

Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischen Krankheitsgeschehen

Projektkoordinatorin: Prof. Dr. med. vet. Martina Hoedemaker, Ph.D.
Arbeitsbereich Bestandstiermedizin der Klinik für Rinder
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Schlussbericht Friedrich-Loeffler-Institut 2014

Teilprojekt „Clostridiendiagnostik“

Forschungsprojekt-Nummer: 2810HS036

Laufzeit: 01.02.2012 bis 31.05.2014

Projekträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, BLE
Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und
Verbraucherschutz, BMELV

Zuweisungsempfänger : Dr. Christian Seyboldt
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Naumburger Str. 96 a
07743 Jena
Tel.: 03641 804-2295,
Fax: - 2228
christian.seyboldt@fli.bund.de

Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Dr. Sabrina Discher
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Naumburger Str. 96 a
07743 Jena
Tel.: 03641 804-2423,
Fax: - 2228
sabrina.discher@fli.bund.de

Dr. Eva Jordan
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Naumburger Str. 96 a
07743 Jena
Tel.: 03641 804-2341,
Fax: - 2228
eva.jordan@fli.bund.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Im Rahmen einer Ausschreibung -Wissenschaftliche Entscheidungshilfe zum Thema „Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischen Krankheitsgeschehen“ (Förderkennzeichen 2810HS005)- wurde ein Verbundprojekt der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Projektkoordinatorin Prof. Dr. med. vet. Martina Hoedemaker und dem FLI gefördert.

In den letzten Jahren wird über eine bei Rindern vorkommende, zehrende Erkrankung diskutiert, die von einigen Autoren dem Botulismus zugerechnet wird und als „viszeraler“ oder „chronischer“ Botulismus bekannt wurde. Entsprechende Berichte in den Medien lenkten hierbei auch das allgemeine Interesse der Öffentlichkeit auf dieses Thema. Zudem wurde die Frage aufgeworfen, ob der „chronische Botulismus“ als Zoonose auf den Menschen übertragbar ist.

Um die Ursachen dieser sehr kontrovers diskutierten Erkrankung bei Rindern, die mit einem schleichenden Verfall einhergeht und ganze Rinderbestände betreffen kann, zu klären, wurde im März 2012 eine gemeinsame Studie von mehreren Instituten der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) und dem Friedrich-Loeffler-Institut gestartet. Hierin soll geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten chronischer Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und dem Vorkommen von *Clostridium (C.) botulinum* und der Bildung von Neurotoxinen besteht. Die Rinderklinik der TiHo koordiniert die Studie.

Das Ziel des FLI Teilprojektes „Nachweis von *Clostridium botulinum* und *Clostridium botulinum* Neurotoxin“ war die Untersuchung von Kotproben aus dem Verbundprojekt auf *C. botulinum* Neurotoxin (BoNT) mittels des Maus-Bioassays, sowie die Untersuchung der Kotproben auf das Vorhandensein von *C. botulinum* vegetativen Zellen oder Sporen.

Ein Kernpunkt der Hypothese zur Entstehung des Krankheitsbildes „chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus ist der Nachweis bzw. das Vorhandensein von BoNT im Kot betroffener Rinder. Daher könnten die Untersuchungen auf BoNT mittels Maus-Bioassay auf Kotproben begrenzt werden. Die derzeit einzige allgemein akzeptierte Methode zum Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin (BoNT) ist der Maus-Bioassay in Verbindung mit der Neutralisation der Toxizität durch typspezifische Antiseren. Das Vorgehen umfasst die intraperitoneale Injektion von Probenextrakt, gefolgt von der Beobachtung der Tiere über vier Tage auf das Auftreten charakteristischer Symptome und/oder Tod.

Für den Nachweis von Sporen oder vegetativen Keimen von *C. botulinum* können Tierversuche (indirekter Erregernachweis) oder molekularbiologische Untersuchungstechniken (PCR-Nachweise) angewendet werden. Nach eigenen Untersuchungen können mit molekularbiologische Untersuchungstechniken (PCR-Nachweise) mit dem indirekten Erregernachweis vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Die PCR-Untersuchung einer Probe umfasst den PCR Nachweis aus dem nativen Probenmaterial sowie den PCR Nachweis nach einer Voranreicherung (verdächtiges, möglicherweise *C. botulinum* enthaltendes Material in geeignetem Medium unter anaeroben Bedingungen mehrere Tage bebrütet und anschließend untersucht). Die parallele Untersuchung der Kotproben mit molekularbiologischen Untersuchungstechniken (PCR und Realtime-PCR Nachweise) durch die TiHo (Institut für LMQS) und das FLI ermöglichen einen Vergleich der Nachweismethoden.

Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele

Arbeitsziel des Vorhabens ist die Untersuchung von etwa 1500 Kotproben auf *C. botulinum* Neurotoxin mittels des Maus-Bioassays sowie die Untersuchung der Proben auf *C. botulinum* vegetative Zellen oder Sporen.

Die Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* Neurotoxin dient der Forschung zur Hypothese des „viszeralen“ Botulismus. Ein Kernpunkt der Hypothese zur Entstehung des Krankheitsbildes „chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus ist der Nachweis bzw. das Vorhandensein von BoNT im Kot betroffener Rinder. Dies soll geprüft werden. Die Auswahl und die Zuordnung der Proben zu einer epidemiologischen Kategorie (betroffener Betrieb, betroffenes Tier, nicht betroffener Betrieb, nicht betroffenes Tier) obliegt den Projektpartnern der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* vegetative Zellen oder Sporen dient der Forschung zur Verbreitung von *C. botulinum* im Kot von Rindern. Die Proben werden auch durch den Projektpartner TiHo (Institut für LMQS) mit molekularbiologischen Methoden auf *C. botulinum* vegetative Zellen oder Sporen untersucht, durch diese Untersuchungen können die verschiedenen molekularbiologischen Methoden verglichen werden.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Arbeitsplan des FLI orientierte sich an der Arbeitsplanung der Projektpartner der Tierärztlichen Hochschule Hannover und bestand aus zwei Arbeitspaketen:

- 1) Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* Neurotoxin.
- 2) Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* vegetative Zellen oder Sporen.

Zu 1) Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* Neurotoxin:

In diesem Arbeitspaket wurden die von der TiHo gesammelten Kotproben mittels Maus-Bioassay auf *C. botulinum* Neurotoxin untersucht. Das Vorgehen ist in Material und Methoden beschrieben. Für eine Untersuchung wurde mindestens 20 g Probenmaterial benötigt, so dass die Probenmenge 50 g betragen sollte, um eventuelle Nachuntersuchungen durchführen zu können. Die Kapazität des FLI zur Durchführung des Maus-Bioassays betrug am Anfang der Projektlaufzeit 90 Versuchstiere pro Woche (dies entspricht einer Anzahl von 15 Proben pro Woche) und wurde im Lauf des Projektes auf 120 Versuchstiere pro Woche (dies entspricht einer Anzahl von 20 Proben pro Woche) erhöht. Durch einen kontinuierlichen Probeneingang am FLI der durch die TiHo realisiert wurde, konnten die Proben wie geplant untersucht werden. Die Anlaufzeit des Projektes wurde genutzt, um die Versuchstierzucht mit den erforderlichen Tierzahlen aufzubauen und so eine kontinuierliche Versorgung mit den notwendigen Versuchstieren sicherzustellen.

