

Diagnostik von Proben bei vermuteten bioterroristischen Anschlägen

Allgemeine Aspekte und grundsätzliche Erwägungen

Zusammenfassung

Die terroristischen Anschläge Ende 2001 in den USA rückten die Bedrohung von Menschen durch biologische Waffen in den Blickpunkt politischer Entscheidungsträger und der breiten Öffentlichkeit. In Folge der Anschläge mit Anthraxsporen gab es eine Flut von vorgetäuschten Angriffen auf Personen und Institutionen. Da in solchen Fällen nicht immer eindeutig zu erkennen ist, ob z. B. Briefsendungen lediglich unschädliche Materialien oder aber Krankheitserreger enthalten, muss eine sorgfältige Analyse erfolgen, die einen Krankheitserreger entweder nachweist oder ausschließt. Methoden wie klassische Anzuchtverfahren für Bakterien und Viren, elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen sowie Genomnachweismethoden (PCR, Real-Time-PCR) sind für viele der in Frage kommenden Organismen etabliert. Eine Differenzierung zwischen pathogenen und apathogenen Mikroorganismen ist u. a. bei eng verwandten Keimen wichtig. Diese Methoden können in der Regel nur in Speziallaboratorien durchgeführt werden und sind teilweise zeitintensiv. In der Entwicklung sind Chiptechnologien und physikochemische Verfahren, die möglicherweise innerhalb von Minuten vor Ort eine Diagnosestellung erlauben. Inwieweit diese Technologien solche Erwartungen erfüllen, bleibt abzuwarten. Die mit den verschiedenen Untersuchungsmethoden erzielten Ergebnisse erlauben in Kombination mit Art und Menge des Untersuchungsmaterials eine Bewertung des Risikos einer Infektion der Menschen, die mit dem Material direkt oder indirekt in Kontakt gekommen sind.

Schlüsselwörter

Umweltproben · Risikobewertung · Genomnachweis · Erregeranzucht · Schnellteste

Biologische Agentien mit einem hohen Bedrohungspotenzial

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Institutionen biologische Agentien (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten, Toxine), die für Angriffe auf Menschen, Tiere oder Pflanzen eingesetzt werden können, entsprechend ihrer Gefährlichkeit als Biowaffen klassifiziert – so existieren Listen der WHO, der Australia Group [1] und der Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Tatsache, dass einige dieser Agentien bereits als Waffe eingesetzt bzw. intensiv auf ihre Eignung als Biowaffe untersucht worden sind und sogar waffenfähiges Material hergestellt wurde [2]. Medizinische Aspekte, die für das Erkennen und das Management von Angriffen mit Biowaffen von Bedeutung sind, wurden bisher vor allem im militärischen Bereich intensiv untersucht [3]. Die Experten konzentrieren sich zum heutigen Zeitpunkt auf die Agentien, die als kritisch für das öffentliche Gesundheitswesen betrachtet werden [4]. Diese Erreger bzw. die Toxine werden in 3 Kategorien eingeteilt (Tabelle 1).

Kategorie A. Kategorie A umfasst solche Erreger, die leicht zu verbreiten sind bzw. von Mensch zu Mensch übertragen werden. Infizierte Personen erkranken zu einem hohen Prozentsatz, und die Erkrankung endet ohne rechtzeitige Therapie häufig tödlich.

Kategorie B. In die Kategorie B werden solche Agentien eingruppiert, die sich leicht verbreiten lassen und eine hohe Erkrankungsrate aufweisen, jedoch nur eine niedrige Mortalität. Diese Erreger stellen ebenso wie diejenigen der Kategorie A vor allem aufgrund der hohen Morbidität hohe Anforderungen an das Gesundheitswesen.

Kategorie C. Zur Kategorie C gehören solche Erreger, die als so genannte emerging pathogens angesehen werden und die man möglicherweise durch genetische Modifikation leichter disseminierbar machen kann.

Um auf einen möglichen Angriff mit diesen Agentien vorbereitet zu sein, muss die Labordiagnostik gestärkt bzw. müssen schnellere und sicherere diagnostische Nachweismethoden überhaupt erst entwickelt werden. Zudem sind die entsprechenden Medikamente (sofern vorhanden) für die Bevölkerung vorzuhalten. Bereits der Verdacht oder

© Springer-Verlag 2003

Prof. Dr. G. Pauli
Robert Koch-Institut, Nordufer 20,
13353 Berlin
E-Mail: paulig@rki.de

G. Pauli · H. Ellerbrok

Diagnosics of samples collected in the context of suspected bioterrorist attacks. General aspects and basic considerations

Abstract

The terrorist attacks in the fall of 2001 in the USA focussed the attention of both the general public and policymakers on the potential threat posed by biological weapons. Following the attacks using anthrax spores, a surge of hoaxes were perpetrated against individuals and institutions. Since it is not always possible to determine unequivocally whether mail envelopes merely contain harmless materials or pathogens, a careful analysis must be performed in order to be able to either confirm or exclude the presence of a pathogen. Diagnostic methods such as classic isolation techniques for bacteria and viruses, investigations using electron microscopy and light microscopy, and molecular biological diagnostics (PCR, real-time PCR) are available for the majority of the organisms in question. It is crucial to be able to distinguish pathogenic from apathogenic microorganisms in the case of closely related pathogens. Normally these methods can only be performed in specialized laboratories and some of them are time-consuming. In the development stage are chip technologies and physicochemical procedures, which allow an on-site diagnosis to be made within minutes. Whether these technologies can measure up to such expectations remains to be seen. In combination with the kind and amount of investigated material, the results obtained by the different investigation methods allow one to perform a risk assessment regarding an infection of those persons who have come directly or indirectly into contact with the material.

