

## Schlussbericht

### **Titel des Verbundprojektes:**

„Raman-Spektroskopie zur Detektion agroterroristisch relevanter Erreger der Sicherheitsstufe 3 (PathoSafe)“

### **Titel des Teilprojektes:**

„Herstellung standardisierten Probenmaterials mit *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei* und *Brucella* spp. die für Raman-Spektroskopie und Referenzanalyse mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden“

### **Zuwendungsempfänger:**

Friedrich Loeffler Institut (FLI)  
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen  
Naumburger Str. 96a  
07743 Jena  
Tel: +49-(0)3641-804-0  
Fax: +49-(0)3641-804-228  
E-Mail: [mandy.elschner@fli.bund.de](mailto:mandy.elschner@fli.bund.de)

**Förderkennzeichen**13N9547)

**Vorhabenbezeichnung:** PathoSafe

**Laufzeit des Vorhabens:** 01. Januar 2008 bis 30.Juni 2011

**Berichtszeitraum:** 01. Januar 2008 bis 30.Juni 2011

## **Aufgabenstellung**

Im Mittelpunkt des Verbundes „PathoSafe“ stand die Erforschung der Grundlagen für die Detektion und Identifizierung von Pathogenen in unterschiedlichen Umgebungen mittels Raman-Mikroskopie. Die Untersuchungen am Gerät selbst wurden vom Projektpartner IPC durchgeführt. Das FLI war beteiligt an der Validierung der Raman-basierten Nachweisttechnologie und hatte im Rahmen des Projektes die Aufgabe, Referenzproben in Form definierter Erregerpräparationen von *Bacillus anthracis*-Sporen, *Burkholderia mallei* und *Brucella* spp. bereitzustellen. Darüber gehörte die Herstellung simulierten Probenmaterials (Boden, Futtermittel, Milch) mittels Spiken (Einbringen definierter Erregermengen) zum Aufgabenspektrum des FLI. Durch eine begleitende Referenzanalyse des Probenmaterials mit verschiedenen mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden sollte die Raman-basierte Diagnostik hinsichtlich Schnelligkeit, Spezifität und Sensitivität bewertet werden. Des Weiteren sollte das FLI als Endnutzer mitverantwortlich sein für die Ausdehnung der Validierung auf Testung des Gerätes unter Praxisbedingungen in landwirtschaftlichen und lebensmittel- und futtermittelproduzierenden Betrieben in der Endphase des Projektes.

## **Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

In der Arbeitsgruppe 130 des Institutes für Bakterielle Infektionen und Zoonosen (IBIZ) des Friedrich-Loeffler-Institutes am Standort Jena sind die bakteriologischen Referenzlaboratorien für Milzbrand, Rotz und Brucellose angesiedelt. Für die Diagnostik der genannten Erkrankungen sind Routinemethoden etabliert und konnten in das Projekt eingebracht werden. Für alle Arbeiten mit diesen Risikogruppe 3-Erregern stand das S3-Labor am FLI zur Verfügung. Neben den methodischen Aspekten stellte das FLI Präparationen aus den umfangreichen Stammsammlungen der genannten Erreger für die Raman-Datenbank zur Verfügung, die mittels Referenzmethoden charakterisiert wurden.

## **Planung und Ablauf des Vorhabens**

### **AP: Referenzanalyse, Bereitstellung von Referenzmaterial**

In jedem Szenario zur Detektion von hochpathogenen Erregern, ob im Labor oder vor Ort, sind auch die an den Untersuchungen beteiligten Personen vor Infektionen mit den gefährlichen Agenzien zu schützen. Deshalb war zunächst die Frage zu

beantworten, wie *Bacillus (anthracis)*-Sporen so sicher inaktiviert werden können, dass sie im Raman-Spektroskop noch reproduzierbare verwertbare Spektren liefern. Dazu wurden Sporensuspensionen von *Bacillus thuringiensis* jeweils nativ und parallel unter Verwendung sieben verschiedener Inaktivierungsverfahren (Abbildung 1,2) hergestellt und dann am Raman-Spektroskop gemessen. Als Inaktivierungslösungen kamen Formaldehyd-Lösungen, Wofasteril – Alcapur (CH<sub>3</sub>COOOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOH) mixture (Kesla, Bitterfeld-Wolfen, Germany), Peressigsäure-Lösungen, Danchlorix (NaOCl, Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg, Germany) zum Einsatz.

Abbildung 1: Verwendete Inaktivierungslösungen bzw. -verfahren

**Inaktivierungsverfahren:**

- Formaldehydlösung 10 %ig
- Formaldehydlösung 20%ig
- Danchlorix (NaOCl) unverdünnt
- Danchlorix 1:20
- 0,5% Wofasteril - Alcapur - Gemisch
- 1% Peressigsäure
- 2% Peressigsäure
- Autoklavieren, 134° C, 1 h
- Waschlösung (Kontrolle)

Inaktivierungsdauer: 15min, 30min, 1h, 2h, 4h

Ausgangskeimzahlen (Sporenzahlen): 1 - 4 x10<sup>7</sup> KBE/ml

Für ein sporizides Wirkungsspektrum gibt es kein in Deutschland gelistetes Desinfektionsmittel (VAH 2006). Die Entscheidung, welche Inaktivierungsverfahren zur Anwendung kommen, basiert auf behördlichen Richtlinien und Empfehlungen (RKI 2007). Die WHO Richtlinien “ Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals” empfehlen Formaldehyd und Peressigsäure (WHO, 2009). Die nationale Desinfektionsmittelrichtlinie in Ausbruchsgeschehen von Anthrax in Tierbeständen (Anonymus, 2007) schreibt den Einsatz von hochprozentiger Formaldehyd- oder Peressigsäure- oder Glutaraldehydlösungen vor. Ein großer Nachteil des Einsatzes von Peressigsäure sind seine korrosive Wirkung und die extrem Geruchsbelastung für die Anwender. Eine Alternative dazu ist die Kombination mit Aluminiumhydroxid (Wofasteril-Alcapur – Kombiverfahren, Kesla,

Bitterfeld-Wolfen, Germany). Außerdem ist die sporizide Wirkung von Hypochlorit bekannt allgemein akzeptiert und ein weit verbreitetes Desinfektionsmittel in der Lebensmittelindustrie. Die sporizide Wirkung von Hypochlorit-haltigen Haushaltsreinigern ist beschrieben (Black et al., 2008), und deshalb wurde Danchlorix (NaOCl, Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg, Germany) in das zu testende Panel von Inaktivierungsmitteln aufgenommen Die sicherste Methode zur Inaktivierung von Sporen (VAH 2007) ist das Autoklavieren bei 134 °C.