Zu 2) Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* vegetative Zellen oder Sporen.

Die PCR-Untersuchung einer Probe umfasste den PCR Nachweis aus dem nativen Probenmaterial sowie den PCR Nachweis nach einer Voranreicherung (verdächtiges, möglicherweise *C. botulinum* enthaltendes Material wurde in geeignetem Medium unter anaeroben Bedingungen mehrere Tage bebrütet und anschließend untersucht). Pro Probe wurden also zwei DNA-Extraktionen durchgeführt. Für jede Extraktion wurde jeweils eine PCR (keine Multiplex) für jedes Toxin-Gen A, B, C, D, E, F plus Inhibitionskontrolle durchgeführt (7 Reaktionen). Pro Probe wurden also 2 DNA-Extraktionen und 14 PCR-Reaktionen durchgeführt. Durch die parallele Untersuchung der Kotproben mit molekularbiologischen Untersuchungstechniken (PCR und Realtime-PCR Nachweise) durch die TiHo (Institut für LMQS) und das FLI kann ein Vergleich der verschiedenen Nachweismethoden durchgeführt werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Vorkommen von *C. botulinum*

Das Bakterium *C. botulinum* kommt in der Umwelt weit verbreitet vor. Fälle von klassischem Botulismus, also Vergiftungen mit durch *C. botulinum* gebildetem Neurotoxin, treten relativ selten auf. Da Botulismus bei Nutztieren weder anzeige- noch meldepflichtig ist, gibt es keine genauen Zahlen zur Häufigkeit in Deutschland.

Botulismus ist bei einer ganzen Reihe von Säugetieren und Vögeln bekannt. Relativ häufig ist der Botulismus durch Toxin Typ C bei Wassergeflügel, wobei vor allem Wildtiere betroffen sind. Auch bei Wirtschaftsgeflügel tritt dieser Typ gelegentlich in Erscheinung, ist jedoch auch ohne jegliche klinische Erkrankung in Geflügelkot und Einstreu zu finden. Bei Botulismuserkrankungen von Rindern werden Intoxikationen häufig auf die Typen C und D

zurückgeführt; hier wurden auch Zusammenhänge mit Geflügelkot oder Geflügeleinstreu beschrieben. Die Toxintypen A und B wurden ebenfalls bei Botulismustfällen von Rindern beobachtet. Ursache von Vergiftungen ist hier oft mit Kadavern verunreinigtes Futter wie z.B. Silage. In den Tropen kommt es durch Phosphormangel bei Rindern zu Osteophagie (Benagen von Knochen) und so durch die Aufnahme von Kadaverteilen zu Botulismus. Pferde sind ebenfalls sehr empfindlich gegenüber BoNT, kontaminierte Grassilage und Kadaver von Kleinsäugetieren in Futtermitteln werden hier als Ursache von Vergiftungen angesehen. Vergiftungen bei Schweinen, Katzen und Hunden sind selten, aber ebenfalls bekannt.

Erkrankungen beim Menschen

Menschen können durch den Verzehr von Lebensmitteln, die *C. botulinum*-Neurotoxin enthalten, erkranken. Eine direkte Übertragung vom Tier auf den Menschen konnte bisher wissenschaftlich nicht nachgewiesen werden. Daher handelt es sich hier nicht um eine klassische Zoonose wie beispielsweise die Tollwut, deren Erreger bei einem Biss von infizierten Tieren (Füchse, Hunde etc.) mit dem Speichel in die Wunde gelangen.

Neben der Intoxikation durch Lebensmittel sind beim Menschen weitere Formen des Botulismus bekannt. Am bedeutendsten ist hier der so genannte Säuglingsbotulismus: bei Säuglingen im Alter bis zu einem Jahr kommt es durch eine Besiedelung (Kolonisierung) des Darms 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 richtet sich gegen die Symptome. Ursache für diese sogenannte „Toxikation“ oder „Toxoinfektion“ ist die noch nicht ausgebildete Darmflora im Säuglingsalter, wodurch die Besiedelung mit *C. botulinum* begünstigt werden kann. Bei der Aufnahme von Sporen von *C. botulinum* spielt möglicherweise Honig eine Rolle.

„Chronischer“ / „Viszeraler“ Botulismus

Neben den über 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 entstehen. 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 (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.).

Diagnostik

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 verteilt ist. Der Toxinnachweis im Serum, in Organen oder im 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 der Bakterien nicht als beweisend für die kausale Ursache der Erkrankung (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990; Sharma und Whiting, 2005).

Tatsächlich können die verschiedenen Typen von *C. botulinum* weltweit in Boden und Wasser bzw. Sedimentproben nachgewiesen werden. Allerdings muss angemerkt werden, dass der Nachweis häufig über das Toxinbildungsvermögen der anaeroben Mikroflora ohne kulturelle Isolierung der *C. botulinum* Stämme erfolgte. Die Isolierung aus Umwelt- und anderen Proben gilt allgemein als schwierig. Bei positiven Befunden im Boden oder Sediment kann in der Regel von relativ geringen Keimzahlen ausgegangen werden (Hatheway, 1988).

Für die Standardmethode des Toxinnachweises im Maus-Bioassay erhalten die Versuchstiere zunächst eine intraperitoneale Injektion der bakterienfrei zentrifugierten bzw. sterilfiltrierten und 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 neutralisierenden Antiserum verabreicht. Überleben die Mäuse, die ein typspezifisches Antiserum erhalten haben (A bis G, auch die Verabreichung von trivalenten Antiseren ist möglich), so gilt der entsprechende Toxintyp als nachgewiesen (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990).

Beim indirekten Erregernachweis wird verdächtiges, möglicherweise sporenhaltiges Material in geeignetem Medium unter anaeroben Bedingungen mehrere Tage bebrütet und der sterilfiltrierte Kulturüberstand anschließend auf seine Toxizität im Maus-Bioassay untersucht. Es ist jedoch zu bedenken, dass durch diese Untersuchung kein kausaler Toxinnachweis erfolgt, sondern lediglich 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).

Verschiedene immunologische Nachweise, zum Beispiel auf der Basis des ELISA, wurden in der Literatur mehrfach beschrieben, sind in Deutschland jedoch bisher nicht kommerziell erhältlich. Immunologische, auf Antikörper basierende Nachweissysteme erreichen meist nicht die hohe Sensitivität des Maus-Bioassays (Dezfulian et al., 1984; Doellgast et al., 1993; Sharma et al., 2006; Thomas, 1991). Ein weiterer Nachteil ist neben der geringeren Sensitivität der fehlende Nachweis des aktiven Toxins, da auch denaturierte Toxine in diesen Systemen positive Reaktionen ergeben.

