 25 ng/mL	1:10, 100 ng/ml	1:100, 25 ng/ml
Boden	Positiv	–	–
Staub	Negativ	Positiv	–
Silikagel	Negativ	Negativ	Positiv
Bentonit ^b	Negativ	Positiv	–
Hefebackmischung	Positiv	–	–
Mehl	Positiv	–	–
Backpulver	Positiv	–	–
Puderzucker	Positiv	–	–
Pfeffer	Positiv	–	–
Bovines Serumalbumin	Positiv	–	–

^aDie Umweltproben wurden als 10 % (1:10 Verdünnung) oder 1 %ige (1:100 Verdünnung) Suspensionen in Rizin-haltigen Pufferlösungen suspendiert, die jeweils 25 oder 100 ng/ml Rizin enthielten. Die partikulären Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (2 × 5 min Zentrifugation bei 16.000 × g) und der Überstand zur Testung verwendet. Die Konzentration von 25 ng/ml, die aus der Pufferlösung sicher nachweisbar war, wurde zunächst in der 10%igen Suspension der verschiedenen Proben getestet. Bei negativen Signalen wurde eine höhere Konzentration (100 ng/ml) getestet. Falls auch mit der höheren Konzentration keine Signale messbar waren, wurden die Experimente in einer 1 %igen Suspension wiederholt. –: Nicht getestet

^bModifikation des zur Probenaufarbeitung verwendeten Zentrifugationsschritts notwendig für positiven Nachweis aus Bentonit: nur 1 × 1,5 min zentrifugiert, um Rizin im Überstand zu halten

weltprobe negative Auswirkungen auf den Nachweis haben. Darüber hinaus ist es unmöglich, einen Nachweis aus allen potenziellen Umweltproben oder Matrixmaterialien für die Breite der nachzuweisenden Gefahrstoffe zu erproben. Für die Evaluierung von Testverfahren werden häufig exemplarisch Lebensmittel (Milch, Saft, Wasser, Rohfleisch) oder haushaltsübliche „weiße Pulver“, die unter Umständen für Trittbrettfahreranschläge genutzt werden können, mit definiertem Zusatz der biologischen Agenzien verwendet [26, 38].

Spektroskopische Verfahren

Dem Einsatz spektroskopiegestützter Verfahren zum direkten Nachweis biologischer Gefahrstoffe sind enge Grenzen gesetzt. Zum einen enthalten kommerziell verfügbare Spektrendatenbanken in der Regel keine oder nur sehr wenige Einträge der biologischen Gefahrstoffe selbst. Zum anderen sind die beobachtbaren Unterschiede zwischen Spektren hochpathogener Erreger und ihrer nächsten Verwandten (Beispiel *B. anthracis* und *B. cereus*) minimal und können nur unter standardisierten Laborbedingungen sicher reproduziert werden [7]. Da

Mikroorganismen, Viren und Toxine am Einsatzort mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in reiner Form und in nur geringer Konzentration vorliegen werden (siehe Abschnitt Sensitivität/Spezifität), kann der Einsatz von IR- und Ramanbasierten Verfahren zum direkten Nachweis der biologischen Gefahrstoffe nicht empfohlen werden.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass Täter biologische Agenzien in Träger-substanzen (wie z. B. Mehl) einmischen. Daher sind in einer vermeintlich bioterroristischen Lage, in der die Ernsthaftigkeit geprüft und bejaht wurde, auch dann Proben auf biologische Agenzien zu untersuchen, obwohl z. B. mittels spektroskopischer Verfahren eine spezifische Substanz (z. B. Mehl) identifiziert werden konnte. Trotz dieser Einschränkung können spektroskopische Nachweismethoden dazu dienen, bei nicht bestätigter Ernsthaftigkeit eines bioterroristischen Anschlages, d. h. zur Beendigung eines Einsatzes ohne den spezifischen Nachweis biologischer Agenzien, die Trittbrettfahrersubstanz wie Mehl, Zucker, Backpulver etc., zu identifizieren und der Einsatzleitung sowie den Betroffenen zu kommunizieren.