Keywords

Environmental samples · Risk assessment · Genome detection · Pathogen isolation · Rapid test systems

Tabelle 1
Eingruppierung von BT-Erregern/Toxinen in die Kategorien A–C

	Erkrankung
Kategorie A	
<i>Bacillus anthracis</i>	Milzbrand/Anthrax
Variola-major-Virus	Pocken
<i>Yersinia pestis</i>	Pest
<i>Francisella tularensis</i>	Hasenpest/Tularämie
Filoviren, Arenaviren	Hämorrhagische Fieber
<i>Clostridium-botulinum</i> -Toxin (0,001 µg/kg)	Botulismus
Kategorie B	
<i>Coxiella burnetii</i>	Q-Fieber
<i>Brucella spec.</i>	Brucellose
<i>Burkholderia mallei</i>	Rotz/Malleus
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Pseudorotz/Melioidosis
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Typhus
<i>Chlamydia psittaci</i>	Psittacose
Alphaviren (VEE,EEE, WEE) ^a	Enzephalitis
Ricin-Toxin (<i>Ricinus communis</i>) (3–5 µg/kg)	Toxisches Syndrom
Epsilon-Toxin (<i>Cl. perfringens</i>)	Toxisches Syndrom
<i>Staphylococcus</i> -Enterotoxin B (0,03 µg/kg)	Toxisches Syndrom
Kategorie C	
Nipah-Virus	Enzephalitis
Hanta-Virus	u. a. hämorrhagische Fieber
Tick-Borne-Enzephalitis-Viren (FSME)	(Meningo-)Enzephalitis
Gelbfieber-Virus	Gelbfieber
Multiresistente Tuberkulosebakterien	Tuberkulose

^a Venezuelan Equine (VEE), Eastern Equine (EEE) und Western Equine Encephalitis (WEE) Virus

die Androhung einer Exposition mit diesen Agenzien hat ein hohes Panikpotenzial und erfordert erhebliche Aktivitäten des öffentlichen Gesundheitswesens. Die Diagnostik dieser Erreger kann nur in Sicherheitslaboratorien von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.

Anschläge mit biologischen Agenzien

Bioterroristische Anschläge mit Krankheitserregern oder bakteriellen bzw. pflanzlichen Toxinen sind in den vergangenen Jahrzehnten mit mehr oder weniger großem Erfolg geplant und z. T. durchgeführt worden. Als Beispiele seien hier nur der Salmonellen-Anschlag im Jahr 1984 in The Dalles, Oregon, durch Mitglieder der Bhagwan Shree Rajneesh-Sekte [5], der Anschlag auf Mitarbeiter eines diagnostischen Labors

in Dallas, Texas, mit Shigellen [6] im Jahr 1996 und die versuchten Anschläge mit Anthrax durch die AUM-Sekte in Japan im Jahr 1993 genannt [7]. Der Ausbruch der Salmonellen-Epidemie in Oregon (751 Fälle) wurde erst Jahre später zufällig als terroristischer Anschlag erkannt, die Erkrankungen selbst konnten jedoch recht zügig auf 10 kontaminierte Salatbars in dem Ort zurückgeführt werden. Die Infektionen mit Shigellen durch den Verzehr von Gebäck wurden vor allem deshalb eingehend untersucht und die Infektionsquelle identifiziert, weil es sich um einen relativ seltenen Erreger handelte. Die Annahme lag nahe, dass ein Labormitarbeiter den Anschlag verübt hatte, da dieser Erreger in der Stammsammlung des betroffenen Labors vorhanden war. Die geplanten Anschläge der AUM-Sekte mit Anthrax misslangen, weil sich die hergestellten Sporensuspensionen nicht zur aeroben

Verbreitung eigneten. Die gleiche Sekte war 2 Jahre später jedoch „erfolgreich“ beim Sarin-Anschlag in der Untergrundbahn in Tokio (12 Tote, 5.500 Verletzte). In der Öffentlichkeit wenig beachtet waren Anschläge auf Regierungen, Institutionen und auch Privatpersonen, bei denen der Einsatz von biologischen Kampfstoffen vorgetäuscht wurde [8].

Unerwartet und überraschend kamen die Anschläge mit Anthraxsporen in den USA im Herbst 2001. Hier wurden waffenfähige Anthraxsporen in Briefen versendet [9]. Es erkrankten sowohl Personen, die die Briefe geöffnet hatten, als auch Personen in den Postverteilerstellen, durch welche diese Briefe geleitet worden waren. Bemerkenswert ist, dass von 22 *B.-anthracis*-infizierten Personen 10 an Lungenmilzbrand erkrankten, was auf die Übertragung des Erregers durch die Atemluft zurückzuführen war. Bei 3 Erkrankungsfällen bestand kein direkter Kontakt mit den kontaminierten Briefen [10]. Insgesamt wurden in der Folge der Anschläge nahezu 30.000 Personen einer prophylaktischen Behandlung mit Antibiotika unterzogen.

Folgen der Anschläge in den USA

Als direkte Folge der Anthrax-Anschläge wurden in den USA allein in den Monaten Oktober und November 120.000 Verdachtsproben untersucht.

Weltweit, insbesondere jedoch in den USA und Europa, häuften sich in Folge „Anschläge“ auf Regierungen, Behörden, Botschaften und Privatpersonen, bei denen eine Vielzahl von Briefen oder Päckchen mit der Drohung verschickt wurde, dass die Sendungen Anthraxsporen beinhalten. Diese Postsendungen fanden – im Gegensatz zu den Ereignissen der zurückliegenden Jahre – nicht nur ein weites Medienecho. Im Zusammenhang mit den Anschlägen vom 11.9.2001 in New York und Washington wurde das Bedrohungspotenzial durch Terroristen nun auch durch die Politik thematisiert und die finanziellen und personellen Ressourcen zur Erkennung und zum Management von bioterroristischen Angriffen im zivilen Sektor in einzelnen Ländern in erheblichem Umfang verstärkt.

Es wurden auch Briefe versendet, die Substanzen enthielten, die bei den Empfängern den Verdacht aufkommen ließen, es könne sich um einen Anschlag mit Anthraxsporen handeln bzw. um andere Krankheitserreger, wie z. B. Pockenviren. Weitere Verdachtsfälle von bioterroristischen Anschlägen betrafen „weißes Pulver“, das an ungewöhnlichen Orten, wie z. B. in Fabrikhallen oder Postverteilerstellen, gefunden wurde. Bis zur Abklärung, ob diese weißen Pulver Anthraxsporen enthielten, wurden die betroffenen Räume geschlossen und Materialproben unter hohen und höchsten Sicherheitsbedingungen an die Untersuchungslaboratorien geschickt, wo die Proben wiederum in Sicherheitslaboratorien analysiert wurden. Seit den Milzbrand-Anschlägen in den USA im Herbst 2001 wurden weltweit bei keiner der untersuchten Proben dieser Art Anthraxsporen nachgewiesen. Aber allein in den Monaten Oktober und November 2001 mussten in den USA als direkte Folge der Anschläge über 120.000 Proben auf Anthraxsporen untersucht werden.