Abbildung 2: Ablaufschema der Inaktivierungsversuche

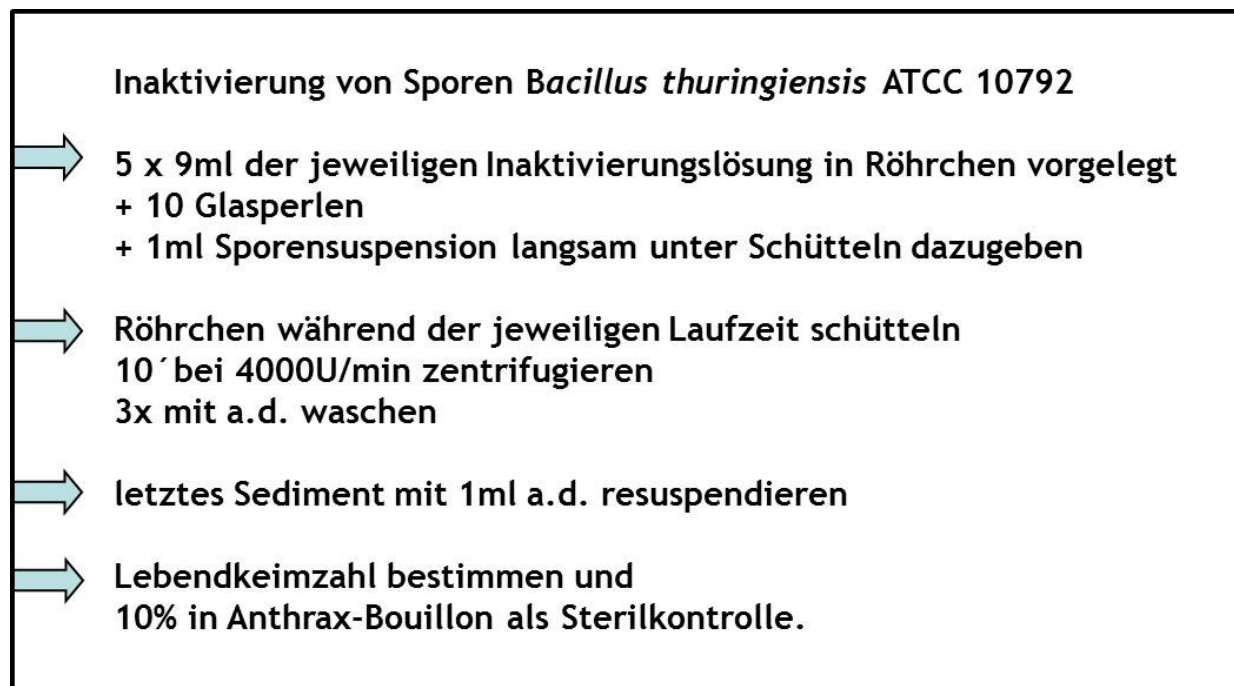


Tabelle 1: Ergebnisse der Sporen-Inaktivierungsversuche mit *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 (290403RA0164),  $1 - 4 \times 10^7$  KBE/ml

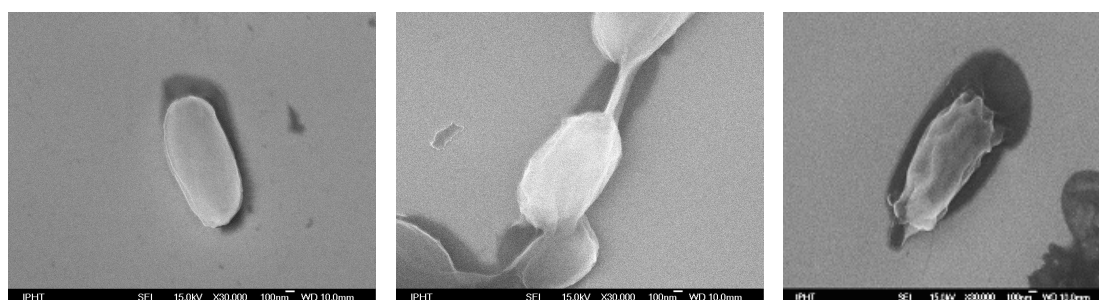
Inaktivierungslösung	Wachstumskontrolle je nach Einwirkzeit				
	15 Min	30 Min	1 h	2h	4h
10 % Formaldehyd-Lsg.	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
20% Formaldehyd-Lsg.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Danchlorix unverdünnt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Danchlorix 1:20	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
0,5% Wofasteril - Alcapur	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
1 % Peressigsäure	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2 % Peressigsäure	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Tabelle 2: Ergebnisse der Sporen-Inaktivierungsversuche mit *Bacillus anthracis* Stamm 4463 (291001RA0337)  $2 \times 10^7$  KBE/ml

Inaktivierungslösung	Wachstumskontrolle je nach Einwirkzeit				
	15 Min	30 Min	1 h	2h	4h
10 % Formaldehyd-Lsg.	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-
20% Formaldehyd-Lsg.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Danchlorix unverdünnt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Danchlorix 1:20	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
0,5% Wofasteril - Alcapur	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
1 % Peressigsäure	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
2 % Peressigsäure	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Wesentliches Ergebnis dieser Versuche war, dass sich eine 20%ige Formaldehydbehandlung besonders eignet, Sporen sicher abzutöten aber gleichzeitig die Raman-Spektren reproduzierbar darzustellen (Abbildung 3). Dieses Verfahren wurde für die gesamten Analysen von Sporen im Projekt ausgewählt. Die Behandlung mit Persessigsäure resultierte auch in einer sichern Inaktivierung, allerdings war die Analysefähigkeit am Raman-Mikroskop abhängig von der Einwirkzeit. Die Inaktivierung mit Danchlorix (Abbildung 4) oder Autoklavieren (Abbildung 3) zeigte zwar eine sichere Abtötung, allerdings bei gleichzeitigem Verlust der Darstellungsmöglichkeit im Raman-Mikroskop. Da für *B.anthraxis* derzeit kein gelistetes Flächendesinfektionsmittel verfügbar ist, werden die erzielten Ergebnisse genutzt, um im eigenen Labor die Hygienemaßnahmen zu ergänzen.

