

**Entwicklung und Etablierung verschiedener
Nachweisverfahren für *Clostridium botulinum* und
aktiver Toxinnachweis mit ELISA-Verfahren in
unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes sowie
Untersuchungen zur Stabilität der Toxine**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Biologin Daniela Schneider

Bernau, Mai 2013

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Appel
Abteilung Biologische Sicherheit
Bundesinstitut für Risikobewertung

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Rupert Mutzel
Institut für Mikrobiologie
Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 28.05.2013

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Appel für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung der Doktorarbeit am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin.

Herrn Prof. Dr. Mutzel danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung und Erstellung des Zweitgutachtens im Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. Juliane Bräunig für die stets gute Betreuung bedanken und dafür, dass sie mich über all die Jahre stets unterstützt hat und wir immer über neue Ideen reden konnten. Besonders danke ich ihr für das stets sehr gewissenhafte und stundenlange Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Fachgruppe 41 für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei der großen Alex, Ulrike, Jane, Britta, Annette, der kleinen Alex, Gladys und Boga.

Vor allem möchte ich ganz besonders noch einmal Uli danken, die mir stets ein wichtiges Bindeglied zu den Mitarbeitern des BfR war, mir notwendige Informationen gab und immer wusste, wen ich bei welchem Problem anrufen musste.

Ein ganz lieber Dank geht auch an meine Kollegin und Freundin Jane, ohne deren Ideen, Anregungen sowie Hilfe ich bei einigen Methoden und Versuchen ewig geknobbelt hätte. Und natürlich für das stets offene Ohr, bei allen Fragen und missglückten Experimenten sowie für eine Vielzahl schöner persönlicher Gespräche.

Ein liebes Dankeschön auch an Steffie, mit der ich immer über alles reden konnte.

Ein besonderer Dank auch an meine lieben Eltern für die hilfreiche Unterstützung über all die Jahre.

DANKE!!! Es ist vollbracht.

Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	
I	Inhaltsverzeichnis	1
II	Abbildungsverzeichnis	7
III	Tabellenverzeichnis	9
IV	Abkürzungsverzeichnis	11
1	Einleitung	13
1.1	Die Gattung <i>Clostridia</i> - Taxonomie und Eigenschaften	13
1.1.1	<i>Clostridium botulinum</i>	14
1.1.2	Differenzierung	15
1.2	Sporen	17
1.3	Botulinumneurotoxin (BoNT)	20
1.3.1	Aufbau der Botulinumneurotoxine.....	22
1.3.2	Weitere Toxine.....	26
1.4	Nachweismethodik	28
1.5	Erkrankungsbilder beim Menschen	30
1.5.1	Lebensmittelassoziierter Botulismus.....	33
1.5.2	Säuglingsbotulismus.....	36
1.5.3	Wundbotulismus	36
1.5.4	Viszeraler Botulismus	37
1.6	Medizinischer Nutzen	39
1.7	Bioterroristische Relevanz	40
2	Zielsetzung	43

Inhaltsverzeichnis

3	Material und Methoden	44
3.1	Verzeichnis der Materialien	44
3.1.1	Chemikalien und Lösungen	44
3.1.2	Enzyme.....	46
3.1.3	Antikörper	46
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	47
3.1.5	Kits.....	47
3.1.6	Marker, Standards und Ladepuffer	48
3.1.7	Größen des Standardmarkers HyperLadder II.....	48
3.1.8	Bakterien und Primer	49
3.1.8.1	Bakterienstämme.....	49
3.1.8.2	Oligonukleotide	50
3.1.9	Nährmedien	51
3.1.10	Färbelösungen.....	54
3.1.11	Material für den Mäuse-Bioassay	56
3.2	Methoden	57
3.2.1	Kultivierung der Stämme	57
3.2.2	Reaktivierung der Lyophilisate.....	57
3.2.3	Stammhaltung.....	58
3.2.4	Eingesetzte Nährmedien für die Kultivierung.....	58
3.2.5	Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KbE)	58
3.2.6	Sporenerstellung.....	59
3.2.7	Färbeverfahren zur Charakterisierung der Stämme.....	60
3.2.7.1	Gram-Färbung	60
3.2.7.2	Sporenfärbung nach Rakette.....	61
3.2.8	DNA-Extraktion	62
3.2.8.1	RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit.....	62
3.2.8.2	DNeasy® Blood & Tissue Kit.....	64
3.2.8.3	DNA-Extraktion nach Lindström et al., 2001	66
3.2.9	PCR Verfahren - Toxingen Nachweis	66

Inhaltsverzeichnis

3.2.9.1	Single-PCR zur Detektion der Toxintypen A bis F von <i>Clostridium botulinum</i>	68
3.2.9.2	Multiplex-PCR zur Detektion der humanpathogenen Toxingene A, B, E und F von <i>Clostridium botulinum</i>	70
3.2.9.3	PCR zur Unterscheidung der Stämme von <i>Clostridium botulinum</i> in Gruppe I und Gruppe II	71
3.2.10	Detektion spezifischer Amplifikate im Agarosegel	73
3.2.11	Toxinproduktion durch vegetative Zellen von <i>Clostridium botulinum</i>	75
3.2.12	ELISA-Verfahren zum aktiven Toxinnachweis von <i>Clostridium botulinum</i>	76
3.2.13	Mäuse-Bioassay	79
3.2.14	Kontamination der verschiedenen Matrices (Lebensmittel)	82
3.2.14.1	Kontamination mit vegetativen Bakterien oder Sporen.....	84
3.2.14.2	Kontamination der Lebensmittel mit Toxinen von <i>Clostridium botulinum</i>	85
3.2.15	Toxinbildungsfähigkeit vegetativer <i>Clostridium botulinum</i> Kulturen in verschiedenen Lebensmitteln unter Einbeziehung des Matrix Effektes.....	86
3.2.16	Stabilitätsuntersuchungen der humanpathogenen <i>Clostridium botulinum</i> Toxine	86
3.3	Versuchsüberblick	89
3.3.1	Versuchsaufbau.....	89
3.3.2	Eingesetzte Lebensmittel.....	90
4	Ergebnisse	91
4.1	Mikrobiologischer Nachweis der vegetativen Formen von <i>Clostridium botulinum</i>.....	91
4.1.1	Mikrobiologischer Nachweis aus Kulturüberstand	91

Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Nachweis und Keimzahlbestimmung in verschiedenen Lebensmittelmatrizes.....	92
4.2	Sporenerstellung	94
4.3	Testung und Entwicklung geeigneter DNA- Extraktionsverfahren.....	95
4.4	Kontamination verschiedener Lebensmittelmatrizes (Hackfleisch, Bohnen aus Konserven und H-Milch) mit vegetativen Formen und Sporen von <i>Clostridium botulinum</i>	98
4.5	Molekularbiologischer Nachweis von humanpathogenen <i>C. botulinum</i>-Stämmen in verschiedenen Lebensmittelmatrizes.....	99
4.5.1	Multiplex-PCR mit Primern von Lindström et al. zum Nachweis von vegetativen Zellen verschiedener <i>C. botulinum</i> -Stämme in Hackfleisch	100
4.5.2	Single-PCR der Toxintypen A, B, E und F mit Primern von Takeshi et al. zum Nachweis von vegetativen Zellen verschiedener <i>C. botulinum</i> -Stämme in Bohnen und Milch	102
4.5.3	Multiplex-PCR mit Primern von Lindström et al. zum Nachweis von Sporen von <i>C. botulinum</i> -Stämmen in Hackfleisch und Bohnen.	105
4.6	Differenzierungs-PCR für die Unterscheidung in proteolytische und nicht-proteolytische Stämme von <i>C. botulinum</i>	108
4.7	Toxinnachweis von <i>C. botulinum</i> mit Hilfe des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA)	110
4.7.1	Nachweis der Toxine im Kulturüberstand mit dem ELISA und vergleichende Analysen im Mäuse-Bioassay	111
4.7.1.1	Mäuse-Bioassay	111
4.7.1.2	ELISA-Verfahren.....	115

Inhaltsverzeichnis

4.7.2	Nachweis von Toxinen in verschiedenen Lebensmittelmatrizes und Untersuchungen zur Stabilität der Toxine mit Hilfe des ELISA ...	118
4.7.2.1	Untersuchungen zur Stabilität der Toxine in kontaminierter H-Milch	119
4.7.2.2	Untersuchungen zur Stabilität der Toxine in kontaminiertem Corned Beef	122
4.7.2.3	Untersuchungen zur Stabilität der Toxine bei verschiedenen Lagertemperaturen	124
4.8	Toxinproduktion von <i>C. botulinum</i>-Stämmen in verschiedenen Lebensmitteln.....	125
5	Diskussion	127
5.1	Kultivierung und Wachstum von <i>C. botulinum</i>	130
5.1.1	Nährmedien	130
5.1.2	Sporenerstellung.....	131
5.1.3	Toxinherstellung	132
5.1.4	Keimzahlbestimmung	133
5.2	Analyse und Testung geeigneter DNA-Extraktionsverfahren	134
5.3	Testung geeigneter PCR-Verfahren zur Detektion von <i>C. botulinum</i>-Toxingenen in verschiedenen Lebensmittelmatrizes.....	136
5.4	Entwicklung eines Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) zur Bestimmung aktiver Toxine im Kulturüberstand unter Berücksichtigung der Stabilität bei Hitzeeinwirkung.....	139
5.5	Untersuchungen zur Stabilität der Botulinumneurotoxine in verschiedenen Lebensmittelmatrizes	144

Inhaltsverzeichnis

5.5.1	Untersuchungen zur Stabilität der Botulinumneurotoxine unter Einwirkung lebensmittelrelevanter Hitzebehandlungen	146
5.5.2	Untersuchungen zur Stabilität und Lagerfähigkeit der Botulinumneurotoxine bei verschiedenen Temperaturen.....	149
5.6	Toxinproduktion in ausgewählten Lebensmittelmatrizes.....	150
6	Zusammenfassung.....	152
7	Summary.....	156
8	Literaturverzeichnis	160
9	Lebenslauf	186
10	Versicherung	187
11	Anhang.....	188

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Sporulation von <i>C. botulinum</i> Stamm 1944	17
Abb. 2:	Dreidimensionale Struktur des BoNT Typ A	20
Abb. 3:	Funktionsweise der Signalübertragung an den Synapsen der motorischen Endplatten, ohne Botulinumneurotoxine	21
Abb. 4:	Systematische Darstellung des Toxinmoleküls	24
Abb. 5:	Mechanismus an den Synapsen bei einer Botulinumintoxikation	26
Abb. 6:	100 bp DNA-Marker	48
Abb. 7:	Systematischer Aufbau der DNA-Extraktion mit dem RTP Spin Bacteria Mini Kit von Invitek	63
Abb. 8:	Systematischer Aufbau eines Sandwich-ELISA	77
Abb. 9:	Versuchsablauf bei Lebensmittelkontaminationen	84
Abb. 10:	Kolonieform von <i>C. botulinum</i> Toxintyp B, auf einer Schafblutagar-Platte, aus Kulturüberstand gewonnen	92
Abb. 11:	Morphologie von <i>C. botulinum</i> Toxintyp B auf Schafblutagar-Platten, isoliert aus künstlich kontaminiertem Hackfleisch	93
Abb. 12:	Ergebnisse der Sporulationsversuche	94
Abb. 13:	Multiplex-PCR Resultate mit Primern von Lindström et al. (2001) aus kontaminiertem Hackfleisch	100
Abb. 14:	Single-PCR Resultate mit Primern von Takeshi et al. (1996) aus kontaminierten Bohnen und Milch, Toxintyp A	102
Abb. 15:	Single-PCR Resultate mit Primern von Takeshi et al. (1996) aus kontaminierten Bohnen und Milch, Toxintyp B	103
Abb. 16:	Single-PCR Resultate mit Primern von Takeshi et al. (1996) aus kontaminierten Bohnen und Milch, Toxintyp E	104
Abb. 17:	Single-PCR Resultate mit Primern von Takeshi et al. (1996) aus kontaminierten Bohnen und Milch, Toxintyp F	105
Abb. 18:	Multiplex PCR-Verfahren mit Primern von Lindström et al. (2001) zum Nachweis von Sporen in Hackfleisch und Bohnen, Toxintyp A und B	106

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 19:	Multiplex PCR-Verfahren mit Primern von Lindström et al. (2001) zum Nachweis von Sporen in Hackfleisch und Bohnen, Toxintyp E und F	107
Abb. 20:	PCR-Verfahren nach Dahlsten et al. (2008), Anzucht jeweils in Selzer-Bouillon und DRGM	108
Abb. 21:	Standardkurven der verschiedenen Botulinumneurotoxintypen A, B, E und F	115
Abb. 22:	Nachweis von Botulinumtoxin in Milch mit Hilfe des ELISA	119
Abb. 23:	Nachweis von Botulinumtoxin in Corned Beef mit Hilfe des ELISA	122
Abb. 24:	Toxinstabilität bei einer Lagertemperatur von 4 °C über einen Zeitraum von 20 Tagen	124
Abb. 25:	Toxinstabilität bei einer Lagertemperatur von -21 °C über einen Zeitraum von 20 Tagen	125
Abb. 26:	Toxinproduktion verschiedener Stämme von <i>C. botulinum</i> in den Lebensmitteln Bohnen und Corned Beef aus der Konserve	126

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Faktoren für das Wachstum von <i>Clostridium botulinum</i>	15
Tab. 2:	Genomische Lokalisation der wichtigsten bakteriellen Toxine der Gattung <i>Clostridiaceae</i>	17
Tab. 3:	Chemikalien und Lösungen	44
Tab. 4:	Enzyme	46
Tab. 5:	Polyklonale Antikörper vom Kaninchen der Firma Metabiologics	46
Tab. 6:	Verbrauchsmaterialien	47
Tab. 7:	Kits	47
Tab. 8:	Marker, Standards und Ladepuffer	48
Tab. 9:	Verwendete Bakterienstämme	49
Tab. 10:	DNA-Proben vom FLI als Positivkontrolle für die PCR	50
Tab. 11:	Oligonukleotide nach Takeshi et al., 1996	50
Tab. 12:	Oligonukleotide nach Lindström et al., 2001	51
Tab. 13:	Oligonukleotide nach Dahlsten et al., 2008	51
Tab. 14:	Überblick über die Erhitzungsstufen der Lebensmittel- Matrizes für die Untersuchungen der Toxinstabilität von <i>C. botulinum</i> Toxinen	88
Tab. 15:	Umrechnungstabelle zur Toxinbestimmung von Proben zwischen der Mäuseletalen Dosis (MLD) und der Toxinkonzentration in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit der Maus	112
Tab. 16:	Ergebnisse aus dem Mäuse-Bioassay mit den verschiedenen <i>C. botulinum</i> Toxintypen aus Kulturüberstand (unbehandelt und hitzebehandelt)	113
Tab. 17:	Ergebnisse aus dem ELISA-Verfahren mit den verschiedenen Proben (unbehandelt und hitzebehandelt)	116
Tab. 18:	Direkter Vergleich der Ergebnisse von Mäuseassay und ELISA-Ansatz	141

III Tabellenverzeichnis

Tab. 19:	Überblick über verschiedene Literaturangaben zu Temperatur-Zeit-Profilen für die Hitzeinaktivierung der Botulinumtoxine	145
Tab. 20:	Ergebnisse der ELISA-Ansätze bei unterschiedlichen Hitzebehandlungen der verschiedenen <i>Clostridium botulinum</i> Stämme im Lebensmittel Milch	188
Tab. 21:	Ergebnisse der ELISA-Ansätze bei unterschiedlichen Hitzebehandlungen der verschiedenen <i>Clostridium botulinum</i> Stämme im Lebensmittel Corned Beef	189
Tab. 22:	Ergebnisse der ELISA-Ansätze bei der Produktion von Toxinen durch <i>Clostridium botulinum</i> Bakterien in Corned Beef und Bohnen	190

IV Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Aqua dest.	destilliertes Wasser
a _w -Wert	Wasseraktivität
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BGA	Bundesgesundheitsamt
BoNT	Botulinumneurotoxin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
CBI	<i>Clostridium botulinum</i> Isolationsagar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta
CMM	Cooked Meat Medium
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnTP	Desoxyribonukleotide
DRCM	Clostridien Differential Medium (Differential Reinforced Clostridial Medium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
h	Stunde
HRP	horse raddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
kb	Kilobasen
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LM	Lebensmittel
M	Mol

IV Abkürzungsverzeichnis

min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLD	Mäuseletale Dosis
MKBO	Modifizierte Kochfleisch Bouillon
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodekylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TeNT	Tetanusneurotoxin
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin
TPGY	Tryptose-Pepton-Glukose-Hefe-Bouillon
TPGYT	Tryptose-Pepton-Glukose-Hefe-Bouillon mit Trypsin
TYG	Tryptose-Glukose-Hefe-Bouillon
UV	Ultraviolett
V	Volt
ZNB	Zentraler Nährmedienbereich

1 Einleitung

Clostridium botulinum ist ein Intoxikationserreger, der lebensmittelbedingte Erkrankungen verursachen kann.

Die Erkrankung Botulismus mit seinen klinischen Symptomen wurde bereits von dem Mediziner Justinus Kerner (1786-1862) 1820 erstmalig beschrieben (Kerner, 1817, 1820 & 1822). Die eigentliche Identifikation des Erregers gelang aber erst viele Jahre später durch den belgischen Mikrobiologen Emile van Ermengen 1897 (van Ermengen, 1897). Dieser isolierte einen Keim, den er in verdorbenem Schinken nachwies. Botulismus ist als "Wursterkrankung" bekannt, die Namensgebung des Keims erfolgte durch die lateinische Bedeutung für das Wort Wurst „botulus“.

Eine Vielzahl anderer Clostridien-Spezies sind Auslöser von Erkrankungen bei Mensch und Tier, z. B. Gas- oder Rauschbrand, Wundstarrkrampf (Tetanus) und Enterotoxämie (Hatheway, 1990).

1.1 Die Gattung *Clostridia* - Taxonomie und Eigenschaften

Die Familie der *Clostridiaceae* umfasst ca. 150 verschiedene Clostridium-Arten. Es sind etwa 35 pathogene Stämme unter den Clostridien bekannt, wobei 15 von ihnen Toxine produzieren können (Collins und East, 1998, Loch, 2000).

Einige für Mensch und Tier wichtige pathogene Arten sind unter anderem *Clostridium tetani*, der Wundstarrkrampferreger, *Clostridium perfringens*, Ursache für Rauschbrand, *Clostridium septicum*, Erreger des Pararauschbrandes sowie *Clostridium botulinum*, der Verursacher des Botulismus. Obwohl einige dieser Krankheiten heute weitestgehend durch Impfprophylaxe und eine gute klinische Versorgung in Vergessenheit geraten sind, besteht weiterhin umfangreicher Forschungsbedarf im Hinblick auf die

Eigenschaften, Virulenzfaktoren und krankheitsauslösenden Wirkungen der Erreger.

1.1.1 *Clostridium botulinum*

Clostridium (C.) botulinum ist ein grampositives, stäbchenförmiges, obligat anaerob lebendes Bakterium. Die Erreger haben eine Breite von 0,5 bis 2,4 μm und eine Länge von 1,6 bis 22 μm . Die Bakterien können ihren Stoffwechsel nur in einer sauerstofffreien (anaeroben) Atmosphäre aufrecht erhalten. Beim Abbau chemischer Substanzen können sich Gase, wie z. B. Methan bilden.

Die Bakterien sind ubiquitär verbreitet. Sie kommen im Boden, im Sediment von Gewässern (Süß- und Salzwasser), im Magen-Darm-Trakt verschiedenster Tierarten sowie beim Menschen vor. Auch in und auf Pflanzen sowie in Kadavern von Wildvögeln sind sie zu finden (Böhnel und Gessler, 2010).

Über eine mögliche Verbreitung der Keime durch das Ausbringen von Biokompost, Gärrückständen aus der Biogasgewinnung, Jauche oder Gülle als Dünger, durch Mülldeponien oder auch landwirtschaftlich genutzte Überflutungsflächen (Smart et al., 1987; Köhler, 1984; Livesey et al., 2004; Böhnel et al., 2003; Böhnel und Gessler, 2005 & 2010) wird diskutiert.

C. botulinum ist ein peritrich begeißeltes, bewegliches Bakterium. Die Kolonieförmungen auf einer Agarplatte sind rund bis lappig, leicht unregelmäßig und meist erhaben. Der Durchmesser einer Kolonie kann zwischen 1 bis zu 6 mm je nach Gruppe variieren (Cato, 1986; Loch, 2000). Die Kolonien sind meist durchsichtig bis semiopak und können eine grau-weiße Farbe annehmen.