Immunologische Schnell-detektionsverfahren

Immunologische Schnelldetektionsverfahren sind häufig relativ robust gegenüber Störeinflüssen aus Umweltproben. Zur Probenaufarbeitung genügt meist eine ausreichende Vorverdünnung in Probenpuffer mit anschließender Justierung des pH-Wertes, kombiniert mit einem kurzen Zentrifugationsschritt zur Abtrennung unlöslicher Probenbestandteile. Nichtsdestotrotz muss beachtet werden, dass die Empfindlichkeit des Nachweises in bestimmten Matrices beträchtlich abnimmt [20, 39]. Eine stärkere Verdünnung vermindert in der Regel negative Matrix-Einflüsse, verringert jedoch gleichzeitig die Empfindlichkeit des Tests, da für ein positives Signal insgesamt mehr Toxin oder Erreger in der Probe enthalten sein müssen (Tab. 2). Zudem können verschiedene biologische Gefahrstoffe unterschiedlich empfindlich gegenüber Einflüssen von Probenbestandteilen sein. Dies kann zu falsch-negativen oder unter Umständen auch falsch-positiven Resultaten führen [27]. Allgemein gültige Aussagen lassen sich daher nicht treffen, weswegen empfohlen wird, die betreffende Literatur für bestimmte Testverfahren zu studieren und bestenfalls eigene Validierungsexperimente in Kooperation mit Expertenlaboren durchzuführen. Hierbei ist zu bedenken, dass eine Validierung immer nur exemplarisch und niemals für sämtliche in der Umwelt verfügbaren Matrices durchgeführt werden kann. Erfahrungsgemäß problematisch sind jedoch Stoffe, die nicht in Lösung übergehen und fein dispergiert in der Probe vorliegen, wodurch in der Probe befindliche Bakterien, Viren oder Toxine durch Absorptionseffekte entfernt werden und die Sensitivität der Analysen deutlich verringert wird.

Nukleinsäurebasierte Schnell-detektionsverfahren

Auch bei nukleinsäurebasierten Verfahren können komplexe Matrices den Erregernachweis inhibieren [38]. Dies gilt sowohl für die Probenaufarbeitung (Extraktion) als auch für die folgende Amplifikationsreaktion (PCR). Einige Matrices binden genetisches Material irrever-