Abbildung 3: Raster-Elektronenmikroskopische Darstellung von Sporen v. *B.thuringiensis* DSM 350 nativ / inaktiv nach 15' Inaktivierung mit 20% Formaldehyd-lösung und nach Autoklavieren (Quelle IPC)

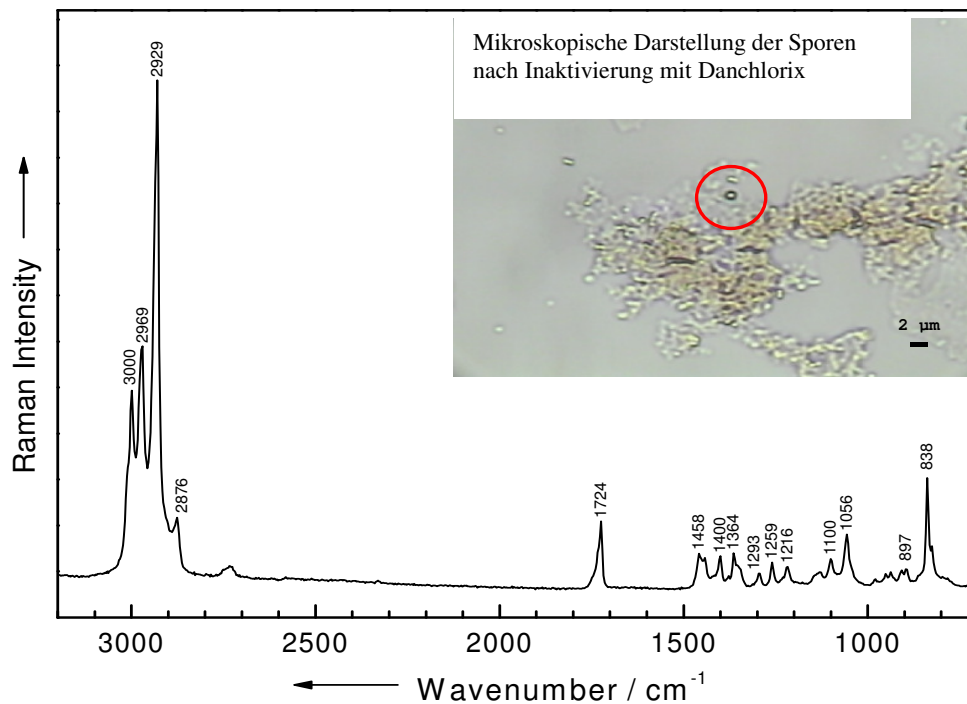


20% Formalin, 15'

nativ

autoklaviert

Abbildung 4: Darstellungsversuch von Sporen inaktiviert mit Danchlorix – nur PHB auffindbar, keine verwertbaren Spektren m Raman-Mikroskop darstellbar (Quelle IPC)



Für die Validierung der Reproduzierbarkeit der Analyse am Raman-Mikroskop wurden beispielsweise inaktivierte Sporen (20 % Formaldehydlösung) von *B. thuringiensis* und *B. anthracis* wiederholt gemessen. Dabei konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Differenzierung auch bei unterschiedlicher Formaldehyd-behandlungszeit nachgewiesen werden (Abbildung 5).

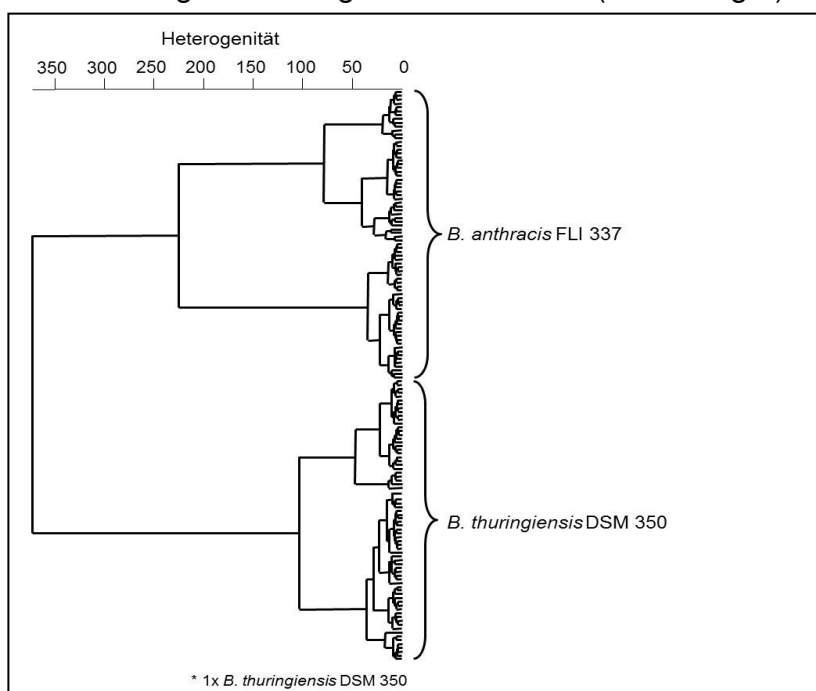


Abbildung 5: Ergebnis aus  $\Sigma$  150 Spektren, 75 pro Stamm, Daten umfassen sämtliche mit 20 % Formaldehyd-Lösung jedweder Zeit behandelten Sporen beider Stämme ; 1 falsch klassifiziert\* Ergebnis reproduziert sich auch auf einzelne Zeiten (15' – 4 h)

Zu Beginn des Projektes war keine Datenbank für die Identifikation von Bacillen am Raman-Mikroskop verfügbar. Im Verlauf des Projektes wurden deshalb zusätzlich zu denen am FLI vorhandenen Stammsammlungen insgesamt 39 neue *Bacillus*-Stämme angeschafft und in die Sammlung des FLI aufgenommen.

