

Schlussbericht

Projekt

„Vergleichsuntersuchung zur Botulismusdiagnostik in Deutschland“

Förderkennzeichen: 2807HS032;

Aktenzeichen: 514-06.01-2807HS032,

Projektdauer:

01.03.2008 -28.02.2010 (2 Jahre)

Verlängert bis 31.08.11

Kontakt Daten des Antragstellers:

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI)

Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen

Naumburger Str. 96a

07743 Jena

Ansprechpartner:

Dr. Christian Seyboldt

Tel. 03641 804-295, FAX 03641 804-228

E-Mail: christian.seyboldt@fli.bund.de

Teilnehmende Laboreinrichtungen:

Miprolab GmbH
Kellnerweg 6
D-37077 Göttingen
gessler@miprolab.com
Ansprechpartner:
Dr. Frank Gessler

Ripac-Labor GmbH
Am Mühlenberg 11
14476 Potsdam-Golm
info(@)ripac-labor.de
Ansprechpartner:
Dr. habil. Bernd Köhler

Landeslabor Berlin-Brandenburg
FbL III-4/Infektionsdiagnostik
Invalidenstrasse 60
D-10557 Berlin
Ansprechpartner:
Dr. Ulrich Wittstatt

Institut für Bakteriologie und Mykologie
An den Tierkliniken 29
D-04103 Leipzig
Ansprechpartner:
Prof. Dr. Monika Krüger

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Botulismus ist eine Erkrankung die durch Neurotoxine von *Clostridium (C.) botulinum* verursacht wird und von einer schlaffen Lähmung der Muskulatur gekennzeichnet ist. Neben der durch die Intoxikation mit belasteten Futtermittel verursachten Erkrankungen von Haustieren durch *C. botulinum*-Toxine wird insbesondere bei Rindern auch eine weitere Form des Botulismus diskutiert. Diese als „viszeraler Botulismus“ bezeichnete Form der Erkrankung soll durch die Besiedelung von unteren Darmabschnitten mit *C. botulinum* und dort stattfindender Toxinbildung ausgelöst werden. Durch kontinuierliche Toxinresorption in geringen Mengen soll sich das Krankheitsbild eines chronischen Botulismus ausprägen können, das vor allem durch unspezifische Symptome und Leistungseinbußen gekennzeichnet ist. Als Ursache des Symptomkomplexes wird eine „Dysbiose“ (Fehlbesiedelung mit Fremdkeimen) im Verdauungstrakt mit Vermehrung und Toxinbildung von *C. botulinum* im Rahmen einer multifaktoriellen Erkrankung vermutet. Dieses Geschehen und das daraus abgeleitete Krankheitsbild wurde als „viszeraler Botulismus“ vorgestellt. Dieses „Krankheitsbild“ und seine Entstehung werden sehr kontrovers diskutiert. Bundesweit führen nur wenige Laboratorien die veterinärmedizinische Botulismus-Diagnostik durch, was die Situation kompliziert. Bisherige Untersuchungsergebnisse der Laboratorien wiesen Divergenzen auf, die die kontroverse Diskussion verstärkten.

Eine zuverlässige Diagnostik des Botulismus in Hinblick auf den Nachweis von *C. botulinum*-Neurotoxin und *C. botulinum*-Sporen oder lebenden Bakterien ist die Grundvoraussetzung für eine sachliche, fundierte Diskussion. Aus diesem Grund führte das Friedrich-Loeffler-Institut im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) diese Vergleichsuntersuchung zur Botulismusdiagnostik in Deutschland durch, an der verschiedene Laboreinrichtungen beteiligt waren. Das Ziel dieser Vergleichsuntersuchung ist eine Standardisierung und Qualitätssicherung in der Botulismusdiagnostik.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Durch die Laborvergleichsuntersuchung soll die Standardisierung, Harmonisierung und die Qualitätssicherung der Botulismusdiagnostik vorangetrieben werden. Um dieses Ziel zu erreichen sollte die geplante Laborvergleichsuntersuchung aus zwei thematischen Teilen bestehen. Im ersten Teil der Laborvergleichsuntersuchung wurden durch das FLI dotierte Proben hergestellt und an die teilnehmenden Laboratorien versendet. Die dotierten Proben wurden durch die Laboratorien und das FLI untersucht, die erhaltenen Ergebnisse anschließend ausgewertet. Thematisch wurden die Fragestellungen Neurotoxin-Nachweis und Nachweis von *C. botulinum* bearbeitet. Relevante Toxintypen und die Matrices Kot und Futtermittel wurden berücksichtigt und in die Vergleichsuntersuchung eingeschlossen. Der geplante Umfang umfasste die Untersuchung von insgesamt ca. 100 Proben auf *C. botulinum* Neurotoxin und *C. botulinum* (vegetative Keime und Sporen) durch die beteiligten Untersuchungseinrichtungen. Die Laborvergleichsuntersuchung mit dotierten Proben wurde in diesem Umfang durchgeführt, um die Kompetenz der Laboratorien auf dem Gebiet der Botulismusdiagnostik mittels Maus-Bioassay einschätzen zu können.

Im zweiten Teil der Laborvergleichsuntersuchung sollten ca. 50 Feldproben gesammelt und von den teilnehmenden Laboratorien untersucht, sowie die Ergebnisse anschließend ausgewertet werden. Die Sammlung von Feldproben erfolgte von Betrieben mit dem klinischen Verdacht auf Botulismus bzw. „viszeralem Botulismus“, es sollten Proben aus bis zu 100 Beständen mit Verdacht auf Botulinumintoxikation gesammelt werden. Der Probenversand sollte durch die Veterinärämter an das FLI Jena erfolgen. Diese Proben wurden im FLI portioniert, gelagert (-20°C) und sollten zu einem späteren Zeitpunkt für die Laborvergleichsuntersuchung verwendet werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Botulinumtoxine sind sehr potente Neurotoxine und gelten als die toxischsten bekannten Substanzen. Die letale Dosis für Mäuse beträgt 0,3 ng/kg während die Angaben für die orale letale Dosis des Menschen von ca. 100 ng/kg bis 2 µg/kg schwanken (Gill, 1982; Johnson und Bradshaw, 2001; Sharma und Whiting, 2005). Die sieben bekannten Serotypen (A bis G) des Botulinum Neurotoxins (BoNT) werden von verschiedenen Stämmen von *Clostridium (C.) botulinum* gebildet und verursachen muskuläre Paralysen durch Blockade der Acetylcholinausschüttung an den neuromuskulären Synapsen (Hatheway, 1990). Aufgrund der komplexen Natur ihrer Toxizität war und ist die Detektion der Neurotoxine von *C. botulinum* eine große Herausforderung. Bisher ist BoNT das einzige bekannte bakterielle

Toxin, das von nichttoxischen Begleitproteinen vor Umwelteinflüssen geschützt wird (Sharma und Whiting, 2005).

Das durch *C. botulinum* verursachte Krankheitsbild wird als Botulismus bezeichnet und stellt eine klassische Intoxikation dar, bei der das präformierte BoNT mit dem Lebensmittel aufgenommen wird. Botulismus ist als Erkrankung seit Jahrhunderten bekannt (Hatheway, 1990) und wurde meist nach dem Genuss verdorbener Wurstwaren (botulus: lat. = Wurst) beobachtet. Die bakterielle und toxische Genese der Erkrankung wurde im Jahr 1897 durch van Ermengem erstmals beschrieben, der den isolierten toxischen Organismus *Bacillus botulinus* benannte (van Ermengem, 1897). In den darauf folgenden Jahren konnten eine Reihe verschiedener Bacillen aus Botulismusfällen von Menschen, Säugetieren und Geflügel isoliert werden, deren Toxine sich serologisch unterscheiden ließen. Zusätzlich fanden sich signifikante kulturelle und physiologische Unterschiede zwischen den toxischen Stämmen, die aus den verschiedenen Quellen isoliert wurden. Bis 1970 waren sieben serologisch unterscheidbare Toxintypen und vier physiologisch verschiedene toxinbildende Gruppen (I, II, III, IV) von *C. botulinum* beschrieben (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990; Johnson und Bradshaw 2001).