C. botulinum-Stämme zeigen auf bluthaltigen Medien teilweise eine starke β -Hämolyse (Cato, 1986; Popoff, 1995; Collins und East, 1998; Loch, 2000). Dabei produzieren die Bakterien bestimmte Proteine, die Streptolysine O oder S, die durch Abbau oder Lyse der Erythrozyten eine klare Hämolysezona bilden.

1 Einleitung

In Tabelle 1 sind einige wichtige Faktoren für das Wachstum von *C. botulinum*-Stämmen der physiologischen Gruppen I (proteolytisch) und II (nicht-proteolytisch) zu sehen.

Tabelle 1: Faktoren für das Wachstum von *Clostridium botulinum* (Baumgart, 1999; EFSA, 2004)

Wachstumsfaktoren	Gruppe I	Gruppe II
Minimale Temperatur	10-12 °C	3-4 °C
Optimale Temperatur	35-40 °C	28-30 °C
Maximale Temperatur	40-42 °C	34-35 °C
Minimaler pH-Wert	4,6	5,0
Minimaler a_w -Wert	0,94	0,97
max. NaCl-Konzentration (%)	10	5

1.1.2 Differenzierung

Clostridium botulinum ist in der Lage 7 serologisch unterscheidbare Toxine (A, B, C (C₁ & C₂), D, E, F und G) zu produzieren, wobei nur die Toxintypen A, B, E und F humanpathogen sind (Sugiyama, 1980; Hatheway, 1988; Sharma und Whiting, 2005; Popoff und Bouvet, 2009). Die Toxintypen C und D sind als pathogen für Wasser- und Hausgeflügel, Rinder und andere (Haus)-Säugetiere sowie Wildtiere (Rings, 2004; Smart et al., 1987) bekannt. Nach neuesten Erkenntnissen ist die Gruppe der 7 *C. botulinum* Serovare (A-G) in 32 Subtypen und 60-70 Serovare zu untergliedern (Oguma et al., 1980; Simpson, 1981; Smith et al., 2005 & 2007; Franciosa et al., 2006; Chen et al., 2007; Hill et al., 2007; Böhnelt und Gessler, 2010; Raphael et al., 2010; Macdonald et al., 2008 & 2011; Kalb et al., 2012), wobei der Toxintyp A in die Subtypen A1-A6, Toxintyp B in die Typen B1-B7, Toxintyp C in C1 und C/D, Toxintyp D in D und D/C, Toxintyp E in die Typen E1-E8 und Toxintyp F in die Subtypen F1-F7 zu unterteilen ist. Dies erschwert dementsprechend die Detektion der verschiedenen Toxine mit Hilfe eines einzigen Antikörpers, da sich alle Subtypen in ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden.

1 Einleitung

Es gibt andere Clostridien-Arten, die ebenfalls Botulinumtoxine produzieren können. Dazu zählen *C. butyricum*, *C. argentinense* und *C. baratii* (Hall et al., 1985; Aureli et al., 1986; McCroskey et al., 1986; Fenicia et al., 1999).

Man unterscheidet 4 physiologische Gruppen, die Gruppen I bis IV (Holdemann und Brooks, 1970; Smith und Hobbs, 1974; Hutson et al., 1993).

Gruppe I: *Clostridium botulinum* Toxintyp A und proteolytische Stämme von *Clostridium botulinum* Toxintyp B und F, proteolytisch aktiv (Proteinabbau findet intra- und extrazellulär statt; Peptide werden frei gesetzt und Aminosäuren können für die Proteinbiosynthese wieder verwendet werden; keine Säurebildung)

Gruppe II: *Clostridium botulinum* Toxintyp E und glukosidische Stämme von *Clostridium botulinum* Toxintyp B und F; saccharolytische Typen; sehr leichte Versporung

Gruppe III: *Clostridium botulinum* Toxintyp C und D; *Clostridium novyi*; aproteolytisch, teils proteolytisch; fermentieren Glukose und andere Zucker, höheres Wachstumsoptimum bei 45°C

Gruppe IV: *Clostridium botulinum* Toxintyp G und *Clostridium argentinense*; bilden keine Lipasen und fermentieren keine Glukose; selten Sporenbildung; toxische Stämme von *Clostridium butyricum* und *Clostridium baratii*

Es gibt Stämme, die 2 Toxine codieren können (Hathaway und McCroskey, 1987; Franciosa et al., 1997; Kirma et al., 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass es ein aktives und ein passives ruhendes ("silent") Toxingen gibt, z. B. A (B). Dabei wird nur das aktive Toxin A ausgebildet (Franciosa et al., 1994, 1998 & 2004; Kirma et al., 2004; Fujinaga et al., 1995). In anderen Studien wurde aber auch nachgewiesen, dass 2 Toxine produziert werden, z.B. Ab, Af, Ba und Bf, jeweils ein Haupt- und ein Nebentoxin (Lund und Peck, 2000).

Die Toxine A, B, E und F sind chromosomal codiert, während die Gene für die Toxinsubtypen C und D von lysogenen Bakteriophagen codiert werden, die

1 Einleitung

spezifisch für *Clostridium botulinum* sind. Bakteriophagen sind Viren, die sich auf Bakterien als Wirt spezialisiert haben. Das Gen für den Toxintyp G ist als einziges auf einem Plasmid codiert.

Tabelle 2: Genomische Lokalisation der wichtigsten bakteriellen Toxine der Familie *Clostridiaceae* (Popoff, 1995; Dürre, 2005)

Neurotoxischer Organismus	Neurotoxin	Lokalisation des Toxingens
Gruppe I- proteolytisch	A, B, F	Chromosom
Gruppe II- nicht proteolytisch	B, E, F	Chromosom
Gruppe III	C, D	Bakteriophage
Gruppe IV (<i>C. argentinense</i>)	G	Plasmid
<i>C. baratii</i>	F	Chromosom
<i>C. butyricum</i>	E	Chromosom
<i>C. tetani</i>	TeNT	Plasmid

1.2 Sporen

Clostridien sind in der Lage, Endosporen zu bilden und somit das Überleben bei ungünstigen äußeren Bedingungen oder bei Nährstoffmangel zu gewährleisten. Bei *C. botulinum* erfolgt die Sporenbildung subterminal in der vegetativen Zelle und führt zum Auftreiben des Zell-Leibes. Die Form der Sporenbildung wird auch als "Tennisschlägerform" bezeichnet (Abb.1).

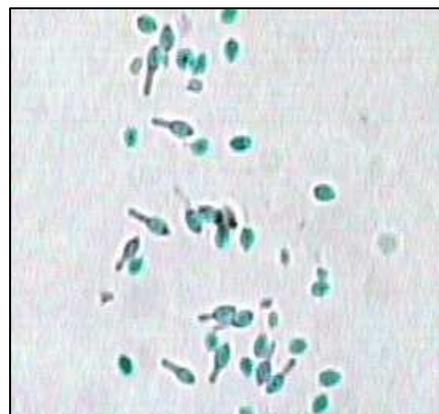


Abb.1: Sporulation von *C. botulinum* Stamm 1944, Toxintyp B, nach 4 Tagen, 1000- fach, Öl

1 Einleitung

Die Bildung von Sporen wird durch eine Vielzahl von äußeren Faktoren beeinflusst und in der vegetativen Zelle unter ungünstigen Umwelteinflüssen (H₂O Mangel, Hitze, pH-Wert (minimaler akzeptabler pH-Wert 4,6; Smith und Sugiyama, 1988), O₂-Überschuss, toxische Substanzen, Alterung etc.) ausgelöst.

In mehreren Studien wurde belegt, dass ein Sporulationsmedium mit einer bestimmten Zusammensetzung die Sporulation der Bakterien fördert. Vor allem die Zugabe von Trypticase, Pepton und Glukose (Sonnenschein, 1980), aber auch die Verwendung von Hefeextrakt (Tsuji und Perkins, 1962; Anellis et al., 1972; Roberts, 1965; Segner et al., 1966, 1971a und b; Durban et al., 1974; Roberts und Smart, 1974) steigert die Sporenbildung.

Des Weiteren sind die Zugabe von Arginin (Perkins und Tsuji, 1962) und frischen oder getrockneten Fleischpartikeln (Ohye und Scott, 1953), Natriumthioglykolat (Roberts, 1965), Ammoniumsulfat und L-Cysteinhydrochlorid (Roberts und Smart, 1974) sowie Kaliumdihydrogenphosphat und Natriumbicarbonat (Anellis et al., 1972) entscheidend. Optimale Temperaturen für die Sporenbildung wurden von Ohye und Scott (1953 & 1957) mit 25-30 °C angegeben. Eine kurze Hitzeaktivierung der vegetativen Zellen für 10 Minuten bei 80 °C für Vertreter der Gruppe I und 70 °C für die Gruppe II sind weitere Maßnahmen zur gesteigerten Sporenbildung (Smith und Sugiyama, 1988; Peck et al., 1995; Yang et al., 2009).

In den gebildeten Sporen findet wenig Stoffwechselaktivität statt und durch den Entzug von Wasser und die Bildung einer inneren (Zellwand) und äußeren (Sporenhülle) Zytoplasmamembran sind diese sehr widerstandsfähig (Gould, 2000). Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die Sporenrinde (Cortex), welche aus Mucopeptiden (muranischen Säuren und Diaminopicolinsäure) besteht. Während der Sporenbildung kommt es zu einem Überschuss an Calciumionen, einer Häufung von löslichen Sporenproteinen und zur Dipicolinsäurebildung. Dieser Prozess führt dann zur Wasserreduktion und dementsprechend zur Volumenabnahme der gesamten vegetativen Zelle (Russell, 1990). Da die Sporen die gesamte Trockensubstanz der vegetativen

1 Einleitung

Zelle beinhalten, aber wesentlich kleiner sind, weisen sie einen sehr hohen Brechungsindex auf (Sojka, 1996). Dieser ist ebenfalls ein Grad für die Hitzeresistenz (Seidel, 1992; Madigan et al., 2001).

In ihrer Sporenform ist es den Bakterien möglich, über mehrere Jahrzehnte hinweg zu existieren und sich bei passenden Lebensbedingungen wieder in ihre vegetative Form umzuwandeln und die potenten Botulinumneurotoxine zu bilden. Die anschließende Freisetzung der Toxine erfolgt durch Zell-Lyse (Simpson, 1981; Sakaguchi, 1983, Foster und Wynne, 1948).

Die Reaktivierung oder Auskeimung (Germination) erfolgt in mehreren Schritten:

- **Aktivierung** der ruhenden Spore, z. B. durch subletale Temperaturen, Strahlung, extreme pH-Werte (Strasidine, 1967)
- **Keimung** durch die Zugabe von L-Alanin oder Adenosin (Hashimoto et al., 1969). Es kommt zum Verlust der Dipicolinsäure, gefolgt vom Abbau der Sporenproteine und dem Verlust der lichtbrechenden Eigenschaften (Foster & Johnstone, 1990) und der Hitzeresistenz, gefolgt von der Bildung lytischer Cortexenzyme
- **Auswachsen**, Zunahme des Zellvolumens durch Wasseraufnahme, Aktivierung des Stoffwechsels mit Synthese von RNA und weiteren Proteinen

1.3 Botulinumneurotoxin (BoNT)

Clostridium botulinum-Stämme produzieren verschiedene immunologische Neurotoxine (BoNT A-G, Exotoxine), welche die Abgabe von Acetylcholin an den neuromuskulären Verbindungen und Synapsen verhindern und blockieren (Lacy und Stevens, 1999; Hanson und Stevens, 2002; Schiavo et al., 2000).

Die dreidimensionale Struktur des BoNT wurde von Lacy et al. (1998) untersucht und in einem Modell dargestellt (Abb.2).

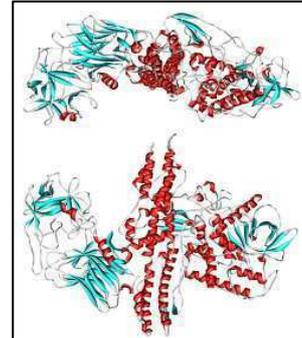


Abb.2: Dreidimensionale Struktur des BoNT Typ A, Stamm PDB 3BTA (Lacy et al., 1998)

Bei allen toxinbildenden Bakterienarten, auch außerhalb der Familie der *Clostridiaceae*, werden 3 Gruppen von Exotoxinen unterschieden:

- zytolytische Toxine: ihr enzymatischer Angriff auf die Bestandteile von Zellen führt zur Lyse
- A-B Toxinfragmente: bestehen aus 2 kovalent verknüpften Untereinheiten A und B, B bindet an Zelloberflächenrezeptor, wobei A dann durch die Membran in die Zielzelle eindringen und seine toxische Wirkung entfalten kann
- Superantigene: wirken durch die Stimulierung einer großen Anzahl von Immunzellen, was zu ausgedehnten entzündlichen Reaktionen im Wirt führt

Bei *C. botulinum* handelt es sich um Toxine mit A-B-Fragment, welche die stärksten bekannten biologischen Gifte überhaupt darstellen.

Die Toxine gelangen über das Blut zu den cholinergischen Nervenfasern. Dazu zählen die parasympathischen, die präganglionären sympathischen und die

1 Einleitung

motorischen Nervenfasern. Die Übertragung von Impulsen erfolgt von einem Neuron auf ein anderes oder von der Nervenendigung direkt auf das Erfolgsorgan durch den Neurotransmitter-Botenstoff Acetylcholin (siehe Abb. 3). Der erste Schritt einer Intoxikation beginnt mit der Kontaktaufnahme zu einem spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche. Die Anwesenheit oder das Fehlen solcher Rezeptoren ist entscheidend für die Vergiftung eines Individuums. Letztlich ist die Interaktion der Toxine mit dem Rezeptor der Schlüsselprozess, der in Folge eine Intoxikation nach sich zieht.

Das Bruchstück B vermittelt die spezifische Bindung des Toxins an den Rezeptor der Wirtszelle, welche sich an den motorischen Endplatten befinden. Nach dem Kontakt mit der Wirtszelle erfolgt die proteolytische Spaltung des Fragmentes A, das in das Cytoplasma der Wirtszelle eindringt.

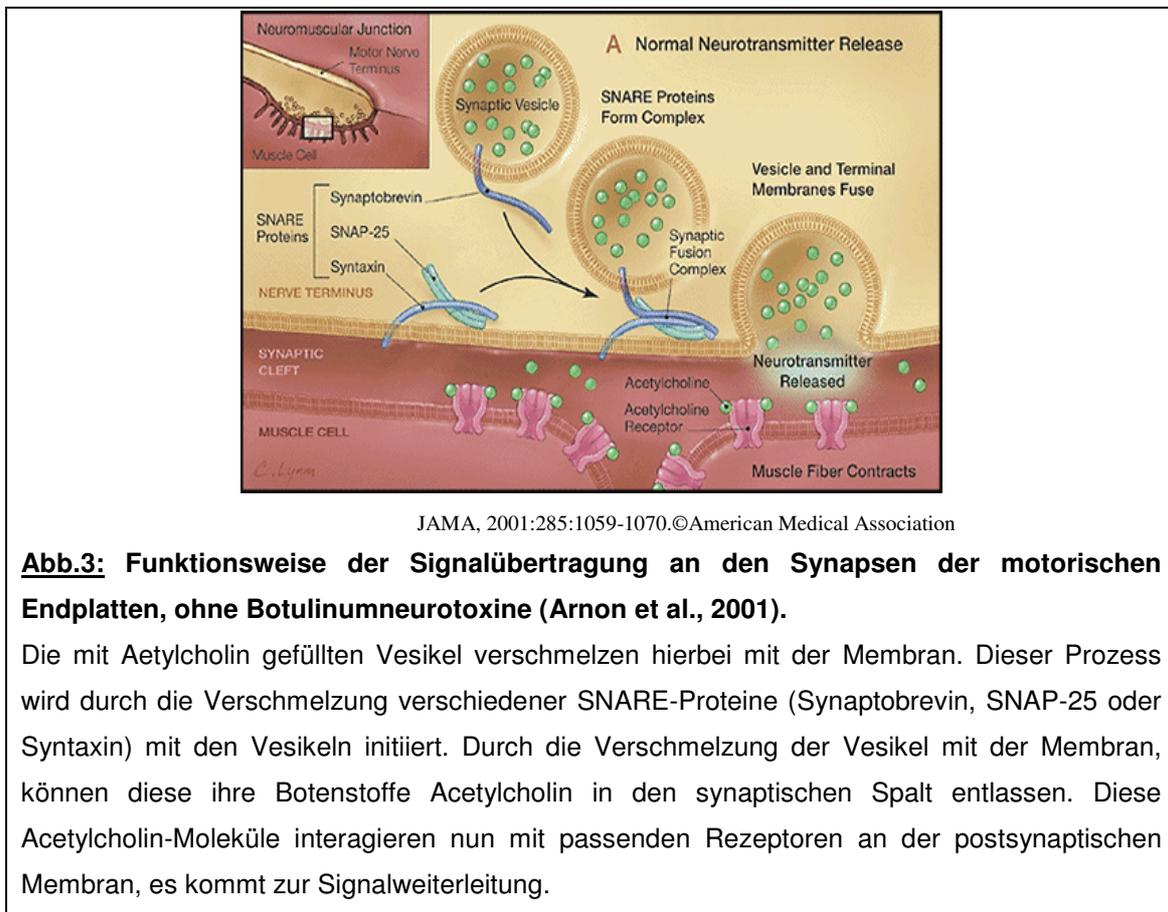


Abb.3: Funktionsweise der Signalübertragung an den Synapsen der motorischen Endplatten, ohne Botulinumneurotoxine (Arnon et al., 2001).

Die mit Acetylcholin gefüllten Vesikel verschmelzen hierbei mit der Membran. Dieser Prozess wird durch die Verschmelzung verschiedener SNARE-Proteine (Synaptobrevin, SNAP-25 oder Syntaxin) mit den Vesikeln initiiert. Durch die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran, können diese ihre Botenstoffe Acetylcholin in den synaptischen Spalt entlassen. Diese Acetylcholin-Moleküle interagieren nun mit passenden Rezeptoren an der postsynaptischen Membran, es kommt zur Signalweiterleitung.

Durch das Botulinumtoxin wird die Freisetzung des Acetylcholins am neuronalen Synapsenabschnitt gehemmt (Brunger et al., 2008), wobei die Impulsleitung und die postsynaptische Erregbarkeit der Muskelfasern erhalten

bleibt (Burgen et al., 1949; Harris und Miledi, 1971). Dies führt dann zu den Krankheitssymptomen einer Botulinumintoxikation mit Lähmungserscheinungen der Hirnnerven, sowie einer absteigenden Paralyse der Extremitäten und der Atemmuskulatur.

1.3.1 Aufbau der Botulinumneurotoxine

In einer Vielzahl von Studien wurden Untersuchungen zu den verschiedenen Clostridien Toxinen durchgeführt, z. B.: Boroff et al., 1952; Simpson, 1986; Hatheway & Ferreira, 1996; Fujinaga et al., 2000 & 2009; Dürre, 2005; Chai et al., 2006; Dembek et al., 2007; Chen et al., 2007 etc. .

Botulinumtoxine sind sehr große Proteinkomplexe, die aus einer toxischen und einer nicht-toxischen Komponente zusammengesetzt sind (Cai et al., 1999; Inoue et al., 1996), diese Besonderheit nennt man "Progenitortoxin" (Vorläufermolekül des Toxins). Die an das Neurotoxin assoziierten Proteine schützen die eigentlichen Toxine vor schädlichen Einflüssen, z. B. vor der Magensäure im menschlichen Organismus oder vor Proteasen. Auch für die Stabilität des gesamten Toxins sind die assoziierten Proteine wichtig (Sakaguchi, 1983).

BoNT bestehen aus einer toxischen Neurotoxinkomponente und aus bis zu 7 verschiedenen nichttoxischen Komponenten (NAPs - neurotoxin-associated proteins) (Oguma et al., 1995; Inoue et al., 1996; Sugiyama, 1980). Diese NAPs bestehen aus einer nichttoxischen, nichthämagglutinierenden (NTNH) Komponente und vielen verschiedenen hämagglutinierenden Bestandteilen (HAs) (Fujinaga et al., 1997, 2000, 2004, 2009 & 2010; Cai et al., 1999; Inoue et al., 1996).

Botulinumneurotoxine bilden mit den verschiedenen nicht-toxischen Komponenten (NTNH & HA) den BoNT Komplex (Progenitortoxin).