Für die Erstellung einer Datenbank und für die Validierung der Raman-Mikroskopie wurden insgesamt 129 Sporenpräparationen 12 verschiedener *Bacillus*-Spezies einschl. *B. anthracis* (Tabelle 3) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Untersuchte *Bacillus*-Stämme und Anzahl der bereitgestellten Sporenpräparationen

Spezies	Präparationen Bis 2/2010	Präparationen 2-8/2010	Präparationen ab 3/2010 - 4/2011
<i>B. anthracis</i>	14	15	5
<i>B. atropheus</i>	2		
<i>B. cereus</i>	10	3	4
<i>B. licheniformis</i>	2		
<i>B. mycoides</i>	2	2	
<i>B. polymyxa</i>	5		2
<i>B. subtilis</i>	10	1	7
<i>B. thuringiensis</i>	2	2	2
<i>B. weihenstephanensis</i>	20	3	21
<i>B. brevis</i>	2		2
<i>B. megaterium</i>	2	1	1
Summe	71	27	31

Tabelle 4: Identifizierung von *Bacillus*-ssp. mittels Raman-Mikroskopie (Quelle: IPC)

erwartet / identifiziert	<i>B.</i> <i>anthracis</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>	<i>B.</i> <i>polymyxa</i>	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>B.</i> <i>weihensteph.</i>
unknown	13	27	1	2	29
<i>B. anthracis</i>	<b>511</b>	20	0	4	5
<i>B. cereus</i>	15	<b>79</b>	0	0	4
<i>B. polymyxa</i>	1	0	<b>110</b>	0	1
<i>B. subtilis</i>	1	0	0	<b>162</b>	2
<i>B. weihensteph.</i>	0	6	1	2	<b>166</b>

Nach Erstellung eines hierarchischen Klassifizierungsmodells für *Bacillus*-Sporen konnten in unabhängig präparierten Proben *B. anthracis* mit einer Genauigkeit von 90% identifiziert werden (Tabelle 4). Die falsch-positiven Zuordnungen traten insbesondere mit *B. cereus* auf.

Der zweite Schwerpunkt des Projektes lag auf der Detektion von *Burkholderia mallei* und *Brucella* ssp. mittels Raman-Mikroskopie.

Die bereits etablierten Protokolle für die Inaktivierung von *Bacillus*-Sporen wurden auf Brucellen und Burkholderien optimiert. Die Inaktivierung erfolgte mit 10% Formaldehyd-Lösung für 1 h. Auch für dieses Verfahren wurde zunächst untersucht, ob native und inaktivierte Bakterien vergleichbare Ramanspektren liefern.

Auch für diese Erregergruppen musste zunächst eine Datenbank an Spektren für die Raman-Mikroskopie erstellt werden. Insbesondere für die Datenbank von *Brucella*-Spezies und ihrer Begleitflora wurden Präparationen auch genetisch verwandter Bakterien bereitgestellt. So wurden vor allem genetische ähnliche Gattungen wie *Ochrobacter* und *Yersinia* in das Spektrum aufgenommen. In den Tabellen 5 und 7 sind die bereitgestellten inaktivierten Präparationen zusammengefasst.

Tabelle 5: Untersuchte *Brucella*-Stämme , nahe verwandte Spezies und Anzahl der bereitgestellten Präparationen

Spezies	Anzahl von Präparationen
<i>Ochrobactrum</i> ssp.	12
<i>Brucella abortus</i>	3
<i>Brucella melitensis</i>	3
<i>Brucella suis</i>	3
<i>Brucella ceti</i>	3
<i>Brucella pinnipedialis</i>	3
<i>Brucella canis</i>	3
<i>Brucella microti</i>	3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Summe	43



Neben 7 verschiedenen *Brucella* spp. wurden weitere 9 genetisch relevante Gattungen Raman-spektroskopisch untersucht. Dabei entstand mittels linearer Diskriminanzanalyse (LDA) ein Klassifizierungsmodell mit ~2000 Spektren, welche zur Identifizierung weiterer unabhängiger Proben (825 Spektren, Tabelle 6) herangezogen werden konnten. Mit einer Genauigkeit von über 94% konnte Brucellen von anderen genetisch ähnlichen Genera unterschieden werden. Die Gesamt-Identifizierungsrate für alle untersuchten Gattungen liegt bei ~92%.

Tabelle 6: Identifizierung von *Brucella* ssp. und nahe verwandten Spezies (Quelle: IPC)

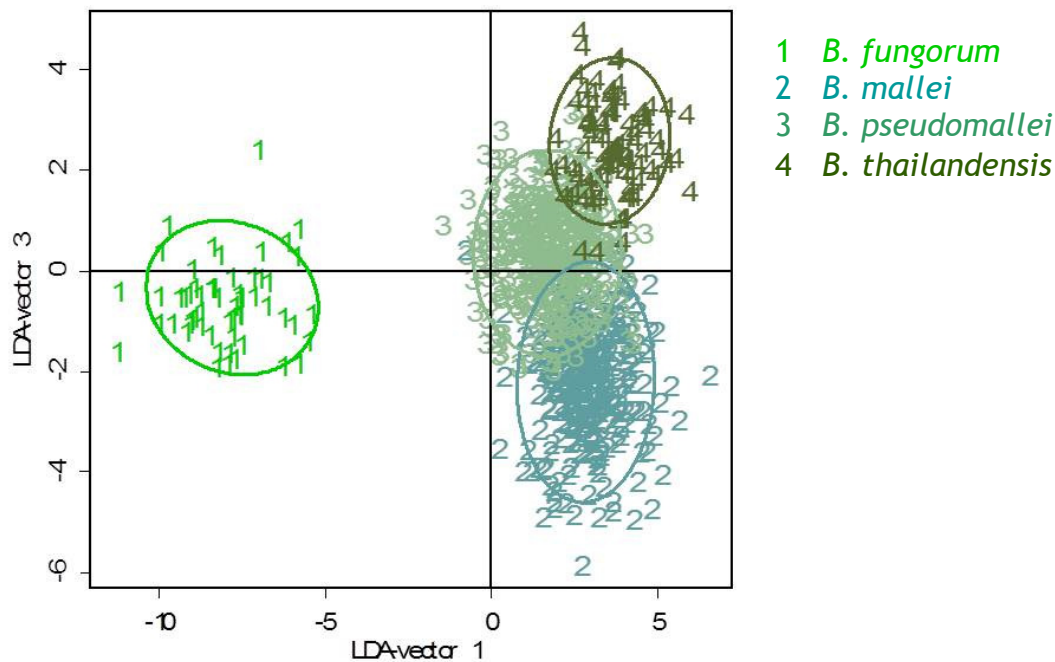
erwartet identifiziert	<i>Brucella</i> (7 Spezies)	<i>Ochrobactrum</i> (2 Spezies)	<i>Pseudomonas</i> (6 Spezies)	<i>Yersinia</i> (1 Spezies)	Sensitivität %	Spezifität %
<i>Brucella</i>	251	10	0	1	94.72	98.01
<i>Ochrobactrum</i>	11	90	0	0	90.00	98.46
<i>Pseudomonas</i>	3	0	307	4	99.35	98.58
<i>Yersinia</i>	0	0	2	146	96.69	99.69