Durch die Tatsache, dass sieben verschiedene Toxin-Gene bekannt sind, die bei einem DNA-basierten molekularbiologischen Nachweissystem berücksichtigt werden müssen, sind PCR-Nachweise arbeitsintensiv. Die PCR-Nachweise der Toxin-Gene erfolgen hierbei entweder durch den Einsatz von für den jeweiligen Toxintyp spezifischen Primerpaaren (Franciosa et al., 1994; Franciosa et al., 1996; Hielm et al., 1996; Lindstrom et al., 2001; Takeshi et al., 1996; Szabo et al., 1993), oder mittels degenerierter Universalprimer, durch die eine bei allen Toxintypen vorkommende Gensequenz amplifiziert wird. Ein evtl. positives Ergebnis muss dann bei letzterer Variante in einer weiteren Untersuchung mit toxingenspezifischen Sonden differenziert werden (Fach et al., 1995). Für die Diagnostik sind inzwischen auch Realtime-PCR-Nachweise beschrieben worden (z.B.: Akbulut et al., 2005).

Einige innovative Nachweistekniken machen sich die spezifische enzymatische Aktivität der BoNT zunutze, indem die Spaltung einer bestimmten Proteinsequenz in ein auswertbares Signal umgewandelt wird (Dong et al., 2004; Liu et al., 2003; Parpura und Chapman, 2005; Wictome und Shone, 1998). Dadurch können Begrenzungen der immunologischen und DNA- basierten Nachweise umgangen werden, weil es so möglich ist, die Enzymaktivität bzw. biologische Aktivität des Toxins nachzuweisen. Dies könnte sich insbesondere für die Testung von therapeutischen Zubereitungen von BoNT als wertvoll erweisen und möglicherweise Tierversuche zur Bestimmung der Toxineinheiten ersetzen. Zur Diagnostik des Botulismus scheinen diese Verfahren jedoch wenig geeignet, da im Probenmaterial meist mit der Anwesenheit verschiedener Proteasen gerechnet werden muss, die das „Nachweisprotein“ ebenfalls spalten könnten.

Nach wie vor ist also der Maus-Bioassay 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 könnten sie eine wertvolle Ergänzung der Diagnostik des Botulismus darstellen.

Das Vorhaben des FLI soll einen Beitrag zur Aufklärung der Beteiligung des Erregers *C. botulinum* und der Neurotoxine von *C. botulinum* an einem Krankheitsgeschehen unklarer Genese leisten. Die Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* Neurotoxin dient der Forschung zur Hypothese des „viszeralen“ Botulismus. Ein Kernpunkt der Hypothese zur Entstehung des Krankheitsbildes „chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus ist der Nachweis bzw. das Vorhandensein von BoNT im Kot betroffener Rinder. Dies soll geprüft werden. Die Auswahl und die Zuordnung der Proben zu einer epidemiologischen Kategorie (betroffener Betrieb, betroffenes Tier, nicht betroffener Betrieb, nicht betroffenes Tier) werden hierbei von den Projektpartnern der Tierärztlichen Hochschule Hannover vorgenommen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* Neurotoxin mittels Maus-Bioassay

Der Maus-Bioassay wurde entsprechend der „Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin in Rinderkot und Silage“ (Dlabola et al. 2013) durchgeführt.

Auszug:

Vorwort

Bundesweit führen nur wenige Laboratorien die veterinärmedizinische Botulismus-Diagnostik durch, hierbei ist der Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin (BoNT) ein entscheidender Bestandteil der Laboruntersuchungen. Bisher sind sieben serologisch unterscheidbare Typen (A-G) von Botulinum-Neurotoxinen bekannt, die sich aufgrund ihrer genetischen und/oder antigenen Eigenschaften in mindestens 35 Subtypen unterscheiden lassen. Im Zusammenhang mit einer ätiologisch ungeklärten Erkrankung bei Rindern, die mit einem schleichenden Verfall einhergeht und ganze Rinderbestände betreffen kann, wird als mögliche Ursache des Krankheitsbildes die Produktion von Neurotoxin durch *Clostridium (C.) botulinum* im Darm der betroffenen Rinder mit anschließender Resorption geringer Mengen diskutiert. Bisherige Untersuchungsergebnisse verschiedener Laboratorien wiesen Divergenzen beim Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin auf, die zu kontroversen Diskussionen führten.

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 sich verschiedene Laboreinrichtungen beteiligt haben. Die Ergebnisse fielen sehr unterschiedlich aus, sodass erheblicher Verbesserungsbedarf im Bereich der Qualität der Labordiagnostik festgestellt wurde. In der Folge des Projektes wurde die hier vorliegende Durchführungsempfehlung für den Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin mittels des Maus-Bioassays entwickelt. Ein entscheidender Schritt in der Botulismusdiagnostik ist zunächst die Untersuchung der Proben auf Toxizität im Maus-Bioassay. Werden hier Hinweise auf das Vorliegen von *C. botulinum* Neurotoxin erhalten, sollten sich weitere Untersuchungen zur Typisierung des Toxins mit entsprechenden Antiseren anschließen, da der eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit entsprechenden Antiseren im Maus-Bioassay erfordert. Die Neutralisation ist nicht Gegenstand dieser Empfehlung, da die durch die Vergleichsuntersuchung aufgedeckten diagnostischen Schwierigkeiten zunächst die Feststellung von Toxizität (durch *C. botulinum* Neurotoxin) im Maus-Bioassay betreffen. Die unter 11. dieser Methodenempfehlung angegebenen Literaturstellen enthalten Protokolle zur Durchführung der Neutralisation.

In der Laborvergleichsuntersuchung wurde der Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin aus Rinderkot und Silage untersucht. Bei der Herstellung der dotierten Proben aus Rinderkot und Silage wurde das Probenmaterial mit Gelatine-Phosphat-Puffer vermischt, daher waren alle Proben der Vergleichsuntersuchung im Bezug auf die Matrix verdünnt. Die Basis der vorliegenden Methodenempfehlung ist der Vergleich der Durchführung des Maus-Bioassays in den teilnehmenden Laboren. Die Empfehlung resultiert aus den Ergebnissen der Vergleichsuntersuchung, den Erfahrungen der Laboratorien und der daraus folgenden Einschätzung zu unterschiedlichen methodischen Vorgehensweisen. In der Methodenempfehlung sind alternative Varianten aufgeführt, wenn diese als annähernd gleichwertig betrachtet wurden. Der Nachweis von vegetativen Zellen oder Sporen von *C. botulinum* sowie die Typisierung von *C. botulinum* Neurotoxin ist nicht Gegenstand dieser Empfehlung.