Bei Erkrankungen des Menschen spielen vor allen die proteolytischen Stämme der Toxin-Typen A, B und F der Gruppe I, sowie die nicht proteolytischen Stämme der Toxin-Typen B, E und F der Gruppe II eine wichtige Rolle (Hatheway, 1988; Sharma und Whiting, 2005). Die Typen C und D der Gruppe III spielen eine wichtige Rolle beim Botulismus von Wasser- und Hausgeflügel (Typ C) sowie weiteren (Haus-)Säugetieren (Typ D und C) (Rings, 2004; Smart et al., 1987). *Clostridium botulinum* Typ G repräsentiert die Gruppe IV, weitere neurotoxinbildende Clostridien sind einzelne Isolate von *C. barati* (Typ F) und *C. butyricum* (Typ E). Das von *C. tetani* gebildete Neurotoxin weist eine enge strukturelle Verwandtschaft zu BoNT auf, entfaltet seine Wirkung jedoch in anderen Zielzellen (Hatheway, 1990).

Neben der Intoxikation durch Lebensmittel sind beim Menschen noch weitere Formen des Botulismus bekannt. Am bedeutendsten ist hier der so genannte Säuglingsbotulismus; hierbei kommt es zu einer Kolonisierung des Darms von Säuglingen bis zu einem Jahr mit *C. botulinum*, zur kontinuierlichen Toxinproduktion und nachfolgender Resorption. Das klinische Bild manifestiert sich in einer ausgeprägten Muskelschwäche (Schlaffheit und Atemschwäche) der betroffenen Säuglinge; die Therapie erfolgt symptomatisch. Ursache für diese so genannte „Toxikation“ oder „Toxoinfektion“ ist die noch nicht ausgebildete Darmflora im Säuglingsalter, wodurch die Kolonisierung mit *C. botulinum* begünstigt werden kann (Hatheway 1988). Bei der Aufnahme von Sporen von *C. botulinum* spielt möglicherweise Honig eine Rolle.

Neben den alimentären Erkrankungen von Haustieren durch *C. botulinum*-Toxine werden insbesondere bei Rindern und Pferden auch weitere Formen des Botulismus diskutiert.

Analog zur Pathogenese beim Säuglingsbotulismus soll eine Besiedelung von unteren Darmabschnitten mit *C. botulinum* beim Rind möglich sein. Durch kontinuierliche Toxinresorption in geringen Mengen soll sich das Krankheitsbild eines chronischen Botulismus ausprägen, das vor allem durch unspezifische Symptome und Leistungseinbußen gekennzeichnet ist. Ursache des Symptomkomplexes soll eine Dysbiose im Verdauungstrakt mit Vermehrung und Toxinbildung von *C. botulinum* im Rahmen einer multifaktoriellen Erkrankung sein. Dieses postulierte Krankheitsbild wird als viszeraler Botulismus bezeichnet (Böhnel et al., 2001). Eine Beteiligung von *C. botulinum* an der equinen Dystonie (Equine Grass Sickness) wird von manchen Autoren vermutet (Newton et al., 2004).

Die Diagnose von Botulismus ist sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin schwierig und stützt sich vorwiegend auf das klinische Bild und den Ausschluss der in Frage kommenden Differentialdiagnosen. Da schon geringste Mengen von BoNT zu schweren Erkrankungen führen können, ist es oft schwierig den Toxinnachweis im Lebens- oder Futtermittel zu führen, vor allem wenn das Toxin nicht gleichmäßig im Futter verteilt ist. Der Toxinnachweis im Serum, Organen oder Darminhalt von Patienten gelingt ebenfalls nicht immer. Der Nachweis von *C. botulinum* in der Umgebung oder Organen bzw. im Darminhalt gilt aufgrund der weiten Verbreitung nicht als beweisend für die kausale Ursache der Erkrankung (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990; Sharma und Whiting, 2005).

Nach wie vor ist der „Mäuseversuch“ die empfindlichste und zuverlässigste Nachweismethode für biologisch aktives BoNT und wird weltweit als Standardmethode zum Toxinnachweis angesehen (Sharma und Whiting, 2005; Parpura und Chapman, 2005; Wictome und Shone, 1998). Alternative Nachweismethoden wie chromatographische, immunologische und molekularbiologische Nachweismethoden erreichen meist nicht die Sensitivität des Maus-Bioassays und weisen auch nicht die biologische Aktivität der BoNT nach. Dennoch können sie eine wertvolle Ergänzung der Diagnostik des Botulismus darstellen.

Aktuell wird die Diagnostik des Botulismus durch mehrere Faktoren erschwert: Für die Standardmethode des Toxinnachweises im Maus-Bioassay erhalten die Versuchstiere zunächst eine intraperitoneale Injektion der bakterienfrei zentrifugierten bzw. sterilfiltrierten mit einem Puffer versetzten, verdächtigen Substanz. Zeigen die Versuchstiere die spezifischen Symptome (Wespentaille, erschwerte Atmung, Paralyse) oder verenden innerhalb von 4 Tagen, so wird durch weitere Tierversuche die Bestimmung des Toxintyps versucht. Dazu wird die aufbereitete Probe zusammen mit einem neutralisierendem Antiserum verabreicht. Überleben die Mäuse, die ein typspezifisches Antiserum erhalten

haben (A bis G, es sind auch trivalente Antiseren möglich), so gilt der entsprechende Toxintyp als nachgewiesen (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990).

Beim indirekten Toxinnachweis wird verdächtiges, möglicherweise sporenhaltiges Material in geeignetem Medium unter anaeroben Bedingungen mehrere Tage bebrütet und anschließend der sterilfiltrierte Kulturüberstand auf seine Toxizität im Maus-Bioassay untersucht. Es ist jedoch zu bedenken, dass durch diese Untersuchung nicht ein kausaler Toxinnachweis erfolgt, sondern dass das Toxinbildungsvermögen der Probe d.h. die Anwesenheit von Sporen oder vegetativen Keimen von *C. botulinum* im Probenmaterial nachgewiesen wird. Aus diesen Inkubationsansätzen kann auch die Erregerisolation versucht werden, die zwar selten gelingt aber einen weiteren diagnostischen Baustein darstellt (Hatheway, 1988; CDC, 1998).