Erkennen von bioterroristischen Anschlägen

Anhand der oben ausgeführten Beispiele werden die vielen Probleme deutlich, die mit dem Erkennen von Anschlägen mit biologischen Agenzien verbunden sind. Hierzu zählt insbesondere das Problem der Bewertung des Risikos, das von einer Verdachtsprobe ausgeht. Anschläge mit Krankheitserregern können unangekündigt erfolgen und nur daran erkannt werden, dass zahlreiche Personen in einem zeitlichen und/oder regionalen Zusammenhang mit vergleichbaren Symptomen erkranken und gleichzeitig keine natürliche Ursache für die Erkrankungen zu finden ist. Solche Anschläge können nur mithilfe der Epidemiologie im Nachhinein aufgespürt werden. Ziel sollte es hierbei sein, Instrumente zu entwickeln, die solche ungewöhnlichen Erkrankungsmuster so früh wie möglich erkennen, um geeignete Gegenmaßnahmen einleiten zu können. Weitere epidemiologische Hinweise auf einen Anschlag können auch unerklärliche Erkrankungen/Sterbefälle sein, unerwartet hohe Zahlen von Krankheitsfällen, ungewöhnliche Antibiotikaresistenzen, aber auch – wie im Falle von Lungenmilzbrand in den USA – das Auftreten von

Erkrankungen, die auf ungewöhnliche Übertragungswege (in diesem Fall aerogene Übertragung) hinweisen (s. [9]).

Des Weiteren können (gehäufte) Krankheitsfälle durch Erreger, die z. B. in Deutschland nicht endemisch sind [genannt seien hier virale hämorrhagische Fieber (VHF), hervorgerufen durch Filo- oder Arenaviren], den Verdacht nahe legen, dass ein Anschlag mit den entsprechenden Krankheitserregern stattgefunden hat. Dies gilt auch für Erkrankungen in unüblichen Altersgruppen und bei Vorliegen von bisher unbekanntem Varianten eines Erregers. Kein Zweifel an einem bioterroristischen Anschlag würde heute aufkommen, wenn Erkrankungen mit dem Orthopockenvirus Variola major oder minor, dem Erreger der Menschenpocken, auftreten würden, da diese Erkrankung in einer bisher beispiellosen weltweiten Zusammenarbeit unter Führung der Weltgesundheitsorganisation vor über 25 Jahren ausgerottet worden ist und der Erreger nicht mehr in der Umwelt vorkommt.

Anforderungen an die Diagnostik

Wenn Krankheitsfälle auftreten, ergeben sich bereits aus dem klinischen Bild Hinweise auf den oder die Erreger(gruppe), die den gezielten Einsatz von diagnostischen Methoden erlauben. Bei klinischen Proben können einerseits etablierte Nachweismethoden eingesetzt werden, andererseits neue Methoden entwickelt oder hinzugezogen werden, die die Sensitivität und die Spezifität erhöhen und in kürzerer Zeit einen verlässlichen Befund ermöglichen.

Problematischer sind Untersuchungen von so genannten Umweltproben (z. B. Brief- und Päckcheninhalte, Proben aus Luftfiltern, von potenziell kontaminierten Fußböden und Wänden, Kleidungsstücken etc.), da bei solchen Proben hilfreiche Hinweise und Einschränkungen, die ein klinisches Bild liefern kann, fehlen und unter Umständen auf eine Vielfalt verschiedener Erreger untersucht werden muss. Hier ist beim Einsatz der Nachweissysteme zu berücksichtigen, dass in der Umwelt eine Vielzahl von Mikroorganismen vorkommt und diese möglicherweise auf den verschiedensten Ebenen mit den anzuwendenden Nachweisverfahren interferieren können. Einige dieser Mikroorganismen