1. Anwendungszweck

Die hier vorliegende Durchführungsempfehlung zum Maus-Bioassay dient der Untersuchung von Rinderkot und Silage auf das Vorliegen von *C. botulinum* Neurotoxin. Weiteres Probenmaterial war nicht Gegenstand der Vergleichsuntersuchung, veterinärmedizinisches Organmaterial wie Leber, Darminhalt oder Panseninhalt kann ggf. nach dieser Empfehlung untersucht werden. Der

eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin erfordert die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay. Die Neutralisation ist nicht Gegenstand dieser Empfehlung. Die unter 11. angegebenen Literaturstellen (1, 2, 3, 4) enthalten Protokolle zur Durchführung der Neutralisation.

Die hier vorliegende Methodenempfehlung orientiert sich im Wesentlichen an der Methode

L 06.00-26 „Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen“ der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) (2). Hauptunterschiede zur Methode L 06.00-26 (2) sind die Filtration des Probenextraktes mittels Spritzenvorsatzfilter, um eine weitgehende Sterilität des Probenextraktes zu erreichen, und die Verwendung von nur einer Verdünnungsstufe des Probenextraktes im Maus-Bioassay. Hierdurch werden zur Untersuchung einer Probe sechs Tiere benötigt, während nach Methode L 06.00-26 (2) zunächst 14 Tiere zur Untersuchung eines Probenextrakts vorgegeben sind.

2. Grundlagen

Die Durchführungsempfehlung orientiert sich an 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“ (2). Weitere Grundlage waren die Durchführungsanweisungen/ Protokolle zum Maus-Bioassay der teilnehmenden Labore sowie die angegebenen Literaturstellen (1, 3, 4).

3. Kurzbeschreibung des Verfahrens

Zum Nachweis von BoNT werden die Proben mit Gelatine-Phosphat-Puffer versetzt und homogenisiert. Die homogenisierte Probe wird bei 4-8°C über Nacht inkubiert, anschließend wird durch Zentrifugation und Filtration ein Probenextrakt gewonnen. Der Probenextrakt wird weißen Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Mäuse werden bis zu 96 Stunden auf das Auftreten charakteristischer neurologischer Symptome oder des Todes beobachtet.

4. Chemikalien

Gelatine-Phosphat-Pufferlösung (GPP)

Rezeptur: Gelatine: 2g, di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄): 4g, Aqua dest: 1L

Herstellungsvorschrift: Die Bestandteile werden unter leichtem Erwärmen in dest. Wasser gelöst. Der pH-Wert ist mit 1N NaOH oder 1N HCL auf 6,2±0,1 einzustellen, gemessen bei einer Temperatur von 20°C. Der Puffer wird abgefüllt und im Autoklav 20 Minuten bei 121°C sterilisiert.

Trypsinlösung

Erläuterungen: Die Aktivität des Trypsins wird in USP Einheiten (U) angegeben. Eine USP Einheit ist die Enzymmenge, die die Hydrolyse von BAEE (Benzoylargininethylester) bewirkt, die zu einem Anstieg der Lichtabsorption bei 253 nm von 0,003 Extinktionseinheiten pro Minute bei 25 °C führt. Der Gehalt von 250 USP U/mg für Trypsinpulver (1:250) ist eine Mindestanforderung in der Spezifikation vieler Hersteller. Der tatsächliche Gehalt kann weitaus höher sein (z.B. 1000 USP U/mg) und muss im Analysenzertifikat der jeweiligen Charge angegeben sein. In der Methode L 06.00-26 (2) ist für die Trypsinbehandlung des Extraktes eine 10%ige Lösung aus Trypsin 1:250 vorgeschrieben. Diese Lösung soll im Verhältnis 1:10 mit Probenextrakt vermischt werden. Dies entspricht einer 1%igen Lösung im Probenextrakt. Unter der Annahme, dass Trypsinpulver (1:250) 250 USP U/mg enthält, hat eine 10%ige Lösung demnach 25.000 USP U/ml, eine 1%ige Lösung 2.500 USP U/ml.

Andere Angaben: Das CDC Handbook (1) beschreibt eine 0,5%ige Lösung (1.250 USP U/ml); die Konzentration im Probenextrakt (0,25 ml der Lösung zu 1 ml der Probe) entspricht 250 USP U/ml. Die Anleitung FDA/CFSSAN - BAM * Chapter 17 - Clostridium botulinum (4) gibt eine 5%ige Lösung (12.500 USP U/ml) vor, die Konzentration im Probenextrakt (0,2 ml der Lösung zu 1,8 ml der Probe) entspricht 1.250 USP U/ml.

Empfehlung: Der Gehalt von 2.500 USP U/ml in der trypsinierten Probe sollte nicht überschritten werden. Es wird empfohlen eine Trypsinlösung mit 12.500 bis 25.000 USP U/ml herzustellen und im Verhältnis 1:10 anzuwenden, z.B. 1,8 ml Probenextrakt plus 0,2 ml Herstellung der Trypsinlösung: 125.000 bis 250.000 USP U Trypsinpulver (1:250) in 10 ml dest. Wasser lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm).

5. Geräte

Kleingeräte und Verbrauchsmaterial des bakteriologischen Labors, sowie die notwendigen Einrichtungen und Gegenstände zur Haltung von Versuchstieren (Mäuse) und zur Durchführung des Maus-Bioassays.

Brutschrank 37°C

Kühlschrank 4-8°C

Zentrifuge mit einer Zentrifugalbeschleunigung von $> 10.000\text{ g}$, mit Kühleinrichtung und hermetisch verschließbarem (aerosoldichten) Rotorkessel
Zentrifugenröhrchen (hermetisch verschließbar, steril)
Wasserbad 100°C
Sicherheitswerkbank der Klasse 2
Waage mit einem geeigneten Wägebereich z. B.: $0,02\text{ g}$ - 400 g
Beutel-Walkmischgerät (z.B. Stomacher 400 Circulator)
Beutel für Beutelwalkmischgerät (steril, versch. Größen, mit/ ohne Filter)
Beutelständer
Pipetten unterschiedlichen Volumens (z.B.: $20\text{-}200\ \mu\text{l}$, $100\text{-}1000\ \mu\text{l}$, $0,5\text{-}5\text{ ml}$)
Spritzenvorsatzfilter (Porengröße $0,22\ \mu\text{m}$ Materialempfehlung PES oder Porengröße $0,45\ \mu\text{m}$)
Die Geräte sind einer GLP konformen Wartung und Instandhaltung zu unterziehen, die z.B. durch Akkreditierung bzw. Zertifizierung nach aktuellen Normen garantiert werden kann.

6. Versuchstiere

Verwendet werden sowohl männliche als auch weibliche weiße Labormäuse (BALB/c oder NMRI) eines Gewichtsbereichs von 18 bis 25 Gramm.