1 Einleitung

Es wurden 3 verschiedene Progenitortoxine mit einer Größe von 300 kDa (12S), 500 kDa (16S) und 900 kDa (19S) identifiziert (Inoue et al., 1996, Jacob, 2003):

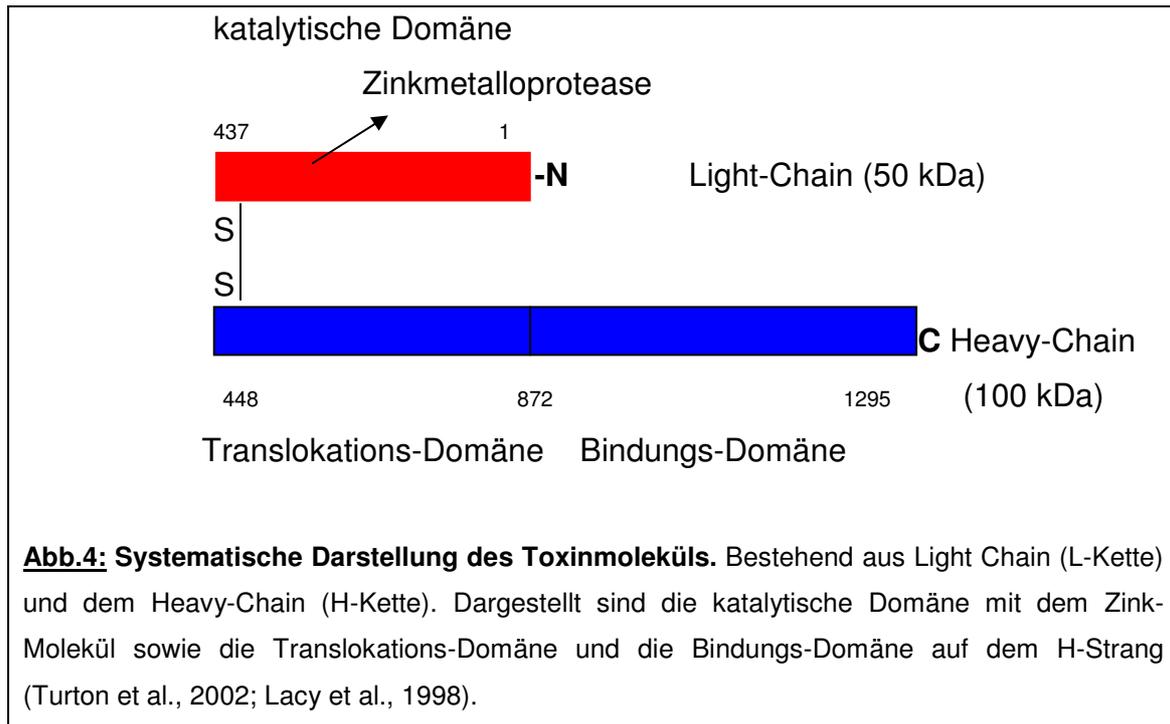
- 300 kDa (12S): - Fragment aus je einem Molekül Neurotoxin und nichttoxischem, nichthämagglutinierendem Protein
- 500 kDa (16S): - Fragment aus je einem Molekül Neurotoxin, nichttoxischem, nichthämagglutinierendem Protein und 2 Molekülen Hämagglutinin
- 900 kDa (19S): - Fragment, Dimer des 500 kDa-Toxins

Botulinumtoxine werden als Einzelstrang-Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 150 kDa synthetisiert (Simpson, 1981; Sakaguchi, 1983; Hatheway, 1990; Lacy und Stevens, 1999). Einige toxinbildende Organismen besitzen eine Protease, welche das Molekül in einen zweikettigen Strang umknicken kann. Diese 2 Ketten, eine leichte (Light Chain, L-Kette, 50 kDa) und eine schwere Kette (Heavy Chain, H-Kette, 100 kDa), sind durch eine Disulfidbrücke verbunden (siehe Abb. 4) (Singh, 2000). Die 2-kettige Konformation der Toxine ist die aktive Form.

Die Toxine bestehen aus 3 verschiedenen Strukturen (Turton et al., 2002; Lacy et al., 1998):

- die **L-Kette** ist aus einer α -Helix und einem β -Strang aufgebaut und enthält die katalytische Link-Bindungsdomäne
- der N-terminale Teil des **H-Stranges**, besteht aus 2 ungewöhnlich langen und gedrehten α -Helices
- das C-terminale Ende des **H-Stranges**, besteht aus 2 deutlichen Unterdomänen, die an der Rezeptorerkennung beteiligt sind

1 Einleitung



Die schwere Kette dockt an die Synapse mit ihrer Rezeptordomäne an, es kommt zur Aufnahme des Toxins in die Vesikel der neuromuskulären Synapse. In dieser wird der zweite Teil der schweren Kette, die Translokationsdomäne, aktiv und sorgt dafür, dass die leichte Kette ins Cytoplasma abgegeben wird. Die leichte Kette des Toxins kann mit ihrer Zink-abhängigen Metalloproteinase die verschiedenen SNARE-Strukturproteine in der Synapse zerstören (Montecucco und Schiavo, 1994 & 1995; Baldwin et al., 2004 & 2005; Simpson et al., 2001). Dadurch wird die Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran verhindert und die damit verbundene Ausschüttung des Acetylcholins in den synaptischen Spalt (Li und Singh, 1999; Simpson, 2004; Montecucco und Molgo, 2005; Singh, 2006). Dies führt dann zum Krankheitsbild einer Botulinumintoxikation mit Lähmungserscheinungen, häufig mit Todesfolge. Den molekularen Mechanismus einer BoNT Interaktion mit den motorischen Endplatten oder Synapsen kann man in 3 Schritte aufteilen (Simpson, 1981; Singh, 2006; Simpson, 2004; Simpson et al., 2004b; Li und Singh, 1999; Montecucco und Schiavo, 1994 & 1995):

1 Einleitung

- **Extrazellulärer Schritt:** das Persistieren des Toxins an der Zelloberfläche und das Auslösen lokaler Aktivitäten (Rezeptorbindung, Porenformation, enzymatische Degradierung von bestimmten Membran-Komponenten)
- **Internalisierung und Translokation:** anschließende intrazelluläre Bewegung und Austausch von Stoffen, die Toxine werden durch Endozytose in das Zytosol der Nervenendigungen aufgenommen
- **Intrazellulärer Schritt:** im Zytosol befindet sich eine Zn^{2+} abhängige Endopeptidase (L-chain), die die Neurotransmitterfreigabe durch z. B. Spaltung der SNARE Proteine inhibiert

BoNTs spalten eines der 3 Mitglieder des SNARE-Protein-Komplexes im Zytoplasma. SNARE-Proteine (**s**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive-factor **a**ttachment **r**eceptor) sind Proteinkomplexe in Vesikeln von Zellen (Montecucco und Schiavo, 1995; Singh, 2006; Simpson, 2004). SNARE-Komplexe katalysieren bei der Fusion von biologischen Membranen den Transport von Molekülen in den Vesikeln. Bei Menschen gibt es insgesamt 9 verschiedene SNARE Proteine: Synaptobrevin-1 und 2, Syntaxin-1A und -4, Snapin, SNAP-23 und -25, Endobrevon sowie das Vesikelfusionsprotein NSF. Diese Proteine können eine Vielzahl von verschiedenen SNARE-Komplexen bilden (Arnon et al., 2001).

BoNT Typ B, D, F und G spalten Synaptobrevin (oder VAMP- Vesicular associated membrane protein) (Schiavo et al., 1992 & 1993, BoNT Typ A und E schneiden SNAP25 (Blasi et al., 1993, Binz et al., 1994), und BoNT Typ C1 spaltet SNAP25 und Syntaxin (Das Gupta und Sugiyama, 1972; Ohishi und Sakaguchi, 1977; Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1995; Ekong et al., 1997). Die Schnittstellen sind für jedes Neurotoxin anders. Die Spaltung erfolgt bei Botulinumtoxinen der proteolytischen Gruppe I durch endogene Enzyme. Bei den nicht-proteolytischen Stämmen der Gruppe II wird eine externe Protease benötigt, dies ist im Gastrointestinaltrakt das Trypsin (Duff et al., 1956; Das Gupta und Sugiyama, 1972).

1 Einleitung

Durch die Spaltung der SNARE-Proteine wird die Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran verhindert und die damit verbundene Ausschüttung des Acetylcholins in den synaptischen Spalt unterdrückt (Singh, 2006) (Abb.5).

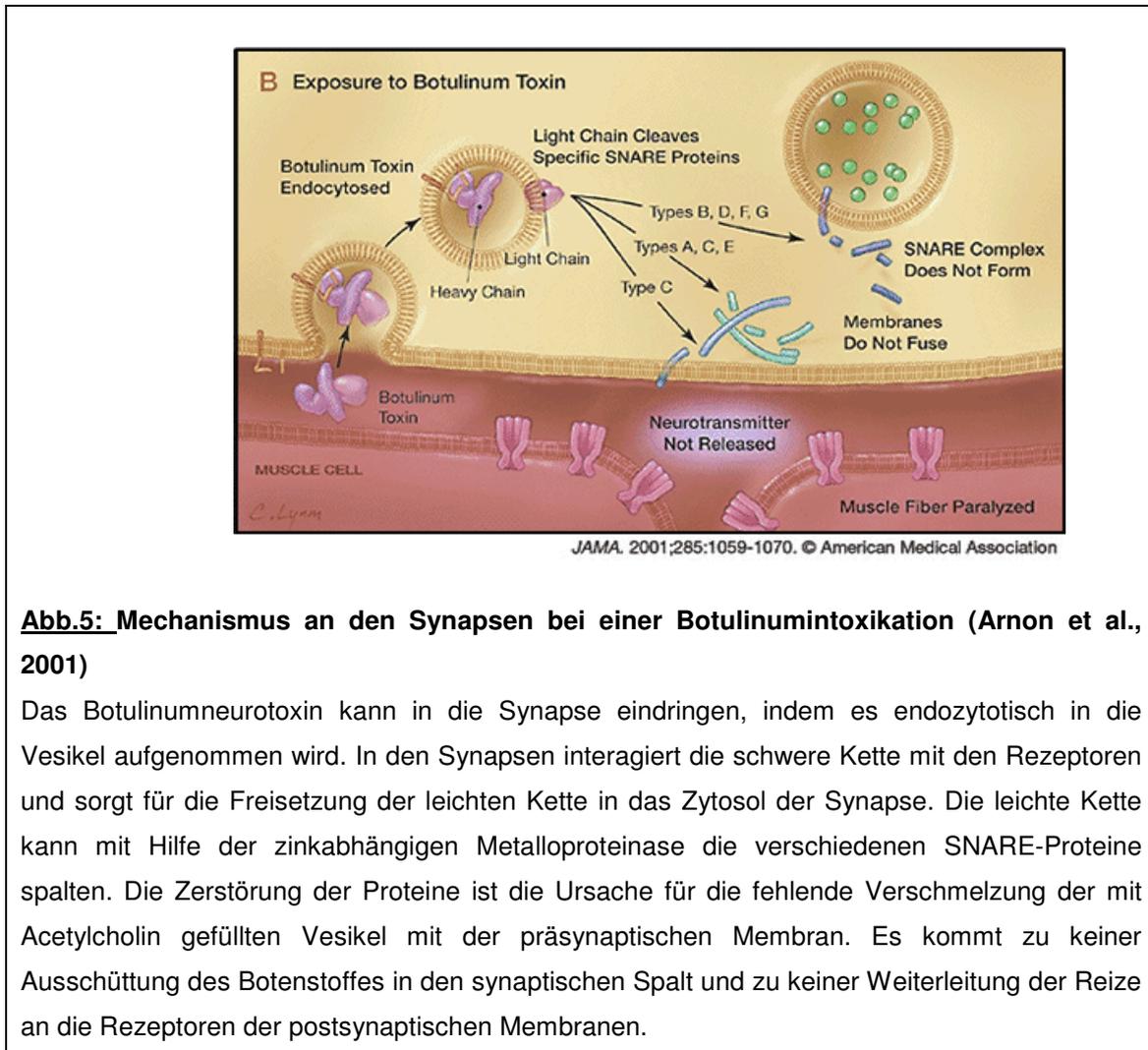


Abb.5: Mechanismus an den Synapsen bei einer Botulinumintoxikation (Arnon et al., 2001)

Das Botulinumneurotoxin kann in die Synapse eindringen, indem es endozytotisch in die Vesikel aufgenommen wird. In den Synapsen interagiert die schwere Kette mit den Rezeptoren und sorgt für die Freisetzung der leichten Kette in das Zytosol der Synapse. Die leichte Kette kann mit Hilfe der zinkabhängigen Metalloproteinase die verschiedenen SNARE-Proteine spalten. Die Zerstörung der Proteine ist die Ursache für die fehlende Verschmelzung der mit Acetylcholin gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Es kommt zu keiner Ausschüttung des Botenstoffes in den synaptischen Spalt und zu keiner Weiterleitung der Reize an die Rezeptoren der postsynaptischen Membranen.

1.3.2 Weitere Toxine

C₂ Toxin

Der Toxintyp C kann in zwei Gruppen, C alpha und C beta, unterteilt werden, wobei C alpha zwei Toxineinheiten (C₁ und C₂) produzieren kann. Die Gruppe C beta kann nur das C₂-Toxin produzieren. C alpha-Stämme können auch kleine Mengen des Toxintyps D herstellen und D-Toxintypen können ebenfalls kleine

1 Einleitung

Mengen an C₁-Toxinen synthetisieren (Eklund und Poysky, 1972, Oguma et al., 1980 & 1984).

Das C₂-Toxin wird von *Clostridium botulinum* Typ C und D Stämmen gebildet und besitzt keine neurotoxischen (paralytischen) Eigenschaften. Es wird deshalb zu den zytotoxischen Enterotoxinen gezählt (Ohishi et al., 1977, 1981, & 1984a).

Dieses Enterotoxin hat Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität der Zellen, weil es die Aktinfilamente in der Zelle zerstört und zur Vakuolbildung führt (Ohishi, 1983). Auf Grund dieses Prozesses kommt es zu interzellulären Ödemen, Nekrosen der Mukosa sowie Flüssigkeitsansammlungen im Darm (Simpson, 1982; Ohishi und Odagiri, 1984c),

Das Toxin liegt nicht auf einem Phagen, sondern auf dem Bakterienzellgenom, es besteht aus einer leichten und einer schweren Kette: C₂-I (50 kDa) und C₂-II (105 kDa). C₂-I ist eine ADP-Ribosyltransferase, die zelluläres, nicht muskuläres G Aktin ribosyliert und zur Verhinderung der Aktinpolymerisation führt. Das Mikrofilamentgerüst wird nicht polymerisiert, was zu einem Stabilitätsverlust führt. C₂-Toxine haben hämagglutinierende Eigenschaften und vermitteln eine Internalisation der ersten Komponenten in die Zelle. Dies erhöht die vaskuläre Permeabilität, verursacht Hämorrhagien und Ödeme auf der Zunge und hat hypotone Effekte. In einer Veröffentlichung weisen Nakamura et al. (1977) nach, dass das Toxin nur während der Sporulation gebildet wird.

Exoenzym C₃

Clostridium botulinum C und D besitzen eine ADP-Ribosyltransferase, welche enzymatische Aktivität aufweist, sie wird als C₃ Exoenzym bezeichnet (Aktories et al., 1987). Dieses Toxingen ist auf dem gleichen Bakteriophagen lokalisiert, wie BoNT Typ C₁ und BoNT Toxintyp D. Es ist eine einfache Peptidkette von 26 kDa. Das Exoenzym katalysiert die Ribosylierung eines kleinen GTP-bindenden Proteins Rho und, weniger ausgeprägt, auch des Rac Proteins. Die zytotoxische Wirkung ist gering und als Virulenzfaktor bei einer Erkrankung bisher unbekannt (Popoff, 1995).

Bakteriozinbildung

Bakteriozine sind hochspezifisch wirkende Proteine, die von grampositiven und gramnegativen Bakterien gebildet werden können. Sie sind in der Lage die Toxinbildung, aber auch das Wachstum anderer Stämme derselben oder ähnlicher Bakterienarten zu inhibieren.

Mehrere Untersuchungsergebnisse wurden veröffentlicht, die zeigen, dass *C. botulinum*-Stämme Bakteriozine bilden können (Reeves, 1965; Ellison und Kautter, 1970, Ellison et al., 1971). Diese Stoffe können das Wachstum und die Toxinbildungsfähigkeiten anderer Stämme derselben Spezies hemmen. Einige Veröffentlichung belegen, dass ein ein Stamm des Toxintyps E, der kein Toxin ausgebildet hat, einen Stoff produziert, der Stämme mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften im Wachstum hemmen kann (Kautter et al., 1966). Auch in Stämmen vom Toxintyp G konnten solche Bakteriozine durch Eklund et al. (1988) nachgewiesen werden.

1.4 Nachweismethodik

Es gibt bereits eine Vielzahl von verschiedenen Studien und Veröffentlichungen zum Nachweis der aktiven Toxine mit einem breiten Methodenspektrum in einer Veröffentlichung von Dorner et al. (2013) werden diese teilweise analysiert.

Dazu zählen Endopeptidase Assays (Wang et al., 2010) oder ähnliche Nachweistechiken, wobei die Spaltung einer bestimmten Proteinsequenz in ein auswertbares Signal umgewandelt wird (Wictome und Shone, 1998; Liu et al., 2003; Dong et al., 2004; Parpura und Chatman, 2005).

Auch quantitative Real-Time PCR-Systeme (Akbulut et al., 2004 & 2005; Shin et al., 2006; Chen et al., 2008; Fach et al., 2009; Kirchner et al., 2010; Fencia et al., 2007), DNA Microarrays (Raphael et al., 2010), Untersuchungen mit Mäuse-Stammzellen (Pellett et al., 2010) oder Zwerchfellen von Mäusen (Dressler et al., 2005), Immunochromatografie (Gessler et al., 1998 & 2005; Brunt et al., 2010; Franciosa et al., 2004) und ELISA Systeme bzw. Enzymassays (Doellgast et al., 1993; Cadieux et al., 2005; Sharma et al., 2006;

1 Einleitung

Ganapathy et al., 2008; Chiao et al., 2008; Grate et al., 2009; Ozanich et al., 2009; Poras et al., 2009; Scotcher et al., 2010; Gessler et al., 2007; Volland et al., 2008; Thomas, 1991) finden als Nachweismethoden für BoNT Verwendung. Eine Methode von Fach et al. (2010) beschäftigt sich mit der Identifikation der verschiedenen Toxintypen mit Hilfe eines Gene Disc Cyclers. In einer Arbeit von Gessler et al. (2006) wurden mit Hilfe von immunomagnetischen Beads verschiedene Toxine der Typen C und D detektiert.

In einer Studie von Sharma et al. aus dem Jahr 2006 wird ein ELISA-Verfahren beschrieben. Diese Veröffentlichung diente als Grundlage für die hier durchgeführten Arbeiten. Aber auch in anderen Veröffentlichungen wurden ELISA-Systeme entwickelt, wie z. B. bei Dezfulian et al. (1984), Doellgast et al. (1993 & 1997), Dezfulian und Bartlett (1991); Brooks et al. (2010), Scotcher et al. (2010), Brooks et al. (2011) und Chiao et al. (2008). Alle diese Systeme sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut. Zur Detektion der aktiven Botulinumtoxine werden spezifische Antikörper gegen die einzelnen Toxintypen verwendet. Es wird versucht diese mit Hilfe eines zweiten Antikörpers und einer anschließenden Farbreaktion quantitativ bestimmen zu können.

Dennoch gilt der Mäuse-Bioassay aus der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) bis zum heutigen Zeitpunkt als Goldstandard für den Nachweis von aktiven Botulinumtoxinen (Holdemann et al., 1977; Wictome und Shone, 1998; Sharma und Whiting, 2005; Parpura und Chapman, 2005). Die hohe Sensitivität und die eindeutige Identifizierung der einzelnen Toxintypen mittels des Neutralisationstestes beim Tierversuch konnten bisher mit keiner anderen Methode so effektiv durchgeführt werden. In einer Studie von Adler et al. (2010) werden aber eine Vielzahl von Ersatzmethoden für den LD₅₀ Test aufgeführt.

Der Nachweis der Toxingene von *C. botulinum* erfolgt bei den meisten Veröffentlichung ebenso mit Hilfe von PCR-Verfahren, so z. B.: von Dahlenborg

1 Einleitung

et al. (2001), Fach et al. (1993 & 1995), Szabo et al. (1993 & 1994), Dahlsten et al. (2008), De Medici et al. (2009), Shin et al. (2007), Prevot et al. (2007), Franciosa et al. (1994, 1996 & 1998), Takeshi et al. (1996), Alsallmi und Kotlowski (2001), Lindström et al. (2001) und Hielm et al. (1996).

Die neuesten Entwicklungen in der Detektion der Botulinumtoxine beschäftigen sich mit dem Nachweis durch eine Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (time of flight-TOF). Dieses MALDI-TOF Verfahren wurde bereits von Kull et al. (2010), Boyer et al. (2011), Alam et al. (2012) und Drevinek et al. (2012) angewendet.