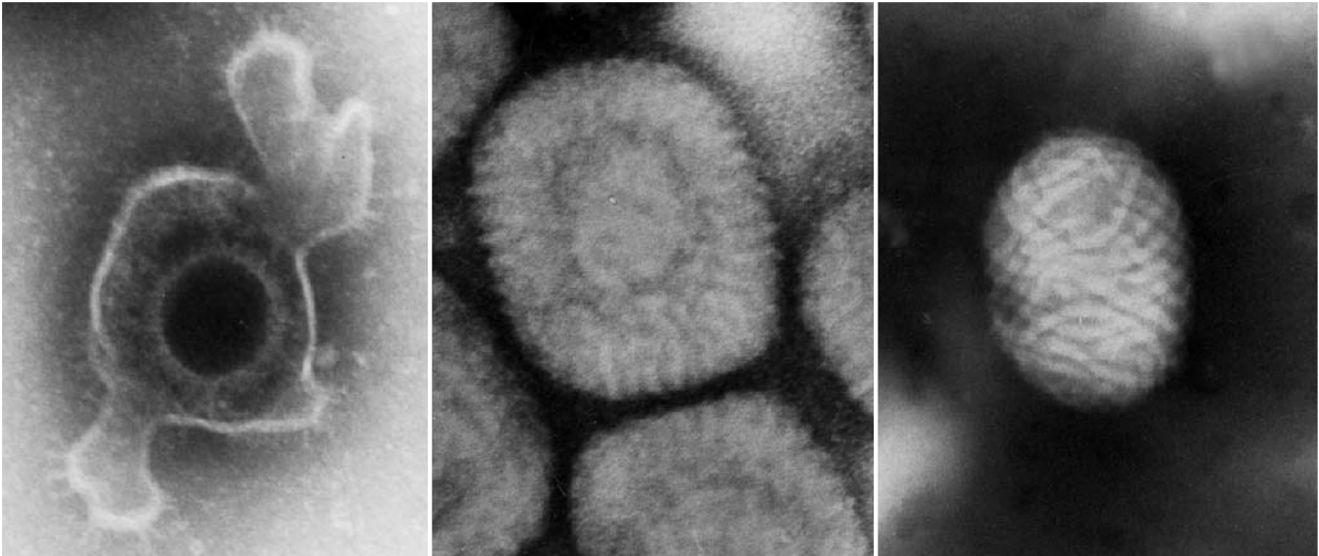


Abb. 1 ▲ Das klinische Bild von Windpocken, hervorgerufen durch das Varicella-zoster-Virus (Herpesvirus), und von Erkrankungen mit dem Orthopockenvirus Variola-Virus (Menschenpocken) ist sehr ähnlich. Der Erregernachweis (z. B. aus Vesikeln) mit dem Elektronenmikroskop erlaubt eine schnelle morphologische Differenzierung. Von links nach rechts: Herpesvirus, Orthopockenvirus, Parapockenvirus. Eine Differenzierung der Orthopockenviren kann mithilfe molekulargenetischer Methoden erfolgen [12]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen: H.R. Gelderblom, Robert Koch-Institut

mögen sehr nahe mit dem Krankheitserreger verwandt, aber für den Menschen nicht pathogen sein, sodass eine sehr genaue und teilweise aufwändige Abgrenzung notwendig wird. Als Beispiel sei hier nur der Einsatz des Ascoli-Tests bei Verdacht auf *B. anthracis* in einer Umweltprobe im November 2001 genannt. Dieser Test erlaubt eine eindeutige Diagnose bei an Milzbrand erkrankten Menschen und Tieren. Eine Vielzahl von *Bacillus spec.*, die in der Umwelt vorkommen, aber nicht humanpathogen sind, reagiert jedoch ebenfalls in diesem Testsystem, sodass man bei Umweltproben falsch positive Ergebnisse erhalten kann. Eine Differenzierung zwischen *B. anthracis* und anderen *Bacillus spec.* ist jedoch mit molekulargenetischen Methoden möglich [11].

Der Nachweis eines Erregers in Umweltproben erfordert ein hohes Maß an Erfahrung.

Wie aus diesen Ausführungen zu ersehen ist, wirft Probenmaterial, das aus Einsendungen stammt, in denen ein Anschlag mit Krankheitserregern angekündigt wird oder bei dem die Vermutung eines Anschlags besteht, Probleme bei der Diagnostik auf. Die Entwicklung von Unter-

suchungs- und Bewertungsstrategien für solche Proben ist unabdingbar. Für den Fall, dass beispielsweise *B. anthracis* oder andere Erreger nachgewiesen werden, müssen umgehend Interventionsmaßnahmen eingeleitet werden, wie z. B. eine Postexpositionsprophylaxe mit Antibiotika und wenn möglich eine passive bzw. aktive Immunisierung der direkt exponierten Personen. Zudem müssen Umgebungsuntersuchungen zur Ermittlung weiterer potenziell exponierter Personen erfolgen sowie die Dekontamination der potenziell kontaminierten Bereiche vorgenommen werden. Da bei diesen Untersuchungen ein positives Ergebnis immer sehr weit reichende Auswirkungen hat, sollte parallel zu den auf jeden Fall sofort einzuleitenden Maßnahmen in einem zweiten Expertenlabor eine Bestätigung der Diagnose durchgeführt werden. Auch für den Fall, dass sich letztlich herausstellt, dass ein Anschlag nur vorgetäuscht wurde, werden Personen bis zur Abklärung, ob tatsächlich Krankheitserreger im Verdachtsmaterial vorhanden waren, in der Ungewissheit und Furcht leben, sich infiziert zu haben und möglicherweise auch ihre Angehörigen zu infizieren. Zudem können etwa durch die Schließung von Fabrikhallen oder Postverteilungsstellen bis zur Abklärung hohe finanzielle Verluste auftreten. Deshalb

muss das Ziel der Labordiagnostik sein, so schnell wie technisch möglich und mit hoher Sicherheit das Vorliegen von Erregern oder Agenzien, die als biologische Waffen eingesetzt werden können, auszuschließen oder das Agens nachzuweisen. In jedem Fall muss anschließend zur endgültigen Bewertung einer Probe eine Risikoanalyse erfolgen. Bei einem negativen Ergebnis sollte das theoretische Restrisiko anhand der Nachweisgrenze des jeweiligen Testverfahrens ermittelt werden. In den PCR-Nachweissystemen sollte eine Nachweisgrenze von 10 Genomen oder weniger (d. h. 10 Bakterien oder Viren) erreicht werden. Sie ist bei einer Reihe von Nachweissystemen bereits auch etabliert. Können keine erregerspezifischen Sequenzen nachgewiesen werden, so kann man davon ausgehen, dass keine Gefahr einer Infektion besteht. Im positiven Fall muss das Risiko einer Infektion durch die analysierte Probe abgeschätzt werden. Hier spielen vor allem die Konzentration sowie die Reinheit und Konsistenz des Materials für die Beurteilung des Infektionsrisikos eine wesentliche Rolle. Die Einleitung von Abwehr- und Eindämmungsmaßnahmen orientiert sich am Infektionsrisiko.

Prinzipiell steht für die Diagnostik von Patienten- und Umweltproben eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, die im Folgenden dargestellt werden.

Etablierte diagnostische Verfahren

Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie (EM) erlaubt einen direkten Einblick in die zu