7. Durchführung

7.1. Vorbemerkung

Clostridium botulinum Neurotoxine sind außerordentlich giftig. Alle verdächtigen Proben und Kulturen sind daher nur von erfahrenem Personal in entsprechend zugelassenen Laboratorien zu handhaben. Äußerste Vorsicht ist vor allem beim Hantieren mit Spritzen und Kanülen sowie bei Verfahren geboten, bei denen die Gefahr einer Aerosolbildung besteht (z.B. Zentrifugieren). Derartige Verfahrensschritte sind, soweit sie nicht überhaupt vermeidbar, in Sicherheitswerkbänken mit Personen- und Objektschutz nach DIN 12 950 Teil 1 bzw. in hermetisch abgeschlossenen sterilisierbaren Rotoren durchzuführen. Verschüttetes Botulinum-Toxin lässt sich mit starkem Alkali (Sodalösung oder Natronlauge $c(\text{NaOH}) = 0,1\text{ mol/l}$) inaktivieren. Gesetzliche Regelungen und Empfehlungen für den Umgang mit pathogenen Mikroorganismen und die im Umgang mit ihnen auftretenden Gefahren sind strikt zu beachten. Der Toxinnachweis beinhaltet Tierversuche im Sinne des § 7 Tierschutz-Gesetz. Nach § 8 Absatz 7 Nr. 2 dieses Gesetzes bedürfen die Versuche keiner Genehmigung. Sie unterliegen aber der Anzeigepflicht nach § 8a Tierschutz-Gesetz. Die Anzeige hat unter Angabe der in §

8a Absatz 2 enthaltenen Erfordernisse und nach Maßgabe der zuständigen jeweiligen Landesveterinärbehörde bei dieser zu erfolgen. Die Tierversuche sind im Interesse des öffentlichen Gesundheitsschutzes vorerst noch unerlässlich. Sobald alternative Verfahren verfügbar sind, werden sie den Tierversuch ersetzen (siehe auch 2).

7.2. Herstellung des Probenextraktes mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung

- Etwa 20 g der Probe werden mit der gleichen Menge Gelatine-Phosphat-Puffer in einem Beutel-Walkmischgerät homogenisiert (z.B. Stomacher 400 Circulator, 80 ml Filterbeutel, zur Sicherheit in 400 ml Beutel bei 250 rpm für 1 min). Sollte kein flüssiger Anteil der Mischung erkennbar sein, so wird die zugegebene Menge Gelatine-Phosphat-Puffer erhöht, im Verhältnis 1:3 bis zu 1:5. Es werden mindestens 6 ml Extrakt benötigt.
- Diese Mischung wird im Stomacher-Beutel belassen und über Nacht (> 12 h) bei ca. 4-8°C in einem Kühlschrank inkubiert.
- Im Anschluss daran wird der flüssige Überstand der Mischung z. B. mithilfe einer Einmal-Pasteurpipette entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten bei 4°C mit einer Beschleunigung von mindestens 10.000g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert.
- Der flüssige Überstand wird gewonnen und mithilfe eines Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,45 µm oder 0,22 µm (PES-Material) sterilfiltriert.
- Der Extrakt wird in einem sterilen verschließbaren Röhrchen (Volumen 15-50 ml, je nach gewonnenem Extrakt-Volumen) bis zur Testung im Maus-Bioassay gelagert.
- Die Lagerung erfolgt bis zu 5 Tage bei 4-8°C in einem Kühlschrank, darüber hinaus bei -20°C in einer Gefriertruhe.

7.3. Vorbehandlung von Probenextrakten (Trypsinierung, Erhitzung)

- Trypsinbehandlung
Der Extrakt wird im Verhältnis 10:1 mit Trypsinlösung versetzt (z.B. 1,8 ml Extrakt mit 0,2 ml der Trypsinlösung), gemischt und 30 bis 45 Minuten bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.
- Hitzebehandlung
2 ml Extrakt werden 10 Minuten in kochendem Wasser erhitzt, wodurch eventuell vorhandenes *C. botulinum* Neurotoxin zerstört wird.

7.4. Injektion der Probenextrakte

- Intraperitoneale Injektion in Mäuse

Pro Extrakt werden 2 Mäuse benötigt. Jedem Tier werden 0,5 ml oder 1,0 ml Extrakt intraperitoneal injiziert. Anmerkung: Durch die Vergleichsuntersuchung ergab sich der Hinweis, dass die Sensitivität durch die Injektion von 1 ml Extrakt verbessert werden kann.

- **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.

8. Ergebnis und Kontrolle

Die Mäuse sollen für die Dauer von bis zu 4 Tagen (96 h) beobachtet werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion sollen die Mäuse möglichst alle 4 Stunden, später mindestens zweimal täglich inspiziert werden. War im Extrakt *Clostridium 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 des Tiers durch eine vermehrte Nutzung der Bauchmuskulatur zur Unterstützung der Atmung. Weitere Symptome sind eine angestrengte Atmung sowie Lähmungserscheinungen der Gliedmaßen-Muskulatur. Das Tier verendet schließlich.

9. Auswertung

Verenden Tiere, die unbehandelten oder trypsinbehandelten Extrakt erhielten unter typischen Symptomen und bleiben die Tiere am Leben, die erhitzten Probenextrakt erhielten, so lässt dies auf die Anwesenheit von *C. botulinum* Neurotoxin in der untersuchten Probe schließen. Der eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin erfordert die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay. Verenden Tiere ohne Ausprägung der oben beschriebenen typischen Symptome oder mit anderen Symptomen, so ist dies nicht als Hinweis auf *C. botulinum* Neurotoxin zu bewerten.

10. Weiteres Vorgehen

Kann durch das Ergebnis des Maus-Bioassays auf das Vorhandensein von *Clostridium botulinum* Neurotoxin geschlossen werden, sollte die Typisierung

(Neutralisation) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay durchgeführt werden. Der eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin erfordert die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay. Die unter 11. angegebenen Literaturstellen enthalten Protokolle zur Durchführung der Neutralisation.

Verenden Tiere ohne Ausprägung von typischen Symptomen, sollte der Maus-Bioassay unter der Berücksichtigung weiterer Verdünnungsstufen der Extrakte, sowie ggf. mit der Durchführung von Neutralisationsversuchen wiederholt werden.

11. Literatur

1. Centers for Disease Control and Prevention: Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention, 1998.
2. 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
3. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Edition/1998, Chapter 14. Methods for the Detection of *Clostridium botulinum* Toxins in Meat and Poultry Products, Authors L. Victor Cook, Wei Hwa Lee, Charles P. Lattuada and Gerri M. Ransom, <http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/MLgchp14.pdf>
4. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. Chapter 17, *Clostridium botulinum*, Authors: Haim M. Solomon and Timothy Lilly, Jr. January 2001 <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

2.2 Untersuchung der Kotproben auf *C. botulinum* vegetative Zellen oder Sporen mittels PCR.

Die PCR-Untersuchung einer Probe umfasste den PCR Nachweis aus dem nativen Probenmaterial sowie den PCR Nachweis nach einer Voranreicherung (verdächtiges, möglicherweise *C. botulinum* enthaltendes Material wurde in geeignetem Medium unter anaeroben Bedingungen mehrere Tage bebrütet und anschließend untersucht). Pro Probe werden also zwei DNA-Extraktionen durchgeführt. Für jede Extraktion wurde jeweils eine PCR (keine Multiplex) für jedes Toxin-Gen A, B, C, D, E, F plus Inhibitionskontrolle durchgeführt (7 Reaktionen). Pro Probe wurden also 2 DNA Extraktionen und 14 PCR-Reaktionen durchgeführt.