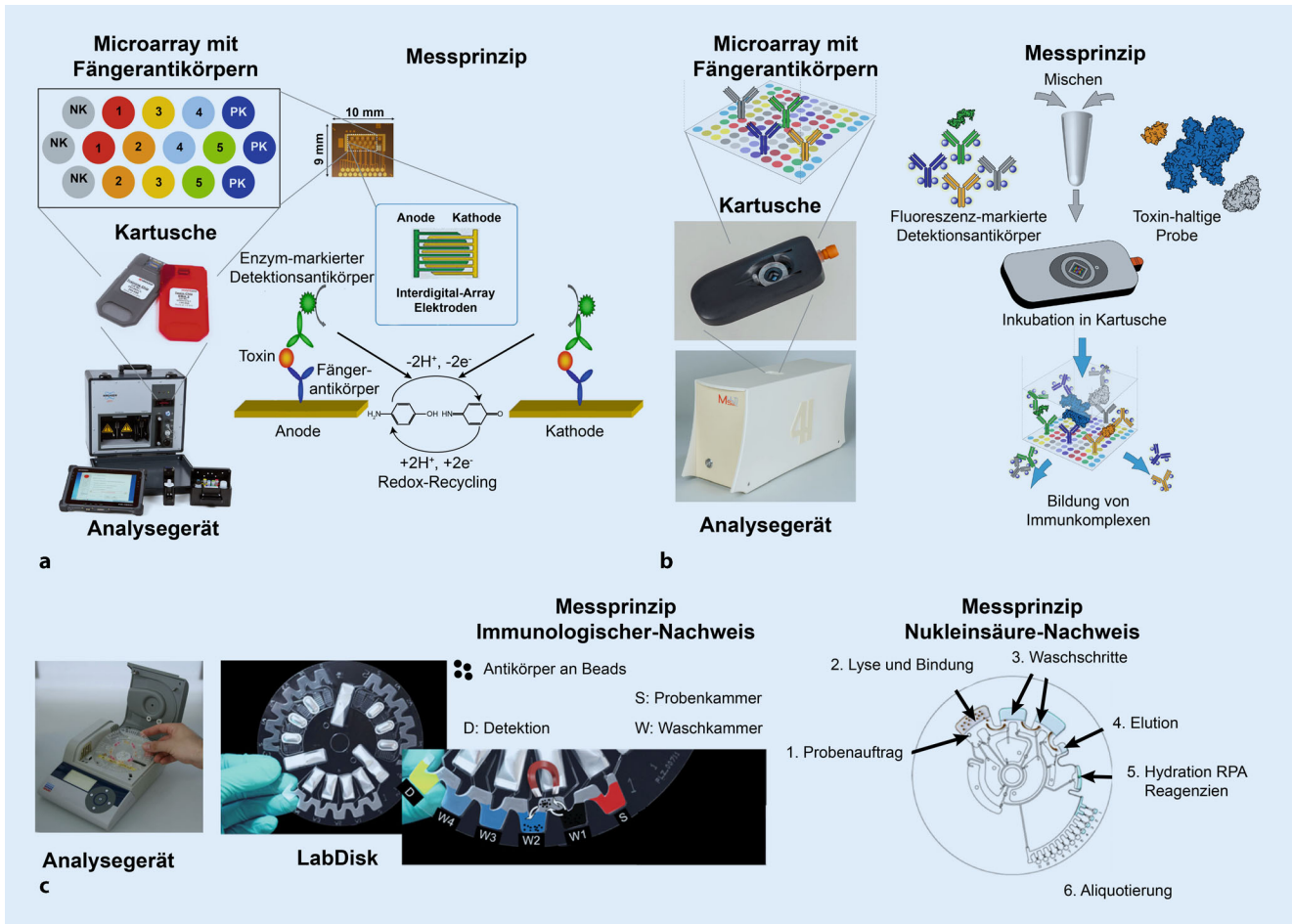


Abb. 2 **▲** Vielversprechende Entwicklungen von Vor-Ort-Detektionssystemen. **a, b** Automatisierte Microarray-basierte portable Vor-Ort-Detektionssysteme erfassen simultan eine höhere Anzahl an Agenzien (Multiplexing) bei ähnlicher oder höherer Sensitivität als Lateral Flow Assays (LFA). Die Signale können elektrochemisch [44] (**a**) oder fluoreszenzbasiert [43] (**b**) ausgelesen werden. **c** Lab-on-Disk-Systeme ermöglichen nukleinsäurebasierte und immunologische Nachweise bei integrierter Probenvorbereitung in mikrofluidischen Disks. Abbildung modifiziert nach [49], mit freundlicher Genehmigung © Springer Verlag

sibel, sodass keine Amplifikation möglich ist. Andere Matrices wie Pflanzenteile, Lebensmittel und Böden enthalten Gerbstoffe (Tannine) oder Huminsäuren, welche die enzymatische Reaktion der PCR hemmen [40–42]. Wie bei anderen Verfahren hilft auch hier häufig die Verdünnung der Probe oder der extrahierten Nukleinsäure. Da die PCR ein äußerst sensitives Nachweisverfahren ist, sind geringe Verdünnungen häufig tolerierbar. Zusätzlich gibt es Extraktionsmethoden, welche Hemmstoffe gezielt entfernen, oder es werden Zusätze eingesetzt, welche den Einfluss der Hemmstoffe reduzieren [38]. Diese Methoden sind jedoch aufwendiger und somit für eine Vor-Ort-Schnelldetektion bislang ungeeignet. Nukleinsäurebasierten Vor-Ort-Schnelldetektionsverfahren, die teilwei-

se ganz auf die Probenvorbereitung verzichten, fehlt die Möglichkeit der Matrixspezifischen Extraktionsmethode.