1.5 **Erkrankungsbilder beim Menschen**

Eine Erkrankung beim Menschen durch den Erreger *Clostridium botulinum* wird durch die Toxintypen A, B, E und F ausgelöst. Die Toxintypen C und D kommen bei Tieren vor und sind bisher für den Menschen nur sehr selten als Erkrankungsursache beschrieben worden. Der Toxintyp G ist bis heute noch nicht als Verursacher von Krankheiten aufgetreten.

Eine Intoxikation mit dem Erreger führt meist nach 12-72 h (lebensmittelbedingt) zu ersten Symptomen, die Zeitspanne ist dabei dosisabhängig. Beim Wundbotulismus kann es bis zu 14 Tage dauern, ehe die ersten Symptome auftreten. Die bis zum heutigen Zeitpunkt offiziell untersuchten drei Fälle von Inhalationsbotulismus hatten eine Inkubationszeit von 72 h. Diese Fälle sind in wissenschaftlichen Forschungseinrichtungen, z. B. beim Kontakt mit kontaminierten Tieren aufgetreten (Holzer, 1962). Die Letalitätsrate beträgt ca. 3-10% beim Lebensmittelbotulismus und 15% beim Wundbotulismus (Shapiro et al., 1998; Sobel, 2005).

Eine Intoxikation mit Botulinumneurotoxinen ist durch eine akute, afebrile, symmetrische und absteigende Lähmung charakterisiert (Franz et al., 1997).

1 Einleitung

Als erste Krankheitssymptome treten vor allem Übelkeit, Erbrechen und Krämpfe im Gastrointestinaltrakt sowie Schwindel und allgemeines Unwohlsein auf. Weitere Indikatoren für eine Erkrankung sind Mundtrockenheit, Diplopie (Sehstörungen, Schielen oder Doppelbilder), Dysarthrie (Sprachbeschwerden, Lispeln) und Dysphonie (Stimmstörung, Artikulations- und Kommunikationsprobleme) sowie Dysphagie (Schluckbeschwerden) der Patienten. Ursache dieser Symptome ist die symmetrische Lähmung der Hirnnerven, die für jede dieser Bewegungen und Muskelkontraktionen entscheidend sind (Cai et al., 2007; Dembek et al. 2007; Franz et al., 1997, CIDRAP, 2007; CDC Homepage)

Der weitere Verlauf der Krankheit ist charakterisiert durch eine absteigende schlaffe Lähmung, welche eine Abschwächung und Erschlaffung der Extremitäten, Beeinflussung des Herz-Kreislaufsystems und letztendlich eine Atemwegs-Obstruktion oder eine Lähmung der Atemmuskulatur der Betroffenen bewirkt.

Wenn 3/4 aller Rezeptoren der motorischen Endplatten mit dem BoNT besetzt sind, ist eine Behandlung des Menschen unwirksam und der Tod ist unausweichlich.

Eine eindeutige Diagnose erfolgt meist nur durch eine intensive Anamnese des Patienten und die Ergebnisse der klinischen Befunde.

Die Falldefinition einer Botulismus-Erkrankung wurde vom Robert Koch-Institut in Berlin mit folgenden Kriterien festgelegt:

- Hirnnervenstörung, z. B. Ptosis (Herabhängen des Oberlids), Sehstörungen (Doppelbilder), Schluckstörungen,
- innerhalb weniger Tage fortschreitende, symmetrische, absteigende schlaffe Lähmung,
- Dyspnoe (Atemstörung),
- Erbrechen,
- Übelkeit,
- Bauchschmerzen.

Die Gabe von Botulismus-Antitoxinen ist nur in einem möglichst frühen Stadium der Erkrankung hilfreich. Antitoxine werden aus Pferdeseren gewonnen und

1 Einleitung

sind gereinigte, modifizierte und konzentrierte Lösungen aus Immunoglobulinen vom Pferd mit Antikörpern gegen die verschiedenen Toxintypen (Shapiro et al., 1997).

In Deutschland und der Schweiz wird ein trivalentes equines "Botulismus Antitoxin Behring" (Novartis Behring, 2006) gegen die Toxintypen A, B und E verabreicht.

Ein Antitoxin kann nur freies zirkulierendes BoNT binden und neutralisieren. Deshalb ist bei allen Patienten mit einem möglichen Botulismus eine rasche Verabreichung des Antitoxins entscheidend. Gegen Toxine, die bereits an die neuromuskulären Synapsen gebunden sind oder sogar in die Vesikel aufgenommen wurden, ist es dagegen wirkungslos.

Als mögliche Nebenwirkungen nach Behandlung mit Antikörpern können kurzzeitiger Temperaturanstieg, allergische Reaktionen oder sehr selten auch ein anaphylaktischer Schock oder Serumerkrankungen auftreten (Gutzwiller et al., 2008).

Die weitere Behandlung der Patienten in der Klinik besteht in der einer symptomatischen Therapie, z. B. mit Beatmung und Substitution von Flüssigkeiten sowie ausreichender Intensivpflege.

Eine Möglichkeit für eine Impfung besteht für die Bevölkerung nicht. Nur besonders exponierte Personengruppen, wie Forscher in Hochsicherheitslaboren oder militärische Angestellte können einen pentavalenten (ABCDE) Botulinumtoxoid-Impfstoff in den USA beziehen. Dieses Präparat wird von den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta hergestellt.

1.5.1 Lebensmittelassoziierter Botulismus

Vegetative Zellen oder Endosporen von *C. botulinum* können auf pflanzliche Lebensmittel, z. B. durch Kontakt mit Erdboden bei der Ernte gelangen. Auch eine Kontamination von Lebensmitteln über die Umwelt oder bei der Schlachtung von Tieren und der anschließenden Weiterverarbeitung ist möglich.

Fehler bei technologischen Herstellungsverfahren und Hygienemängel beim Umgang und bei der Lagerung von Lebensmitteln können Ursache für das Überleben von Sporen und Bakterien und eine Vermehrung sein (Lindström et al., 2006; Nevas et al., 2006). Bekannt für die Kontamination und Bildung von Toxinen sind insbesondere im eigenen Haushalt hergestellte Fleisch- oder Fischerzeugnisse. Auch Konserven mit Fleisch und Gemüse, die nicht ausreichend erhitzt wurden, gelten als Quelle für bakterielle Belastungen. Sporen von *C. botulinum* können eine kurzzeitige Erhitzung auf 100°C überstehen und bleiben so im Lebensmittel zurück. Die Sporen können in diesen Produkten überleben und bei geeigneten Lebensbedingungen hinsichtlich der Umgebungstemperatur, der Verfügbarkeit von Nährstoffen und bei Sauerstoffreduktion auskeimen und Toxine bilden.

In der Lebensmittelindustrie werden heute bei der Konservenherstellung Erhitzungsverfahren eingesetzt, die ein Abtöten der Sporen nahezu garantieren. Es wird das sogenannte "Botulinum cooking" angewendet, das auch als 12-D-Konzept bezeichnet wird.

Dafür werden die Lebensmittel bei 121 °C über eine definierte Zeitspanne sterilisiert. Die dezimale Reduktionszeit (D) gibt die Zeit an, bei der bei konstanter, letaler Temperatur t die Bakterien- oder Sporenzahl um eine Zehnerpotenz auf 10% des Ausgangskeimgehaltes reduziert wird. Diese Zeitspanne ist abhängig von der Art des Mikroorganismus, seines Entwicklungsstandes, der letalen Temperatur und dem Umgebungsmilieu (Prändel et al., 1988).

1 Einleitung

Die Formel für die Überlebenskurve lautet:

$$t = D (\log a - \log b)$$

t = Zeit der Hitzebehandlung in min bei konstanter letaler Temperatur

D = Dezimalreduktionswert, Zeit in min, die erforderlich ist, um 90% der Zellen abzutöten

a = Keimzahl vor der Hitzebehandlung

b = Keimzahl nach der Hitzebehandlung

Der D-Wert wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$D_T = t / \log a - \log b$$

Bei der Annahme einer Keimzahl von 1 Spore pro Gramm Lebensmittel wird mit Hilfe des 12-D Prinzips eine Reduktion der Keime auf 10^{-12} Sporen pro Gramm Lebensmittel bewirkt. Das bedeutet, dass bei derart behandelten Produkten in einer von 10^{12} Konserven 1 Spore von *C. botulinum* zu erwarten ist, und stellt ein ausreichendes Sicherheitskonzept für derartige Lebensmittel dar.

In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche D-Werte für *C. botulinum*-Stämme ermittelt. Jede der 4 physiologischen Gruppen von *C. botulinum* benötigt unterschiedliche Hitzeeinwirkungszeiten um die gewünschte 90-prozentige Reduktion des Keimgehaltes zu erreichen (Smith und Sugiyama, 1988; Baumgart, 1999; Lund und Peck, 2000; Stringer und Peck, 2008):

Gruppe I: $D_{121^\circ\text{C}}=0,21$ Minuten

Gruppe II: $D_{82,2^\circ\text{C}}=2,4$ Minuten

Gruppe III: $D_{104^\circ\text{C}}=0,9$ Minuten

Gruppe IV: $D_{104^\circ\text{C}}=1,1$ Minute

Bei der Hitzebehandlung von Lebensmitteln wird ebenfalls der F-Wert ermittelt, um ein Maß für die Abtötung von Keimen auf oder in bestimmten Lebensmitteln oder Gegenständen zu bestimmen.

1 Einleitung

Dieser Wert ist die Summe aller letalen Effekte, die im Verlauf einer Erhitzung auf einen Mikroorganismus einwirken können.

Mit Hilfe dieser Formel kann man ihn näher bestimmen:

$$F = D (\log N_0 - N)$$

D = Dezimalreduktionswert

N_0 = Ausgangskeimzahl

N = Endkeimzahl

Die Dauer der Erhitzung bezieht sich dabei auf 1 min bei einer Referenztemperatur T_x , von meist 121,1 °C. Beim sogenannten "Botulinum cooking" werden 121°C für eine Dauer von 3 min angewendet, um eine Reduktion der *C. botulinum* Sporen auf 1 Sporen unter 1 Milliarde Lebensmitteleinheiten zu erreichen.

Als weitere Möglichkeiten der Vermeidung einer Toxinbildung in kontaminierten Lebensmitteln dienen andere technologische Verfahren, wie Salzen, Pökeln oder Säuern (z. B. pH-Wert kleiner 4,5), die häufig in Kombination als sogenanntes Hürdenkonzept eingesetzt werden. Auch das Einhalten der optimalen Lagertemperatur bei verderblichen Lebensmitteln in einem Bereich von etwa 0°C bis max. +7°C kann eine Vermehrung und Toxinbildung durch Clostridien unter Kontrolle halten.

1.5.2 Säuglingsbotulismus

Der Säuglingsbotulismus ist eine Erkrankungsform, die durch die Aufnahme von Bakteriensporen von *C. botulinum*, z. B. durch den Verzehr von kontaminiertem Honig auftreten kann (Arnon et al., 1977 & 1979, Brown, 1979 & 1981; Midura et al., 1979; Aureli et al., 2002; Nevas et al., 2002 & 2005; CDC). Die Erkrankung kommt etwa bis zu einem Alter von 12 Monaten vor. Auch ältere Menschen mit dezimierter Darmflora oder Personen mit Gastrointestinalerkrankungen können an dieser Form des Botulismus erkranken.

Der Säuglings- oder intestinale Botulismus beginnt mit einer primären Aufnahme von *C. botulinum* und seinen Sporen, gefolgt von einer sekundären Intoxikation ("intestinaler Botulismus"). Ein noch nicht oder nicht mehr voll ausgebildetes Immunsystem, die fehlende Mikroflora im Darm und eine geringe Magensäureproduktion führen bei Säuglingen und geschwächten älteren Personen dazu, dass sich die Bakterien im Darm ansiedeln können und dort Toxine bilden, die dann den Organismus schädigen. Gesunde Menschen besitzen eine ausreichende Menge Magensäure, um die Bakterien abzutöten und eine stabile Flora, die die Clostridien negativ beeinflussen.

1.5.3 Wundbotulismus

C. botulinum können sich in großflächigen Wunden, z. B. offenen, klaffenden oder großflächigen Quetschwunden, aber auch in Hautfalten ansammeln und dort in den Körper eindringen (Arnon et al., 2001; CDC). Die eingebrachten Sporen und Bakterien können unter anaeroben Bedingungen Toxine bilden, die dann in den Blutkreislauf gelangen.

Gelegentlich sind solche Erkrankungsformen auch bei Spritzenabszessen von Drogen-abhängigen Personen zu finden. Durch kontaminierte Nadeln kann es zu einer Übertragung der Bakterien kommen. Im Jahr 2005 wurde in Deutschland im Rahmen des Infektionsschutzgesetzes über 17 Fälle von

Wundbotulismus bei drogenabhängigen Personen berichtet (Epidemiologisches Bulletin des RKI, 2005; Alpers et al., 2005).

1.5.4 Viszeraler Botulismus

Seit Ende der neunziger Jahre wird in einigen wissenschaftlichen Veröffentlichung über den sogenannten chronischen oder viszeralen Botulismus in Rinderbeständen berichtet (Böhnel et al., 2001b & 2005; Böhnel und Gessler, 2005; Lindström et al., 2010; Krüger, 2010a & b; Böhnel und Gessler, 2010; Köhler - AVA-Tagung, 2010; Rodloff und Krüger, 2012; Krüger et al., 2012).

Die klinischen Erscheinungsformen der Krankheit umfassen ein breites Spektrum verschiedener Symptome. Unter anderem werden Abmagerung, Festliegen, Ataxien und Muskelschwäche, Leistungsabfall, Gewichtsverlust, Somnolenz, Schluckstörungen, Labmagen-Verlagerung, Pneumonien, Klauen- und Gelenkserkrankungen, Lähmungen, gespannte Bauchdecke, hochgezogenes Abdomen, Schluckstörungen sowie fieberhafte akute Mastitiden beschrieben.

Die Erkrankung wurde zunächst bei Hochleistungsrindern später dann aber auch bei Kälbern beschrieben. Eine Falldefinition für das Krankheitsbild beim Rind liegt noch nicht vor, die ätiologischen Ursachen gelten als ungeklärt. Die Bezeichnung chronischer Botulismus resultiert aus der Hypothese, dass möglicherweise *C. botulinum* eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung der Klinik spielt. Es wird einerseits diskutiert, dass die Bakterien im Darmkanal der Tiere siedeln, dort Toxine bilden, die resorbiert werden und zu einem chronischen, schleichend verlaufenden Krankheitsbild, einer Toxiko-Infektion, führen. Andererseits wird auch die Aufnahme kleinster Mengen an Toxinen, z.B. aus dem Futter, für möglich gehalten, die dann ebenfalls in der Lage sein könnten die Klinik auszulösen.

Im Gegensatz zu diesen Annahmen findet beim klassischen Botulismus eine Aufnahme von im Futter oder auf Weideflächen gebildeten Toxinen in

1 Einleitung

Konzentrationen statt, die ausreichend sind, ein akutes Erkrankungsbild mit vielen Todesfällen bei den Tieren hervorzurufen.

Die Befürworter der Hypothese des chronischen Botulismus diskutieren auch, in wieweit eine Verbreitung der Bakterien im landwirtschaftlichen Bereich auf Weide- und Futterflächen durch Biogastrückständen, Gärresten, Gülle oder Mist möglich ist, sodass immer mehr Rinderhalter erhebliche Einbußen aufgrund der gesundheitlichen Situation ihrer Tiere erleiden.

Die klinischen Symptome in den betroffenen Beständen dauern Monate bis Jahre an. Eine hohe Erkrankungsrate von 30-40% bei den Tieren und ein damit verbundener schleichender Leistungsabfall führen zu einer extremen wirtschaftlichen Bedrohung und Gefährdung der Existenz dieser Betriebe. (BfR-Stellungnahme Botulismus, 2002, 2004, 2009 & 2012).

In Zusammenhang mit dieser Rinderkrankheit werden auch andere Hypothesen aufgestellt. So sind einige Wissenschaftler und Rinderkliniker der Ansicht, dass es sich möglicherweise um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem Fragen der Hygiene, Fütterung und Haltung eine Rolle spielen und *C. botulinum* eine nachgeordnete oder überhaupt keine Bedeutung hat.

Etwa seit 2009 werden Äußerungen laut, dass auch einige wenige Menschen, die in landwirtschaftlichen Betrieben leben und arbeiten, die von dieser Tierkrankheit betroffen sind, ebenfalls klinische Symptome zeigen, die dem chronischer Botulismus zugeordnet werden. Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie hat diese Hypothese bisher nicht bestätigt. Auch für den humanen Bereich fehlt eine Faldefinition.

Da der Nachweis von *C. botulinum* und seinen Neurotoxinen auch beim sogenannten chronischen Botulismus problematisch ist und vielfach nicht gelingt, wird in den verschiedenen Diskussionen zur Abklärung des Krankheitsgeschehens immer wieder eine verbesserte Diagnostik gefordert. Zur

Aufklärung der Ursachen der Klinik werden wissenschaftlich belegbare Ergebnisse eingefordert. Neben der Verbesserung der Nachweistechiken sind noch andere Forschungsaufgaben zur Verbreitung der Erreger in Tierbeständen bei gesunden und kranken Tieren, in der Umwelt und beim Menschen durchzuführen.

1.6 Medizinischer Nutzen

Botulinumneurotoxine können gegen eine Vielzahl von Erkrankungen als Medikament eingesetzt werden.

Die muskelentspannende Wirkung des Bakteriengifts wird seit langem in sehr geringen Dosen zur Behandlung der Dystonie genutzt. Dies ist eine Erkrankungsform der Basalganglien des Gehirns, aufgrund von Fehlsignalen kann dies zu Spasmen der Muskulatur und dementsprechend zu unkontrollierten Verrenkungen und Verkrampfungen des Körpers führen. Auch eine Vielzahl anderer unkontrollierbarer Muskelkontraktionen oder Erschlaffungen, wie z.B. der Blepharoptosis (Lidkrampf), Speiseröhrenfehlstellungen oder Ösophagusspasmus, Migräneanfällen oder Spannungskopfschmerzen, Fehlstellungen der Augen (Strabismus-Schielen), Diplosis und Ptosis (hängendes Augenlid) sind therapierbar. Viele Sprach- und Schluckbeschwerden, wie Dysarthrie und Dysphagia können durch die gezielte Gabe des Toxins erfolgreich behandelt werden. Auch bei vermehrter Schweißproduktion (Hyperhidose), erhöhter Speichelproduktion (Patienten mit M. Parkinson und amyotropher Lateralsklerose), Patienten mit einer Sphincter-oddi-Dysfunktion Typ II, zur Behandlung des Morbus-Hirschsprung Symptoms oder Analfissuren ist die Toxingabe sinnvoll (Kahl et al., 2006; Bartolome und Schröter-Morasch, 2006).

Des Weiteren ist auch bereits eine Vielzahl anderer Behandlungsgebiete in der Erprobung. Dazu zählen teilweise urologische Erkrankungen (Blasenschwäche) sowie orthopädische und dermatologische Probleme. Die Behandlung mit

1 Einleitung

Botulinumtoxin kann bei allen Erkrankungen hilfreich sein, bei denen eine Muskelrelaxation eine Verbesserung der Symptomatik erzielen kann.

In den letzten Jahren (seit 2001) wird auch in der ästhetischen Behandlung von mimischen Falten, die durch übermäßige Muskelkontraktionen der Gesichtsmuskeln verursacht werden, Botulinumtoxin eingesetzt. Medikamente unter dem Namen Botox® (Hersteller Alagan) oder Dyspot (Hersteller Ipsen) aus Botulinumtoxin sind als sogenannte Faltenkiller im Gesicht wirksam, soweit die Falten auf der Verfestigung von dauernden Gesichtsausdrücken (z. B. gerunzelte Stirn) beruhen.

Die Konzentration des Botulinumtoxins für therapeutische Behandlungen ist dabei sehr gering mit einer Dosis von nur 0,005% (Arnon et al., 2001). Die Dosen für den medizinischen Einsatz müssen seitens der Hersteller ständig hinsichtlich ihrer Wirkung und Ungefährlichkeit überprüft werden.

1.7 Bioterroristische Relevanz

Die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) unterteilen bioterroristisch relevante Stoffe hinsichtlich ihrer möglichen Wirkungen in 3 Gruppen (CDC Homepage).

Gruppe A: Hierzu zählen Erreger von Erkrankungen, die ein Problem für die Sicherheit der Bevölkerung darstellen, leicht verbreitet bzw. übertragen werden können und eine hohe Letalität besitzen. Dazu zählen z. B. Pockenviren (Variola), *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, Ebolaviren und Viren, die hämorrhagisches Fieber auslösen, aber auch Toxine wie BoNT, Rizin oder Shiga-Toxine.