Die Extraktion der DNA aus Probenmaterial und Anreicherungskulturen wurde mit einem Kit (QIAamp DNA Stool Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der Nachweis der Toxingene erfolgte nach Takeshi et al. 1996 entsprechend der Laborarbeitsanweisung „Nachweis und Toxintypisierung von *Clostridium botulinum* mittels PCR“ Auszug:

Arbeitsvorschrift

Die speziellen Angaben und Bedingungen zum Nachweis von *Clostridium botulinum* sind folgender Literaturstelle zu entnehmen: Takeshi K, Fujinaga Y, Inoue K, Nakajima H, Oguma K, Ueno T, Sunagawa H, Ohyama T.: Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by ploymerase chain reaction, *Microbiol Immunol.* 1996;40(1):5-11

Abweichend hiervon ist die Reaktion mit folgender Zusammenstellung des Mastermixes optimiert:

- 2,5µl Puffer (mit MgCl₂)
- 1µl dNTP-Mix (10mM)
- 0,5µl Pri. 1 [A-FS - 11]
- 0,5µl Pri. 2 [A-FS - 22]
- 2µl Q-Solutions
- 2µl MgCl₂ (25mM)
- 0,25 µl Hotstart-Taq-Polymerase [QIAGEN]
- 14,25µl H₂O
- 2µl Proben-DNA

Für den Nachweis oder Ausschluss der jeweiligen Toxintypen muss jeweils eine Reaktion mit jedem der 7 Primerpaare angesetzt werden (keine Multiplex-PCR).

Material

Alle erforderlichen Reagenzien für einen Mastermix sind getrennt von der zu untersuchenden DNA-Probe zu lagern.

Primer-Oligonukleotide, Konzentration je 10 µM:

Primer	Sequenz
AS-11	5'-TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT-3'
AS-22	5'-TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC-3'
BS-11	5'-CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG-3'
BS-22	5'-CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT-3'
CS-11	5'-ATA CAC TAG CTA ATG AGC CTG-3'
CS-22	5'-TGG AGT ATT GTT ATT CCC AGG-3'
DS-11	5'-GTG ATC CTG TTA ATG ACA ATG-3'

DS-22	5'-TCC TTG CAA TGT AAG GGA TGC-3'
ES-11	5'-CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT A-3'
ES-22	5'-ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTC-3'
FS-11	5'-CAA TAG GAA CGA ATC CTA GTG-3'
FS-22	5'-ATC AGG TCC TGC TCC CAA TAC-3'

Verzeichnis der Reagenzien

10x PCR-Puffer; dNTP's, 10 mM, portioniert

Taq-DNA-Polymerase, 5 U/μl (Hotstart)

DEPC-Wasser, portioniert

Q-Solution und MgCl₂ (25 mM)

Primer (siehe Tabelle), Arbeitskonzentration: 10μMol)

DNA-Isolate (Templates)

Positivkontrollen (siehe Tabelle)

Negativkontrolle (Mastermixansatz)

DNase-Away (Sprühdekontamination)

Verzeichnis der Geräte und Materialien

Thermocycler für die PCR

Vortex-Schüttler

Tischzentrifuge

Pipetten 0,1-2,5 μl, 0,5-10 μl, 10-100μl, 100-1000 μl

Pipettenspitzen

Reaktionsgefäße 0,2 ml

Horizontale Elektrophorese mit Stromversorgung

UV-Transilluminator

Gel-Dokumentationssystem

Durchführungsschritte

Die PCR erfolgt in steril gelieferten 0,2 ml Reaktionsgefäße. Pro Reaktionsansatz wird ein Volumen von 25 μl verwendet. Um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren, ist ein Mastermix anzusetzen. Die Reagenzienzusammensetzung für einen Reaktionsansatz ist in dem Musterprotokoll auf Seite 4 aufgeführt. Um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden, wird der Mastermix in einem eigens hierfür bereitgestellten Arbeitsbereich angesetzt. Die Zugabe der zu untersuchenden DNA-Proben erfolgt daraufhin in einem separaten Raum. Für jeden durchzuführenden PCR-Ansatz werden folgende Kontrollen mitgeführt: 1) Für die Positiv-Kontrollen wird jeweils DNA von *Clostridium botulinum*-Serotyp A bis F-Stämmen verwendet:

2) Als Negativ-Kontrolle (Reagenzienkontrolle) wird dem Reaktionsansatz anstelle von DNA lediglich Reinstwasser zugefügt. Durch Pipettieren eingeführte Luftblasen in den Reaktionsansätzen sind gegebenenfalls vor dem Programmstart des Thermocyclers zu entfernen (Tischzentrifuge). Es ist das aufgeführte Temperatur-Zeit-Profil mit der entsprechenden Zyklusanzahl zu verwenden.

Programm:				
Init. Denaturierg.	95	°C	900	sec
Denaturierung	94	°C	15	sec
Annealing	55	°C	60	sec
Elongation	72	°C	60	sec
Finale Extension	72	°C	180	sec
Kühlung	4	°C		sec
Zykluszahl	35			

Ergebnis und Kontrolle

Eine DNA-Probe gilt als positiv getestet auf *Clostridium botulinum*, wenn bei der nachfolgend durchgeführten gelelektrophoretischen Untersuchung 1.) ein Amplifikat mit der Größe entsprechend unten stehender Tabelle 2.) kein Amplifikationsprodukt bei der Negativ-Kontrolle vorhanden ist, 3.) bei den Positiv-Kontrollen jeweils Amplifikationsprodukte mit einer entsprechenden Fragmentgröße (Tabelle) nachgewiesen werden konnten. Eine DNA-Probe gilt als negativ getestet, wenn kein Amplifikat nachgewiesen werden konnte und die Positiv- und Negativ-Kontrollen eindeutig positiv bzw. negativ sind. Falls die Kontrollreaktionen keine eindeutigen Ergebnisse geben, ist der Ansatz zu wiederholen. Bei „schwierigen“ Probenmatrices (z.B. Bodenproben, Kot) kann ggf. eine Inhibitionskontrolle durchgeführt werden. Im vorliegenden Projekt wurde für jede DNA-Probe eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Hierbei wird zusätzlich eine/mehrere PCR –Reaktionen mit Proben-DNA und Kontroll-DNA angesetzt. Ist ein Amplifikat mit der Größe entsprechend unten stehender Tabelle nachweisbar, sind in der Reaktion keine Hemmstoffe der PCR vorhanden.