Die diagnostischen Möglichkeiten zur Feststellung des Botulismus weisen derzeit deutliche Mängel auf. Problematisch ist insbesondere die „Standarddiagnostik“ mittels des Maus-Bioassays. Aufgrund des hohen Aufwandes und der Notwendigkeit Tierversuche durchzuführen, wird der Maus-Bioassay nur noch in wenigen Einrichtungen überhaupt durchgeführt. Alternative Nachweismethoden wie PCR-Verfahren müssen in ihrer Aussage vorsichtig bewertet werden, da weder das Toxin selbst, noch dessen Bildung nachgewiesen wird. PCR-Verfahren bieten sich jedoch für die Typisierung von BoNT und zur Untersuchung des Vorkommens von *C. botulinum* in der Umwelt an. Immunologische Nachweisverfahren wie ELISAs erreichen zwar nicht die Sensitivität des Maus-Bioassays, sind aber vergleichsweise schnell und einfach durchzuführen. Nachteil ist hier der mögliche Nachweis von inaktiviertem Toxin, sowie Sensitivitätsverlust beim Nachweis von BoNT aus komplexem Probenmaterial wie z. B. bei verschiedenen Futter- und Lebensmitteln oder Organ- und Umweltproben.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung von dotierten Proben

Die Arbeiten zur Herstellung der dotierten Proben erwiesen sich schwieriger als geplant, so gelang es bei einigen *Clostridium botulinum* Neurotoxin (BoNT) Serotypen erst nach langwierigen Versuchen ausreichend toxinhaltige Kulturüberstände zu gewinnen. Zusätzlich ergaben sich Schwierigkeiten bei der Herstellung toxinfreier Bakterien-/Sporen-Präparationen. Es gelang in der Projektlaufzeit nicht ausreichende Sporenmengen von *C. botulinum* Typ E herzustellen. Insgesamt führten diese Schwierigkeiten zu einem erhöhten Zeitbedarf für die Herstellung der dotierten Proben. Es wurden umfangreiche Vorversuche

zur Dotierung der Probenmaterialien Kot und Silage durchgeführt und darauf folgend ein Verfahren festgelegt, bei dem die Proben jeweils einzeln hergestellt wurden.

Dabei wurde die jeweilige Probenmatrix Kot oder Silage in einem Beutel mit dem toxinhaltigen Kulturüberstand oder einer Suspension von Bakterienzellen in der jeweiligen Verdünnung in einem Beutelwalkmischgerät vermischt. Von jeder Probenart wurden 8 bis 10 gleichartige Proben (jeweils 40g bzw. 40 ml) hergestellt. Zur besseren Weiterverarbeitung und Handhabung wurde bei der jeweiligen Probenmatrix Kot oder Futtermittel jeweils 20 g Probenmaterial mit 20 ml Gelatine-Phosphat-Pufferlösung, die das Toxin (Kulturüberstand) bzw. die Bakteriensuspension beinhaltete, vermischt. Durch diese Vorverdünnung wurde auch die weitere Probenverarbeitung (Toxinextraktion und Sterilfiltration des Extraktes) ermöglicht bzw. erleichtert.

2.1.1. Herstellung von dotierten Proben mit BoNT haltigem Kulturüberstand.

Clostridium botulinum neurotoxinhaltiger Kulturüberstand verschiedener Toxintypen wurde jeweils in einem entsprechenden Nährmedium produziert und die Toxizität im Maus-Bioassay näherungsweise bestimmt. Die Endkonzentrationen des jeweiligen Toxintyps in den dotierten Proben wurde in der Konzentrations-Abstufung >10 MLD, >100 MLD, > 1000 MLD pro Gramm bzw. Milliliter Probenmaterial gewählt. Ausnahmen bildeten die Proben Rinderkot mit BoNT A und BoNT D, hier wurden höhere Toxinkonzentrationen eingesetzt. Insgesamt wurden dotierte Proben mit neurotoxinhaltigen Kulturüberständen von 6 unterschiedlichen BoNT Serotypen hergestellt, 18 Proben der Matrix Rinderkot und 18 Proben der Matrix Silage.

2.1.2. Herstellung von dotierten Proben mit *Clostridium botulinum* Sporen

Zum Beginn der Probenherstellung konnte für einen Serotyp (D) eine hohe „Rest-Toxizität“ einer mehrmals gewaschenen Bakteriensuspension festgestellt werden. Daraufhin wurde versucht *C. botulinum* Bakterien und Sporen nicht aus Flüssigkulturen zu gewinnen, sondern auf Festnährböden entsprechende Bakterien und Sporenzahlen zu erhalten. Diese Ansätze verliefen bei 5 der 6 zu untersuchenden Serotypen erfolgreich. Um an den Bakterien oder Sporen anhaftendes BoNT zu inaktivieren wurden die Präparationen für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt, bei diesem Schritt werden auch vegetative *C. botulinum* abgetötet. Insgesamt wurden 12 dotierte Proben mit 5 Serotypen in der Matrix Rinderkot hergestellt sowie 12 dotierte Proben mit 5 Serotypen in der Matrix Silage produziert.

2.2. Probenlagerung und Versand

Unmittelbar nach der Herstellung wurden die Proben kodiert und anschließend bis zum Versand oder der Untersuchung durch das FLI bei -20°C gelagert. Für den Versand wurden

die Proben entsprechend der geltenden Regularien verpackt und mit tiefgekühlten Thermoelementen in einer Styroporversandbox verpackt. Der Versand an die teilnehmenden Laboratorien erfolgte zu Beginn der Vergleichsuntersuchung durch einen Transportdienstleister und später durch institutseigenen Gefahrguttransport. Die Proben erreichten die Laboratorien so innerhalb von 12 Stunden.

2.3. Untersuchung der Proben durch das FLI

Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert, entsprechend der Untersuchungskapazitäten des FLI aufgetaut und untersucht. Das Untersuchungsziel war der Nachweis von Botulinum Neurotoxin (BoNT) und der Nachweis von *C. botulinum* (Sporen oder vegetative Zellen). Die Untersuchung auf BoNT erfolgte mittels des Maus-Bioassays in Anlehnung an die DIN 10102 von Juni 1988 bzw. Methode L 06.00-26 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch). Die Untersuchungen zum Nachweis von *C. botulinum* orientierten sich ebenfalls an der oben genannten DIN, beinhaltete jedoch einige Modifikationen: Als Anzuchtmedien wurde RCM-Bouillon (RCM) und Modifiziertes Kochfleisch-Medium (MCM) verwendet, die Inkubation (ca. 1g Probenmaterial in 10 ml Flüssigmedium) erfolgte unter anaeroben Bedingungen für 5 bis 7 Tage bei 30°C. Pro Medium wurden 2 Inkubationsansätze hergestellt: Ein Ansatz wurde zum Zweck der Sporenselktion für 10 Minuten auf 75°C im Wasserbad erhitzt, der zweite Ansatz wurde nicht weiter behandelt. Die insgesamt 4 Kulturansätze pro Probe wurden nach der Inkubation im Maus-Bioassay auf BoNT untersucht, hierfür wurden die Ansätze unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Kulturansätze auf die BoNT Gene A bis F durch PCR nach Takeshi et al. 1996.

2.3.1. Durchführung des Maus-Bioassays durch das FLI, Laboranweisung (Auszug)

1. Anwendungszweck

Der Maus-Bioassay dient dem Nachweis und der Typisierung von durch *Clostridium botulinum* gebildetem Botulinum-Neurotoxin (BoNT) in Probenmaterial (Kot, Organproben, Futtermittel- und Lebensmittelproben) sowie in Toxinextrakten, die bei der Anzucht von *Clostridium botulinum*-Stämmen gewonnen wurden.

2. Grundlagen

Methode L 06.00-26 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch): Untersuchung von Lebensmitteln, Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen, gleich lautend mit Norm DIN 10102 von Juni 1988.

