

Raman-spektroskopische Detektion von Anthrax-Endosporen in Pulverproben**

S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch und J. Popp*

Gilt es, Mikroorganismen in komplexen Proben wie „weißen Pulvern“, Lebensmitteln oder Erde nachzuweisen, findet häufig die Polymerasekettenreaktion (PCR) Anwendung.^[1] Meistens allerdings verhindern Inhibitoren in den Proben selbst, dass eine direkte Analyse mittels PCR möglich ist.^[2] So ist es oft zwingend erforderlich, zuvor die Bakterienkulturen anzureichern, was sich bei anspruchsvollen Mikroorganismen als sehr zeitaufwändig erweisen kann. Alternativ bietet sich eine Extraktion sämtlicher DNA an, wobei hier die Probenaufarbeitung stark von der Art der Matrix abhängig ist, um reproduzierbare DNA-Ausbeuten zu erzielen.^[2,3]

Verlegt man sich auf die Analyse von intakten Einzelbakterien, so ist eine Anreicherung der Biomasse ebenso wie eine Extraktion bestimmter Zellbestandteile obsolet.^[4] Diesen Vorteil macht sich die Raman-Mikrospektroskopie mit einer Anregung im sichtbaren Spektralbereich zu Eigen. Hierbei wird der gesamte Organismus durch sein Raman-Spektrum charakterisiert, da Informationen aus dem Zytosoma, der Zellmembran und der Oberfläche der Zellen einfließen. Bakterien lassen sich so mittels ihrer spektralen Fingerabdrücke identifizieren, indem diese mit Referenzspektren anderer Bakterien gleicher oder ähnlicher Spezies verglichen werden. So ist die Detektion von Keimen in verschiedenen zivilen und militärischen Feldern möglich, wie beispielsweise die des endosporenbildenden Erregers des Milzbrandes (Anthrax), *Bacillus anthracis*.^[5] Das Aufspüren von *Bacillus*-Endosporen mittels Raman-Spektroskopie in

komplexen Matrices und Briefsendungen wurde bereits in einzelnen Publikationen behandelt, wobei aber ausschließlich das endosporenspezifische Salz Calciumdipicolinat (CaDPA) detektiert wurde.^[6] Dieser Ansatz hat allerdings den inhaltlichen Nachteil, dass nicht-pathogene Bazillen nicht von *B.-anthracis*-Endosporen unterschieden werden können.

Daher wenden wir zum ersten Mal die Raman-Spektroskopie an, um Anthrax-Endosporen in Umweltproben und der gleichzeitigen Gegenwart anderer *Bacillus*-Arten zu detektieren und zu identifizieren. Wir schlagen dafür einen Arbeitsablauf vor, der mit minimalem Zeit- und Materialaufwand bereits drei Stunden nach Probenahme Resultate generiert: Zuerst wird die kontaminierte Probe (ca. 100 mg) eine Stunde mit Formaldehyd behandelt, um mögliche Pathogene zu inaktivieren.^[7] Danach erfolgt die Extraktion der Sporen mittels einer Dichtegradientenzentrifugation innerhalb von 30 Minuten, ehe ein Mikroliter der Endospension auf einem Quarzsubstrat getrocknet und mit einem Raman-Mikrospektrometer (532 nm, 6 s pro Einzelspore) vermessen wird.^[8] Die erhaltenen Raman-Spektren werden zuletzt mit Hilfe chemometrischer Verfahren und spektraler Datenbanken analysiert.

Besonderes Augenmerk gilt pulverförmigen Substanzen, da sie zu den am häufigsten auf *B. anthracis* zu testenden, nicht-klinischen Proben gehören.^[9] Wir wählten ein breites Spektrum an sieben Haushaltspulvern (Backpulver, Gips, Milchpulver, Natron, Schmerztabletten, Vogelsand, Waschmittel) und versetzten diese mit Endosporen zweier *B.-anthracis*-Stämme sowie vier weiterer *Bacillus*-Arten: Die genetisch eng verwandten *B. anthracis*, *B. mycoides* und *B. thuringiensis* gehören dabei zur *Bacillus-Cereus*-Gruppe, welche in PCR-Ansätzen zuweilen verwechselt wurden.^[10] Entferntere Spezies sind die Erdbakterien *B. megaterium* und *B. subtilis*.