Typ	Fragmentgröße
A	283 bp
B	315 bp
C	290 bp
D	497 bp
E	266 bp
F	332 bp

Ergab sich bei einer Probe der Nachweis eines BoNT-Gens, wurde untersucht, inwieweit das Ergebnis der PCR reproduzierbar war. Hierzu wurde die PCR mit der entsprechenden DNA Präparation 2-mal wiederholt, sowie eine erneute DNA Präparation in der entsprechenden PCR getestet.

Handelte es sich um eine DNA Präparation aus einer Voranreicherung, wurde ggf. eine nochmalige Voranreicherung des Probenmaterials durchgeführt, DNA präpariert und wieder mittels PCR untersucht. Zusätzlich wurden alle DNA Präparationen, die einen BoNT-Gen Nachweis erbrachten, an das Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit der TiHo geschickt und dort ebenfalls untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellungen der wichtigsten Ergebnisse

Maus-Bioassay

Im Maus-Bioassay wurden jeweils 10 Kotproben aus 142 Betrieben untersucht. 139 Betriebe und 1388 Kotproben wurden in die finale Auswertung durch die TiHo einbezogen (3 Betriebe und ein Einzeltier entsprachen nicht den Kriterien für die Studienteilnahme und bei einem Einzeltier war kein Kot vorhanden). Das entspricht einer Gesamtzahl von 1419 bzw. 1388 untersuchten Kotproben.

Einschließlich der erforderlichen Kontrollen wurden 8698 Mäuse (für 1419 Kotproben) bzw. 8512 Mäuse (für 1388 Kotproben) für die Untersuchungen benötigt. Bei keiner der untersuchten Proben war BoNT nachweisbar bzw. ergaben sich Hinweise auf die Anwesenheit von BoNT in der Probe.

Insgesamt verendeten 33 (= 0,39 % von 8512 Tieren) der Versuchstiere mit unspezifischen Symptomen. Dies betraf 13 Versuchstiere, die unbehandelten Extrakt erhielten, 14 der verendeten Tiere erhielten trypsinisierten Extrakt und 6 der verendeten Tiere hatten erhitzten Probenextrakt erhalten.

Insgesamt wurden 4 Proben ein weiteres Mal mittels Maus-Bioassay auf BoNT untersucht - in 3 Fällen, weil insgesamt 2 Tiere des Versuchsansatzes (die Extrakt oder trypsinisierten Extrakt erhielten) verendeten und in einem Fall, weil ein Tier verendet war und aus der dazugehörigen Anreicherung der Probe mittels PCR das BoNT Typ A-Gen nachgewiesen werden konnte.

Bei drei der vier Proben war die Toxizität nicht reproduzierbar. Eine Probe wies eine reproduzierbare Toxizität auf, hier verendeten wiederum 2 Versuchstiere. BoNT spezifische Symptome konnten nicht beobachtet werden. Die PCR Untersuchungen dieser Probe auf BoNT-Gene verlief negativ, d.h. BoNT-Gene A-F ließen sich nicht nachweisen. Aus der DNA Präparation der Kotprobe (ohne Voranreicherung) konnten die Gene für *C. perfringens* α - und ϵ -Toxin nachgewiesen werden. Somit kann vermutet werden, dass der Tod der

Versuchstiere möglicherweise durch *C. perfringens*-Toxine im Extrakt verursacht wurde. Ein Nachweis von *C. perfringens*-Toxinen in der Kotprobe wurde nicht durchgeführt.

In Summe konnte bei keiner der untersuchten Proben BoNT nachgewiesen werden.

PCR

1419 Proben wurden mittels PCR auf die Anwesenheit der BoNT-Gene A bis F untersucht, jedoch wurden 1388 Proben in die finale Auswertung einbezogen (3 Betriebe und ein Einzeltier entsprachen nicht den Kriterien für die Studienteilnahme und bei einem Einzeltier war kein Kot vorhanden). Die PCR-Untersuchung einer Probe umfasste den PCR Nachweis aus dem nativen Probenmaterial sowie den PCR Nachweis nach einer Voranreicherung. Pro Probe wurden also zwei DNA-Extraktionen durchgeführt. Für jede Extraktion wurde jeweils eine PCR (keine Multiplex) für jedes Toxin-Gen A, B, C, D, E, F plus Inhibitionskontrolle durchgeführt (7 Reaktionen). Pro Probe wurden also 2 DNA-Extraktionen und 14 PCR-Reaktionen durchgeführt. Insgesamt entspricht das 2776 DNA-Extraktionen und 19432 PCR-Reaktionen zuzüglich Wiederholungen, die in diesem Teilprojekt durchgeführt wurden.

Durch PCR Untersuchungen konnten bei 5 Proben nach DNA Präparation direkt aus dem Probenmaterial BoNT-Gene nachgewiesen werden (Tabelle1). Bei 2 der Proben war der Nachweis reproduzierbar. Diese Ergebnisse wurden in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 1: PCR-Nachweise von BoNT-Genen aus DNA Präparation (Probenmaterial direkt)

Probennummer	Betrieb (durchnummeriert) + Kategorie (F1/F2/K)	Verdachts- /Kontrolltier	Toxin- Gen	Ergebnisse TiHo (mit FLI-DNA; PCR positiv/negativ)
12S0270	1 – F2	V	A	-
12S0273	1 – F2	K	A	+
12S0291	2 – F2	K	F	+
12S0771	3 – Kontrollbetrieb	V	E	-
14S0139	4 – Kontrollbetrieb	V	F	-

Nicht reproduzierbare Ergebnisse grau hinterlegt; Betriebe zur Anonymisierung durchnummeriert

Die Ergebnisse der PCR Untersuchungen nach Voranreicherung (MCM, anaerob, 30°C, 7 d) sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei 31 Proben gelang der Nachweis eines BoNT-Gens, bei 26 Proben war der Nachweis reproduzierbar, diese Ergebnisse wurden in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 2: PCR-Nachweise von BoNT-Genen aus DNA Präparation nach Voranreicherung

Probennummer	Betrieb (durchnummeriert) + Kategorie (F1/F2/K)	Verdachts- /Kontrolltier	Toxin- Gen	Ergebnisse TiHo (mit FLI-DNA; PCR positiv/negativ)
12S0177	5 – F1	V	A	+
12S0270	1 – F2	V	A	+
12S0274	1 – F2	K	A	+
12S0402	6 – F1	K	B	+
12S0405	6 – F1	K	B	+
12S0406	6 – F1	K	B	+
12S0454	7 – Kontrollbetrieb	V	D	-
12S0463	7 – Kontrollbetrieb	K	D	-
12S0582	8 – F1	V	A	+
12S0607	9 – Kontrollbetrieb	K	A	+
12S0610	9 – Kontrollbetrieb	K	A	+
12S0641	10 – F1	V	A	+
13S0086	11 – F1	K	F	+
13S0527	12 – Kontrollbetrieb	V	F	+
13S0530	12 – Kontrollbetrieb	V	F	+
13S0583	13 – F2	V	A	+
13S0586	13 – F2	V	A	+
13S0587	13 – F2	K	A	+
13S0589	13 – F2	K	A	+
13S0869	14 – F1	V	E	+
13S0900	15 – F1	V	A	+
13S0902	15 – F1	K	A	+
13S0905	15 – F1	K	A	+
13S0969	16 – Kontrollbetrieb	V	A	-
13S0993	17 – F1	K	A	-
14S0059	18 – F2	V	D	+
14S0060	18 – F2	V	D	+
14S0061	18 – F2	V	D	+
14S0065	18 – F2	K	D	+
14S0131	19 – F1	V	A	+
14S0139	4 – Kontrollbetrieb	V	F	-