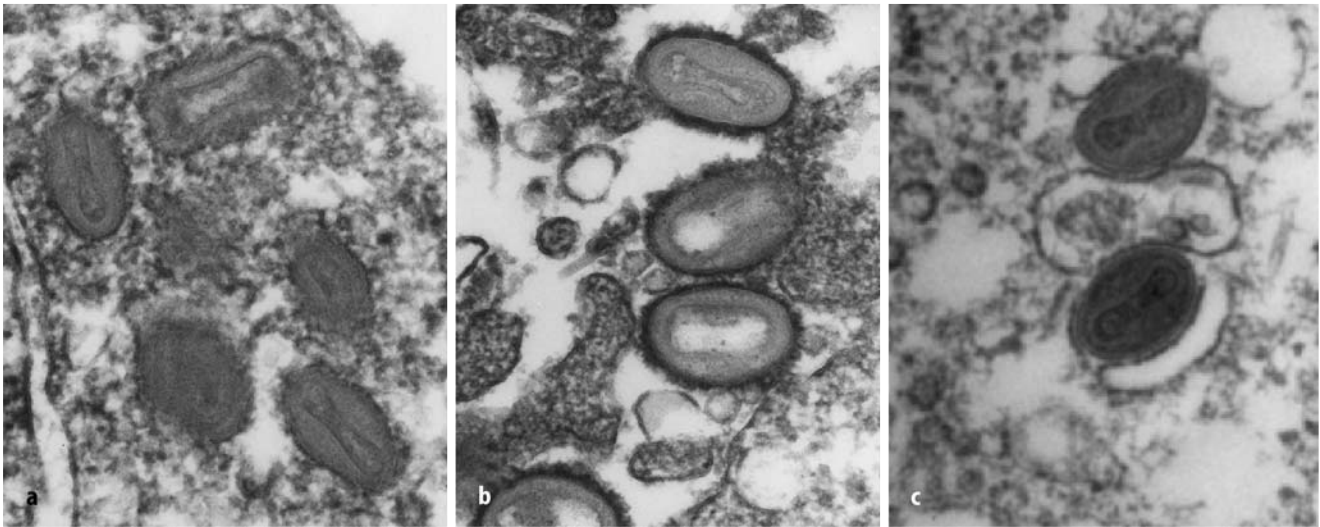


Abb. 2a-c ▲ Orthopockenvirus-infizierte Zellen wurden fixiert und Ultradünnschnitte im Elektronenmikroskop analysiert. Von links nach rechts: Vacciniavirus, Kuhpockenvirus, Affenpockenvirus. Morphologisch sind die Orthopockenviren nicht unterscheidbar. Eine weitere Differenzierung kann mit molekulargenetischen Untersuchungen geführt werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen: H.R. Gelderblom, Robert Koch-Institut

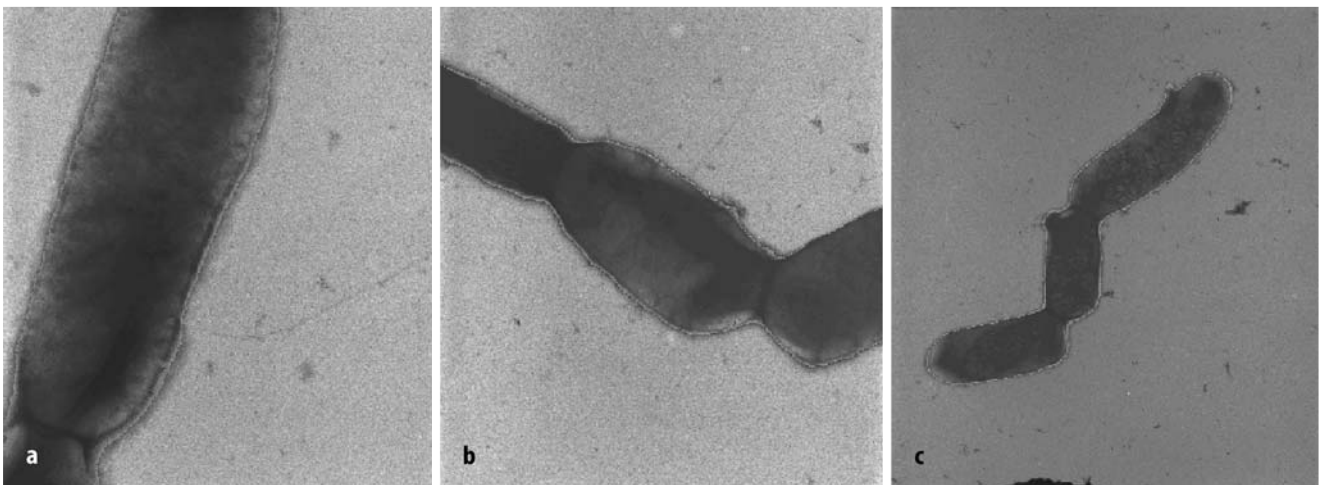


Abb. 3a-c ▲ Bakterienkolonien, die auf einer Agarplatte gewachsen waren (Verdacht auf *Bacillus anthracis*; eingeliefert am 2.11.2001), wurden mit dem Elektronenmikroskop untersucht (negative Kontrastierung). Die vegetativen Keime trugen Flagellen. *B. anthracis* ist unbeweglich und hat keine Flagellen. Der Ausschluss von *B. anthracis* wurde durch die Real-Time-PCR bestätigt [11]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen: M. Özel, Robert Koch-Institut

untersuchende Probe und führt rasch zu einem ersten Ergebnis (etwa 15 Minuten nach Eingang der Probe im EM-Labor). Anhand von morphologischen Kriterien können z. B. Viren und Bakterien identifiziert werden. Diese Methode hat sich beispielsweise in der Differenzialdiagnostik bei klinischem Verdacht auf Menschenpocken bewährt und ermöglicht eine eindeutige Abgrenzung zwischen Orthopockenviren und Herpesviren (Abb. 1). Die verschiedenen Orthopockenviruspezies lassen sich hingegen

mit dem EM nicht voneinander differenzieren (Abb. 2). Auch Bakterien lassen sich mithilfe des EM unterscheiden. So weisen vegetative *B. anthracis* eine glatte Oberfläche auf, während andere *Bacillus spec.* Geißeln tragen (Abb. 3).

Nachteil der Methode – insbesondere bei der Untersuchung von Umweltpflanzen – ist jedoch, dass relativ hohe Erregerkonzentrationen vorliegen müssen, damit die/der Erreger beispielsweise mit der „negative-staining-Methode“ erfasst werden kann ($>10^5$ – 10^6 Partikel/ml). An-

reicherungsmethoden, wie z. B. die Zentrifugation, können prinzipiell eingesetzt werden. Viel versprechend ist der Einsatz der Immunelektronenmikroskopie, hier fehlen jedoch bisher für eine breite Palette an Erregern geeignete Antikörper. Insgesamt eignet sich die EM als Werkzeug für die primäre Diagnostik, vor allem um eine schnelle erste Abschätzung zur Erregerbelastung durchführen zu können. Werden Mikroorganismen im EM dargestellt, so ergeben sich daraus wertvolle Hinweise für die weiteren Untersuchungsstrategien.