3. Arbeitsvorschrift

3.1. Material

3.1.1. Verzeichnis der Reagenzien

- a) Blutagar-Platten (NGBK)
- b) RCM-Bouillon
- c) Selzer-Bouillon
- d) Modifizierte Kalbfleisch-Bouillon nach OHISHI (MKBO)
- e) Modifiziertes Kochfleisch-Medium (MCM)
- f) Gelatine-Phosphat-Pufferlösung (GPP)
- g) Trypsin-Lösung (0,5 %ig)
- h) Antitoxin-Seren
- i) PBS-Pufferlösung

3.1.2. Verzeichnis der Geräte

- a) Brutschrank, einstellbar auf 30 (\pm 1) °C , z.B. Brutschrank nach DIN 58 945 Teil 1
- b) Kühlschrank, 4 (\pm 2) °C
- c) Anaerobiertöpfe bzw. Anaerobierwerkbank
- d) Zentrifuge mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 10 000 rpm, mit Kühleinrichtung und hermetisch verschließbarem Rotorkessel
- e) Zentrifugenröhrchen (hermetisch verschließbar, autoklavierbar)
- f) Wasserbad
- g) Laminar-Flow-Werkbank
- h) Waage
- i) Vortex-Gerät
- j) Beutel-Walkmischgerät (Stomacher)
- k) Beutelständer
- l) Pipetten unterschiedlichen Volumens
- m) Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 μ m)
- n) Bechergläser (klein, steril)
- o) Messzylinder (steril)
- p) 5-ml-Spritzen
- q) Pipettenspitzen (steril, mit Filter)
- r) Kulturröhrchen (steril, verschließbar, autoklavierbar)
- s) Beutel für Beutelwalkmischgerät (steril, versch. Größen, mit/ ohne Filter)
- t) Reagenzglasgestelle
- u) Einwegösen für Bakterienausstriche
- v) 1,8-ml-Eppendorf-Tubes

3.2. Durchführungsschritte

Begriffsklärung:

Toxinextrakte (= Extrakte) können sowohl als Direktextrakte durch Mischen des Probenmaterials mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung (GPP) oder als Kulturüberstände nach Inkubation der *Clostridium botulinum*-Stämme bzw. des Probenmaterials in Flüssigmedien hergestellt werden. Durch Direktextraktion mittels GPP erfolgt ein Nachweis von präformiertem Botulinum-Neurotoxin aus der Probe. Nach Inkubation von Stämmen oder Probenmaterial in Flüssigmedien kann die Toxinbildung durch vermehrungsfähige *Clostridium botulinum*-Zellen oder –sporen nachgewiesen werden.

3.2.1. Herstellung von Toxinextrakten aus *Clostridium botulinum*-Kulturen

3.2.1.1. Anzucht von Stämmen

Die Anzucht der Stämme zur Toxinproduktion erfolgt entweder aus der Mikrobank, aus Lyophilisat oder aus Kryokonservierung (-80°C) auf Blutplatten (NGBK) oder in Flüssigmedium (RCM- oder Selzer-Bouillon). Die Inkubation erfolgt anaerob bei 37°C. Bei gutem Wachstum, welches nach 24 bis 48 Stunden zu erwarten ist und erkennbar wird an ausgebildeten Kolonien mit Hämolyse auf Platte oder Gasbildung (schäumen) und Trübung in Flüssigmedium, kann eine Überimpfung in das Toxinproduktionsmedium erfolgen.

3.2.1.2. Herstellung des toxischen Kulturüberstandes in MKBO-Bouillon

Zur Toxinbildung werden die *Clostridium botulinum*-Stämme nach Anzüchtung in MKBO-Flüssigmedium verbracht. Hierzu werden je 1 ml einer gut bewachsenen Anzucht-Bouillon oder mehrere Kolonien von Platte in 10 ml MKBO-Bouillon überimpft und bei 37°C für 5 bis 7 Tage anaerob inkubiert. Zur Gewinnung des toxischen Kulturüberstandes wird der flüssige Teil der Bouillon in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten gekühlt auf 4°C mit einer Geschwindigkeit von 10000 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation gewinnt man den flüssigen Anteil unter Belassung des gebildeten Pellets im Zentrifugenröhrchen, welcher mithilfe eines Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm (PES-Material) sterilfiltriert und in einem sterilen verschließbaren Röhrchen (Volumen 12-50 ml, je nach gewonnenem Extrakt-Volumen) bei 4°C bis zur Testung in der Maus gelagert wird.

3.2.1.3. PCR-Testung zum Nachweis des typspezifischen Toxin-Gens

Sowohl aus dem Anzuchtmedium als auch dem Toxinproduktionsmedium werden Pellets für die PCR-Testung der *Clostridium botulinum*-Stämme zum Nachweis von typspezifischem Toxin-Gen gewonnen. Hierfür werden 1,5 ml der gut bewachsenen und durchmischten Bouillon in ein 1,8 ml Eppendorf-Tube gegeben und 10 Minuten mit 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das gewonnene Pellet kann nach DNA-Extraktion für die PCR-Testung verwendet werden. Erfolgte die Anzucht auf Platte, so können mehrere Kolonien mit einer Einwegöse von der Platte abgenommen und in 1,5 ml PBS-Pufferlösung in einem 1,8 ml Eppendorf-Tube gelöst und im Anschluss für 10 Minuten mit 8000 rpm zentrifugiert werden. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, kann das

gewonnene Pellet nach DNA-Extraktion für die PCR-Testung verwendet werden. Für den Nachweis des typspezifischen Toxin-Gens von *Clostridium botulinum* stehen verschiedene PCR-Protokolle aus der Literatur zur Verfügung. Erfolgt der Nachweis des Toxin-Gens (positives PCR-Ergebnis) eines zur Toxinproduktion angezüchteten *Clostridium botulinum*-Stammes, so kann aus MKBO Toxinextrakt gewonnen werden, der sehr wahrscheinlich Botulinum-Neurotoxin des entsprechenden Types enthält und im Maus-Bioassay getestet werden kann. Sollte ein Nachweis des Toxin-Gens negativ ausfallen, so ist das Toxinproduktionsmedium zu verwerfen und der *Clostridium botulinum*-Stamm neu anzuzüchten. Der Toxinextrakt wird in einem solchen Fall nicht für den Maus-Bioassay verwendet.

3.2.2. Vorbereitung von Probenmaterial (Kot, Organe, Futtermittel, Lebensmittel) für Maus-Bioassay

3.2.2.1. Herstellung des Direktextraktes mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung

Etwa 20 g einer Probe werden mit der gleichen Menge Gelatine-Phosphat-Puffer in einem Beutel-Walkmischgerät homogenisiert. Diese Mischung wird belassen im Stomacher-Beutel über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluß daran wird der flüssige Überstand der Mischung mithilfe einer Einmal-Pasteurpipette entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten gekühlt auf 4°C mit einer Geschwindigkeit von 10000 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation gewinnt man den flüssigen Anteil der Probe unter Belassung des gebildeten Pellets im Zentrifugenröhrchen, welcher mithilfe eines Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm (PES-Material) sterilfiltriert und in einem sterilen verschließbaren Röhrchen (Volumen 12-50 ml, je nach gewonnenem Extrakt-Volumen) bei 4°C bis zur Testung in der Maus gelagert wird.

3.2.2.2. Herstellung des toxischen Kulturüberstandes in MCM-Bouillon

10 ml MCM-Bouillon werden entweder mit 1 g unbehandeltem Probenmaterial oder 2 g Probenmaterial-GPP-Ansatz beimpft und 5 bis 7 Tage bei 30°C anaerob inkubiert. Zur Gewinnung des toxischen Kulturüberstandes wird der flüssige Teil der Bouillon in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten gekühlt auf 4°C mit einer Geschwindigkeit von 10000 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation gewinnt man den flüssigen Anteil unter Belassung des gebildeten Pellets im Zentrifugenröhrchen, welcher mithilfe eines Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm (PES-Material) sterilfiltriert und in einem sterilen verschließbaren Röhrchen (Volumen 12-50 ml, je nach gewonnenem Extrakt-Volumen) bei 4°C bis zur Testung in der Maus gelagert wird.

3.2.3. Vorbehandlung von Toxinextrakten (Trypsinierung, Erhitzung) für den Tierversuch

3.2.3.1. Trypsinbehandlung

1,8 ml Extrakt werden mit 0,2 ml einer Suspension aus 0,5 g Trypsin gelöst in 10 ml sterilem Wasser vermischt und 30 Minuten bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

3.2.3.2. Hitzebehandlung

1,5 ml Extrakt wird 10 Minuten in kochendem Wasser erhitzt, wodurch eventuell vorhandenes Botulinum-Neurotoxin zerstört wird.