Der LD₅₀-Wert von Anthrax-Aerosol gegenüber Menschen wurde nach Experimenten an Javaneraffen auf 8000 bis 50000 koloniebildende Einheiten (KbE) taxiert, was ungefähr 8–50 ng Endosporen entspricht.^[11] Um zu überprüfen, ob die ausgewählte Isolierungstechnik ausreichend empfindlich ist, haben wir definierte Mengen an Sporen in Backpulver- und Vogelsandproben inkuliert. Dazu wurden beide Matrices mit lebenden *B.-thuringiensis*-Endosporen in Konzentrationen von 10⁸, 10⁶, 10⁴ und 10³ KbE pro Gramm Matrix versetzt. Nach dem Extraktionsschritt wurden die isolierten Endosporen ausgezählt (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen): 1–12% der vorgelegten Bakterien wurden zurückgewonnen, was ausreichend für mindestens 100 Sporen pro Probe ist, womit belastbare Resultate in den folgenden Raman-Messungen erzielt werden können. Dazu wurde 1 µL jeder verarbeiteten Probe Raman-mikrospektroskopisch auf

[*] S. Stöckel, S. Meisel, Dr. P. Rösch, Prof. Dr. J. Popp

Institut für Physikalische Chemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Helmholtzweg 4, 07743 Jena (Deutschland)
E-Mail: juergen.popp@uni-jena.de

Prof. Dr. J. Popp
Institut für Photonische Technologien
Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena (Deutschland)

Dr. M. Elschner
Friedrich Loeffler Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Naumburger Straße 96a, 07743 Jena (Deutschland)

[**] Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Deutschland) für die Förderung der Forschungsprojekte „Pathosafe“ (FKZ 13N9547 und FKZ 13N9549) und „RamaDek“ (FKZ 13N11168), der Thüringischen Exzellenzinitiative (TMBWK) für die Förderung des „MikroPlex“-Projekts (PE113-1) und der EU (EAHC Agreement – No 2007 204).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201201266> zu finden.

 Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.

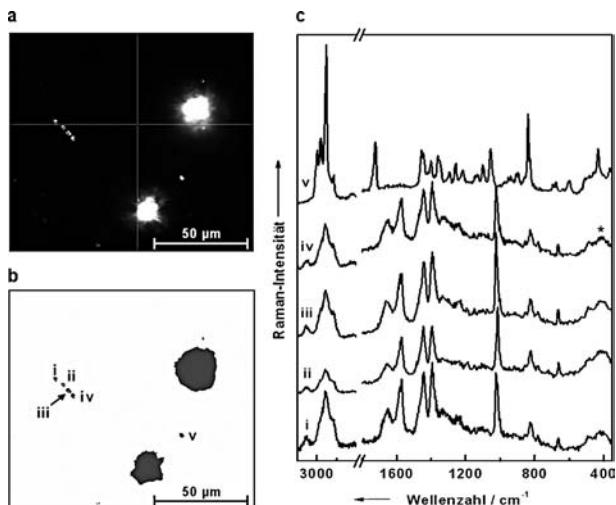


Abbildung 1. Partikelanalyse einer mit *B. anthracis* Sterne versetzten Backpulverprobe. a) Sichtfeld unter Dunkelfeldbeleuchtung. b) Im Binärbild erfüllen fünf Partikel (i–v) die morphologischen Kriterien einer Bakterienzelle. c) Unbearbeitete Raman-Spektren der Partikel i–v. Das Sternchen markiert eine Bande des Quarzglassubstrats.