Erregeranzucht

Einen hohen Stellenwert für die Charakterisierung von Mikroorganismen in Un-

tersuchungsproben haben die klassischen Methoden der Erregeranzucht. Der Einsatz von Selektivmedien bei der Anzucht von Bakterien ermöglicht es in vielen Fällen, nicht relevante Begleitkeime im Wachstum zu unterdrücken. Mithilfe von etablierten Methoden ist dann die Differenzierung und Typisierung der Erreger möglich (s. Beitrag von S. Klee et al. in diesem Heft). Insbesondere bei Umweltproben muss bei der Anzucht von Erregern gesichert werden, dass sich keine Wachstumsinhibitoren in der Probe befinden. Parallel geführte Anzuchtversuche mit Proben, die mit dem zu suchenden Erreger oder einem Modellkeim gespik wurden, geben Auskunft über potenziell vorhandene Inhibitoren.

Komplexer gestaltet sich die Anzucht von Viren, da sie nicht selbstständig replizieren können und in Zellkulturen angezüchtet werden müssen. Umweltproben, die in der Regel mit einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Pilzen und Bakterien kontaminiert sind oder/und evtl. toxische Substanzen enthalten, können leicht die Vitalität und das Wachstum der Zellkulturen beeinflussen und damit auch die Anzucht der Viren behindern. Eine Filtration der Proben eliminiert zwar diese Mikroorganismen, kann jedoch auch einen erheblichen Verlust des zu suchenden Virus zur Folge haben. Eine Charakterisierung von angezüchteten Viren kann dann z. B. in einem ersten Schritt mit dem EM (morphologische Charakterisierung) erfolgen. Hieraus ergeben sich Hinweise auf die Eingruppierung der Viren in Virusfamilien oder Genera. Eine weitere Differenzierung kann anschließend z. B. mit immunologischen Methoden (Immun-EM oder Immunfluoreszenz, Neutralisationsteste) oder molekulargenetischen Methoden wie PCR und Sequenzierung durchgeführt werden.

Die Anzucht der Erreger und weitere Charakterisierung mit mikrobiologischen und immunologischen Methoden sowie auch in Tierversuchen ist sehr zeitintensiv. Es sollte daher in jedem Fall geprüft werden, ob nicht frühzeitig molekulare Nachweismethoden zum Erregernachweis und zur Differenzierung eingesetzt werden können.

Molekulargenetische Verfahren

Nachweissysteme wie PCR, RT-PCR oder Real-Time-PCR werden zuneh-

mend für die schnelle und sensitive Erkennung des Erbmaterials von Mikroorganismen einschließlich Viren eingesetzt. Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen von Sequenzinformationen, die die Herstellung von geeigneten Primern (und Sonden) für die Amplifikation der Genomabschnitte mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglichen. Da die verwendete Polymerase (Taq-Polymerase) nur DNA als Matrize erkennt, muss zum Nachweis von RNA-Viren (z. B. Filoviren) vor der PCR eine Umschreibung der RNA in DNA mithilfe der Reversen Transkriptase erfolgen (RT-PCR). Modifikationen der PCR unter Verwendung z. B. von geeigneten fluoreszenzmarkierten Sonden ermöglichen eine Verfolgung der PCR in Echtzeit (Real-Time-PCR) und erlauben bei Verwendung geeigneter Standards eine Quantifizierung der Genome (Genomäquivalente) im Ausgangsmaterial. Eine weitere Differenzierung von eng verwandten Erregern wie beispielsweise Orthopockenviren kann einerseits durch Sequenzierung, aber auch durch eine Schmelzanalyse der PCR-Produkte erfolgen. Unter Verwendung von Referenzmaterialien können die verschiedenen Orthopockenviren unterschieden werden. Dies ist besonders wichtig im Fall des Verdachts auf Vorliegen des Variola-Virus. Hier stehen seit kurzem validierte PCR-Nachweismethoden zur Verfügung [12]. Viele Experten sind sich einig, dass es notwendig ist, zum Nachweis der relevanten Erreger mehrere Genombereiche oder – wie im Fall von Pest und Anthrax – auch die verschiedenen Plasmide mit der PCR abzudecken. Dieses Vorgehen soll einerseits verhindern, dass Mutationen in den Primer- bzw. Sondensequenzen zu falsch negativen Ergebnissen führen oder dadurch die Sensitivität der Nachweissysteme herabgesetzt wird. Andererseits werden mögliche neue Varianten, die mit einem Nachweissystem nicht erfasst werden, mit großer Wahrscheinlichkeit von den anderen eingesetzten Nachweissystemen erkannt.

Die PCR kann grundsätzlich zeitgleich mit elektronenmikroskopischen und mikrobiologischen Nachweismethoden zur Erregeridentifizierung kombiniert werden und sollte zur Beschleunigung des diagnostischen Verfahrens so früh wie möglich zum Einsatz kommen. Wichtig für die Risikobewertung

bei Umweltproben kann die Information sein, die über eine quantitative PCR erhalten wird, da beim Nachweis von großen Mengen an Genomen ein höheres Infektionsrisiko besteht.

Zur Risikobewertung eines Erregers aus einer Umweltprobe ist es wichtig, die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse durch Anzuchtversuche abzusichern.

Zur weiteren Risikobewertung ist es notwendig zu ermitteln, ob die nachgewiesenen Erreger lebens- und vermehrungsfähig sind. Daher ist es in der Regel bei Umweltproben notwendig, die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse durch Anzuchtversuche abzusichern. Die Anzucht von Erregern aus Patientenmaterial, die mit molekularen Methoden nachgewiesen wurden, ist für die weitere Charakterisierung der Erreger von Interesse, jedoch nicht für die Bewertung des Untersuchungsergebnisses, da die Vermehrungsfähigkeit durch die Isolierung aus dem Patienten belegt ist.