Vielversprechende innovative Entwicklungen

In den letzten Jahren wurden neue Methoden entwickelt, die Verbesserungen bei künftigen Generationen von Vor-Ort-Detektionsmethoden versprechen.

Ein vielversprechender Ansatz für immunologische Methoden liegt in der Entwicklung von automatisierten Multiplex-Detektionsverfahren, die gleichzeitig die Anwesenheit mehrerer Bakterien, Viren und/oder Toxine überprüfen (**Abb. 2a und b**) [43, 44]. Der größte Vorteil der neu entwickelten Methoden liegt in der deutlich größeren Anzahl an

Erregern und Toxinen, die simultan aus einer Probe nachgewiesen werden können, wobei die Sensitivität vergleichbar oder besser zu LFAs ist [26, 45]. Interessanterweise sind ausgewählte Multiplex-Verfahren in der Lage, neben immunologischen Multiplex-Tests auch nukleinsäurebasierte Verfahren automatisiert durchzuführen [43, 46].

Auf dem Feld der nukleinsäurebasierten Verfahren gibt es aussichtsreiche Daten zu isothermalen Amplifikationsverfahren, bei denen keine Temperaturzyklen benötigt und daher einfachere Geräte und eine kürzere Inkubationsdauer verwendet werden können [47]. Ein kleines tragbares Sequenziergerät, nur wenig größer als ein USB-Stick, ist grundsätzlich für den mobilen Einsatz geeignet und – abgesehen von einer Internetan-

Tab. 3 Zusammenfassung wichtiger Punkte beim Einsatz von Schnelldetektionsverfahren zum Vor-Ort-Nachweis biologischer Gefahrstoffe

	Generische Methoden	Immunologische Methoden	Nukleinsäurebasierte Methoden
Einsatzbereich	Schnelle Screeningmethode, Identifizierung von Stellstoffen ^a	Schnelle und robuste Screeningmethoden. Sinnvoller Einsatz bei begründetem Verdacht auf Vorliegen bestimmter Substanz	Mobile Labore
Probenaufarbeitung	Nicht notwendig	Minimal	Notwendig (Nukleinsäureisolation/Reinigung)
Komplexität und Geschwindigkeit der Durchführung	Sehr schnell und einfach	Sehr schnell und einfach	Komplexer und zeitaufwendiger in der Durchführung wegen notwendiger Geräte und Infrastruktur (Probenaufarbeitung)
Sensitivität	Gering	Mittel	Hoch
Spezifität	Referenzspektrern zur Identifizierung benötigt, Identifizierung aus Mischproben nicht möglich	Sollte für verwendete Tests überprüft werden, v. a. ob atoxische Varianten unterschieden werden können	Üblicherweise hohe Spezifität
Aussagekraft positiver Ergebnisse	Hauptkomponente der Probe identifiziert	Mit hoher Wahrscheinlichkeit hohe Konzentration an Testsubstanz	Nahezu sicherer Nachweis der Erregernukleinsäure
Aussagekraft negativer Ergebnisse	Keine Entwarnung wegen geringer Sensitivität und Spezifität	Kein oder zu wenig Erreger/Toxin, anderer Erreger oder geringere Konzentration aber nicht auszuschließen	Getesteter Erreger mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht enthalten, Gefahr von Hemmstoffen, anderer Erreger oder Toxin aber nicht auszuschließen
Zu beachten	Nur bei nahezu reinen Substanzen sinnvolle Ergebnisse, gering konzentrierte Beimengung bleibt unerkant	Möglichkeit falsch-positiver/falsch-negativer Ergebnisse beachten, je nach Agens limitierte Sensitivität	Kein Nachweis von Toxinen möglich, sensitive und spezifische Labormethode, wegen der notwendigen Infrastruktur aber kein echter Schnell- und Vor-Ort-Test