Einzelzellebene analysiert, wie es in Abbildung 1 anhand einer mit *B. anthracis* Sterne versetzten Backpulverprobe demonstriert wird. Das Sichtfeld unter Dunkelfeldbeleuchtung wurde zur Erfassung und Beurteilung der Partikel hinsichtlich ihrer Morphologie binärisiert. Die fünf in Abbildung 1b markierten Teilchen wurden dann gemessen und ergaben die unbearbeiteten Raman-Spektren in Abbildung 1c (i–iv: Endosporen, v: Polyhydroxybutyrat, ein bakterieller Speicherstoff). Derart wurden ungefähr 50 Partikel pro Probe mit einer Integrationszeit von jeweils 5 s plus 1 s Vorbrennzeit vermessen. Letztere wurde appliziert, um mögliche, allenfalls geringe Beiträge durch Fluoreszenz zu minimieren.

Abbildung 2a präsentiert Mittelwertspektren einer jeden analysierten *Bacillus*-Art. Hervorstechende Merkmale sind die vom endosporenspezifischen Salz CaDPA hervorgerufenen Signale bei 657, 1013 und 1397 cm⁻¹. Andere spektrale Beiträge entstammen von Proteinen bei 1001 cm⁻¹ (Ringatmungsschwingung von Phenylalanin) oder 1659 cm⁻¹ (Amid I) ergänzt durch Signale von Nukleinsäuren wie 781 cm⁻¹ (Ringschwingung von Cytosin/Uracil). Andere Banden hingegen ergeben sich durch Überlagerungen von Signalen unterschiedlicher Biomoleküle mit CaDPA-Banden, etwa bei 821 cm⁻¹ die Ringatmungsschwingung von Tyrosin mit der CaDPA-Carboxylat-Streckschwingung; oder aber bei 1450 cm⁻¹ die CH₂/CH₃-Deformationsmoden von Proteinen und Lipiden sowie bei 1578 cm⁻¹ die Ringschwingungen von Guanin und Adenin mit den Pyridinringschwingungen des CaDPA. Das intensive Signal bei 2939 cm⁻¹ ist den (as)symmetrischen CH-Streckschwingungen von überwiegend Proteinen und Fetten zuzuordnen.^[12]

Sind in bestimmten Proben nur wenige Bakterien präsent, so ist eine ungewollte Messung biotischer und abiotischer Matrixpartikel mit Endosporenmorphologie unvermeidbar. Diese Spektren können sich negativ auf die statistische Auswertung auswirken, da unmöglich von jedem Matrixmaterial

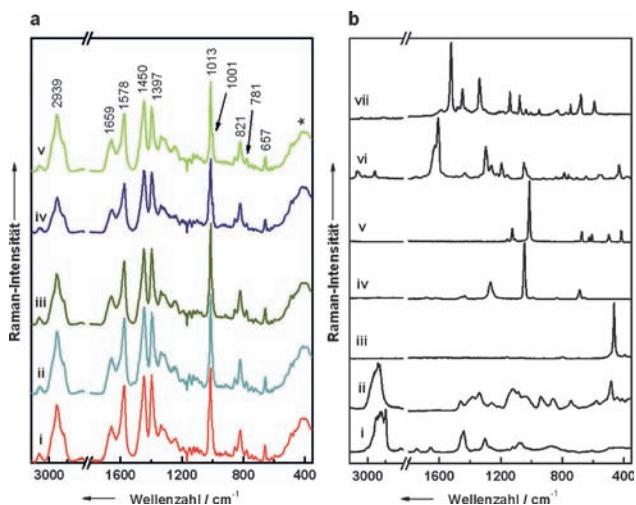


Abbildung 2. Raman-Spektren von *Bacillus*-Endosporen und verschiedener Matrixpartikel. a) Hintergrundkorrigierte Mittelwert-Raman-Spektren von *B. anthracis* (i, berechnet aus 997 Einzelsporen-Spektren), *B. megaterium* (ii, 1420 Spektren), *B. mycoides* (iii, 1142 Spektren), *B. subtilis* (iv, 1217 Spektren) und *B. thuringiensis* (v, 947 Spektren). Das Sternchen markiert eine Bande des Quarzglassubstrats. b) Raman-Spektren von Teilchen aus Milchpulver (i, Milchfett), Backpulver (ii, Stärke), Vogelsand (iii, Quarz), Natron (iv, Natriumhydrogencarbonat), Gips (v, Calciumsulfat-Dihydrat), Schmerztabletten (vi, Acetylsalicylsäure) und Waschpulver (vii, Kupferphthalocyanin). Die Spektren wurden zur besseren Übersicht skaliert und vertikal verschoben angeordnet.