3.2.4. Nachweis von Botulinum-Neurotoxin im Maus-Bioassay

3.2.4.1. Mäuse

Verwendet werden sowohl männliche als auch weibliche weiße Labormäuse (BALB/c) mit einem Mindestalter von 5 Wochen.

3.2.4.2. Intraperitoneale Injektion in Mäuse

Pro Extrakt werden 2 Mäuse benötigt. Jedem Tier werden 0,5 ml Extrakt intraperitoneal injiziert.

3.2.4.3. Extraktkonzentrationen

Folgende Konzentrationen der Extrakte werden den Mäusen verabreicht:

Tier 1 und 2	unbehandelter Extrakt, 1 : 2 verdünnt
Tier 3 und 4	trypsinbehandelter Extrakt, 1 auf 1,8 verdünnt
Tier 5 und 6	erhitzter Extrakt, unverdünnt oder in geringster Verdünnung

Alle Verdünnungen erfolgen mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung.

3.2.4.4. Kulturüberstand aus Anzucht der Probe in Flüssigmedium

Tier 1 und 2	unbehandelter Extrakt, 1 : 2 verdünnt
Tier 3 und 4	trypsinbehandelter Extrakt, 1 auf 1,8 verdünnt
Tier 5 und 6	erhitzter Extrakt, unverdünnt
Tier 7 und 8	unbehandelter Extrakt, 1 : 10 verdünnt
Tier 9 und 10	trypsinbehandelter Extrakt, 1 : 9 verdünnt
Tier 11 und 12	erhitzter Extrakt, 1 : 10 verdünnt

Alle Verdünnungen erfolgen mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung.

3.2.5. Typisierung des Toxins mit Seren

Zur Typisierung und Quantifizierung des nachgewiesenen Toxins wird derjenige Extrakt eingesetzt, der vermutlich die höchste Toxinmenge enthielt. War der Extrakt mit Trypsin behandelt, so ist frisch trypsinbehandelter Extrakt herzustellen, da langandauernde Trypsinwirkung das Botulinum-Neurotoxin inaktivieren kann. Einzusetzen ist jeweils die höchste Verdünnung des Extrakts, die noch toxisch war, sowie eine weitere zehnfache und hundertfache Verdünnung des Extraktes.

Die verwendeten Antitoxin-Lösungen werden gemeinsam mit dem Extrakt injiziert. Es sind Antitoxin-Lösungen mit 10 antitoxischen Einheiten je ml herzustellen (eine antitoxische Einheit neutralisiert 100 Mäuse-Letaleinheiten des jeweiligen Toxintyps).

Jeweils 0,25 ml der jeweiligen Antitoxin-Lösung werden mit 1,0 ml des Extraktes vermischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz werden je 0,5 ml in Mäuse intraperitoneal injiziert.

Tier 1 bis 6	Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)
Tier 7 bis 12	Antitoxin A + Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)
Tier 13 bis 18	Antitoxin B + Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)
Tier 19 bis 24	Antitoxin C + Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)
Tier 25 bis 30	Antitoxin D + Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)
Tier 31 bis 36	Antitoxin E + Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)
Tier 37 bis 42	Antitoxin F + Extrakt (3 Verdünnungsstufen, je 2 Tiere)

Ist der Serotyp bekannt, so können nicht relevante Antitoxine gemeinsam mit dem Extrakt verabreicht werden, auf diese Weise lässt sich die erforderliche Tierzahl reduzieren.

Annahme: 1 antitoxische Einheit (AE) neutralisiert 100 LD₁₀₀
1 LD₁₀₀ entspricht 2x LD₅₀

Werden Toxin und Antitoxin gemeinsam verabreicht, sollen die Antitoxin-Lösungen 10 AE/ml enthalten. Nach der DIN 10102 werden 0,25 ml Antitoxin-Lösung (dies entspricht 2,5 AE/ml) mit 1,0 ml Extrakt vermischt. Verwendet werden typspezifische polyklonale Antitoxin-Seren der CIDC, Lelystad, Niederlande. Die Antitoxin-Seren liegen in lyophilisierter Form vor und werden entsprechend den Herstellerangaben gelöst. Bei jeder Charge ist auf den angegebenen Titer zu achten und gegebenenfalls eine Neuberechnung des zu verwendenden Volumens vorzunehmen. Die typspezifischen Antitoxin-Seren können sowohl einzeln als auch als Gemisch verschiedener Antitoxin-Typen zusammen mit dem Toxinextrakt verabreicht werden. Werden Mischungen verschiedener Antitoxin-Typen (z.B. Antitoxin ABEF, CD) hergestellt, so ist von jedem Antitoxin-Typ die für das betreffende Volumen an Toxinextrakt (z.B. 1 ml, 2 ml) berechnete Menge an Antitoxin dem Toxinextrakt zuzusetzen.

Übersicht zu den Antiseren der CIDC, Lelystad, NL:

	Antitoxin A	Antitoxin B	Antitoxin C	Antitoxin D	Antitoxin E	Antitoxin F
Titer (anti-LD50/ml)	13 400	25 600	4 418	17 100	25 600	20 600
AE/ml	67	128	22,1	85,5	128	103
Volumen (µl), dass 2,5 AE enthält	37,3	19,5	113,12	29,2	19,5	24,3
Volumen (µl), dass 1 ml Extrakt zugegeben werden soll	37,5	20	115	29,5	20	24,5
Volumen (µl), dass 2 ml Extrakt zugegeben werden soll	75	40	230	59	40	49

Ändert sich der Titer (anti-LD50/ml) der bezogenen Antiseren (CIDC, Lelystad, NL) so werden die Berechnungen entsprechend angepasst.

3.3. Ergebnis und Kontrolle

Die Mäuse werden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion möglichst alle 4 Stunden, später mindestens zweimal täglich inspiziert. War im Extrakt oder Kulturüberstand Botulinum-Neurotoxin vorhanden, wird das Versuchstier unter typischen Symptomen konzentrationsabhängig meist innerhalb weniger Stunden bis zu 3 Tage nach der Injektion verenden. Ein typisches Symptom für eine Botulismus-Erkrankung ist die Ausbildung einer „Wespentaille“. Hierbei handelt es sich um eine Einziehung der Flanken der Tiere durch eine vermehrte Nutzung der Bauchmuskulatur zur Unterstützung der Atmung. Weitere Symptome sind eine angestrengte Atmung sowie Lähmungserscheinungen in der Gliedmaßen-Muskulatur. Die Tiere verenden schließlich durch Atemlähmung.

3.3.1. Toxinnachweis

Verenden die Tiere unter diesen typischen Symptomen und bleiben die Tiere am Leben, die erhitzten Toxinextrakt erhielten, so lässt dies auf Botulinum-Neurotoxin schließen.

3.3.2. Toxintypisierung

Die Tiere, die dem Toxintyp entsprechendes Antitoxin-Serum erhalten haben, werden überleben, während alle nicht durch das passende Antitoxin-Serum geschützten Tiere typische Botulismus-Symptome zeigen und verenden werden.

3. Ergebnisse

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1. Ergebnisse der Untersuchung auf BoNT

Insgesamt wurden 36 (+1) Proben mit BoNT der Typen A, B, C, D, E, F hergestellt. In die Auswertung wurden auch die Proben mit einbezogen, die mit Sporen dotiert wurden. Eine dieser Proben enthielt noch relevante Toxinmengen, diese Probe wurde den toxinhaltigen Proben zugerechnet. Die anderen Proben, die mit Sporen versetzt wurden enthielten kein nachweisbares Toxin, die Toxinfreiheit der Sporenpräparationen wurde vor der Herstellung der Proben mittels des Maus-Bioassays gezeigt. In die Auswertung flossen somit die Ergebnisse von 47 Proben ohne Toxin ein. Die Abbildungen 1 bis 4 stellen die Ergebnisse der Laboratorien im Bezug auf die untersuchten Proben detailliert dar. Die Auswertung erfolgte nach der Maustoxizität der Probenextrakte ohne die Einbeziehung von Typisierungsergebnissen bzw. nach ELISA positiven Ergebnissen ohne Berücksichtigung des detektierten Toxintyps.