Nicht reproduzierbare Ergebnisse grau hinterlegt; Betriebe zur Anonymisierung durchnummeriert

Bezogen auf die jeweilige Betriebskategorie – Fall-1-Betrieb, Fall-2-Betrieb, Kontrollbetrieb – können folgende Aussagen getroffen werden.

Für die Kategorie Fall-1-Betrieb: Aus 12 Kotproben konnte nach Voranreicherung BoNT-Gene nachgewiesen werden, auf Betriebsebene waren bei 8 Betrieben BoNT-Gene nachweisbar. Bezogen auf die Kategorie Verdachtstier / Kontrolltier waren bei jeweils 6 Tieren BoNT-Gene nachweisbar.

Für die Kategorie Fall-2-Betrieb: Aus 2 Kotproben konnte direkt, und aus 10 Kotproben nach Voranreicherung BoNT-Gene nachgewiesen werden (insgesamt 12 Kotproben). Auf Betriebsebene waren bei 4 Betrieben BoNT-Gene nachweisbar. Bezogen auf die Kategorie Verdachtstier/ Kontrolltier waren bei jeweils 6 Tieren BoNT-Gene nachweisbar.

Für die Kategorie Kontrollbetrieb: Aus 4 Kotproben konnte nach Voranreicherung BoNT-Gene nachgewiesen werden. Auf Betriebsebene waren bei 2 Betrieben BoNT-Gene nachweisbar. Bezogen auf die Kategorie Verdachtstier/ Kontrolltier waren bei jeweils 2 Tieren BoNT- Gene nachweisbar.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Teilprojekts „Clostridiendiagnostik“ des FLI sind ein wichtiger Beitrag zur Klärung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten chronischer Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und dem Vorkommen von *C. botulinum* und der Bildung von Neurotoxinen besteht.

4. Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Studie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) und dem Friedrich-Loeffler-Institut sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten chronischer Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und dem Vorkommen von *C. botulinum* und der Bildung von Neurotoxinen besteht. Die Rinderklinik der TiHo koordinierte die Studie. Insgesamt wurden 139 Milchviehbetriebe untersucht. Neben Einzeltieruntersuchungen wurde eine umfassende Analyse der Herdensituation durchgeführt und Proben für Laboruntersuchungen genommen. Hierbei wurde auch nach dem Bakterium *C. botulinum* und insbesondere seinem Neurotoxin gesucht. Ein Kernpunkt der Theorie zur Entstehung dieses Krankheitsbildes durch *C. botulinum* ist die Produktion von Neurotoxin durch *C. botulinum* im Darm der betroffenen Rinder. Die labordiagnostische Grundlage der Hypothese „viszeraler“ oder „chronischer“ Botulismus ist der Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin (BoNT) im Kot betroffener Tiere. Daher wurden im Rahmen der Studie insgesamt 1388 Kotproben von Tieren aus betroffenen Betrieben und nicht betroffenen Kontrollbetrieben auf BoNT untersucht. Die Auswahl und Zuordnung der Proben erfolgte durch die TiHo, das FLI übernahm den zuverlässigen Nachweis von BoNT in den

gesammelten Kotproben. Bereits im Vorfeld hatte das FLI zusammen mit Laboren aus verschiedenen Bundesländern aufwendige Vergleichsuntersuchungen für entsprechende Nachweise durchgeführt. Hieraus wurde eine Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin in Rinderkot und Silage entwickelt und in dieser Studie eingesetzt.

Die Untersuchungen der Kotproben ergaben in keiner der untersuchten Kotproben einen Hinweis auf BoNT. Somit kann die Hypothese des „viszeralen“ oder „chronischen“ Botulismus nicht bestätigt werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Die im Teilprojekt geplanten Ziele konnten erreicht werden. Es wurden 1419 Kotproben untersucht, von denen 1388 (aus 139 Betrieben) in die Auswertung einbezogen wurden.

6. Literaturverzeichnis

Akbulut D, Grant KA, McLauchlin J. Improvement in laboratory diagnosis of wound botulism and tetanus among injecting illicit-drug users by use of real-time PCR assays for neurotoxin gene fragments. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4342-8.

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.

Dezfulian M, Hatheway CL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* type A and type B toxins in stool samples of infants with botulism. *J Clin Microbiol.* 1984 Sep;20(3):379-83.

Diabola J., Aue A., Gessler F., Köhler B., Neubauer H., Repp A., Wittstatt U., Seyboldt C., 2013; Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin in Rinderkot und Silage; Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 20. Jahrgang – 2 / 2013 120-123

Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Roh BH, Roman MG, Hall PA, Brown JE. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J Clin Microbiol.* 1993 Sep;31(9):2402-9.

Dong M, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER. Using fluorescent sensors to detect botulinum neurotoxin activity in vitro and in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14701-6.

Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP, Popoff MR. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Jan;61(1):389-92.

Franciosa G, Fenicia L, Caldiani C, Aureli P. PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 1996 Apr;34(4):882-5.

Franciosa G, Ferreira JL, Hatheway CL. Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1911-1917.

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.

Hielm S, Hyytia E, Ridell J, Korkeala H. Detection of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol.* 1996 Aug;31(1-3):357-65.

Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5694-9.

Liu W, Montana V, Chapman ER, Mohideen U, Parpura V. Botulinum toxin type B micromechanosensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:13621-5.

Parpura V, Chapman ER. Detection of botulinum toxins: micromechanical and fluorescence-based sensors. *Croat Med J.* 2005 Aug;46(4):491-7.

Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Feb;72(2):1231-8.

Sharma SK, Whiting RC. Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods. *J Food Prot.* 2005 Jun;68(6):1256-63.

Szabo EA, Pemberton JM, Desmarchelier PM. Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Sep;59(9):3011-20.

Takeshi K, Fujinaga Y, Inoue K, Nakajima H, Oguma K, Ueno T, Sunagawa H, Ohyama T. Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 1996;40(1):5-11.

Thomas RJ. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. *Aust Vet J.* 1991 Mar;68(3):111-3.

Wictome M, Shone CC. Botulinum neurotoxins: mode of action and detection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 1998;27:87S-97S.