Immunologische Verfahren

Der Nachweis von erregerspezifischen Antigenen mithilfe immunologischer Nachweisverfahren, wie Immunfluoreszenz und antigen capture assays, ist für einzelne Erreger, wie z. B. *Yersinia pestis*, etabliert (s. auch die Beiträge von S. Klee et al. und von A. Rakin in diesem Heft). Gar nicht oder nur ungenügend untersucht ist jedoch die Spezifität und Sensitivität dieser Verfahren. Zudem stehen nicht für alle Erreger hochspezifische Antikörper zur Verfügung. Die Entwicklung solcher Antikörper für die relevanten Agenzien, die dann allen Untersuchungslaboratorien zur Verfügung gestellt werden, ist eine vordringliche Aufgabe.

Im Fall eines Angriffs mit biologischen Agenzien müssen zügig Maßnahmen ergriffen werden, um exponierte Personen rechtzeitig zu behandeln (Postexpositionsprophylaxe). Zudem muss verhindert werden, dass sich der Erreger weiter verbreitet. Es besteht daher die Forderung, neben den gut etablierten Nachweismethoden neue Nachweisverfahren zu etablieren, die eine

noch schnellere – möglichst im Minutenbereich liegende – Identifizierung von Mikroorganismen und Toxinen ermöglichen. Hier bieten sich verschiedene neue Technologien an, die nachfolgend vorgestellt werden.

Neue diagnostische Verfahren

Biochips

Unter dem Begriff Biochips werden verschiedene miniaturisierte Testsysteme (Microarrays) zusammengefasst, die auf einem festen Träger die Durchführung einer Vielzahl von Testen ermöglichen. Für die Identifizierung von Agenzien, die als Biowaffen eingesetzt werden können, wäre hier der Nachweis des Erbmaterials (DNA bzw. RNA) oder von Proteinen wie Toxine oder bakterielle bzw. virale Antigene möglich. Diese Biochips benötigen aufgrund des sehr kleinen Reaktionsvolumens nur geringe Probenmengen und erlauben sehr kurze Reaktionszeiten, sodass es prinzipiell möglich wird, in kurzer Zeit eine Vielzahl von Untersuchungen durchzuführen. Zudem ermöglichen sie, viele verschiedene Agenzien gleichzeitig zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil der Biochips ergibt sich daraus, dass sie aufgrund ihrer kompakten Bauweise für einen Einsatz vor Ort geeignet sein sollten. Inwieweit Biochips letztendlich für den Nachweis aller potenziellen biologischen BT-Erreger eingesetzt werden können oder aber nur für bestimmte Agenzien wie beispielsweise Toxine, muss jedoch noch geklärt werden, da hohe Anforderungen an die Spezifität und Sensitivität der Nachweissysteme gestellt werden.

Physikochemische Verfahren

Die Entwicklung sensitiver physikochemischer Verfahren zur Analyse von Proteinen und anderen biologischen Strukturen ist weit fortgeschritten. Neue Techniken wie die MALDI- (matrix-assisted laser desorption/ionization-)TOF- (time-of-flight-)Massenspektroskopie erlauben es, in kurzer Zeit komplexe biologische Strukturen zu charakterisieren. Die Wissenschaftler erhoffen sich von diesem Verfahren eine schnelle und sichere Detektion von biologischen Kampfstoffen. Eine wesentliche Voraussetzung für die Einsetzbarkeit des Verfahrens ist die Erstellung umfangreicher Datenbanken

mit den Spektren der biologischen Strukturen (z. B. Proteine, Kohlenhydrate) der relevanten und verwandten Mikroorganismen oder Toxine. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Ermittlung von Strukturen für den spezifischen, sensitiven Nachweis der Erreger. Wie auch bei den anderen diagnostischen Nachweisverfahren ist es von größter Bedeutung, pathogene Erreger von apathogenen Varianten oder eng verwandten (apathogenen) Organismen zu differenzieren.

Qualitätssicherung der eingesetzten Nachweisverfahren

Die Qualität der Routinediagnostik wird in Deutschland durch Ringversuche überprüft. Dieses Vorgehen führt erfahrungsgemäß zu einem qualitativ hohen Standard bei den an den Ringversuchen teilnehmenden Laboratorien. Wie wichtig die Qualitätssicherung auch im Bereich der Erreger ist, die für bioterroristische Anschläge eingesetzt werden können, haben die Ergebnisse des ersten Ringversuchs gezeigt, der im Rahmen des European Network of Imported Viral Diseases (ENIVD) durchgeführt wurde [13]: Es wurden an insgesamt 26 deutsche und europäische Laboratorien sowie an jeweils einen Teilnehmer aus Japan und Kanada Proben verschickt, die inaktivierte Orthopocken- bzw. Filoviren enthielten. Bei den Orthopockenviren wurde erwartet, dass mithilfe der PCR und/oder einer Sequenzierung eine Speziesdifferenzierung erfolgte (eingesetzt wurden Affenpocken-, Kamelpocken-, Kuhpocken- und Mäusepockenviren). Zudem wurden Proben mit unterschiedlichen Genomzahlen verschickt. Nur 5 der 26 beteiligten Laboratorien waren in der Lage, eine ausreichend sensitive und spezifische Diagnostik durchzuführen. Vergleichbar unbefriedigende Ergebnisse wurden im Ringversuchsteil mit den Filoviren erzielt.

Sowohl auf europäischer als auch auf globaler Ebene wird ein dringender Bedarf im Hinblick auf die Qualitätssicherung der Diagnostik BT-relevanter Erreger gesehen. Dies betrifft nicht nur virale Erreger, sondern auch die Diagnostik von Bakterien und Toxinen. Nicht gelöst ist in diesem Zusammenhang das Vorgehen beim Versand von lebenden, vermehrungsfähigen Organismen oder aktiven Toxinen, die als Biowaffe eingesetzt werden können.

Schlussbemerkungen

Das Erkennen von Anschlägen mit biologischen Agenzien wirft für die Labor diagnostik neue, bisher nicht bekannte Probleme auf. In diesem Zusammenhang sind 2 Quellen des Untersuchungsmaterials zu unterscheiden, die unterschiedliche Ansprüche an das diagnostische Verfahren stellen: 1. Proben, die von erkrankten Patienten stammen und 2. so genannte Umweltproben, die entweder aus Einsendungen (wie z. B. Briefen etc.) stammen oder in der Umwelt gesammelt wurden.