Tabelle 7: Untersuchte *Burkholderia*-Stämme, nahe verwandte Spezies und Anzahl der bereitgestellten Präparationen

Spezies	Anzahl von Präparationen
<i>Burkholderia mallei</i>	15
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	15
<i>Burkholderia cepacia</i>	3
<i>Burkholderia thailandensis</i>	3
<i>Burkholderia fungorum</i>	1
<i>Burkholderia glathei</i>	1
Summe	38

10 inaktivierte Typstämme und Isolate von *B. mallei* und *B. pseudomallei* wurden zur Klassifizierung (95,8%) gegen *B. fungorum* und *B. thailandensis* herangezogen. Deutlich trennt sich *B. fungorum* von den anderen genetisch untereinander eng verwandten Spezies ab (Abbildung 6). *B. mallei*- und *B. pseudomallei*-Isolate konnten mittels SVM mit einer Genauigkeit von 95% identifiziert werden.

Abbildung 6: Klassifizierung von *Burkholderia* ssp. (Quelle: IPC)



Vor Projektbeginn war nicht vorhersagbar, ob die Analyse des im Fokus stehenden Erregerspektrums mittels Raman-Mikroskopie überhaupt möglich ist. Im Projekt wurde eine umfangreiche Erreger-Datenbank für die Mikro-Raman-Spektroskopie aufgebaut. Es konnte gezeigt werden, dass *B. anthracis* mit einer Genauigkeit von 90% und *B. mallei* und *B. pseudomallei* mit 96%iger Genauigkeit identifiziert werden können. Die Identifizierungsrate für die Gattung *Brucella* lag bei ca. 92 %. Die Datenbank steht zur Verfügung und kann für die Identifizierung der Erreger genutzt werden. Weiterführende Forschungsarbeiten können auf die erzielten Ergebnisse aufbauen. Die Ergebnisse wurden publiziert (s. Veröffentlichungen). Mit dem erfolgreichen Abschluß dieses AP waren gute Voraussetzungen geschaffen, das AP „Isolierung von Bakterien aus komplexen Probenmatrices“ zu beginnen.

#### **AP : Isolierung von Bakterien aus komplexen Probenmatrices**

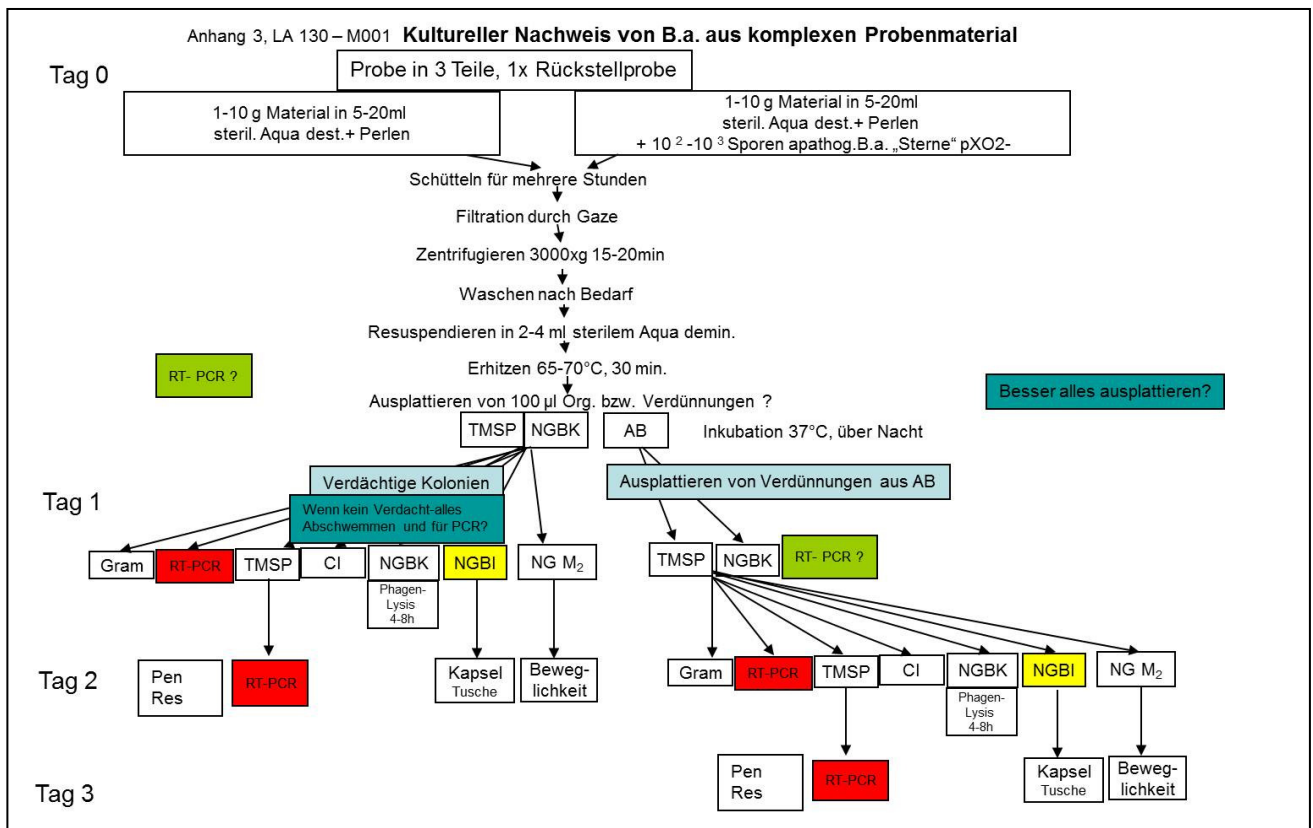
Für die Identifizierung der Bakterien und Sporen aus verschiedenen Probenmatrices ist eine an die Matrix angepasste Isolierungsstrategie für die Mikroorganismen notwendig. Dafür wurden dem Projektpartner IPC zur Messung am Raman-Mikroskop verschiedene Bodenproben mit Sporen gespikt zur Verfügung gestellt (Abbildung 7).