ein Referenzspektrum in der Datenbank hinterlegt sein kann. Abbildung 2b repräsentiert eine Auswahl an Raman-Spektren von Matrixpartikeln, die während der Messungen registriert worden sind. Deutlich sichtbar sind die Unterschiede zwischen den Spektren untereinander, aber auch verglichen mit denen der Endosporen in Abbildung 2a, was ein frühzeitiges Aussortieren dieser Spektren leicht ermöglicht.

Eine geeignete Datenauswertung nach Inaktivierung und Isolierung stellt den letzten Schritt des hier vorgestellten Konzeptes dar. Als Auswertealgorithmus wählten wir eine lineare Diskriminanzanalyse (LDA) aus, welche kürzlich zur Diskriminierung von Bakterien und anorganischen Teilchen anhand ihrer Raman-Spektren herangezogen wurde.^[13] Um das gegebene Problem zu lösen, muss der Klassifizierer so trainiert werden, dass er zwischen den Spektren der fünf *Bacillus*-Arten unterscheiden kann. Dazu wurden Endosporenspektren bekannten Ursprungs mit dem Algorithmus so ausgewertet, dass Diskriminanzfunktionen berechnet werden konnten, die eine maximale Unterscheidbarkeit zwischen den fünf Klassen abbilden. Diese Spektren wurden wie folgt erstellt: Von jeder nicht-pathogenen *Bacillus*-Art wurden mindestens 10 unabhängig kultivierte Batches präpariert und entweder direkt aus dem Kultivierungsmedium entnommen oder für wenigstens 24 h in die verschiedenen Pulver inokuliert (*B. anthracis* nur Backpulver- und Vogelsandproben), danach inaktiviert, isoliert und schließlich jede Spezies-Matrix-Kombination zweimal Raman-spektroskopisch analysiert und chemometrisch ausgewertet. Dadurch entstand ein LDA-Modell mit insgesamt 5723 Raman-Spektren (Tabelle S2a). Eine deutliche Partitionierung der Daten durch drei

der vier Diskriminanzfunktionen zeigt Abbildung S1 auf. Zudem ergab eine Kreuzvalidierung der Daten eine Klassifizierungsgenauigkeit von 94.8% (5427 Spektren wurden der korrekten Spezies zugeordnet, Tabelle S3). Die Mehrzahl der Falsch-Positiven trat zwischen *B. mycoides* und *B. thuringiensis* auf, ebenso die meisten der falsch zugeordneten *B.-anthracis*-Spektren. Offensichtlich ähneln sich die Spektren der *Bacillus-Cereus*-Gruppe stärker als die der anderen Arten.

Um den Fall zu simulieren, dass es unbekannte Umweltproben zu analysieren gilt, wurden weitere gespikte Proben mit neuen Batches der fünf *Bacillus*-Arten angefertigt. Dadurch kann gleichsam die Neigung des erstellten Modells zur Überanpassung geprüft werden. Wenn das Modell zu spezifisch an den Trainingsdatensatz angepasst wurde, kann es nur unzureichend neue Daten beurteilen. Ein Identifizierungsversuch des neuen Satz an 1650 Spektren „unbekannter Identität“ (Tabelle S2b) mittels des zuvor erstellten LDA-Modells resultierte in dem in Abbildung 3a dargestellten