Bei Patientenproben liefern die Symptome Hinweise auf die am Krankheitsgeschehen beteiligten Agenzien (Bakterien, Viren, Toxine) und erlauben damit den gezielten Einsatz von Untersuchungsmethoden. Der Verdacht, dass diese Erkrankungen durch terroristische Anschläge hervorgerufen wurden, lässt sich nur über epidemiologische Untersuchungen erhärten, wenn keine anderen Hinweise, wie z. B. Bekennerschreiben, vorliegen (eine Ausnahme bilden sicherlich die Pocken). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass allen Erkrankungen durch Erreger/Toxine, die für bioterroristische Anschläge verwendet werden können, auch natürliche Ursachen zugrunde liegen können. Bei viralen Erkrankungen sind dies z. B. Reisen in die entsprechenden Endemiegebiete, bei Toxinen Exposition durch kontaminierte Lebensmittel. Da für viele Erreger oder Toxine keine validierten kommerziellen Teste vorliegen, müssen für diese neue, sensitive Nachweisverfahren entwickelt und geeignete Referenzmaterialien gesammelt und zur Verfügung gestellt werden.

Nicht vorhersehbare Probleme können bei der Untersuchung von Umweltproben auftreten. Handelt es sich wie z. B. beim Brief an den Senator Daschle in den USA um eine hochreine Präparation an Anthraxsporen, so können Schnellteste mit hoher Sicherheit verlässliche Ergebnisse liefern, die dann im Anschluss mit validierten Methoden bestätigt werden können. Liegen jedoch Umweltproben vor, die aus Gemischen von Mikroorganismen bestehen, so kann der Einsatz von nicht erregerspezifischen oder wenig sensitiven Testen entweder zu falsch positiven oder zu falsch negativen Ergebnissen führen. In beiden Fällen würde eine fehlerhafte Ri-

sikobewertung erfolgen mit ziemlich sicher erheblichen Konsequenzen. Im Falle eines falsch negativen Befundes würden die notwendigen Maßnahmen zur Postexpositionsprophylaxe oder zur Umgebungsuntersuchung bzw. Dekontamination nicht (rechtzeitig) eingeleitet. Im Fall des falsch positiven Befundes würden unnötige Maßnahmen ergriffen werden, wie z. B. bei einem Befund „*B. anthracis* positiv“ möglicherweise die Behandlung einer Vielzahl von Personen mit Antibiotika und eine mit hohen Kosten verbundene Dekontamination der inkriminierten Räume oder sogar der Gebäude. Wie wir in Deutschland im November 2001 gesehen haben, kann sich aus solchen falsch positiven Befunden ein hohes Panikpotenzial ergeben mit einem breiten Echo in der Öffentlichkeit und bei den Entscheidungsträgern.

Konsequenterweise muss man an die Diagnostik von Proben, bei denen der Verdacht eines bioterroristischen Anschlags besteht, höchste Anforderungen stellen. Die Nachweisverfahren müssen sensitiv und spezifisch sein. Sie sollen entsprechend dem technischen Stand jeweils in der kürzestmöglichen Zeit zu einem Ergebnis führen und möglichst vor Ort durchführbar sein. Verfahren, die diese Anforderungen theoretisch erfüllen, befinden sich in der Entwicklung. Die Praxis, die nur bis zu einem gewissen Grad durch Modell-

und Ringversuche simuliert werden kann, wird zeigen, ob diese Verfahren die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Dabei werden aber voraussichtlich die bisher etablierten Nachweisverfahren ihre Bedeutung als Bestätigungstest nicht verlieren.

Unter folgenden Adressen sind weitere Informationen zu Erregern/Agenzien abrufbar, die für bioterroristische Anschläge eingesetzt werden können:

- USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties Handbook (2001) U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases; Fort Detrick, Frederick, Maryland, Fourth Edition
- The Medical NBC Information Server <http://www.nbc-med.org>
- Medical Research and Materiel Command <http://mrmc-www.army.mil>
- <http://www.usamriid.army.mil/education/bluebook.html>
- Medical Research Institute of Chemical Defense <http://chemdef.apgea.army.mil>
- Medical Research Institute of Infectious Diseases <http://www.usamriid.army.mil>

Literatur

1. <http://dosfan.lib.uic.edu/acda/factshee/wmd/cw/auslist.htm>
2. Eitzen EM, Takafuji ET (1997) Historical overview of biological warfare. In: Medical aspects of chemical and biological warfare. Textbook of Military Medicine. Office of The Surgeon General at TMM Publications, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC, pp 415–423
3. Eitzen EM, Takafuji ET (1997) Medical aspects of chemical and biological warfare. Textbook of Military Medicine. Office of The Surgeon General at TMM Publications, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC; <http://www.nbc-med.org/SiteContent/HomePage/WhatsNew/MedAspects/contents.html>
4. Rotz LD, Kahn AL, Lillibridge SR et al. (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8:225–229
5. Torok TJ, Tauxe RV, Wise RP et al. (1997) A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. *JAMA* 278:389–395
6. Kolavic SA, Kimura A, Simons SL et al. (1997) An outbreak of *Shigella dysenteriae* type 2 among laboratory workers due to intentional food contamination. *JAMA* 278:396–398
7. <http://www.terrorismanswers.com/groups/aumshinrikyo.html>
8. Tucker JB (1999) Historical trends related to bioterrorism: an empirical analysis. *Emerg Infect Dis* 5:498–504
9. Gesamtes Heft: Bioterrorism-related Anthrax (2002) *Emerg Infect Dis* 8:1013ff
10. Hsu VP, Lukacs SL, Handzel T et al. (2002) Opening a *Bacillus anthracis*-containing envelope, Capitol Hill, Washington, D.C., The Public Health Response. *Emerg Infect Dis* 8:1039–1043
11. Ellerbrok H, Nattermann H, Özel M et al. (2002) Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 214:51–59
12. Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G (submitted) Real-time PCR detection of orthopoxvirus DNA and identification of Variola Virus DNA by melting analysis
13. Niedrig M, Schmitz H, Becker S et al. (in press) External quality control measures for PCR-diagnosis of Filo-, Lassa-, and Orthopox viruses. *J Clin Virol*