Gruppe B: Erreger dieser Gruppe sind leicht zu verbreiten, haben eine mittlere Letalitätsrate und können leicht eingedämmt beziehungsweise

1 Einleitung

überwacht werden. Dazu zählen z. B. *Coxiella burnetii* (Erreger des Q-Fiebers), *Brucella spp.* oder *Burkholderia mallei* (Erreger des Rotzes).

Gruppe C: Hierzu zählen Kampfstoffe, die sehr leicht verfügbar sind oder leicht erworben werden können. Diese Erreger haben eine sehr geringe Letalitätsrate. Aber auch Erreger die eine hohe Letalitätsrate besitzen, jedoch kaum verfügbar sind oder sich schlecht verbreiten lassen, gehören in diese Gruppe. Darüber hinaus werden Erreger, die zwar gefährlich sind, aber sich gut und effizient behandeln lassen, in diese Gruppe eingeordnet. Beispiele hierfür sind Gelbfieber-Virus oder multiresistente Mykobakterien (Tuberkulose).

Für Botulinumneurotoxine gilt, dass eine absichtliche Ausbringung im Rahmen eines bioterroristischen Anschlags als durchaus möglich eingeschätzt wird. Die Bakterien sind ubiquitär verbreitet und daher verfügbar. Durch das ubiquitäre Vorkommen des Erregers im Boden oder Sedimenten kann der Erreger von Personen mit biologischem Fachwissen leicht beschafft werden. Toxine können mit Hilfe von geeigneten Nährmedien, die frei gehandelt werden, relativ leicht mit Hilfe einer minimalen technischen Laborausstattung hergestellt werden. Bei einer Intoxikation muss mit sehr schweren Erkrankungserscheinungen möglicherweise mit Todesfolge gerechnet werden. Es bedarf einer intensivmedizinischen Betreuung der Patienten.

Das Einbringen von Toxinen oder Sporen für eine mögliche Kontamination von Lebensmitteln könnte eine erhebliche Schadenslage auslösen. Auch Futterflächen für landwirtschaftliche Nutztiere oder andere Güter des täglichen Gebrauchs könnten kontaminiert werden und würden im Tierbereich eine erhebliche Schadenslage verursachen.

Unsicherheiten in der Diagnostik können zu Verzögerungen bei der richtigen Patientenversorgung führen und die Erfordernisse von intensivmedizinischen Behandlungsplätzen könnten Kliniken an die Grenze ihrer Kapazitäten bringen. In einer Veröffentlichung von Arnon et al. (2001) wird festgestellt, dass ein bioterroristischer Anschlag zur Zerstörung der zivilen Ordnung in einem

1 Einleitung

betroffenen Staat führen würde. Des Weiteren würde es zu wirtschaftlichen Einbrüchen kommen sowie zu einer enormen Verunsicherung der Bevölkerung. Antitoxine zur Behandlung von Patienten sind nur in geringen Mengen vorrätig, die Ressourcen wären schnell ausgeschöpft (Arnon et al., 2001).

In einer Veröffentlichung von Wein und Liu wurde ein mathematisches Modell eines Szenarios für eine absichtliche Ausbringung von *C. botulinum* dargestellt und analysiert (Wein und Liu, 2005). Das Modell stellt dar, dass durch 1 g Botulinumtoxin, das in kommerziell verarbeitete Milch eingebracht wird, ca. 100.000 Menschen an Botulismus erkranken würden. Erst nach 100 erkrankten Personen würde die Krankheit korrekt identifiziert und als Ursache eine Kontamination von Milch mit Toxinen festgestellt werden.

Shapiro et al. (1997) beschreiben ein anderes Szenario: das Versprühen von 1 g Botulinumtoxin in aerolisierter Form könnte ca. 1,5 Millionen Menschen töten. Arnon et al. (2001) vermuten bei einem solchen Szenario sogar bis zu 10 Millionen Tote.

Bereits im 2. Weltkrieg wurden schon geheime Untersuchungen zur Wirkungsweise von Botulinumtoxin durchgeführt. Dabei soll z. B. eine japanische Gruppe für bioterroristische Kriegsführung *C. botulinum*-Kulturen an Gefangene verabreicht haben (Arnon et al., 2001; Sotos, 2001). Auch die amerikanische Regierung soll geplant haben, japanische Offiziere mit Botulinumtoxinkapseln zu töten (Sotos, 2001).

Das amerikanische und andere Biowaffenprogramme wurden 1972 durch das Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) offiziell beendet. Allerdings haben nicht alle Staaten weltweit das Biowaffenabkommen ratifiziert.

Auch in jüngerer Zeit hat es immer wieder Informationen über den Einsatz von Botulinumtoxin gegeben. So wurde unter anderem nach dem Golfkrieg von 1991 angenommen, dass eine enorme Menge an flüssigem Botulinumtoxin im Irak gelagert sein soll. Allerdings wurde das Lager der Biowaffen nie entdeckt. Es können nur Vermutungen über den Verbleib der Kampfstoffe und ihrer heutigen Wirksamkeit angestellt werden (Zilinskas, 1997).

2 Zielsetzung

C. botulinum ist ein grampositives, stäbchenförmiges, obligat anaerobes Bakterium, welches ubiquitär im Boden vorkommt. Dieser Erreger kann eine Erkrankung beim Menschen verursachen, die als Botulismus bekannt ist. Als Ursache für eine "natürliche" Intoxikation mit Botulinumneurotoxinen, werden häufig kontaminierte und unsachgemäß hergestellte Lebensmittel genannt. Aber auch in der Umwelt ist das Bakterium weit verbreitet.

Das Botulinumneurotoxin ist das potenteste von Bakterien produzierte Toxin und wird von der amerikanischen CDC als bioterroristische Agenzie in die höchste Kategorie A eingestuft. Auf Grund der relativ leichten Herstellung der Toxine und das Ausbringen der Sporen sowie der hohen Toxizität und einer Inkubationszeit von 12 - 36 h bis zu wenigen Tagen, wird es mit einer hohen bioterroristischen Relevanz betrachtet.

Zum Nachweis der Toxine wird bis heute der Mäuse-Bioassay als Goldstandard eingesetzt, der hinsichtlich der Aspekte des Tierschutzes erhebliche Probleme mit sich bringt.

Das Gesamtziel dieser Arbeit ist es, die diagnostische Situation im Bezug auf die vegetativen Formen und Sporen von *C. botulinum* und seiner Neurotoxine zu verbessern.

Es sollte ein immunologisches ELISA-Verfahren entwickelt werden, welches eine Ersatzmethode zum Mäuse-Bioassay darstellt. Die molekularbiologischen Nachweise der jeweiligen Toxingene sollten mit Hilfe von verschiedenen PCR-Nachweisverfahren erfolgen und an die unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen angepasst und etabliert werden. Darüberhinaus soll eine Prüfung der Stabilität der Toxine bei lebensmittelrelevanten Erhitzungsverfahren und bei unterschiedlichen Lagerzeiten- und -temperaturen erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Verzeichnis der Materialien

3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Avidin HRP Konjugat	Bio-Rad
Anaerobic Indikator	Oxoid
Agarose UltraPure™	Invitrogen
Borsäure	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva
Casein, Bovine Milk	Calbiochem
EDTA	VWR
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Eosin G (gelblich)	Merck
Egg-Yolk-Emulsion	Oxoid
Flusssäure	Merck
Glycerol	Roth
Isopropanol	Merck
Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol	Roth
Karbol-Gentianaviolett-Lösung	Roth

3 Material und Methoden

Karbol-Fuchsin Lösung	Roth
Magnesiumchlorid für die PCR	Qiagen
Malachitgrünlösung	Alfqa Aesar
Natronlauge	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumphosphat	Sigma Aldrich
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich
PBS	Sigma Aldrich
Primer	Metabion
Salzsäure	VWR
SDS	Bioline
Sulfomethaoxazol	VWR
Schwefelsäure	Merck
TEMED	Roth
Triton X 100	VWR
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	Merck
3,3', 5,5' Tetramethylbenzidine liquid (TMB)	Merck
Trypsin	Merck
Tween 20	Merck
Q Solution	Qiagen

3.1.2 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Enzym	Firma
DyNAzyme II DNA Polymerase	Finnzymes
HotStarTaq Polymerase	Qiagen
Multiplex PCR 5X Master Mix	BioLabs
Platinum Blue PCR SuperMix	Invitrogen
Lysozym	AppliChem
Proteinase K	Qiagen
Taq-Polymerase	Qiagen
dNTPs	Roth

3.1.3 Antikörper

Tabelle 5: Polyklonale Antikörper vom Kaninchen der Firma Metabionics

Antikörper	Konzentration
0,5 mg ungelabelte Antikörper für BoNT Serotyp A,	725 µg/ml
0,5 mg ungelabelte Antikörper für BoNT Serotyp B,	2,45 mg/ml
0,5 mg ungelabelte Antikörper für BoNT Serotyp C,	1,40 mg/ml
0,5 mg ungelabelte Antikörper für BoNT Serotyp E,	2,51 mg/ml
0,5 mg ungelabelte Antikörper für BoNT Serotyp F,	2,12 mg/ml
0,5 mg Biotin-gelabelte Antikörper für BoNT Serotyp A,	2,00 mg/ml
0,5 mg Biotin-gelabelte Antikörper für BoNT Serotyp B,	2,19 mg/ml
0,5 mg Biotin-gelabelte Antikörper für BoNT Serotyp C	1,51 mg/ml
0,5 mg Biotin-gelabelte Antikörper für BoNT Serotyp E	4,00 mg/ml
0,5 mg Biotin-gelabelte Antikörper für BoNT Serotyp F	4,00 mg/ml

3 Material und Methoden

Alle Antikörper wurden von der Firma Metabionics aus den USA bezogen, es sind aufgereinigte polyklonale Kaninchen-Immunglobulin G spezifische Toxin-Antikörper.

Des Weiteren wurden von der Firma Metabionics ELISA-Standards für die Botulinumtoxintypen A, B, E und F geordert. Diese definierten Standardlösungen mit einer Toxinkonzentration von 1 µg/ml wurden als verdünnte Standardreihe eingesetzt und dienen zur Toxinbestimmung der Proben.

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Plastikverbrauchsmaterialien	Falcon, Greiner, VWR
Filter (0,45 µm Porengröße)	Neolab
Microtiter-Platten	Greiner
Einwegpipetten	Neolab
Spritzen	Neolab

3.1.5 Kits

Tabelle 7: Kits

<u>Kit</u>	<u>Firma</u>
Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit (250)	Invitex
Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit	Süd-Laborbedarf
Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	Süd-Laborbedarf
GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich
MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit	Epicentre
	Biotechnologies

3.1.6 Marker, Standards und Ladepuffer

Tabelle 8: Marker, Standards und Ladepuffer

Marker	Firma
HyperLadder II	Bioline
DNA Gel Loading Buffer 10x	Bioline
DNA Gel Loading Dye 5x	Bioline
Gel Loading Dye, blau (6x)	Biolabs

3.1.7 Größen des Standardmarkers HyperLadder II

Alle PCR-Verfahren wurden mit einem HyperLadder II 100bp Marker der Firma BioLabs durchgeführt. Die Bandengrößen des Markers sind in der Abbildung 6 ersichtlich.

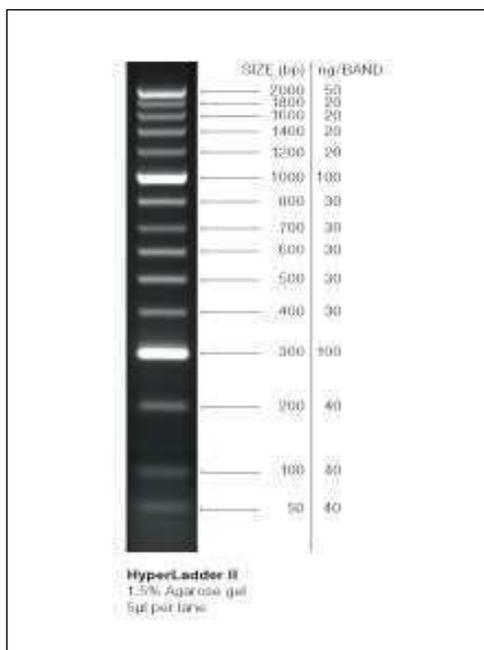


Abb.6: 100 bp DNA-Marker

3.1.8 Bakterien und Primer

3.1.8.1 Bakterienstämme

Es wurde mit insgesamt 11 verschiedenen *Clostridium botulinum*-Stämmen gearbeitet. Davon stammten fünf aus der Stammsammlung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und drei aus dem ehemaligen Bundesgesundheitsamt Berlin (BGA). Vier Stämme kamen auch aus dem Friedrich-Loeffler-Institut in Jena (FLI). Vor allem die positiven DNA-Proben für die PCR-Verfahren stammten größtenteils aus dem FLI (Tab.9).

Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Toxintyp	Herkunft
1750	A	BfR
NCTC 7272	A	BGA
NCTC 7272	A	FLI
89	B	BfR
1944	B	BfR
NCTC 7273	B	BGA
NCTC 7273	B	FLI
REB1455 (int. BC 58/06)	C	FLI
CB-1664 (int. BC 64/06)	D	FLI
8550	E	BGA
1718	E	BfR
1692	F	BfR
1956	F	BfR

3 Material und Methoden

Tabelle 10: DNA-Proben vom FLI als Positivkontrolle für die PCR

DNA Probe	Toxintyp	PCR Ergebnis
BC 35/06	Typ A	Takeshi positiv
BC 46/06	Typ A	Takeshi und Lindström positiv
BC 54/06	Typ B	Lindström positiv, Takeshi Typ B & F positiv
BC 67/06	Typ F	Takeshi und Lindström Positiv

3.1.8.2 Oligonukleotide

Tabelle 11: Oligonukleotide nach Takeshi et al., 1996

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Amplifikationsgröße in bp
AS-11	TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT	283
AS-22	TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC	
BS-11	CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG	315
BS-22	CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT	
CS-11	ATA CAC TAG CTA ATG AGC CTG	290
CS-22	TGG AGT ATT GTT ATT CCC AGG	
DS-11	GTG ATC CTG TTA ATG ACA ATG	497
DS-22	TCCTTGCAATGTAAGGGATGC	
ES-11	CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT A	266
ES-22	ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTC	
FS-11	CAA TAG GAA CGA ATC CTA GTG	332
FS-22	ATC AGG TCC TGC TCC CAA TAC	

Tabelle 12: Oligonukleotide nach Lindström et al., 2001

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Amplifikationsgröße in bp
CBMLA1	AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT	782
CBMLA2	CGTATTTGG AAA GCT GAA AAG G	
CBMLB1	CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA	205
CBMLB2	CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG	
CBMLE1	CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA	389
CBMLE2	GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA	
CBMLF1	CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA	543
CBMLF2	TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT	

Tabelle 13: Oligonukleide nach Dahlsten et al., 2008

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Amplifikationsgröße in bp
CBEDfldB-f	GGG GAG AAA AAG TTG GTT GG	552
CBEDfldB-r	CGA ATC CAC TAA ATG GTG AAG G	
CBEDiac1	CGA CCT GAG AGG GTG ATC G	761
CBEDiac2	GAG CTG ACG ACA ACC ATG C	

3.1.9 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien sind alle im Zentralen Nährmedienbereich (ZNB) des BfR hergestellt worden. Die modifizierte Kochfleisch-Bouillon wurde ebenfalls im ZNB hergestellt, sie musste vor der Verwendung zusätzlich mit Fleischpartikeln angereichert und autoklaviert werden.

3 Material und Methoden

Schafblutagar-Platten	15 g	Pepton
	3 g	Hefeextrakt
	6 g	Natriumchlorid
	1 g	Glukose
	12 g	Agar
	50 ml	Schafblut
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i>
Eigelb-Laktose-Platten	500 ml	Columbia Agar
	5 g	Laktose
	5 ml	einer 0,4%-igen Bromkresolpurpurlösung
	50 ml	Eigelb-Emulsion (Oxoid)
TPGYT (Tryptose-Pepton- Glukose-Hefe) -Bouillon mit Trypsin	5 g	Pepton
	50 g	Trypticase
	4 g	Glukose
	20 g	Hefeextrakt
	1 g	Natriumthioglykolat
	1 g	steriles Trypsin
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7
TYG (Tryptose Hefe Glukose Extract) -Bouillon	30 g	Trypticase
	20 g	Hefeextrakt
	5 g	Glukose
	0,5 g	Cystein HCL
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7,2

3 Material und Methoden

TPGY (Tryptose Pepton Glukose Hefe) -Bouillon	50 g	Trypticase
	5 g	Pepton
	20 g	Hefeextrakt
	4 g	Glukose
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7
Selzer-Bouillon	30 g	Trypton
	20 g	Hefeextrakt
	4 g	Glukose
	1 g	L-Cysteinhydrochlorid
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i>
Clostridien Differential- Medium (DRCM)	5 g	Pepton aus Casein
	5 g	Pepton aus Fleisch
	8 g	Fleischextrakt
	1 g	Hefeextrakt
	1 g	Stärke
	1 g	Glukose
	0,5 g	L-Cysteiniumchlorid
	5 g	Natriumacetat
	0,5 g	Natriumdisulfit
	0,5 g	Ammoniumeisen (III) Ziträt
	2 mg	Resazurin-Natrium
Modifizierte Kochfleisch-Bouillon		
MKBO (Grundmedium)	30 g	Fleischextrakt (trocken)
	10 g	Ammoniumsulfat
	11 g	D-Glukose-Monohydrat
	10 g	Hefeextrakt
	5 g	Stärke
	1,1 g	L-Cysteinhydrochlorid
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7

3 Material und Methoden

Herstellung des vollständigen Kochfleisch-Mediums:

0,5 g	Cooked Meat Medium
10 ml	Grundmedium

Frisch ansetzen, Grundmedium auftauen, zu Fleischpartikeln (Cooked Meat Medium) zugeben, 30 min quellen lassen und dann bei 121°C für 15 min autoklavieren.

<i>Clostridium botulinum</i>	40 g	Trypticase Pepton
Isolationsagar (CBI)	5 g	Natriumhydrogenphosphat
	2 g	Natriumchlorid
	0,2 ml	Magnesiumsulfat (5% wässrige Lösung)
	2 g	Glukose
	20 g	Agar
	5 g	Hefeextrakt
	100 ml	Eigelb-Emulsion (50% in Natriumchlorid)
	250 mg	Cycloserin
	76 mg	Sulfamethoxazol
	4 mg	Trimethoprim
		ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7

3.1.10 Färbelösungen

Malachitgrünlösung	1g	Malachitgrün in 19 ml <i>aqua bidest.</i> lösen
---------------------------	----	--

3 Material und Methoden

Eosinlösung	0,5g	Eosin G in 20 ml <i>aqua bidest.</i> lösen
--------------------	------	--

Die folgenden Lösungen wurden fertig bei der Firma Roth bestellt (siehe 3.1.1), ihre Zusammensetzung ist:

Gentianaviolett-Stammlösung	10-20 g	Gentianaviolett
	100 ml	96%-igen Alkohol

Zur Farbstofflösung mischen, 2 Tage im Dunkeln aufbewahren, danach filtrieren

Karbol-Gentianaviolettlösung	100 ml	Gentianaviolett-Stammlösung
	1 ml	Karbolsäure (Acid. carbolic. lique fact.)
	100 ml	<i>aqua bidest.</i>

Lugolsche Lösung	2 ml	Kaliumjodid
	1 ml	Jod
		ad 300 ml <i>aqua dest.</i>

Kaliumjodid in *aqua dest.* lösen, Jod zugeben, dann auf 300 ml auffüllen

Fuchsin-Stammlösung	10-20 g	Fuchsin
	100 ml	96%-igen Alkohol

Zur Farbstofflösung mischen, 2 Tage im Dunkeln aufbewahren, danach filtrieren

Karbol-Fuchsinlösung	10 ml	Fuchsin-Stammlösung
	5 ml	Karbolsäure (Acid. carbolic. lique fact.)
	100 ml	<i>aqua dest.</i>

3 Material und Methoden

Karbol-Fuchsinlösung, verdünnt	10 ml 90 ml	Karbol-Fuchsinlösung <i>aqua dest.</i>
---	----------------	---

3.1.11 Material für den Mäuse-Bioassay

Probenaufbereitung	Stomacher 400 Stomacher Beutel sterile Löffel, Spatel Messkolben Einmalpipetten Spritzenfilter, Porengröße 0,45 µm Spritzen Falcon Röhrchen	
Gelatine-Phosphat-Buffer	2 g/l 4 g/l	Gelatine Natriumdihydrogen- phosphat ad 1000 ml <i>aqua bideest</i> , pH 6,2
Trypsin Lösung	0,15 g 10 ml	Trypsin Wasser oder ad 1000 ml <i>aqua bideest</i> . steril filtrieren

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Stämme

Für die Versuchsansätze wurden verschiedene *Clostridium botulinum*-Stämme verwendet (siehe Tabelle 7) und kultiviert. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung und Analyse von humanpathogenen Stämmen von *Clostridium botulinum* mit den Toxintypen A, B, E und F.