Folgende Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen wurden für die einzelnen Labore festgestellt: Labor A bewertete 3 Proben falsch negativ. Labor B bewertete 13 Proben falsch negativ und 1 Probe falsch positiv. Labor C bewertete 6 Proben falsch negativ und 19 Proben falsch positiv. Labor D bewertete 17 Proben falsch negativ und 7 Proben falsch positiv. Für Labor D wurden 31 Proben mit Toxin und 45 Proben ohne Toxin ausgewertet. Labor E bewertete 2 Proben falsch negativ. Für Labor E wurden 33 Proben mit Toxin und 43 Proben ohne Toxin ausgewertet.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurde die Spezifität und die Sensitivität des BoNT Nachweises für jedes Labor mit einer 4-Feldertafelermittelt.

Tabelle 1: 4-Feldertafel

	Proben		Summe
Labor	mit Toxin	ohne Toxin	
Test positiv	richtig positiv (rp)	falsch positiv (fp)	rp+fp
Test negativ	falsch negativ (fn)	richtig negativ (rn)	fn+rn
Summe	rp+fn	fp+rn	rp+fp+fn+rn

Sensitivität: $rp/(rp+fn)$

Spezifität: $rn/(rn+fp)$

Als Prozentwert ausgedrückt, erreichten die einzelnen Labore folgende Werte:

Labor A erreichte eine Sensitivität von 92% und eine Spezifität von 100%.

Labor B erreichte eine Sensitivität von 65% und eine Spezifität von 98%.

Labor C erreichte eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 60%.

Labor D erreichte eine Sensitivität von 45% und eine Spezifität von 84%.

Labor E erreichte eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 100%.

Wurden bei Labor C nur typisierbare Toxizitätsnachweise als positive Ergebnisse berücksichtigt so erreichte Labor C eine Sensitivität von 46% und eine Spezifität von 98%.

Toxin	Toxintyp	Matrix	Code	Inokulum (MLD/g)	Labor				
					A	B	C	D	E
					Tox	Tox	Tox	Tox	Tox
1	A	RK	165	10 000 - < 100 000	ja	ja	ja	ja	ja
2	A	RK	166	1000 - < 10 000	ja	ja	ja	ja	ja
3	A	RK	167	100 - < 1000	ja	ja	ja	ja	ja
4	A	RK	168	0	nein	nein	nein	nein	nein
5	B	RK	155	1000 - < 10 000	ja	ja	ja	ja	ja
6	B	RK	156	100 - < 1000	ja	ja	ja Tryps	ja	ja
7	B	RK	157	10 - < 100	ja	nein	ja Tryps	nein	ja
8	B	RK	158	0	nein	nein	ja Tryps	nein	nein
9	C	RK	271	1000 - < 10 000	ja	ja	ja	nein	ja
10	C	RK	281	100 - < 1000	ja	ja	ja	nein	ja
11	C	RK	261	10 - < 100	ja	nein	ja	nein	ja
12	C	RK	251	0	nein	nein	nein	nein	nein
13	D	RK	135	50 000 - 500 000	ja	ja	ja	ja	
14	D	RK	136	5000 - 50 000	ja	ja	ja	ja	
15	D	RK	137	500 - 5000	ja	ja	ja	ja	
16	D	RK	138	0	nein	nein	nein	ja	
17	E	RK	274	1000 - < 10 000	ja	ja	ja Tryps	ja	ja
18	E	RK	284	100 - < 1000	ja	nein	ja	nein	ja
19	E	RK	264	10 - < 100	ja Tryps	nein	ja	nein	ja
20	E	RK	254	0	nein	nein	ja	nein	nein
21	F	RK	276	1000 - < 10 000	ja	nein	ja		ja
22	F	RK	286	100 - < 1000	ja	nein	ja		ja
23	F	RK	266	10 - < 100	nein	nein	ja		nein
24	F	RK	256	0	nein	nein	nein		nein

Abbildung 1: BoNT in Rinderkot, Labor-Ergebnisse der Untersuchung auf Maustoxizität bzw. BoNT Nachweis mittels ELISA. RK: Rinderkot, graue Felder wurden nicht gewertet, orange Felder kennzeichnen ein abweichendes Ergebnis.

Toxinachweis in Sporenproben					Labor A	Labor B	Labor C	Labor D	Labor E
Typ	Inokulum	Matrix	Code	Inokulum (kBE/g)	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox
1 A	Sporen +++	RK	161	2308 - 5000	nein	nein	ja	nein	nein
2 A	Sporen ++	RK	162	923 - 2000	nein	nein	ja	nein	nein
3 A	Sporen +	RK	163	462 - 1000	nein	nein	ja	nein	nein
4 A	Sporen -	RK	164	0	nein	nein	ja Tryps	nein	nein
5 B	Sporen ++	RK	152	865 - 1500	nein	nein	ja	nein	nein
6 B	Sporen -	RK	154	0	nein	nein	ja	nein	nein
7 C	Sporen +++	RK	141	11 - 60	nein	nein	ja	ja	
8 C	Sporen ++	RK	231	3310 - 4070	nein	nein	ja Tryps	nein	nein
9 C	Sporen -	RK	221	0	nein	nein	ja	nein	nein
10 C	Sporen -	RK	144	0	nein	nein	ja Tryps	ja	
11 D	Sporen +++	RK	131	6 - 23	ja	ja	ja	ja	
12 D	Sporen -	RK	134	0	nein	nein	ja	ja	
13 D, B	Sporen ++	RK	235	295 - 3036	nein	nein	nein	ja	nein
14 D, B	Sporen +	RK	215	97 - 1002	nein	nein	ja	ja	nein
15 D, B	Sporen -	RK	225	0	nein	nein	nein	ja	nein
16 F	Sporen +++	RK	111	50 000	nein	nein	ja	nein	nein
17 F	Sporen ++	RK	112	5000	nein	nein	ja	nein	nein
18 F	Sporen +	RK	113	1000	nein	nein	nein	nein	nein
19 F	Sporen -	RK	114	0	nein	nein	nein	nein	nein

Abbildung 3: Sporen in Rinderkot, Labor-Ergebnisse der Untersuchung auf Maustoxizität bzw. BoNT Nachweis mittels ELISA. RK: Rinderkot, graue Felder wurden nicht gewertet, orange Felder kennzeichnen ein abweichendes Ergebnis.