^aStoffe, die bioterroristisch relevanten Stoffen zur Stabilisierung beigemischt sind

bindung – getrennt von etablierten Laborinfrastrukturen zu verwenden [48]. Dieses Gerät verspricht einen molekularen offenen Blick; die aktuell erreichten Nachweisgrenzen sind jedoch für diagnostische Zwecke nicht ausreichend. Ein weiterer vielversprechender Ansatz besteht in der Entwicklung von sogenannten Lab-on-a-Disc-Systemen [49]. Diese Systeme bestehen aus rotationsgetriebenen Mikrofluidik-Discs, die alle zur Durchführung von nukleinsäurebasierten oder immunologischen Nachweisverfahren notwendigen Reagenzien enthalten (Abb. 2c). Die genannten Systeme befinden sich jedoch weitgehend in

der Entwicklung und Evaluierung, sodass abzuwarten bleibt, ob und wann zuverlässige kommerzielle Systeme basierend auf diesen Technologien und Plattformen erhältlich sein werden.

Empfehlungen zum Einsatz von Schnelldetektionsverfahren

Trotz der genannten Einschränkungen von Vor-Ort-Schnelldetektionsverfahren können diese in kritischen Situationen begründete Hinweise über das Vorliegen einer biologischen Gefahrensituation liefern. Hierbei sollten jedoch folgende Punkte berücksichtigt wer-

den, um einen sinnvollen Einsatz dieser Verfahren sicherzustellen (Tab. 3).

Auswahl und Validierung geeigneter Verfahren

- Ist das Agensspektrum des Testverfahrens passend zur Gefährdungsbewertung?
- Wurde das Testverfahren bezüglich Sensitivität, Spezifität und Zuverlässigkeit in unabhängigen Studien mit geeigneten Referenzmaterialien evaluiert?
- Wurde der Nachweis aus verschiedenen Umweltproben überprüft, und welche Beimaterialien verursachen Störungen des Systems?
- Lassen sich basierend auf den Ergebnissen des Testverfahrens im jeweiligen Szenario (Anwendungsbereich) Schlussfolgerungen für das Krisenmanagement ziehen?

Aussagekraft von Schnelldetektionsverfahren

Grundvoraussetzung zur Bewertbarkeit der Ergebnisse eines Schnelldetektionsverfahrens ist die korrekte Durchführung des Testverfahrens mit passenden Kontrollen. Diese sollte regelmäßig erprobt werden, und Kriterien für die Auswertbarkeit von Tests sollten bekannt sein und eingehalten werden. Die prinzipiellen Einschränkungen, die aufgrund der biologischen Gegebenheiten der Nachweissysteme vorliegen und nicht beeinflusst werden können, sollten dem Endanwender bei der Verwendung von Schnelldetektionsverfahren bewusst sein und bei der Bewertung eines Testergebnisses berücksichtigt werden.

Ein entscheidender Aspekt für die Befundinterpretation ist die Sensitivität des angewendeten Tests, die in der Regel nicht dem bestmöglichen Stand der Technik von stationären, laborbasierten Verfahren entspricht. Ein positives Ergebnis bei entsprechender Spezifität des Tests spricht bei korrekter Testdurchführung für das Vorhandensein einer meist hohen Konzentration des untersuchten Agens. Ein positives Ergebnis kann einen begründeten Hinweis auf das Vorliegen eines Erregers oder Toxins liefern. Ein be-

stätigter Nachweis kann nur in Expertenlaboren erfolgen.

Negative Ergebnisse zeigen wiederum lediglich an, dass die getesteten bioterroristisch relevanten Agentien nicht in Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Systems in der Probe vorhanden waren. Das Vorliegen von bioterroristisch relevanten Agentien in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Tests kann hierdurch nicht ausgeschlossen werden. Je nach Agentien können jedoch auch Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenzen eines Vor-Ort-Testverfahrens eine Gefahr darstellen. Zusätzlich müssen mögliche negative Einflüsse auf die Sensitivität durch Bestandteile der Probenmatrix berücksichtigt werden.

Negative Ergebnisse können auch nicht ausschließen, dass ein pathogenes Agens vorliegt, auf das nicht getestet wurde. Somit besteht beim Einsatz von agensspezifischen Schnelldetektionstests und negativen Ergebnissen die Gefahr, ein Gefühl von Sicherheit zu vermitteln, die nicht gegeben ist. Auf negativen Ergebnissen basierende Entscheidungen bezüglich des Krisenmanagements zu treffen, stellt die verantwortlichen Entscheider vor besondere Herausforderungen.