Die Anzucht der Stämme erfolgte teilweise aus der Kryo-Konservierung. Dabei wurden mit einer Einmal-Impföse jeweils 10 µl der Kryo-Lösung auf einer Schafblutagar-Platte ausplattiert und 10 µl in Selzer-Bouillon überimpft und anschließend anaerob inkubiert.

Die Bebrütung der Platten erfolgte in der anaeroben Arbeitsstation Whitley DG250 von meintrup dws Laborgeräte. In der Arbeitsstation herrschte eine anaerobe Arbeitsumgebung, die aus einem Gasgemisch von 10% Kohlendioxid, 10% Wasserstoff und 80% Stickstoff bestand, welche eine optimale sauerstofffreie Umgebung für die Bakterien bot. Die Arbeitsstation hatte eine gleichbleibende Bebrütungstemperatur von 37 °C, so dass nach 24 bis 48 h ein ausreichendes Wachstum der Clostridien-Kulturen festzustellen war.

3.2.2 Reaktivierung der Lyophilisate

Einige der älteren *Clostridium botulinum*-Stämme waren als Lyophilisate konserviert worden und mussten reaktiviert werden. Die Ampullen wurden mit einer Glassäge unter der anaeroben Arbeitsstation vorsichtig geöffnet, um ein Verteilen des Pulvers zu verhindern. Zu dem Lyophilisat wurden 300 µl *aqua dest.* hinzugegeben und diese Lösung jeweils für 1 min unter leichten Schwenkbewegungen gemischt. Von der gelösten Suspension wurden je 100 µl in eine Selzer-Bouillon sowie in DRCM überführt, weitere 50 µl wurden auf einer Schafblutagar-Platte und einer Eigelb-Laktose-Platte ausplattiert und für 48 h bei 37 °C anaerob bebrütet.

3.2.3 Stammhaltung

Die für die Versuche eingesetzten *C. botulinum* Stämme wurden für die Stammsammlung aufbereitet.

Die Konservierung der Stämme, die in Selzer-Bouillon oder DRCM für mindestens 48 h gewachsen waren, erfolgte aus dieser Flüssigkultur. Dabei wurden 0,9 ml der Bakterien-Flüssigkultur mit 0,9 ml 80%-igem Glycerol (Verhältnis 1:1) gemischt und als Gebrauchslösung bei -21 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung fand bei -80 °C statt.

3.2.4 Eingesetzte Nährmedien für die Kultivierung

Die Kultivierung von *C. botulinum* erfolgte in verschiedenen flüssigen und festen Medien. Die Stämme wurden in Selzer-Bouillon oder DRCM für 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Anzucht auf festen Medien erfolgte auf Schafblutagar-Platten und auf Selektivmedien, wie Eigelb-Laktose-Platten oder CBI Agar, ebenfalls anaerob bei 37 °C für 48 h.

Für die Herstellung der Toxine wurde das spezielle MKBO Medium mit Zusatz von Fleischpartikeln verwendet. Dieses Medium musste stets frisch angesetzt werden.

3.2.5 Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KbE)

Die Bakterienkulturen wurden in einer Flüssigbouillon angeimpft. Nach der Inkubationszeit wurde mit Hilfe des Plattenzählverfahrens die Keimzahl in der Bouillon für jeden Stamm bestimmt. Dafür wurde von jeder Kultur eine Dezimalverdünnungsreihe angefertigt (1 ml der Kulturen wurden in 9 ml Peptonwasser überführt bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6}). Danach wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen im Doppelansatz auf Blutplatten ausplattiert und für 48 h bei 37 °C anaerob inkubiert.

3 Material und Methoden

Anschließend wurden die Bakterienkolonien auf den Platten gezählt und mit Hilfe folgender Formel die Keimzahlkonzentration als Kolonie bildende Einheiten (KbE) pro g oder ml berechnet:

$$N = \frac{\Sigma a}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Σa : Summe der *Clostridium botulinum*-Kolonien, die auf ausgewählten Platten gezählt wurden

V: das Volumen der Impfkultur auf jeder Platte, in Milliliter

n_1 : die Anzahl der ausgewählten Platten von der ersten Verdünnungsstufe

n_2 : die Anzahl der ausgewählten Platten von der zweiten Verdünnungsstufe

d: der Verdünnungsfaktor der ersten ausgewerteten Verdünnung

3.2.6 Sporenerstellung

Für die Herstellung einer Sporensuspension wurden die Bakterienkulturen in Selzer-Bouillon für 48 h bei 37°C anaerob inkubiert. Eine Trübung der Bouillon zeigte ein ausreichendes Bakterienwachstum an. Anschließend wurden 1,5 ml der Bakterienlösungen in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 2 ml Volumen überführt und in einem Thermocycler Block der Firma Eppendorf für 15 Minuten bei 85°C erhitzt. Dieser extreme Hitzeschock sorgte für optimale Sporulationsbedingungen. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Bakteriensuspensionen in 3 ml eines Sporulationsmediums (TPGY) überführt und anaerob bei Raumtemperatur (ca. 23°C) für 5-7 Tage inkubiert. Die Anzucht erfolgte dabei in Anaerobentöpfen (Firma Oxoid) unter sauerstofffreier Atmosphäre, mittels eines AnaerogenTM Pack (Firma Oxoid).

Nach 5 Tagen wurden 10 µl Probe der Sporensuspensionen auf einen Objektträger gegeben und einer Sporenfärbung nach Rakette unterzogen.

Unter dem Mikroskop (Zeiss Mikroskop, 1000-fache Vergrößerung mit Ölimmersion) wurde ersichtlich, wie weit die Sporulation im Medium

fortgeschritten war. Die größte Ausbeute an Sporen (Sporendichte 80%) wurde aus den hitzebehandelten Bakterienkulturen nach 7 Tagen ermittelt.

Zur Gewinnung einer Sporenlösung ohne vegetative Zellen wurde die gesamte Suspension in einem Zentrifugenröhrchen bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 4000 rpm zentrifugiert. Die Sporen sammelten sich als Pellet am Boden des Röhrchens an, der Überstand mit den Zellbestandteilen wurde dekantiert und verworfen.

Die Resuspendierung des Pellets erfolgte anschließend in Peptonwasser. Die Sporenlösung wurde zu Kontaminationsversuchen in verschiedenen Lebensmitteln eingesetzt, zeitgleich stellten die Verdünnungsreihen den Ansatz zur Bestimmung der Zellzahl (Sporendichte) dar.

3.2.7 Färbeverfahren zur Charakterisierung der Stämme

3.2.7.1 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung gibt eine gute Übersicht über die Morphologie und Zuordnung von Bakterien. Dafür wurden verschiedene Bakterienstämme von *Clostridium botulinum* ausgewählt und anhand ihres Färbeverhaltens näher charakterisiert. Alle Clostridien sind grampositive, stäbchenförmige Bakterien, die Sporen bilden können. Auf Grund dieser Eigenschaften und ihrer Größe sind sie von anderen grampositiven Bakterienarten (z. B. von Kokken und Listerien) zu unterscheiden.

Folgende Arbeitsschritte wurden dafür durchgeführt:

Die Bakterien wurden in einem Tropfen einer sterilen Kochsalzlösung auf einen Objektträger gebracht, getrocknet und hitzefixiert.

1. **Färbung:** Zuerst wurde das Präparat mit einer Lösung aus Gentianaviolett (ein Anilin-Farbstoff) mit Phenolzusatz bedeckt. Die Bakterien färbten sich dabei an. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Objektträger mit Wasser gespült.

3 Material und Methoden

2. **Komplexierung:** Die weitere Behandlung mit Lugolscher Lösung (jodhaltig) führte zur Bildung größerer Farbkomplexe, die Bakterien erschienen dunkelblau. Das Präparat wurde wieder gewaschen und der überflüssige Farbstoff entfernt.
3. **Entfärbung:** Das Präparat wurde mit 96%-igem Alkohol abgespült, bis sich keine Farbe mehr löste. Bei Bakterien mit mehreren Schichten Peptidoglykan in der Zellwand erfolgt keine Entfärbung. Die blauen Farbstoffkomplexe aus den ersten beiden Schritten sitzen zwischen den Peptidoglykan-Schichten fest. Diese Bakterien sind grampositiv, die entfärbten Bakterien sind gramnegativ.
4. **Gegenfärbung:** Abschließend wurden die Präparate kurz mit einer Fuchsinlösung gegengefärbt und wieder mit Wasser gespült. Bakterien mit einer Schicht Peptidoglykan in ihrer Zellwand, die im zuvor durchgeführten Arbeitsschritt entfärbt wurden, sind durch die Behandlung mit Fuchsin erneut gefärbt und erschienen rot. Es handelte sich um gramnegative Bakterien.
 - Grampositiv: blau gefärbte Bakterien
 - Gramnegativ: rot gefärbte Bakterien

Beim Mikroskopieren wurde auch die Morphologie (Kokken, Stäbchen und Größe) der vorliegenden Bakterien bewertet.

3.2.7.2 Sporenfärbung nach Rakette

Um eine Bakterienkultur auf Sporen zu untersuchen, sind 10 µl Kulturüberstand auf einen Objektträger gebracht worden. Diese Bakterien-Sporensuspension wurde an der Luft getrocknet und durch mehrmaliges Schwenken des Objektträgers über einer Flamme, hitzefixiert. Anschließend wurden die Proben auf dem Objektträger mit einer Malachitgrünlösung bedeckt, die danach mit Hilfe eines Bunsenbrenners mehrmals kurz aufgeköcht wurde. Anschließend musste die erhitzte Färbelösung etwa 30 Sekunden auf das Präparat einwirken.

3 Material und Methoden

Dabei dringt das Malachitgrün in die vegetative Bakterienzelle ein und lagert sich an der Sporenwand an. Die überschüssige Malachitgrünlösung wurde mit Wasser vom Objektträger gespült. Der nächste Schritt umfasste das Gegenfärben der Probe mit einer Eosinlösung, die für 60 Sekunden auf dem Objektträger einwirken musste. Anschließend wurde auch diese Färbelösung wieder mit Wasser abgespült. Der letzte Schritt der Sporenfärbung umfasste das Trocknen des Objektträgers (Schmid et al., 1962).

Das Ergebnis kann unter dem Mikroskop begutachtet werden. Dabei wird ein Tropfen Öl (1000-fache Vergrößerung - Ölimmersion) zum Einschließen der Probe auf den Objektträger gegeben. Im mikroskopischen Präparat ist die vegetative Bakterienzelle rosarot eingefärbt und die Sporen sind im Inneren der Bakterie als grüne, ovale bis rundliche Sporenkörper zu erkennen. *Clostridium botulinum* bildet die sogenannte „Tennisschlägerform“, d.h. es wölbt sich der apikale Teil der Zelle nach außen.

3.2.8 DNA-Extraktion

DNA-Extraktionsverfahren werden für die Freisetzung genomischer DNA aus Bakterien eingesetzt. Die anschließenden Analysen werden auf genetischer Ebene durchgeführt, wobei die genauere Charakterisierung der Bakterien-DNA, z. B. mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion erfolgt.

3.2.8.1 RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit

Mit Hilfe des RTP Spin Bacteria DNA Mini Kits der Firma Invitex (RTP Kit) konnte aus reinen Bakterienkulturen, Kulturüberständen oder verschiedenen Lebensmittelproben DNA gewonnen werden. Das Kit ist aber auch geeignet, aus Gewebe, Blut, Urin und Wasser DNA zu extrahieren.

3 Material und Methoden

Die hier verwendeten Proben (Kulturüberstand und kontaminierte Lebensmittel) wurden bei 13200 rpm abzentrifugiert, der flüssige Überstand in ein Extraktionsgefäß des Kits pipettiert und mit einem Resuspensionspuffer vermischt. Dieser Puffer mit speziellen Enzymen lysiert die Bakterienzellen, wobei gleichzeitig eine ausreichende Stabilität der Nukleinsäuren, der Inaktivierung der RNasen und DNasen und eine verbesserte Absorption der DNA an die Membran der Spin-Filtereinheit erreicht wird. Verunreinigungen der Proben wurden durch häufige Waschschrte minimiert, so dass am Ende durch einen Elutionsschritt eine ausreichende Menge an reiner DNA extrahiert wurde.

Die DNA-Extraktion wurde gemäß der Gebrauchsinformation des Testkit-Herstellers wie folgt durchgeführt:

- Eine Kultur in Selzer-Bouillon ansetzen und 48 h im Anaerobenschrank bei 37°C inkubieren
- 1 ml der Kultur in ein 1,5 ml großes Probengefäß pipettieren, dieses 6 min bei 13200 rpm zentrifugieren und den Überstand mittels Pipette verwerfen
- pro Bakterienpellet 400 µl Resuspensions-Puffer R zugeben, das Pellet mittels Pipette resuspendieren und in ein Extraction Tube L überführen, anschließend kurz vortexen
- Probe im Thermomixer bei 37°C 10 min, bei 65°C 10 min und bei 95°C 10 min inkubieren, danach Probe etwas abkühlen lassen
- 400 µl Binding Buffer B6 pro Probe zugeben und kurz vortexen
- Probengemisch auf RTA Spin Filter-Set geben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation für 1 min bei 12000 rpm, Filtrat verwerfen und RTA Spin Filter zurück auf den

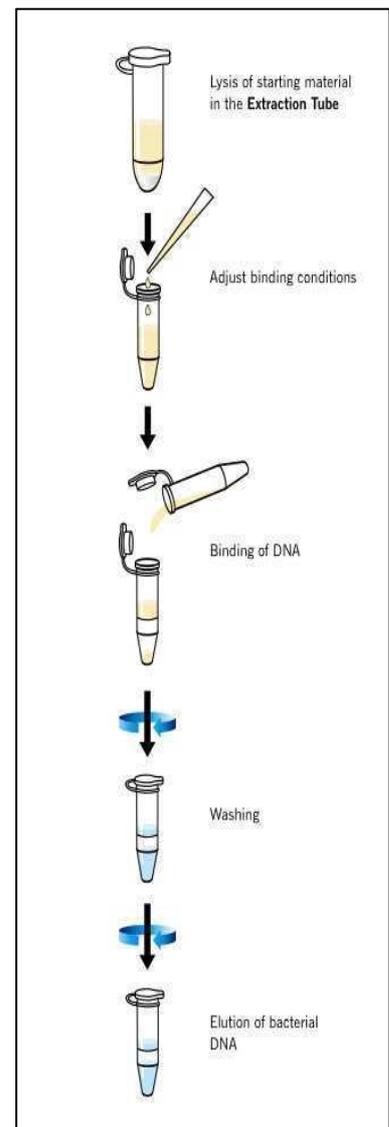


Abb. 7: Systematischer Aufbau der DNA-Extraktion mit dem RTP Spin Bacteria Mini Kit von Invitek.

3 Material und Methoden

- RTA Receiver Tube stecken
- 500 µl Wash Buffer I auf den Filter pipettieren und 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren, Filtrat entsorgen und RTA Spin Filter zurück auf den RTA Receiver Tube stecken
- 700 µl Wash Buffer II auf den Filter pipettieren und 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren, Filtrat entsorgen und RTA Spin Filter zurück auf den RTA Receiver Tube stecken
- nochmals 3 min bei 13200 rpm zentrifugieren, um den Restalkohol abzutrennen
- RTA Spin Filter in ein 1,5 ml Probengefäß stecken und 200 µl Elution Buffer D auf den Filter pipettieren, Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubieren,
- anschließend 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, Filter abschließend verwerfen
- DNA bei -20°C lagern

3.2.8.2 DNeasy® Blood & Tissue Kit

Das DNeasy® Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen kann für eine schnelle Extraktion von DNA aus verschiedenen Proben angewandt werden, z. B. aus tierischem Blut und Zellen, kulturellen Zellmaterialien, Bakterien und Insekten sowie Lebensmitteln. Die gereinigte und extrahierte DNA ist frei von Kontaminanten (Proteinen, RNA etc.) und Enzym-Inhibitoren und gut für weitere Analysen, wie PCR und Southern Blotting geeignet.

Die Extraktion mit diesem Kit beruht auf dem Prinzip einer schnellen Zell-Lyse der Bakterien durch Proteinase K und einem raschen Binden der DNA an die DNeasy-Membran. Die anschließenden Waschschrte minimieren weitere Kontaminanten und Inhibitoren und sorgen für die optimale Bindung der DNA an die Membran. Die DNA wird abschließend in einem Puffer oder in reinem Wasser eluiert und kann sofort für eine PCR Analyse verwendet werden.

Dieses Extraktionsverfahren wird vor allem bei der DNA-Gewinnung der Toxintypen C und D als sehr vorteilhaft angesehen, da die Toxingene hierbei

3 Material und Methoden

auf einem Bakteriophagen und nicht wie bei den anderen humanpathogenen Stämmen chromosomal codiert sind. Aber auch die Untersuchung der humanpathogenen Stämme A, B, E und F zeigte gute Ergebnisse.

Durchführung

Die DNA-Extraktion wurde gemäß der Gebrauchsinformationen des Testkit-Herstellers wie folgt durchgeführt:

- Eine Bakterienkultur von *Clostridium botulinum* wurde für 48 h in Selzer-Bouillon oder DRCM inkubiert
- 1 ml der Kultur wurde in ein 1,5 ml großes Probengefäß gegeben und bei 7500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen
- Bakterienpellet in 180 µl Zell-Lysis Puffer resuspendieren
- für 30 Minuten bei 37°C inkubieren
- 25 µl Proteinase K und 200 µl AL Puffer (ohne Alkohol) hinzugeben und vortexen
- für 30 Minuten bei 56°C inkubieren, 15 Minuten bei 95°C
- 200 µl Ethanol hinzugeben und vortexen
- gesamten Ansatz in die DNeasy Mini Spin Säule geben, die in einem 2 ml Sammelröhrchen fixiert ist, Probe bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugieren, Filtrat verworfen
- Säule in ein neues 2 ml Probengefäß geben und 500 µl AW1 Puffer hinzugeben, 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren, Filtrat verworfen
- Säule wieder in ein neues 2 ml Probengefäß geben und 500 µl AW2 Puffer hinzugeben, 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren, Filtrat verworfen
- Säule in ein neues 1,5 ml großes Probengefäß geben und 200 µl Puffer AE direkt auf die Membran geben, bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubieren lassen, dann 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren, um die DNA zu eluieren
- Probengefäße mit DNA bei -20°C lagern

3 Material und Methoden

Herstellung des Zell-Lysis Puffers:

20 mM Tris HCL, pH 8,0

2 mM Sodium EDTA, pH 8,0

1,2 % Triton X-100

Frisch vor dem Einsatz hinzugeben: Lysozym 20 mg/ml

3.2.8.3 DNA-Extraktion nach Lindström et al., 2001

Die Extraktion der Bakterien-DNA erfolgte durch die Erhitzung der Proben, einer damit verbundenen Zell-Lyse und Denaturierung sowie der anschließenden Freisetzung der bakteriellen DNA.

Durchführung

Die Extraktion der bakteriellen DNA wurde nach einer Veröffentlichung von Lindström et al. aus dem Jahr 2001 durchgeführt. Dabei wurden die Bakterienkulturen von *C. botulinum* in Selzer-Bouillon angeimpft und für 48 h bei 37°C in der Anaerobenbank inkubiert. Der anschließende Aufschluss der Bakterienzellen und die Freisetzung der DNA erfolgte bei 99°C für 10 Minuten im Heizblock. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm für 5 Minuten. Im Eppendorfgefäß bildete sich ein Pellet und ein klarer DNA-Überstand. Ein Mikroliter dieses flüssigen Überstandes wurde dann als Template-DNA in einer PCR eingesetzt.

3.2.9 PCR Verfahren - Toxingen Nachweis

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR - Polymerase Chain Reaction) ist ein Verfahren, bei dem DNA als Träger der Erbsubstanz jedes Organismus vervielfältigt wird. Das Prinzip einer PCR beruht auf einer Art "Kettenreaktion"; für die Vervielfältigung der DNA-Fragmente wird das Ausgangsprodukt der vorherigen Zyklen immer wieder verwendet.