Toxinnachweis in Sporenprouben					Labor A		Labor B		Labor C		Labor D		Labor E	
Typ	Inokulum	Matrix	Code	Inokulum (kBE/g)	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox
20	A	Sporen +++	Slage	261	5048 - 5895	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
21	A	Sporen ++	Slage	262	2524 - 2948	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
22	A	Sporen +	Slage	263	1010 - 1179	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
23	A	Sporen -	Slage	264	0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
24	B	Sporen +++	Slage	251	5550 - 7800	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
25	B	Sporen ++	Slage	252	2775 - 3900	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
26	B	Sporen +	Slage	253	1388 - 1950	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
27	B	Sporen -	Slage	254	0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
28	C	Sporen ++	Slage	131	1062 - 3865	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
29	C	Sporen -	Slage	121	0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
30	D, B	Sporen ++	Slage	135	295 - 3036	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
31	D, B	Sporen +	Slage	115	97 - 1002	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
32	D, B	Sporen -	Slage	125	0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
33	F	Sporen +++	Slage	211	49 200 - 73 200	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
34	F	Sporen ++	Slage	212	4920 - 7320	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
35	F	Sporen +	Slage	213	1025 - 1525	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
36	F	Sporen -	Slage	214	0	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
1 Probe mit Toxin					17 falsch positiv									
35 Proben ohne Toxin					6 falsch positiv									

Abbildung 4: Sporen in Silage, Labor-Ergebnisse der Untersuchung auf Maustoxizität bzw. BoNT Nachweis mittels ELISA. Graue Felder wurden nicht gewertet, orange Felder kennzeichnen ein abweichendes Ergebnis. Abweichende Ergebnisse aus Abb.3 und Abb. 4 unter der Tabelle summiert.

3.1.2. Ergebnisse der Untersuchung auf *C. botulinum*

Die Auswertung der Untersuchungen der Laboratorien auf *C. botulinum* erfolgte anhand der übermittelten Ergebnisse für 23 Proben die mit Sporen dotiert waren und 24 Proben ohne Sporen. In die Auswertung wurden die mit BoNT dotierten Proben nicht einbezogen, da es aufgrund der Probenaufarbeitung zu einem Toxinübertrag in die „Anreicherungskulturen“ kommen kann. Die Auswertung erfolgte auch hier nach der Maustoxizität der Probenextrakte ohne die Einbeziehung von Typisierungsergebnissen bzw. nach ELISA positiven Ergebnissen ohne Berücksichtigung des detektierten Toxintyps. Labor E untersuchte die Proben nicht auf *C. botulinum* bzw. nahm keine Typisierung evtl. festgestellter Toxizität vor und wird infolgedessen in den entsprechenden Auswertungen nicht aufgeführt. Folgende Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen wurden für die einzelnen Labore festgestellt: Labor A bewertete 5 Proben falsch negativ, Labor B bewertete 10 Proben falsch negativ. Labor C bewertete 11 Proben falsch negativ und 3 Proben falsch positiv. Labor D bewertete 5 Proben falsch negativ, 7 Proben falsch positiv. Für Labor D wurden die Ergebnisse von 18 Proben mit und 22 Proben ohne Sporen ausgewertet. Die Auswertung der Ergebnisse der Laboratorien anhand der 4-Feldertafel (Tabelle 1) ergab für die Labore folgende Sensitivitäts- und Spezifitäts-Werte in Prozent:

Labor A erreichte eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 100%.

Labor B erreichte eine Sensitivität von 57% und eine Spezifität von 100%.

Labor C erreichte eine Sensitivität von 52% und eine Spezifität von 88%.

Labor D erreichte eine Sensitivität von 71% und eine Spezifität von 68%.

Wurden bei Labor C nur typisierbare Toxizitätsnachweise als positive Ergebnisse berücksichtigt, so erreichte Labor C eine Sensitivität von 26% und eine Spezifität von 100%.

3.1.2. Untersuchung auf *C. botulinum* durch das FLI; Ergebnisse der PCR Untersuchungen

Tabelle 2: Nachweis von *C. botulinum*, PCR-Ergebnisse (PCR) und Ergebnisse des Tierversuchs (TV) aus unterschiedlichen Anreicherungen im Vergleich

Matrix	Typ	Konz. stufe	Kulturüberstand							
			RCM		RCM (10 min, 75 °C)		MCM		MCM (10 min, 75 °C)	
			TV	PCR	TV	PCR	TV	PCR	TV	PCR
RK	A	+++	-	-	+	+	+	+	+	+
		++	-	+	+	+	+	+	+	+
		+	-	(+)	+	+	+	+	+	+
	B	++	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+
	C	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	D/B	++	-	-	+	B+/D-	+	B+/D-	+	B+/D+
		+	-	-	+	B+/D-	+	B+/D+	+	B+/D+
	F	+++	-	-	+	+	+	+	+	+
		++	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	-	-	(+)	+	+	+	+	+
Silage	A	+++	-	+	+	+	+	+	+	+
		++	-	+	+	+	+	+	+	+
		+	-	(+)	+	+	+	+	+	+
	B	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
		++	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-	-	-	+	-
	C	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	D/B	++	-	-	+	B+/D-	+	B+/D+	+	B+/D+
		+	-	-	+	B+/D-	+	B+/D-	+	B+/D+
	F	+++	-	-	-	-	+	+	+	+
++		-	-	+	+	+	+	+	+	
+		+	+	-	-	+	+	+	-	

Konz.stufe = Konzentrationsstufe, RK = Rinderkot, RCM = Reinforced Clostridia Medium, MCM = Modified Cooked Meat Medium. + positiv, (+) schwach positiv, - negativ.

Aus den Ergebnissen in der oben stehenden Tabelle (Auszug) lässt sich erkennen, dass beim indirekten Erregernachweis (Maus-Bioassay, TV) das zur Anreicherung gewählte Flüssigmedium die Nachweissensitivität beeinflusst. Das Flüssigmedium RCM eignet sich

ohne Erhitzungsschritt nicht zum Nachweis von *C. botulinum*, MCM eignet sich mit und ohne Sporenselktion (10 min, 75°C) deutlich besser zum indirekten Erregernachweis. Allerdings waren bei der Untersuchung der unverdünnten Kulturüberstände im Maus-Bioassay in einigen Fällen toxische Schockreaktionen und unspezifische Todesfälle bei den Versuchstieren zu beobachten. Diese Wirkung beruht höchstwahrscheinlich auf Lipopolysacchariden (nicht hitzeinaktivierbare Toxizität) und anderen bakteriellen Toxinen. Durch die Verdünnung des Kulturüberstandes im Verhältnis 1:10 lassen sich diese unspezifischen Reaktionen der Versuchstiere meist vermeiden. Die Nachweissensitivität wird durch die Verdünnung nur geringfügig negativ beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Aus dem Vergleich der beiden Methoden zum Nachweis von *C. botulinum* (Maus-Bioassay und PCR) wird deutlich, dass der PCR Nachweis gleichwertig zum Maus-Bioassay ist. MCM erscheint als geeignetes Medium zur Voranreicherung. Die Vorteile der PCR liegen auf der Hand: Es besteht keine Notwendigkeit zur Durchführung eines Tierversuchs, die Zeitdauer des Erregernachweises ist im Vergleich zum Tierversuch erheblich kürzer und die Typisierung des Toxins liegt unmittelbar vor.

3.1.3. Ergebnisse der Typisierung

Die Labore A, B, C und D übermittelten für eine jeweils unterschiedliche Anzahl von Proben Typisierungsergebnisse, sowohl im Rahmen des Nachweises von BoNT als auch im Rahmen des Nachweises von *C. botulinum*. Für jedes Labor wurde jeweils die Anzahl der Typisierungen, der richtigen Typisierungen, der nicht erfolgreichen Typisierungen (keine Typisierung möglich) und der falschen Typisierungen erfasst. Labor A führte 40 Typisierungen durch, davon 29 mit dem erwarteten Ergebnis, 11 Typisierungen verliefen nicht erfolgreich. Damit wurden 73% der durchgeführten Typisierungen mit dem erwarteten Ergebnis abgeschlossen. Labor B führte 45 Typisierungen durch, davon 36 mit dem erwarteten Ergebnis, 3 Typisierungen verliefen nicht erfolgreich, 7 falsch. Damit wurden 78% der durchgeführten Typisierungen mit dem erwarteten Ergebnis abgeschlossen. Labor C führte 82 Typisierungen durch, in der Auswertung wurden jedoch nur 62 Typisierungen berücksichtigt. 20 Typisierungsversuche von falsch positiven Proben wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da falsch positiv bewertete Proben folgerichtig kein richtiges Typisierungsergebnis erhalten können. Von den bewerteten 62 Typisierungen wurden 21 mit dem richtigen Ergebnis abgeschlossen. 36 Typisierungen verliefen nicht erfolgreich und 5 falsch. Damit wurden 34% der durchgeführten Typisierungen mit dem erwarteten Ergebnis abgeschlossen. Labor D führte 52 Typisierungen durch, davon 24 mit dem erwarteten Ergebnis, 28 Typisierungen waren falsch. Damit wurden 46% der durchgeführten Typisierungen mit dem erwarteten Ergebnis abgeschlossen.