Abbildung 7: Darstellung der Herstellung von gespiktem Probenmaterial mit Sporen von *Bacillus anthracis* am Beispiel von Sand



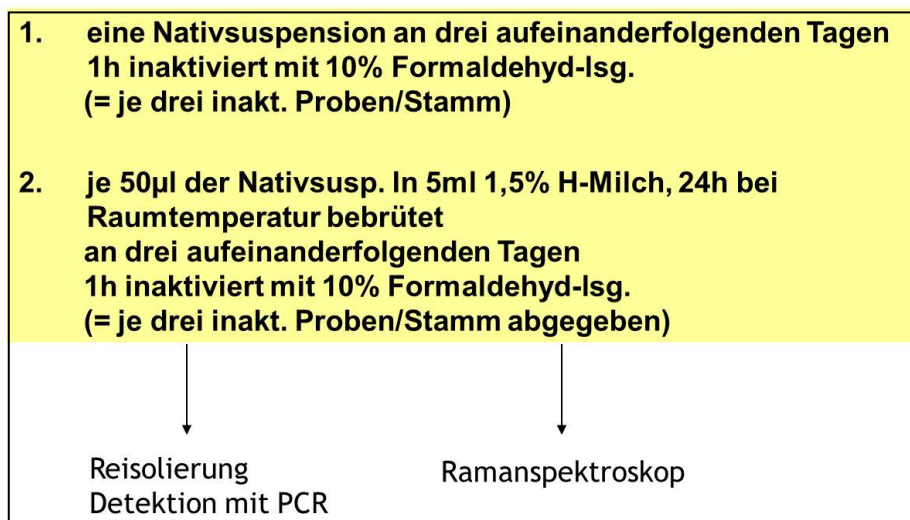
Parallel erfolgte im FLI die Referenzanalyse, d.h. der routinemäßig angewendete Untersuchungsgang z.B. für den Nachweis von Anthrax-Sporen im Boden (Abbildung 8).

Abbildung 8: Darstellung der Standard-Referenzanalytik für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus komplexem



Dazu gehört die mikrobiologische Isolierung und der Nachweis durch molekularbiologische Methoden. Bei den vergleichenden Untersuchungen am FLI und IPC wurde deutlich, dass der mikrobiologische Nachweis sowie der molekularbiologische Nachweis unterschiedlich stark von der Beschaffenheit des Bodens beeinflusst d.h. erschwert wird. Die Probenvorbereitung stellt den kritischen Punkt dar, der den direkten Erregernachweis deutlich beeinflusst. Für den direkten Nachweis von Brucellen wurde im Projekt an der Matrix Milch gearbeitet. Dafür wurden Präparationen von Milch, gespikelt mit Brucellen hergestellt. Auch hier kam die Inaktivierung mit Formaldehyd-Lsg. Zur Anwendung (Abbildung 9).

Abbildung 9: Herstellung standardisierten Probenmaterials mit *Brucella ssp.* in Milch



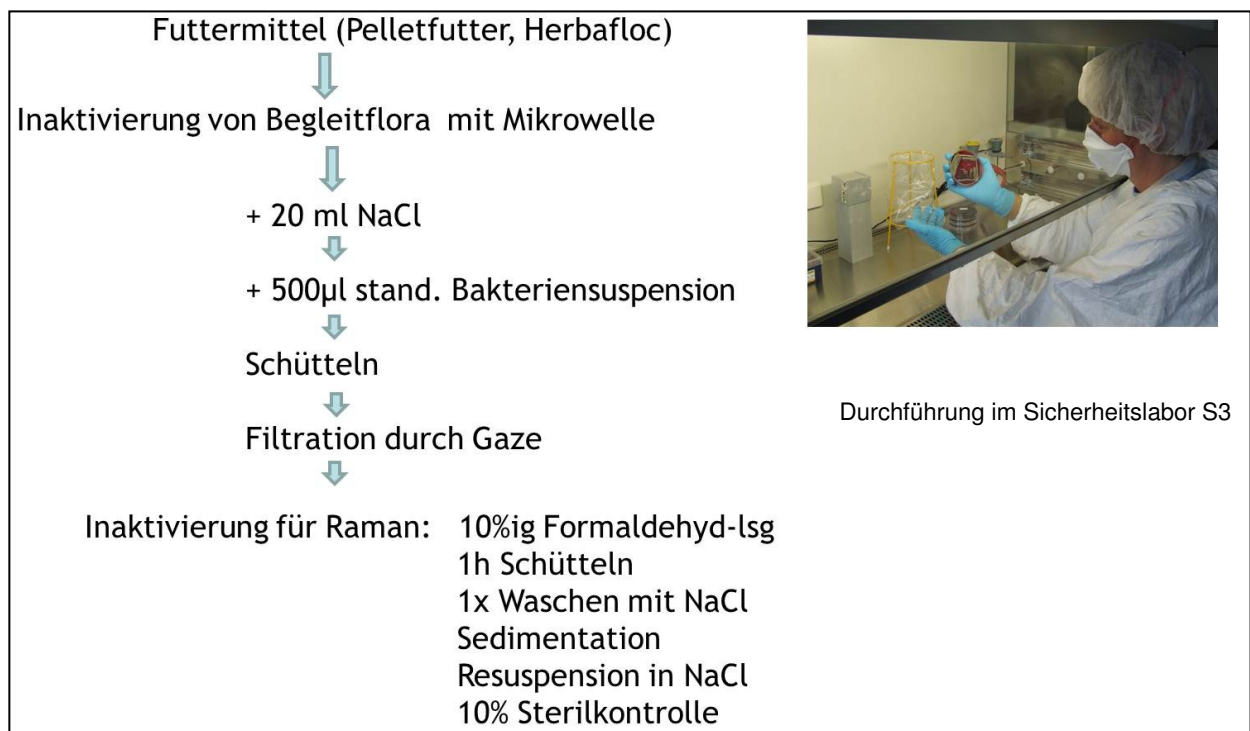
Im Projekt wurden für diesen Teilbereich insgesamt 43 Erreger-Präparationen in Milch hergestellt (Tabelle 8).