3 Material und Methoden

Folgende Bestandteile sind für eine PCR notwendig:

1. Die Original-DNA (Template DNA)
2. Primer für die Festlegung des Startpunktes für die DNA-Synthese auf den Einzelsträngen
3. DNA-Polymerase, hitzebeständig, für die Replikation des festgelegten Abschnittes
4. Magnesium, wichtig für die Funktion des Enzyms Polymerase
5. Pufferlösungen zum Schaffen einer geeigneten chemischen Umgebung für die Polymerase
6. dNTPs, freie Nukleotide für die Anlagerung an neue DNA-Stränge

Eine PCR besteht aus vier verschiedenen Schritten, welche als erstes ein Aufspalten des DNA-Stranges beinhalten. Dies geschieht durch Hitze und eine DNA-Polymerase. Diese initiale Denaturierung oder Aufspaltung der doppelsträngigen DNA erfolgt meist bei hohen Temperaturen um die 95°C. Die weiteren Schritte einer PCR laufen in Zyklen (ca. 25 - 35, abhängig von der DNA-Menge) im Thermocycler ab. Diese Zyklen sind aus drei Phasen aufgebaut: der Denaturierungsphase, dem Annealing und dem Elongationsprozess.

Die Denaturierungsphase dient zur Spaltung der DNA-Stränge, dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren gelöst. Es gibt auch sogenannte Hot Start Polymerasen, welche eine anfängliche Erhitzungsphase von 15 Minuten benötigen. Eine solche Polymerase hat sich bei den hier angewendeten PCR-Verfahren als sehr effektiv herausgestellt. Nach dieser Erhitzungsphase müssen die Proben schnell wieder auf ca. 65°C abgekühlt werden, um die Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern.

Die nächste Phase entspricht dem Annealing, dem Anlagern und Binden der Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Temperatur im Thermocycler wird dabei spezifisch für die Primerbindung eingestellt, da jeder Primer ein anderes Temperaturoptimum (Schmelzpunkt) besitzt. Dieses Optimum ist abhängig von der Sequenz (Anteil von Guanin und Cytosin) der Primer und deren Länge.

3 Material und Methoden

Der letzte Schritt umfasst die Elongation oder Verlängerung, dabei füllt die DNA-Polymerase die neuen Stränge mit freien Nukleotiden auf. Die Temperatur ist dabei abhängig von der DNA-Polymerase und kann zwischen 68-72°C liegen.

Abschließend wird die gesamte Probe im Thermocycler auf 4°C abgekühlt und kann dann mit Hilfe von Agarose-Gelen auf die Größe der DNA-Fragmente untersucht werden.

3.2.9.1 Single-PCR zur Detektion der Toxintypen A bis F von *Clostridium botulinum*

(Nach Takeshi et al., 1996)

Diese PCR dient der Amplifikation spezifischer *Clostridium botulinum* DNA-Abschnitte in verschiedenen Probenansätzen (Reinkulturen aus Kulturüberstand, kontaminierte Lebensmittel) und soll die Gensequenzen der einzelnen Toxintypen A, B, C, D, E und F detektieren. Es handelt sich dabei um ein Single-PCR-Verfahren, wobei jede Probe einzeln mit einem spezifischen Primerpaar für jedes Toxingen untersucht werden muss.

Komponenten des PCR Ansatzes

Mastermix		Volumen pro Reaktion
Aqua bidest.		15,5 µl
Hot Star Taq Master Mix (incl. 3 mM MgCl ₂ und 400 µM je dNTP)		3,0 µl
MgCl ₂ 25mM		3,0 µl
Primer	A-FS-11 je 10 pmol/ µl	0,5 µl
	A-FS-22	0,5 µl
Gesamtvolumen:		22,5 µl

3 Material und Methoden

Alle Komponenten dieses Reaktionsansatzes wurden als Mastermix für die berechnete Anzahl von PCR Reaktionen (plus 10 %) in ein Eppendorf Gefäß pipettiert. Anschließend wurden dann jeweils 22,5 µl Mastermix in ein PCR Tube verteilt und 2,5 µl der zu untersuchenden Template DNA hinzupipettiert.

Die PCR Ansätze liefen bei folgendem Temperatur-Zeit-Profil im Thermocycler:

	Initiale Denaturierung	95 °C für 15 min
30 Zyklen	Denaturierung	94 °C für 30 sec
	Annealing	55 °C für 60 sec
	Elongation	72 °C für 60 sec
	Finale Extension	72 °C für 3 min
	Kühlung	4 °C bis ∞

- PCR Ergebnisse

DNA Positivproben	Stämme	Amplifikatgröße
35/06 (Toxintyp A, 1:10)	7272, 1750	283 bp
54/06 (Toxintyp B, 1:10)	7273, 89, 1944	315 bp
58/06 (Toxintyp C, 1:10)	-	290 bp
64/06 (Toxintyp D, 1:10)	-	497 bp
Stamm 8550 (Toxintyp E)	1718, 8550	266 bp
67/06 (Toxintyp F, 1:10)	1692, 1956	332 bp

Für die negative PCR-Kontrolle wurden anstelle von Template DNA 2,5 µl Wasser pipettiert.

3.2.9.2 Multiplex-PCR zur Detektion der humanpathogenen Toxingene A, B, E und F von *Clostridium botulinum*

(Nach Lindström et al., 2001)

Dieses PCR-Verfahren ist eine Multiplex-Variante, mit der man die humanpathogenen Toxintypen A, B, E und F von *Clostridium botulinum* in einem PCR-Ansatz detektieren kann. Das Verfahren kann mehrere Primerpaaren (für alle 4 Toxintypen) enthalten und dementsprechend mehrere Amplifikate in der Probe detektieren. Dies führt zu einer enormen Zeitersparnis und verringert den Versuchsumfang.

Komponenten des PCR Ansatzes

Mastermix			Volumen pro Reaktion
Aqua bidest.			11,5 µl
Hot Star Taq Master Mix (incl. 3 mM MgCl ₂ und 400 µM je dNTP)			3,0 µl
MgCl ₂ 25mM			3,0 µl
Primer	CBMLA 1	je 10 pmol/µl	0,75 µl
	CBMLA 2		0,75 µl
	CBMLB 1		0,75 µl
	CBMLB 2		0,75 µl
	CBMLE 1		0,75 µl
	CBMLE 2		0,75 µl
	CBMLF 1		0,75 µl
	CBMLF 2		0,75 µl
Gesamtvolumen:			22,5 µl

Alle Komponenten dieses Reaktionsansatzes wurden als Mastermix für die berechnete Anzahl von PCR Reaktionen (plus 10 %) in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend wurden dann jeweils 22,5 µl Mastermix in ein PCR

3 Material und Methoden

Tube verteilt und 2,5 µl der zu untersuchenden Template DNA hinzupipettiert.

Die PCR Ansätze liefen bei folgendem Temperatur-Zeit-Profil im Thermocycler:

Initiale Denaturierung	95 °C für 15 min	
30 Zyklen	Denaturierung	95 °C für 30 sec
	Annealing	60 °C für 30 sec
	Elongation	72 °C für 85 sec
Finale Extension	72 °C für 3 min	
Kühlung	4 °C bis ∞	

- PCR Ergebnisse

DNA Positivproben	Stämme	Amplifikatgröße
46/06 (Toxintyp A, 1:10)	7272, 1750	782 bp
54/06 (Toxintyp B, 1:10)	7273, 89, 1944	205 bp
Stamm 8550 (Toxintyp E)	1718, 8550	389 bp
67/06 (Toxintyp F, 1:10)	1692, 1956	543 bp

Für die negative PCR-Kontrolle wurden anstelle von Template DNA 2,5 µl Wasser pipettiert.

3.2.9.3 PCR zur Unterscheidung der Stämme von *Clostridium botulinum* in Gruppe I und Gruppe II

(Nach Dahlsten et al., 2008)

Dieses PCR-Verfahren diente der Unterscheidung der Bakterienstämme in die proteolytische Gruppe I und die nicht-proteolytische Gruppe II von *Clostridium botulinum*.

3 Material und Methoden

Proteolytische Stämme benötigen zur Toxinaktivierung keinen zusätzlichen Aktivator, die nicht-proteolytischen Stämme müssen dagegen mit Trypsin behandelt werden.

Komponenten des PCR Ansatzes

Mastermix			Volumen pro Reaktion
Aqua bidest.			13,5 µl
Hot Star Taq Master Mix (incl. 3 mM MgCl ₂ und 400 µM je dNTP)			5,0 µl
MgCl ₂ 25mM			2,0 µl
Primer	CBEDfldB-f	je 10 pmol/µl	0,5 µl
	BBEDflaB-r		0,5 µl
	CBEDiac1		0,5 µl
	CBEDiac2		0,5 µl
Gesamtvolumen:			22,5 µl

Alle Komponenten dieses Reaktionsansatzes wurden als Mastermix für die berechnete Anzahl von PCR Reaktionen (plus 10 %) in ein Eppendorf Gefäß pipettiert. Anschließend wurden dann jeweils 22,5 µl Mastermix in ein PCR Tube verteilt und 2,5 µl der zu untersuchenden Template DNA hinzupipettiert.

3 Material und Methoden

Die PCR Ansätze liefen bei folgendem Temperatur-Zeit-Profil im Thermocycler:

Initiale Denaturierung	95°C	für 15 min
28 Zyklen	Denaturierung	95°C für 30 sec
	Annealing	53°C für 30 sec
	Elongation	72°C für 30 sec
Finale Extension	72°C	für 5 min
Kühlung	4°C	bis ∞

Für die negative PCR-Kontrolle wurden anstelle von Template DNA 2,5 µl Wasser pipettiert.

- PCR Ergebnisse

Gruppe I: proteolytische Stämme von *C. botulinum* sind mit einer Bande bei 552 bp und einer zweiten Bande bei 761 bp amplifiziert

Gruppe II: nicht-proteolytische Stämme von *C. botulinum* sind mit einer Bande bei 761 bp amplifiziert

3.2.10 Detektion spezifischer Amplifikate im Agarosegel

Diese Methode dient der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer Größe und Konformation in einem Agarosegel (Elektrophorese). Das Gel wird in eine Gelkammer, welche über 2 Elektroden (Anode und Kathode) verfügt, eingebracht. Wenn der Stromkreis geschlossen wird, wandern negativ geladene Nukleinsäuren (Anionen) zur Anode, positive Kationen wandern zur negativen Kathode.

Die DNA Fragmente legen dabei unterschiedlich lange Strecken im Gel zurück. Kleine und lineare Fragmente passieren eine längere Strecke, als größere und

3 Material und Methoden

ringförmige DNA Fragmente. Je nachdem, wie groß die zu erwartenden DNA Stücke sind, wird die Konzentration der Agarose im Gel ausgewählt. Die daraus resultierende Porengröße des Agarosegels sorgt für die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe.

Lange Fäden aus Agarosepolymeren werden dabei in diesem Gel miteinander verknüpft und bilden Poren. Je höher die Agarosekonzentration, umso kleiner sind die Poren des Gels.

Die Größe der Fragmente wird mit Hilfe eines definierten Größenstandards (Marker) genauer definiert.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein 2%-iges Agarosegel gewählt, welches in flüssiger Form auf einen Gelschlitten aufgebracht wurde. Anschließend sind mit Hilfe von Kämmen die Taschen in das noch flüssige Gel gedrückt worden. Nach dem Polymerisieren des Geles wurden die Kämmen entfernt; die Taschen für die DNA-Proben ließen sich gut erkennen. Das gesamte Gel wurde dann in die Elektrophoresekammer gegeben und mit 1 x TBE Puffer bedeckt.

Es wurden insgesamt 10 µl DNA-Probe pro Tasche pipettiert, wobei diese vorher mit 2 µl 6x Loading Dye vermischt wurden, um ein Herausgleiten der Proben aus den Taschen zu verhindern. Danach wurde für ca. 45-50 min eine elektrische Spannung (100V) an das Gel angeschlossen. Die DNA-Proben wurden dabei im elektrischen Feld ihrer Größe nach getrennt. Als Kontrolle ist ein Größenstandard (Hyperladder II Marker) eingesetzt worden. Danach wurde das Gel zur Anfärbung der einzelnen Banden für 10 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gegeben, anschließend mit Wasser für 5 Minuten entfärbt und mit Hilfe einer Einrichtung für die Geldokumentation ausgewertet.

10 x TBE

109 g Tris

55,6 g Borsäure

9,3 g EDTA

ad 1000 ml *aqua bidest*

3 Material und Methoden

1 x TBE	100 ml 10 x TBE Konzentrat + 900 ml <i>aqua bidest</i>
Ethidiumbromid-Färbelösung	2 Tropfen Ethidiumbromid (50-100 µl) in 1000 ml <i>aqua bidest</i> .
Gelherstellung	2 g Agarose in 100 ml 1x TBE Puffer lösen und in der Mikrowelle erhitzen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat.

3.2.11 Toxinproduktion durch vegetative Zellen von *Clostridium botulinum*

Für die Produktion von Toxinen wurden frische Kulturen der einzelnen Stämme in Selzer-Bouillon angesetzt und für 48 h bei 37°C in der anaeroben Werkbank inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraumes war, auf Grund der Trübung der Bouillon, ein deutliches Wachstum zu erkennen.

Danach wurden 3 ml der Kultur in ein spezifisches Medium (MKBO) zur Toxinproduktion überführt. Die MKBO Bouillon wurde immer frisch angesetzt. Zehn Milliliter der Bouillon wurden mit 0,5 g getrocknetem Cooked-Meat-Medium von Oxoid oder mit Rinderherzpartikeln (gefrostet, Zoohandlung) versetzt. Die Zusätze mussten für 30 Minuten bei Raumtemperatur quellen und sind abschließend bei 121 °C autoklaviert worden. Dieses spezielle Medium regt die Bakterien zur Toxinproduktion an und ermöglicht eine größere Ausbeute an Toxinen.

Für die weitere Toxinproduktion wurden die Bakterien für 5-7 Tage unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Während dieses Prozesses war teilweise eine deutliche Zersetzung der Fleischpartikel zu erkennen und es entwickelte sich ein stark fauliger Geruch (Proteolyse). Nach maximal 7 Tagen Wachstumszeit wurden die Bouillons in Falcon-Röhrchen überführt und in einer Zentrifuge bei 4°C und 4000 rpm für mindestens 30 min abzentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt trennte die Bouillon in einen Überstand mit den

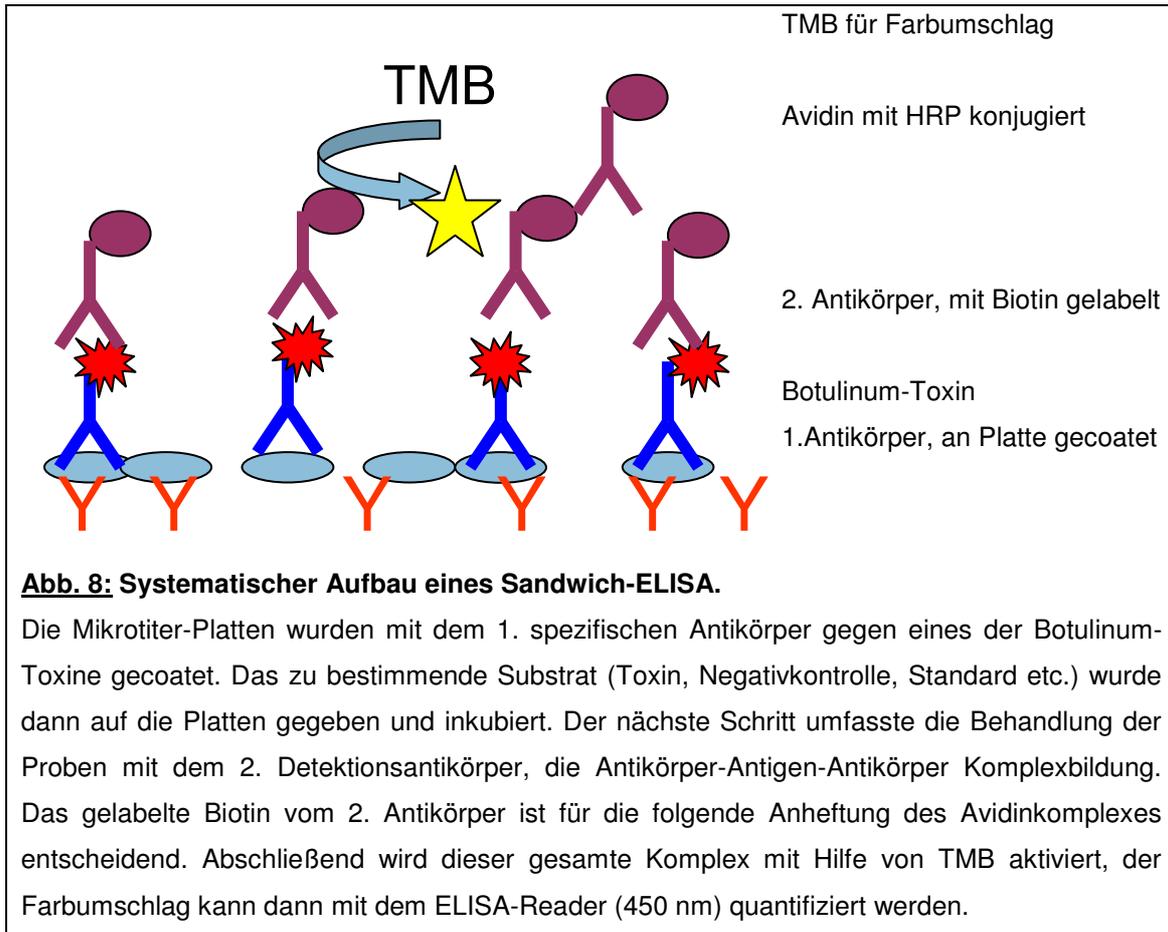
produzierten Toxinen und einen Pellet mit den restlichen festen Bestandteilen. Die klaren Überstände wurden mit Hilfe von 10 ml Einwegspritzen und einer passenden Filtereinheiten (PVDF, 0,45 µm) steril filtriert und im Kühlschrank oder Gefrierschrank bis zum Ansetzen des ELISA oder des Mäuseassay aufbewahrt. Alle Schwebpartikel, wie Fleischstücke oder vegetative Zellen, Sporen etc. sind im Pellet enthalten und wurden verworfen.

3.2.12 ELISA-Verfahren zum aktiven Toxinnachweis von *Clostridium botulinum*

Der **Enzyme Linked Immunosorbent Assay** (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren und beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens können Proteine und Viren, aber auch Antikörper, Hormone und Toxine detektiert werden. Ein ELISA-System kann zum Nachweis von aktiven Botulinumneurotoxinen (BoNT) in Untersuchungsproben bzw. in Kulturüberstand dienen.

Für die Methode wurden die Bindung spezifischer Antikörper und ihre anschließende Interaktion mit dem nachzuweisenden Stoff (Antigen) genutzt.

Der Aufbau dieses ELISA-Systems beruhte auf einem Sandwich-Immunoassay, d.h. eine Mikrotiter-Platte wurde mit einem ersten Antikörper gegen Botulinumtoxin beschichtet (gecoatet). Anschließend wurde auf diesen Antikörper das zu untersuchende Material (Probenextrakte mit Botulinum-Toxin, Negativkontrollen und Standards) als Antigen gegeben. Es kam zu einem Komplex aus Antikörper und Antigen, der dann mit einem zweiten Antikörper behandelt wurde. Der zweite Antikörper war mit einem Enzym (Biotin) gebunden, welches abschließend mit dem Avidin (mit HRP konjugiert) reagierte. Das Binden des Avidins ermöglichte eine katalysierte Farbreaktion, welche durch die Zugabe von 3,3', 5,5" Tetramethylbenzidine liquid (TMB) hervorgerufen wurde. Das Abstoppen des farblichen Umschlags erfolgte durch die Zugabe von Schwefelsäure. Der Farbumschlag kann mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen und quantitativ bestimmt werden.



Durchführung eines ELISA-Nachweises von aktiven Toxinen:

Im ersten Schritt wurden die Mikrotiter-Platten mit 96 Kavitäten (96-Well-Mikrotiter plates) mit dem ersten spezifischen Antikörper gegen eines der Toxine von *Clostridium botulinum* beschichtet. Dafür wurde eine Antikörper-Puffer Mischung auf die Mikrotiter-Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Antikörper wurden entsprechend ihrer zuvor berechneten Konzentrationen mit einem Coating-Buffer auf die Platten pipettiert. Am effektivsten hat sich eine einfache PBS-T Lösung als coating-Substanz herausgestellt, zu der die Antikörper für die Toxine A und B im Verhältnis 1:4000 und für die Typen E und F im Verhältnis 1:3500 hinzugegeben wurden. Die Verdünnungen wurden

3 Material und Methoden

vorher in einer Stammlösung (Stocklösung) angesetzt und konnten ca. 14 Tage im Kühlschrank gelagert werden.

Davon wurden dann jeweils 100 µl in jede Kavität der Platte pipettiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert, so dass sich die Antikörper an die Platte anheften konnten.