4. Zusammenfassung und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt 5 Laboratorien untersuchten dotierte Rinderkot- und Silage-Proben mit dem Untersuchungsziel Nachweis von Botulinum Neurotoxin (BoNT). 4 Labore führten die Untersuchungen mittels Maus-Bioassay durch, ein Labor wendete ELISA Verfahren an. In Bezug auf den Toxinnachweis kann festgestellt werden, dass die Sensitivität und/oder Spezifität bei einigen Laboratorien verbessert werden sollte. Der Maus-Bioassay erreicht in 3 Laboratorien gute Spezifitätswerte ($\geq 98\%$) und in 2 Laboratorien gute Sensitivitätswerte ($\geq 92\%$). Auf dieser Basis soll eine Durchführungsempfehlung für den Maus-Bioassay entwickelt werden.

Der indirekte Erregernachweis bzw. der Nachweis von *C. botulinum* Sporen wurde von 4 Laboren durchgeführt, 3 Labore wendeten den Maus-Bioassay an, ein Labor arbeitete mit ELISA Verfahren. Die Spezifität des Nachweises erreichte bei 2 Laboren 100%, hier wurden Sensitivitätswerte von 78% und 56% erzielt. Bei den beiden weiteren Laboren erreichten die Spezifitätswerte 88% und 68% bei einer Sensitivität von jeweils 52% und 71%. Auch beim indirekten Erregernachweis sollte die die Sensitivität und/oder Spezifität bei einigen Laboratorien verbessert werden.

Die Typisierungen wurden wiederum von 3 Laboren mittels des Maus-Bioassays durchgeführt, ein Labor verwendete ELISA Verfahren. Es kann festgestellt werden, dass die Typisierung (Neutralisation) bei zwei Laboren zu 78% und zu 73% mit einem richtigen Ergebnis abgeschlossen werden konnte, während zwei Labore Werte unter 50% (34% und 46%) erzielten.

Damit hat die Vergleichsuntersuchung -insbesondere im Hinblick auf den Nachweis von Botulinum Neurotoxin- gezeigt, dass bei einigen Laboren die Sensitivität und/oder Spezifität verbessert werden sollte. Die Ergebnisse der Laboratorien wiesen auch bei der Anwendung des Maus-Bioassays teilweise erhebliche Qualitätsunterschiede auf. Der Maus-Bioassay erreichte dennoch in 3 Laboratorien gute Spezifitätswerte ($\geq 98\%$) und in 2 Laboratorien gute Sensitivitätswerte ($\geq 92\%$). Auf dieser Basis soll eine Durchführungsempfehlung für den Maus-Bioassay entwickelt werden.

Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Hypothese des „viszeralen“ Botulismus wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Die labordiagnostische Grundlage der Hypothese ist der Nachweis von Botulinum Neurotoxin aus dem Kot betroffener Tiere. Die Aussagekraft und Qualität der diesbezüglichen Laborergebnisse einiger Laboratorien ist umstritten. Eine zuverlässige Diagnostik des Botulismus in Hinblick auf den Nachweis von *C. botulinum*-Neurotoxin und *C. botulinum*-Sporen oder lebenden Bakterien ist die Grundvoraussetzung für eine sachliche, fundierte Diskussion. Aus diesem Grund führte das Friedrich-Loeffler-Institut im Auftrag des

Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) eine Vergleichsuntersuchung zur Botulismusdiagnostik in Deutschland durch, an der verschiedene Laboreinrichtungen beteiligt waren. Die Ergebnisse fielen sehr unterschiedlich aus, sodass teilweise erheblicher Verbesserungsbedarf im Bereich der Qualität der Labordiagnostik festgestellt werden kann. In der Folge des Projektes soll zunächst eine Durchführungsempfehlung für den Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin entwickelt werden. Ein weiteres Ziel in der Folge dieser Vergleichsuntersuchung ist die Standardisierung und Qualitätssicherung in der Botulismusdiagnostik.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Der geplante Umfang der Untersuchung der dotierten Proben wurde mit 86 durch das FLI hergestellte und versendete Proben erreicht. Neben den Laboren Miprolab und Ripac Labor nahmen zusätzlich das Landeslabor Berlin-Brandenburg und das Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig an der Vergleichsuntersuchung teil. Die Auswertung zeigte, dass die Ergebnisse der Laboratorien auch bei der Anwendung des Maus-Bioassays teilweise erhebliche Qualitätsunterschiede aufwiesen. Daher ist es notwendig zunächst eine Durchführungsempfehlung für den Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin zu entwickeln. Die Untersuchung der gesammelten Feldproben würde im Bezug auf die Qualität der Labordiagnostik keinen weiteren Erkenntnisgewinn ermöglichen, deshalb wurde auf die Untersuchung der Feldproben nach Rücksprache und Einverständnis der Projektpartner und des Projektträgers verzichtet.

Weiterführende Fragestellungen: Mit den teilnehmenden Laboratorien soll eine Laborarbeitsanweisung als Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays erarbeitet werden. Um die erarbeitete Empfehlung zu testen, könnten in einem Ringversuch 12 der bereits hergestellten Proben von den Laboratorien nach der neuen Durchführungsempfehlung untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F. Visceral botulism--a new form of bovine Clostridium botulinum toxication. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2001 Aug;48(6):373-83.

Centers for Disease Control and Prevention CDC: Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention, 1998.

- Gill DM. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev.* 1982 Mar;46(1):86-94.
- Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev.* 1990 Jan;3(1):66-98.
- Hatheway, C.L., 1988. Botulism. In: Balows, A., Hausler Jr, W.J., Ohashi, M. and Turano, A., Editors, 1988. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, pp. 111–133.
- Johnson EA, Bradshaw M. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon.* 2001 Nov;39(11):1703-22.
- Newton JR, Hedderson EJ, Adams VJ, McGorum BC, Proudman CJ, Wood JL. An epidemiological study of risk factors associated with the recurrence of equine grass sickness (dysautonomia) on previously affected premises. *Equine Vet J.* 2004 Mar;36(2):105-12.
- Parpura V, Chapman ER. Detection of botulinum toxins: micromechanical and fluorescence-based sensors. *Croat Med J.* 2005 Aug;46(4):491-7.
- Rings DM. Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004 Jul;20(2):379-91.
- Sharma SK, Whiting RC. Methods for detection of Clostridium botulinum toxin in foods. *J Food Prot.* 2005 Jun;68(6):1256-63.
- Smart JL, Jones TO, Clegg FG, McMurtry MJ. Poultry waste associated type C botulism in cattle. *Epidemiol Infect.* 1987 Feb;98(1):73-9.
- Takeshi, K., Fujinaga, Y., Inoue, K., Nakajima, H., Oguma, K., Ueno, T., Sunagawa, H., and Ohyama, T. 1996. Simple method for detection of Clostridium botulinum type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 40(1), 5-11.
- Van Ermengem, E. 1897. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Z. Hyg. Infektionskr.* 26:1-56.
- Wictome M, Shone CC. Botulinum neurotoxins: mode of action and detection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 1998;27:87S-97S.