In diesem Zusammenhang sei die Bedeutung einer sachgerechten wissenschaftlichen Interpretation des Untersuchungsspektrums und der Ergebnisse von Schnelldetektionsverfahren bei einer akuten Gefahrenlage hervorgehoben, da vorschnelle (Fehl-)Interpretationen weitreichende Handlungskonsequenzen haben können.

Beim aktuellen Stand der Technik wird empfohlen, logistische Voraussetzungen zu schaffen, um eine schnelle Detektion unter minimaler Zeitverzögerung in einem stationären Labor durchzuführen, wobei die Vorteile vor allem darin bestehen, dass neben verbesserten Möglichkeiten der Probenaufarbeitung Testsysteme mit einem „offenen Blick“ sowie agensspezifische Nachweisverfahren mit deutlich höherer Sensitivität und Spezifität eingesetzt werden können [1]. Zu diesem Zweck wird in Deutschland im Auftrag des Bundesamtes für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe

(BBK) ein Nationales Labornetzwerk für die Diagnostik von BT-Agentien (NaLaDiBA) mit Fokus auf Bakterien und Viren erprobt. Alle Teilnehmerlabore verfügen über ein S-3-Labor und werden in Ringversuchen und Workshops regelmäßig geschult und über aktuelle Entwicklungen informiert [50]. Insofern sollte in der langfristigen Einsatzplanung festgelegt werden, welche Entscheidungen und Folgemaßnahmen auf Grundlage welcher Vor-Ort-Detektionssysteme getroffen werden können und für welche Entscheidungen eine weitergehende stationäre Laboruntersuchung erforderlich ist. Entsprechende Labore sollten identifiziert und Absprachen mit ihnen getroffen werden.

Fazit

Vor-Ort-Detektionsverfahren für bioterroristisch relevante Agentien können in bestimmten Lagen Gefährdungsbeurteilungen ergänzen und bei positivem Ergebnis erste Hinweise auf einen bioterroristischen Anschlag liefern. Aufgrund der Komplexität des Nachweises bioterroristisch relevanter Agentien können sie jedoch umfassend evaluierte, hochsensitive und spezifische Labormethoden nicht ersetzen. Spektroskopische Verfahren können wichtige Informationen über die Anwesenheit von Trittbrettfahrersubstanzen sowie von Begleit- und Stoffen liefern, sind jedoch für den spezifischen Nachweis von Bakterien, Viren und Toxinen nicht geeignet. Immunologische Vor-Ort-Nachweissysteme zeichnen sich durch schnelle und einfache Durchführung aus, jedoch sind Matrixeffekte und limitierte Sensitivität beim Einsatz zu berücksichtigen. Nukleinsäurebasierte Verfahren sind hoch sensitiv und spezifisch, aber technisch komplexer in der Durchführung. Die Auswahl der Testverfahren sollte anhand unabhängiger Validierungen erfolgen. Die Limitationen der Testverfahren sollten bekannt sein. Negative Ergebnisse spezifischer Nachweisverfahren erlauben aufgrund des fehlenden „offenen Blickes“ keinen Ausschluss einer möglichen Freisetzung biologischer Agentien. Beim Vorliegen einer biologischen Gefahrenlage sollten daher parallel zur Durchführung von Vor-Ort-Detektions-

verfahren so schnell wie möglich Expertenlabore zur gesicherten Befundung kontaktiert werden [50]. Handlungsempfehlungen hierzu wurden bereits anderweitig publiziert [1].