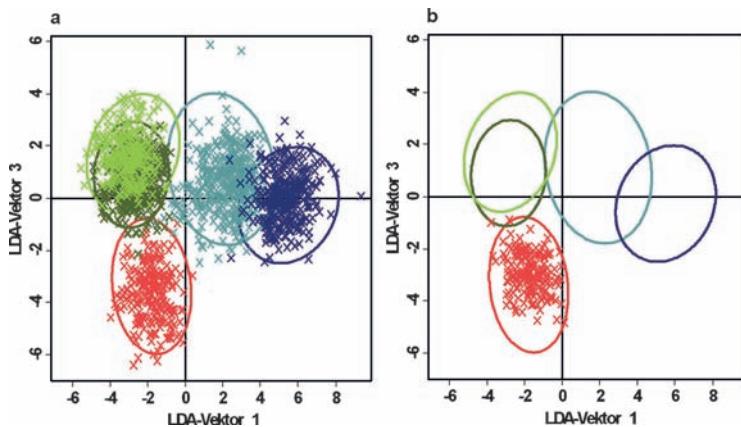


Abbildung 3. LDA-Score-Plot der Validierungsdaten. Die Ellipsen bilden das Konfidenzintervall (zweifache Standardabweichung) jeder Klasse ab. a) *B. anthracis* (rot), *B. megaterium* (cyan), *B. mycoides* (olivgrün), *B. subtilis* (blau) und *B. thuringiensis* (hellgrün). b) Die roten Kreuze stellen 191 Spektren von *B. anthracis*-367-Endosporen dar, die aus einer dem Modell unbekannten Matrix (Kochsalz) isoliert wurden.

Resultat: Nach Projektion der Spektren auf zwei der LD-Achsen bilden sich klar abgegrenzte Punktwolken pro Spezies, welche zudem mehrheitlich im LDA-Modell-Vertrauensintervall der jeweiligen Spezies (doppelte Standardabweichung, dargestellt als Ellipsen) liegen. Tabelle 1 gibt die Identifizierungsgenauigkeiten pro Spezies wieder; 96.8% der Spektren wurden korrekt zugeordnet. Die höchsten bzw. niedrigsten Raten liegen bei *B. subtilis* (100%) und *B. thuringiensis* (91.2%) vor – bei *B. anthracis* wurde eine Empfindlichkeit von 99.6% erreicht. Auch befanden sich sämtliche Fehlzuordnungen von *B. anthracis*, *B. mycoides* und *B. thuringiensis* genau in diesen drei Klassen. Es ist damit festzuhalten, dass die Genauigkeiten dieses Validierungsperiments denen des LDA-Modells entsprechen, was für alle hier untersuchten Probentypen gilt, da offensichtlich keine der Matrices merklich Einfluss auf die Endosporen-Spektren nimmt.

Tabelle 1: Ergebnisse des Validierungsexperiments mit einem unabhängigen Datensatz.^[a]

Identifiziert als ^[b]	Bant	Bmeg	Bmyc	Bsub	Bthu	Bant [C]
Bant	241	4	3	0	0	183
Bmeg	0	374	0	0	0	0
Bmyc	0	0	382	0	26	8
Bsub	0	0	0	331	0	0
Bthu	1	2	17	0	269	0
Sens. [%]	99.6	98.4	95.0	100	91.2	95.8

[a] Angegeben sind die Empfindlichkeiten pro Art (Sens.). Die Gesamtgenauigkeit betrug 96.8%. Die letzte Spalte gibt die Einordnung der Endosporen aus Kochsalz [C] an. [b] Bant = *B. anthracis*, Bmeg = *B. megaterium*, Bmyc = *B. mycoides*, Bsub = *B. subtilis*, Bthu = *B. thuringiensis*.

Wie aber kann das Modell eine Probe bisher unbekannter Matrix verarbeiten? Dafür wurden *B.-anthracis*-Endosporen in Kochsalz eingebracht und wie oben beschrieben verarbeitet. 191 Spektren konnten gemessen und mit dem LDA-Modell ausgewertet werden. Wie in Abbildung 3b ersichtlich, finden sich fast alle (183/191, 95.8%, Tabelle 1) Spektren in dem Raum wieder, der von den *B.-anthracis*-Modelldaten zuvor aufgespannt worden ist. Sämtliche Fehlzuordnungen sind bei *B. mycoides* zu finden. Aber es ist offensichtlich, dass zufriedenstellende Identifizierungsraten selbst dann erreicht werden können, wenn der Probentyp nicht zuvor im LDA-Modell integriert worden ist.