Spezies	Anzahl von Präparationen
<i>Ochrobactrum ssp.</i>	12
<i>B. abortus</i>	3
<i>B. melitensis</i>	3
<i>B. suis</i>	3
<i>B. ceti</i>	3
<i>B. pinnipedialis</i>	3
<i>B. canis</i>	3
<i>B. microti</i>	3
<i>Y. enterocolitica</i>	6
<i>P. aeruginosa</i>	6
Summe	43

Tabelle 8: Gespikte Milchpräparationen mit *Brucella* und *Ochrobacter sp.*

Für das Szenario „*Burkholderia mallei* als Kontaminant in Futtermitteln“ und anschließende Detektion mittels Raman-Mikroskopie wurden zwei verschiedene Futtermittelarten ausgewählt. Neben einem typischen Pelletfutter wurde ein typisches Pferdefutter (Herbafloc) aus verschiedenen Getreidesorten ausgewählt. Dabei stellte sich das Problem, dass die mikrobiologische Reisolierung mittels Referenzanalyse durch die „natürliche“ Kontamination insbesondere bei Herbafloc problematisch ist. Dieses Problem wäre im Ernstfall einer Kontamination extrem nachteilig und eine direkte Detektion im Futtermittel umso mehr von Vorteil. Für den experimentellen Teil wurde deshalb das Futtermittel vor dem Spiken mit dem *B. mallei* in der Mikrowelle dekontaminiert, mit dem Wissen, dass das nicht die Realität widerspiegelt (Abbildung 10).

Abbildung 10: Darstellung der Herstellung von gespiktem Futtermittel mit *B. mallei*



Im Projekt wurden für diesen Teilbereich insgesamt 43 Erreger-Präparationen in Futtermittel hergestellt (Tabelle 9).

Durch die zeitlich nur befristete Haltbarkeit des Referenzmaterials hatte sich der präparative Aufwand insbesondere zeitlich erhöht. Dadurch drängten sich die Arbeiten zu den Burkholderien und der Matrix Futtermittel im letzten Projektabschnitt.

Durch die zuwendungsfreie Verlängerung der Projektlaufzeit konnten alle Arbeiten ausgeführt werden.

Tabelle 9: Gespikte Futtermittel-Präparationen

Spezies	Anzahl der Präparationen
<i>Burkholderia mallei</i>	18
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	15
<i>Burkholderia thailandensis</i>	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6

### **Wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde,**

Bisher wurde die Raman-Mikroskopie in der Tierseuchendiagnostik noch nicht angewendet. Datenbanken waren nicht verfügbar und die Herstellung der Präparationen zur Messung am Raman-Mikroskop waren vor Projektbeginn nicht etabliert und mussten im FLI eingearbeitet werden.

### **Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Insbesondere mit dem Institut für Physikalische Chemie and der FSU Jena bestand einen enge Zusammenarbeit. Das FLI stellte alle Proben mit *B. anthracis*, Brucellen und Burkholderien zur Messung am Raman-Mikroskop zur Verfügung.

Mit den Projektpartnern BfR und ZNF, welche die Teilprojekte zur Begleitforschung durchführten, und der dem Projektpartner radID fanden in regelmäßigen Abständen Erfahrungsaustausch und Diskussionen zum Projekt statt.

### **Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele**

Der zahlenmäßige Nachweis der Verwendung der Mittel wurde von der Abteilung Projektmanagement des FLI zugearbeitet.

Mit den zugewiesenen Mitteln wurden alle Projektaufgaben realisiert. Alle durchgeführten Tätigkeiten waren notwendig und angemessen, um das Projektziel zu realisieren.

Der Nutzen der Ergebnisse besteht im Wesentlichen darin, dass gezeigt werden konnte, dass die Raman-Mikroskopie eine geeignete Geräteplattform für die

Erregerdiagnostik darstellt. Auf den Ergebnissen könnte in Nachfolgeprojekten aufgebaut werden und somit eine weitere Verwertung gesichert werden. Außerdem sind eine Reihe wissenschaftlicher Veröffentlichungen entstanden (s. nächster Abschnitt).

Während der Durchführung des Vorhabens sind uns keine Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen bekannt geworden.

## **Veröffentlichungen im Projektzeitraum**

### **Schutzrechtanmeldungen**

Im Berichtszeitraum wurden keine Patente angemeldet.

### **Veröffentlichungen**

#### *Referierte Veröffentlichungen*

- P1 S. Stöckel, S. Meisel, R. Böhme, **M. Elschner**, P. Rösch and J. Popp, "*Effect of supplementary manganese on the sporulation of Bacillus endospores analysed by Raman spectroscopy*", J. Raman Spectrosc. **2009**, 40, 1469-1477.
- P2 S. Stöckel, W. Schumacher, S. Meisel, **M. Elschner**, P. Rösch and J. Popp, "*Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores*", Appl. Environ. Microbiol. **2010**, 76, 2895–2907.
- P3 S. Meisel, S. Stöckel, **M. Elschner**, P. Rösch and J. Popp, "*Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility to Raman spectroscopy*", Analyst **2011**, 136, 4997-5005.
- P4 S. Stöckel, S. Meisel, **M. Elschner**, P. Rösch and J. Popp, "*Raman Spectroscopic Detection of Anthrax Endospores in Powdery Matrices*", Nature Phot., *in Vorbereitung*.
- P5 S. Meisel, S. Stöckel, **M. Elschner**, **F. Melzer**, P. Rösch und J. Popp, „*Fast and reliable identification of Brucella from agar plates and milk by micro-Raman spectroscopy*“, Appl. Environ. Microbiol., *in Vorbereitung*.