Korrespondenzadresse

D. Stern

Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene (ZBS), Robert Koch-Institut
Seestraße 10, 13353 Berlin, Deutschland
SternD@rki.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. D. Stern, M. Richter, L. Schrick, P. Lasch, K. Keeren, A. Polleichtner, K. Lemmer, A. Nitsche, R. Grunow, C. Herzog, B.G. Dorner und L. Schaad geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Richter M, Herzog C (2015) Allgemeines Vorgehen bei Verdacht auf einen Anschlag mit hochkontagiosen, hochpathogenen Agentien. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 58:699–704
2. Sasse J, Biederick W, Brockmann S et al (2007) Biologische Gefahren I. Handbuch zum Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe. Robert Koch-Institut, Bonn
3. Ozanich RM, Bartholomew RA, Bruckner-Lea CJ, Hess B, Arce JS, Cardamone HC (2015) Bioterrorism technologies for first responders: 2015. <http://bioterrorismresource.pnnl.gov/>. Zugegriffen: 1. Feb 2016
4. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF (2005) Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. Clin Microbiol Rev 18:583–607
5. Gelderblom HR (2003) Elektronenmikroskopie im Methodenspektrum der Bioterrorismus-Diagnostik. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 46:984–988
6. Duriez E, Armengaud J, Fenaille F, Ezan E (2016) Mass spectrometry for the detection of bioterrorism agents: from environmental to clinical applications. J Mass Spectrom 51:183–199
7. Lasch P, Naumann D (2006) Infrared spectroscopy in microbiology. In: Encyclopedia of analytical chemistry. John Wiley & Sons, Hoboken
8. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P et al (2014) Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. Nat Protoc 9:1771–1791
9. Butler HJ, Ashton L, Bird B et al (2016) Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. Nat Protoc 11:664–687
10. Lee J, Deiningner RA (2004) A rapid screening method for the detection of viable spores in powder using bioluminescence. Luminescence 19:209–211
11. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Van Amerongen A (2009) Lateral flow (immuno)assay: its strengths,

- weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393:569–582
12. Mackay IM (2007) Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterisation. Caister Academic, Norfolk
 13. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8:225–230
 14. Rummel A (2015) The long journey of botulinum neurotoxins into the synapse. *Toxicon* 107:9–24
 15. Turnbull PC (1999) Definitive identification of *Bacillus anthracis* – a review. *J Appl Microbiol* 87:237–240
 16. Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G (2004) Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J Clin Microbiol* 42:1207–1213
 17. Pauly D, Worbs S, Kirchner S, Shatohina O, Dorner MB, Dorner BG (2012) Real-time cytotoxicity assay for rapid and sensitive detection of ricin from complex matrices. *PLOS ONE* 7:e35360
 18. Nitsche A, Stern D, Ellerbrok H, Pauli G (2006) Detection of infectious poxvirus particles. *Emerg Infect Dis* 12:1139–1141
 19. Simon S, Worbs S, Avondet MA et al (2015) Recommended immunological assays to screen for ricin-containing samples. *Toxins (Basel)* 7:4967–4986
 20. Hodge DR, Prentice KW, Ramage JG et al (2013) Comprehensive laboratory evaluation of a highly specific lateral flow assay for the presumptive identification of ricin in suspicious white powders and environmental samples. *Biosecur Bioterror* 11:237–250
 21. Dorner MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG (2013) Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. *Curr Top Microbiol Immunol* 364:219–255
 22. Grunow R, Miethe P, Conlan W, Finke EJ, Friedewald S, Porsch-Özcürümez M (2008) Rapid detection of *Francisella tularensis* by the immunoaffinity assay ABICAP in environmental and human samples. *J Rapid Methods Autom Microbiol* 16:30–54
 23. Slotved HC, Sparding N, Tanassi JT, Steenhard NR, Heegaard NH (2014) Evaluating 6 ricin field detection assays. *Biosecur Bioterror* 12:186–189
 24. Slotved HC, Tanassi JT, Sparding N, Lindqvist A, Steenhard NR, Heegaard NH (2013) Botulinum toxin field assays evaluated using cosmetic botox preparations. *Biosecur Bioterror* 11:280–286
 25. Zasada AA, 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* 60:409–413
 26. Worbs S, Skiba M, Bender J et al (2015) An international proficiency test to detect, identify and quantify ricin in complex matrices. *Toxins (Basel)* 7:4987–5010
 27. Gessler F, Pagel-Wieder S, Avondet MA, Bohnel H (2007) Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:243–249
 28. Smith TJ, Lou J, Geren IN et al (2005) Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun* 73:5450–5457
 29. Kull S, Schulz KM, Weisemann J et al (2015) Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. *PLOS ONE* 10:e0116381
 30. Sha J, Endsley JJ, Kirtley ML et al (2011) Characterization of an F1 deletion mutant of *Yersinia pestis* CO92, pathogenic role of F1 antigen in bubonic and pneumonic plague, and evaluation of sensitivity and specificity of F1 antigen capture-based dipsticks. *J Clin Microbiol* 49:1708–1715
 31. Fasanella A (2013) *Bacillus anthracis*, virulence factors, PCR, and interpretation of results. *Virulence* 4:659–660
 32. Kuehn A, Kovac P, Saksena R et al (2009) Development of antibodies against anthrax tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *Clin Vaccine Immunol* 16:1728–1737
 33. Grunow R, Splettschöcker W, McDonald S et al (2000) Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:86–90
 34. Townsend MB, Macneil A, Reynolds MG et al (2013) Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat(R) antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J Virol Methods* 187:37–42
 35. Stern D, Pauly D, Zydek M et al (2016) Development of a genus-specific antigen capture ELISA for Orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLOS ONE* 11:e0150110
 36. Broadhurst MJ, Kelly JD, Miller A et al (2015) ReEBOV Antigen Rapid Test kit for point-of-care and laboratory-based testing for Ebola virus disease: a field validation study. *Lancet* 386:867–874
 37. Matero P, Hemmila H, Tomaso H et al (2011) Rapid field detection assays for *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Infect* 17:34–43
 38. Kurth A, Achenbach J, Miller L, Mackay IM, Pauli G, Nitsche A (2008) Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: inhibitory influences of common household products. *Appl Environ Microbiol* 74:32–37
 39. Ramage JG, Prentice KW, Morse SA et al (2014) Comprehensive laboratory evaluation of a specific lateral flow assay for the presumptive identification of abrin in suspicious white powders and environmental samples. *Biosecur Bioterror* 12:49–62
 40. Opel KL, Chung D, Mccord BR (2010) A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* 55:25–33
 41. Lewis GD, Molloy SL, Greening GE, Dawson J (2000) Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. *J Appl Microbiol* 88:633–640
 42. Sidstedt M, Jansson L, Nilsson E et al (2015) Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 487:30–37
 43. 4h Jena Engineering (2016) MSbM – MultiSensor für biogene Medien. <http://www.4h-jena.de/index.php?id=195>. Zugegriffen: 18 Mai 2016
 44. Bruker (2016) Portable toxin detector: fast gold standard toxin identification. <https://www.bruker.com/de/products/cbrne-detection/elisa/ptd/overview.html>. Zugegriffen: 18 Mai 2016
 45. Worbs S, Fiebig U, Zeleny R et al (2015) Qualitative and quantitative detection of Botulinum neurotoxins from complex matrices: results of the first international proficiency test. *Toxins (Basel)* 7:4935–4966
 46. Elsholz B, Nitsche A, Achenbach J et al (2009) Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex PCR products from biological agents. *Biosens Bioelectron* 24:1737–1743
 47. Euler M, Wang Y, Heidenreich D et al (2013) Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of bioterror agents. *J Clin Microbiol* 51:1110–1117
 48. Quick J, Loman NJ, Duraffour S et al (2016) Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530:228–232
 49. Oordt T, Strohmeier O, Mark D et al (2012) The LabDisk – A fully automated centrifugal lab-on-a-chip system for the detection of biological threats. In: Aschenbruck N, Martini P, Meier M, Tölle J (Hrsg) *Future Security: 7th Security Research Conference, Future Security 2012, Bonn, Germany, September 4–6, 2012*. Proceedings. Springer, Berlin, S 220–223
 50. Robert Koch-Institut (2014) NaLaDiBA – Nationales Labornetzwerk für Diagnostik von BT-Agenzien. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Biosicherheit/Projekte/NaLaDiBA_Labornetzwerk/NaLaDiBA.html. Zugegriffen: 4 Mär 2016