Die geringe Anfälligkeit der Methode gegenüber etwaigen Matrixeinflüssen ist bei nukleinsäurebasierten Detektionsmethoden wie der PCR nicht gegeben, welche vergleichsweise reine Proben benötigen. Ausgehend von vorkultivierten Organismen sind so sehr gute Ergebnisse durch die PCR zu erzielen, aber ein Einsatz der Methode zur Echtzeitdetektion von Pathogenen in Umweltproben zeigte aufgrund einer Vielzahl möglicher Störsubstanzen bisher kaum Erfolge. Deshalb denken wir, dass der hier vorgestellte schwingungsspektroskopische Ansatz diese Unzulänglichkeiten der PCR gut kompensieren kann. Eine hohe Robustheit gegenüber Matrixeinflüssen sowie schnelle, sichere Ergebnisse nach drei Stunden machen eine Point-of-Care-Diagnostik von *B. anthracis* in Umweltproben möglich.

Experimentelles

Details der Methoden sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Sämtliche Endosporen wurden durch einstündige Behandlung mit 20%iger Formaldehyd-Lösung inaktiviert. Zur Isolation wurde als Dichtegradientenmedium eine Lösung Polyvinylpyrrolidon-beschichteter Silicagelpartikel in 0.15M NaCl-Lösung verwendet. Eine Zellzahlbestimmung nach der Isolierung erfolgte über Ausplattierung und Koloniezählung. Raman-Spektren wurden unter Standardbedingungen mit 532-nm-Anregung mittels eines Raman-Mikrospektrometers aufgenommen, wobei die Proben auf Quarzglas mit 7 mW (ca. 1 μm Laserspot) 6 s lang bestrahlt wurden (1 s „Vor-

brennen“ und 5 s Integrationszeit). Alle chemometrischen Berechnungen wurden mit Gnu R ausgeführt.

Eingegangen am 15. Februar 2012
Online veröffentlicht am 13. April 2012

Stichwörter: Analytische Methoden · Anthrax · Endosporen · Raman-Spektroskopie

- [1] L. Settanni, A. Corsetti, *J. Microbiol. Methods* **2007**, *69*, 1–22.
- [2] H. L. Rose, C. A. Dewey, M. S. Ely, S. L. Willoughby, T. M. Parsons, V. Cox, P. M. Spencer, S. A. Weller, *PLoS One* **2011**, *6*, 8.
- [3] P. R. Wielinga, L. de Heer, A. de Groot, R. A. Hamidjaja, G. Bruggeman, K. Jordan, B. J. van Rotterdam, *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *150*, 122–127.
- [4] M. Harz, P. Rösch, J. Popp, *Cytom. Part A* **2009**, *75A*, 104–113.
- [5] K. S. Kalasinsky, T. Hadfield, A. A. Shea, V. F. Kalasinsky, M. P. Nelson, J. Neiss, A. J. Drauch, G. S. Vanni, P. J. Treado, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2658–2673.
- [6] S. Farquharson, G. Lawrence, K. Victor, S. Wayne, F. S. Jay, F. Gerard, *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 82–86.
- [7] S. Stöckel, W. Schumacher, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2895–2907.
- [8] S. Meisel, S. Stöckel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, *Analyst* **2011**, *136*, 4997–5005.
- [9] A. Luna Vicki, D. King, C. Davis, T. Rycerz, M. Ewert, A. Cannons, P. Amuso, J. Cattani, *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 1252–1255.
- [10] E. Helgason, O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, A.-B. Kolsto, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2627–2630.
- [11] C. J. Peters, D. M. Hartley, *Lancet* **2002**, *359*, 710–711.
- [12] a) J. De Gelder, P. Scheldeman, K. Leus, M. Heyndrickx, P. Vandenabeele, L. Moens, P. De Vos, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 2143–2151; b) K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, G. J. Puppels, *J. Microbiol. Methods* **2002**, *51*, 255–271.
- [13] a) W. Schumacher, M. Kühnert, P. Rösch, J. Popp, *J. Raman Spectrosc.* **2011**, *42*, 383–392; b) R. Fisher, *Ann. Eugen.* **1936**, *7*, 179–188.