### **Konferenzbeiträge**

- P6 S. Stöckel, **M. Elschner**, S. Meisel, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Detection and identification of single endospores of the genus Bacillus by means of micro-Raman spectroscopy. At: BMBF-Workshop “Detektionssysteme für CBRNE-Gefahrstoffe”, Karlsruhe, Germany, **2008**.



- P7 S. Stöckel, **M. Elschner**, S. Meisel, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Detection and identification of single endospores of the genus *Bacillus* by means of micro-Raman spectroscopy. At: XXIth International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS), London, United Kingdom, **2008**.
- P8 S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, **M. Elschner**, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Raman spectroscopic studies on inactivated and milk-extracted microorganisms. At: RKI FT-IR Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, Germany, **2009**.
- P9 S. Stöckel, S. Meisel, W. Schumacher, **M. Elschner**, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Micro-Raman study and identification of inactivated *Bacillus* endospores. At: RKI FT-IR Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, Germany, **2009**.
- P10 S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, **M. Elschner**, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Investigations on single microorganisms extracted from milk by means of micro-Raman Spectroscopy. At: 5th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS), Melbourne, Australia, **2009**.
- P11 S. Stöckel, S. Meisel, W. Schumacher, **M. Elschner**, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Micro-Raman study and identification of *Bacillus* endospores isolated from soil-like matrices. At: 5th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS), Melbourne, Australia, **2009**.
- P12 S. Stöckel, S. Meisel, W. Schumacher, **M. Elschner**, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. Detection and identification of single endospores of the genus *Bacillus* by means of micro-Raman spectroscopy. At: ANAKON, Berlin, Germany, **2009**.
- P13 S. Meisel, S. Stöckel, **M. Elschner**, P. Rösch, and J. Popp. Identification of pathogenic bacteria extracted from milk on single-cell-level by means of micro-Raman spectroscopy. At: XXII. International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS), Boston, USA, **2010**.
- P14 S. Stöckel, S. Meisel, **M. Elschner**, P. Rösch, and J. Popp. Micro-Raman based identification of Anthrax endospores isolated from complex matrices. At: XXII. International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS), Boston, USA, **2010**.
- P15 S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, **M. Elschner**, **F. Melzer**, P. Rösch, and J. Popp. Evaluation of various extraction methods for isolation of bacteria from



- milk and identification by means of Micro-Raman spectroscopy. At: Tagung der DVG-FG Bakteriologie und Mykologie, Jena, Germany, **2010**.
- P16 S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, **M. Elschner**, **F. Melzer**, P. Rösch, and J. Popp. Evaluation of various extraction methods for isolation of bacteria from milk and identification by means of Micro-Raman spectroscopy. At: SPIE Photonics Europe, Brussels, Belgium, **2010**.
- P17 S. Stöckel, S. Meisel, W. Schumacher, **M. Elschner**, P. Rösch, and J. Popp. Micro-Raman study and identification of inactivated anthrax endospores. At: Tagung der DVG-FG Bakteriologie und Mykologie, Jena, Germany, **2010**.
- P18 S. Meisel, S. Stöckel, **M. Elschner**, **F. Melzer**, P. Rösch and J. Popp. Rapid identification of pathogenic milk contamination. At: RKI FT-IR Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, **2011**.
- P19 S. Stöckel, S. Meisel, W. Schumacher, B. Kampe, **M. Elschner**, P. Rösch, and J. Popp. Micro-Raman Spectroscopic Identification of Bacillus anthracis. At: RKI FT-IR Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, Germany, **2011**.
- P20 S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, **M. Elschner**, **F. Melzer**, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. PathoSafe: Mikro-Raman-Spektroskopie zur Detektion bioterroristisch relevanter Erreger. At: Workshop "Sicherheit durch innovative Detektionstechnologien", Berlin, Germany, **2011**.
- P21 **Elschner, M.**, Rösch, P., Meisel, S., Stöckel, S., **Melzer, F.**, Lankers, M., Popp, J. Raman-Spektroskopie in der veterinärmedizinischen Infektionsdiagnostik, DVG Tagung AVID, Staffelstein, Oktober **2011**
- P22 S. Meisel, S. Stöckel, **M. Elschner**, **F. Melzer**, P. Rösch, and J. Popp. Micro-Raman spectroscopy - A promising tool to identify milk-born pathogens. At: Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe, Germany, **2011**.

## Literatur

- L1 Anonymus 2007: Desinfektionsmittelrichtlinie. Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen.(323-3602-19/1, Februar 2007)

- L2 Black, D.G., Taylor, .T.M., Kerr, H.J., Padhi, S., Montville, T.J., Davidson, P.M.  
Decontamination of fluid milk containing Bacillus spores using commercial household products. J Food Prot. 2008 ;71(3):473-8.
- L3 RKI 2007: Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und –verfahren, Stand vom 31.5.2007 (15. Ausgabe)  
Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 10, 2007
- L4 VAH 2006: Liste der von der Desinfektionsmittel-Kommission im Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) e. V. : VAH-Liste, Flächendesinfektion, Internet-Fassung vom 31. Juli 2006 ©mhp-Verlag GmbH, 2006
- L5 WHO 2009: WHO Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals: WHO/EMC/ZDI/98/6:  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax>

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt Frau Katja Fischer und Frau Luise Kaiser, die die Labortätigkeiten Rahmen des Projektes termingemäß in außerordentlich guter Qualität durchgeführt haben.

Außerdem danken wir den Projektpartnern beim IPC in Jena für die sehr konstruktive Zusammenarbeit.

Als Koordinator des Verbundes geht mein Dank an die Projektpartner am IPC, rapID, ZNF und BfR sowie die Unterstützung durch den Projektträger VDI.

15.12.2011

Verfasser des Berichtes:

Dr. Mandy Elschner  
Friedrich-Loeffler-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen  
NRL Rotz und Milzbrand  
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena  
[mandy.elschner@fli.bund.de](mailto:mandy.elschner@fli.bund.de)