Am nächsten Tag wurde der überschüssige und nicht gebundene erste spezifische Antikörper von der Mikrotiter-Platte mit mindestens 5-7 Waschschritten mit PBS-T entfernt. Anschließend wurden alle Kavitäten mit 200 µl Blockierlösung (PBS-T) bei 37°C für 60 Minuten inkubiert, um eventuelle andere unspezifische Bindungen zu verhindern.

Im nächsten Schritt wurde die Blockierlösung aus den Kavitäten entfernt und jeweils 100 µl der Probenextrakte in die Wells pipettiert. Als Probenextrakte wurden toxinhaltige Kulturüberstände oder toxinhaltige Lebensmittelextrakte sowie Negativkontrollen und Standardlösungen verwendet. Diese Probenansätze wurden dann 120 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Wells erneut etwa 5x mit PBS-T gewaschen. Der zweite spezifische Antikörper, welcher mit Biotin gebunden (gelabelt) war, wurde nun in die Kavitäten hineinpipettiert und ebenfalls für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend sind die Wells 5-7x mit PBS-T gewaschen worden. Danach wurde in jedes Well eine 100 µl Avidinlösung gegeben (1:5000 in PBS-T); es erfolgte erneut eine Inkubation bei 37°C für 60 Minuten.

Abschließend folgte ein letzter Waschschrift (5-7x) mit PBS-T. Zum Starten der Farbreaktion wurden 100 µl TMB je Well hinzupipettiert und die Platte wurde 15 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert.

Nach einem leichten Farbumschlag der Negativkontrolle ins Bläuliche wurde die gesamte Reaktion bei allen Proben abgestoppt; dies wurde durch die Zugabe von 100 µl Schwefelsäure erreicht.

3 Material und Methoden

Die anschließende Auswertung des ELISA's erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die Grundpufferlösungen wurden vorher mit folgenden Zusammensetzungen angesetzt:

1 x PBS (1 M)	9 g Natriumchlorid 3,58 g Natriumdihydrogenphosphat ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7,4
PBS-T Puffer	10 ml 1 x PBS (0,01 M) 50 µl Tween 20 ad 1000 ml <i>aqua bidest.</i> , pH 7,4

3.2.13 Mäuse-Bioassay

Der Mäuse-Bioassay wurde am RIPAC Labor in Potsdam durchgeführt und in enger Zusammenarbeit mit dem Labor ausgewertet.

Die Mäuseversuche im Labor Ripac wurden mit Kulturüberständen der jeweiligen *C. botulinum*-Stämme durchgeführt. Dabei wurden die Kulturüberstände auf MKBO überimpft und zur Toxinproduktion angeregt, die Probengewinnung erfolgte wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Da bekannt war, welche Toxine die jeweiligen Stämme bilden konnten, wurde auf die Durchführung des Neutralisationstests zur Toxintypisierung verzichtet. Dadurch mussten wesentlich weniger Versuchstiere eingesetzt werden.

Durchführung des Versuchs

Herstellung des Extraktes aus Lebensmitteln:

Es wurden 10 g der zu untersuchenden Probe bzw. des Kulturüberstandes mit 10 ml Gelatine-Phosphat-Puffer in einem Stomacher-Beutel mit Membran

3 Material und Methoden

gemischt und in einem Walkmischgerät (Stomacher) homogenisiert. Diese Mischung wurde dann für mehrere Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der flüssige Anteil der Probe mit Hilfe einer Einmal-Pipette entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Proben wurden dann bei 4000 rpm und bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand der Probe entnommen (Pellet blieb im Röhrchen), in eine Einmalspritze gegeben und durch einen Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert. Die Proben sind dann bei 4 °C bis zum Mäuseversuch gelagert worden.

Trypsinbehandlung aller Proben (Toxinaktivierung)

Eine Trypsinbehandlung erfolgte, um möglicherweise vorhandene Toxine aus den nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Stämmen zu aktivieren. 1,8 ml Probenextrakt wurden mit 0,2 ml einer Suspension aus 0,5 g Trypsin in 10 ml Wasser vermischt und 30 Minuten bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Negativkontrolle

1,5 ml Extrakt wurden 10 Minuten in kochendem Wasser erhitzt, wodurch eventuell vorhandenes Botulinum-Toxin zerstört wurde.

Verwendete Mäuse

Verwendet wurden weiße, weibliche NMRI Mäuse mit einem Gewicht von 20-25 g im Alter von ca. 4- 5 Wochen.

Intraperitoneale Injektion in Versuchsmäuse

Pro Probenextrakt wurden 14 Mäuse benötigt. Jedem dieser Tiere wurden 0,5 ml des Extraktes intraperitoneal injiziert.

3 Material und Methoden

Probenansätze

Tier 1 und 2	unbehandelter Extrakt, 1 : 10 verdünnt
Tier 3 und 4	unbehandelter Extrakt, 1 : 100 verdünnt
Tier 5 und 6	unbehandelter Extrakt, 1 : 1000 verdünnt
Tier 7 und 8	trypsinbehandelter Extrakt, 1 auf 1,8 verdünnt
Tier 9 und 10	trypsinbehandelter Extrakt, 1 : 9 verdünnt
Tier 11 und 12	trypsinbehandelter Extrakt, 1 : 90 verdünnt
Tier 13 und 14	erhitzter Extrakt, unverdünnt (Negativkontrolle)

Alle Verdünnungen erfolgten mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung im Doppelansatz.

Beobachtung der Versuchstiere und Auswertung

Die Injektion des Toxins erfolgte intraperitoneal ohne Narkotisierung, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Während des Versuchsablaufes wurden an den Tieren keine weiteren Eingriffe vorgenommen.

Nach Injektion des Toxins tritt der Tod der Tiere meist innerhalb von 24 h ein. Die Tiere wurden am Anfang alle 1-2 Stunden, später alle 3-4 h, nachts einmal mit nicht mehr als 6 Stunden Abstand, beobachtet.

Wenn im Extrakt oder Kulturüberstand Botulinumneurotoxin vorhanden war, ist das Versuchstier unter typischen konzentrationsabhängigen Symptomen innerhalb weniger Stunden nach der Injektion verendet.

Endpunktkriterium für eine positive Toxinprobe ist die Ausbildung der sogenannten Wespentaille, hervorgerufen durch Schnappatmung. Dabei kommt es zum Einziehen der Flanken der Tiere durch vermehrte Nutzung der Bauchmuskulatur zur Atemunterstützung. Weitere Symptome sind Lähmungserscheinungen in der Muskulatur der Gliedmaßen. Nach Auftreten dieser Symptome wird eine sofortige Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation durchgeführt.

Verenden die Tiere unter diesen Symptomen und bleiben die Tiere, die das erhitzte Extrakt erhielten, am Leben, kann der Toxin-Nachweis als erbracht

3 Material und Methoden

gelten. Sterben die Mäuse unter untypischen Symptomen, ist an Tod infolge Injektionstrauma, Infektionen oder Vergiftungen mit anderen Substanzen zu denken. Der Toxintest mit den Mäusen ist zu wiederholen, wenn die durch polyvalentes Antiserum gegen *Clostridium botulinum* Toxine geschützten Tiere, sterben. Diese Tiere sollten bei Anwesenheit von Botulinumtoxin im injizierten Extrakt am Leben bleiben.

Aufgrund der Injektion von BoNT ist zu erwarten, dass die Tiere erhebliche gesundheitliche Beeinträchtigungen mit Todesfolge erleiden. Das Leiden der Tiere soll so kurz wie möglich dauern, eine schmerzfreie Euthanasie erfolgt unmittelbar nachdem die Diagnose feststeht.

Die infizierten Mäuse werden über den gesamten Versuchsablauf kontinuierlich beobachtet. Der Zeitpunkt des Todes wird möglichst genau festgehalten. Auf Grund dessen können dann anschließend die Konzentrationsspannen der Dosis analysiert werden, bei der die Tiere verendet sind und bei welcher sie überlebten. Die Konzentration des Toxins wird als Mäuseletale Dosis (MLD) angegeben und dient zur Bestimmung der Toxinmenge in den jeweiligen Proben.

3.2.14 Kontamination der verschiedenen Matrices (Lebensmittel)

Die Entwicklung verschiedener Nachweisverfahren zur Detektion von *Clostridium botulinum* und dessen Toxin-Genen in Lebensmitteln wurde auf Grundlage künstlich kontaminierter Proben durchgeführt.

Für die kulturellen und molekularbiologischen Verfahren für den Nachweis der Bakterien wurden verschiedene Lebensmittel (Hackfleisch, Bohnen aus der Konserve und H-Milch) mit einer bestimmten Menge an vegetativen Bakterien oder Sporen kontaminiert.

Die Konzentration der vegetativen Bakterienkulturen oder Sporensuspensionen sind mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt und die Keimzahl berechnet

3 Material und Methoden

worden. Anschließend wurden diese verdünnten Bakterien-/Sporensuspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen in die jeweiligen Lebensmittel eingebracht.

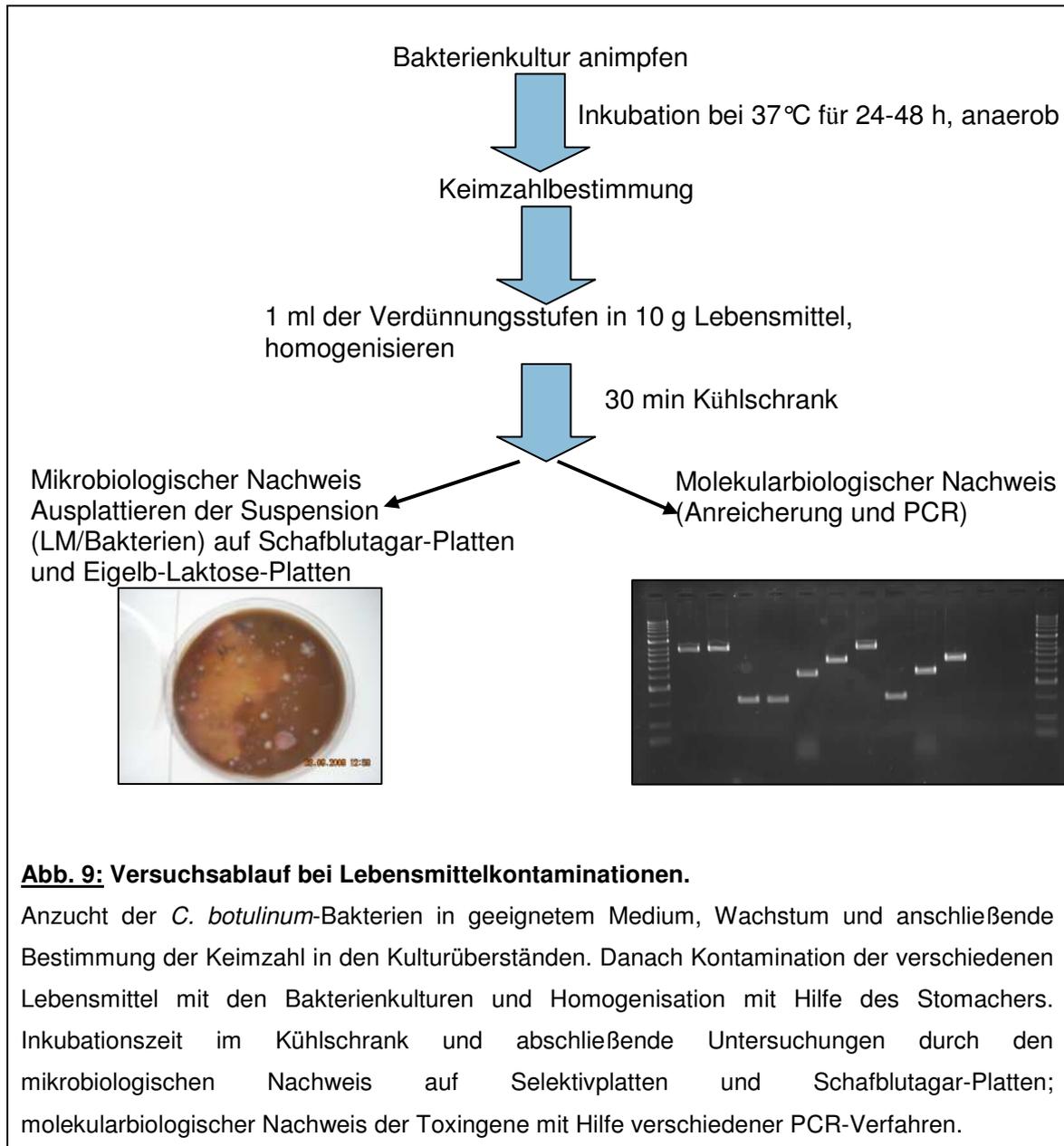
Um eine optimale Verteilung der Bakterien oder Sporen zu gewährleisten, sind die festen Lebensmittel vorher mit Peptonwasser homogenisiert worden. Milch wurde ohne eine weitere Verdünnung sofort mit Bakterien oder Sporen kontaminiert.

Die Lebensmittel wurden dann für 30 min im Kühlschrank gelagert, um eine optimale Verteilung der Bakterien/Sporen zu bewirken.

Nach dem Schritt der Kontamination wurden die Lebensmittel mit Hilfe von mikrobiologischen Selektivplatten (Eigelb-Laktose-Platten) oder Schafblutagar-Platten untersucht. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Dieser Schritt ermöglichte Aussagen über die *C. botulinum* Erreger in den jeweiligen Lebensmitteln und wurde zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl verwendet. Die Auswertung der mikroskopischen Bilder der Gram-Färbung der fraglichen Kolonien erlaubte eine zusätzliche Bestätigung, dass es sich um Clostridien handelte.

Der molekularbiologische Nachweis der Bakterien und Sporen wurde direkt aus den Lebensmitteln durchgeführt. Die Lebensmittel wurden homogenisiert, die DNA-Extraktion erfolgte aus der flüssigen Phase des Homogenisats. Mit einem PCR-Verfahren wurde der Nachweis verschiedener Toxingene geführt. Für die Anwendung der Methode ist es notwendig, Aussagen über die Nachweisgrenze treffen zu können. Die Bestimmung der Keimzahl für *C. botulinum* in Kulturüberstand oder im Lebensmittel wurde mit einem positiven PCR-Ergebnis für die Toxingene abgeglichen. Bei der Zugabe von sehr geringen Konzentrationen an Bakterien (10^1 und 10^2 KbE/g oder ml) war die Durchführung einer PCR erst nach einem Anreicherungsschritt in Selzer-Bouillon oder TPGY Medium für mindestens 18-24 h möglich.

3 Material und Methoden



3.2.14.1 Kontamination mit vegetativen Bakterien oder Sporen

Zu Beginn der Versuchsansätze wurden verschiedene Stämme von *Clostridium botulinum* in Selzer-Bouillon angeimpft und für 48 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend sind die Keimzahlen der Kulturen mit Hilfe von Verdünnungsreihen bestimmt und die Konzentration der Bakterien berechnet worden.

3 Material und Methoden

Die zu untersuchenden Lebensmittel waren Hackfleisch, Bohnen aus Konserven und H-Milch, die mit den vegetativen Bakterien und Sporen kontaminiert wurden. Dafür wurden jeweils 10 g Hackfleisch oder 10 g Bohnen (5 g Bohnen und 5 g Flüssigkeit aus der Bohnenkonserve) mit Peptonwasser homogenisiert. Die H-Milch (10 ml) wurde ohne den Schritt der Homogenisation eingesetzt. Alle Lebensmittel wurden anschließend mit vegetativen Zellen oder Sporen von *Clostridium botulinum* kontaminiert, sodass Konzentrationen zwischen 10^1 bis 10^5 KbE/g oder ml in den Lebensmitteln erreicht wurden.

3.2.14.2 Kontamination der Lebensmittel mit Toxinen von *Clostridium botulinum*

Die Erzeugung der Toxine von *Clostridium botulinum*, die für eine Kontamination der Lebensmittel eingesetzt wurden, sind im Kapitel 3.2.11 beschrieben. Sie wurden mit Hilfe des ELISA-Verfahrens detektiert und quantifiziert. Die Bestimmung der Toxinmengen im Kulturüberstand ermöglichte, dass definierte Mengen an Toxinen in die Lebensmittel (Bohnen, Corned Beef und H-Milch) eingebracht werden konnten.

Jeweils 10 ml Milch wurden mit 1 ml Toxinüberstand mit bekannter Konzentration kontaminiert. 5 g Corned Beef und 5 ml Peptonwasser sowie 5 g Bohnen und 5 g Flüssigkeit wurden homogenisiert und ebenfalls mit jeweils 1 ml Toxinüberstand inkubiert.

Nach einer Einwirkzeit des Toxins auf die Lebensmittel von 60 Minuten im Kühlschrank, wurde der flüssige Anteil der Probe in ein Falcon-Tube pipettiert. Dieser toxinhaltige Überstand wurde anschließend bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Die flüssigen Überstände konnten dann in einem Eppendorfgefäß bei -20°C gelagert werden, bis die Toxinbestimmung mit dem ELISA durchgeführt wurde.

3.2.15 Toxinbildungsfähigkeit vegetativer *Clostridium botulinum* Kulturen in verschiedenen Lebensmitteln unter Einbeziehung des Matrix Effektes

Diese Versuche wurden mit Corned Beef und Bohnen durchgeführt. Es wurden Konserven verwendet, um eine Begleitflora auszuschließen.

Eine definierte Keimmenge der Clostridien wurde den Lebensmitteln zugesetzt. Zunächst wurden jeweils 5 g Corned Beef mit 5 ml Peptonwasser und 5 g Bohnen mit 5 g Bohnenwasser in einem Stomacher homogenisiert und anschließend mit 1 ml einer definierten Bakterienkultur (Toxintypen A, B, E und F) kontaminiert. Die Bakterien wurden dann unter anaeroben Bedingungen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 7 Tagen angeregt, Toxine zu bilden. Danach wurde der flüssige Bestandteil der Lebensmittelproben mit Hilfe einer Pipette entnommen und in ein Falcon-Tube überführt. Diese Ansätze sind dann in einer Zentrifuge bei 4°C und 4000 rpm für 30 min abzentrifugiert worden. Der Überstand enthielt die Toxine, welche mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert wurden. Diese gereinigten Proben konnten dann bis zur Verwendung im ELISA in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen bei -20°C gelagert werden.

3.2.16 Stabilitätsuntersuchungen der humanpathogenen *Clostridium botulinum* Toxine

Für die Untersuchungen der Toxinstabilität wurden reine Kulturüberstände und Lebensmittel mit verschiedenen Toxinen verwendet. Die toxinhaltigen Matrices wurden hitzebehandelt, um die Resistenz der Toxine gegenüber verschiedenen Temperatur-Zeit-Relationen feststellen zu können.

Die ersten Ansätze wurden mit toxinhaltigen Kulturüberständen der verschiedenen *C. botulinum*-Stämme durchgeführt. Dabei wurden diese Proben ebenfalls mit unterschiedlichen Temperaturen behandelt. Sie wurden für 30 min auf 60°C und für 2 min auf 72°C erhitzt. Als Vergleichswerte wurden die

3 Material und Methoden

unbehandelten Proben ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des ELISA-Verfahrens und des Mäuse-Bioassays ermittelt.

Die weiteren Versuchsansätze wurden, auf Grund der gut vergleichbaren Ergebnisse aus ELISA-Tests und Mäuse-Bioassay aus den Kulturüberständen, nur noch mit Hilfe des ELISA-Verfahrens durchgeführt.

Es wurden Temperatur-Zeit-Bereiche gewählt, die auch bei lebensmittel-technologischen Verfahren oder bei der Zubereitung von Lebensmitteln im Haushalt Anwendung finden.

Die Erhitzung der kontaminierten Lebensmittel (0,5 ml Proben) erfolgt in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen im Thermocycler für 30 Minuten bei 60 °C oder 62 °C und für 2 Minuten bei 72 °C. Auch die Erhitzungsstufen bei 85 °C für 10 Minuten erfolgten im Thermocycler in 1,5 ml Gefäßen (siehe Tabelle 13).

Die Erhitzungsansätze für die Milch erfolgten in einem Thermoblock für PCR-Reaktionen. Für diesen Ansatz wurden nur sehr geringe Probenmengen von 100 µl in kleine PCR-Tubes überführt und auf die gewünschte Temperatur von 72 °C für 20 sec erhitzt. Eine anschließende rasche Abkühlung aller Proben erfolgte stets mit Hilfe von Eis, welches zu einer schnellen und gleichmäßigen Kühlung führte.

Corned Beef wurde für 2 min auf 72 °C sowie für 10 min auf 85 °C erhitzt. Die Erhitzung 2 min auf 72 °C sollte einer Temperatur entsprechen, die beim Braten und Erhitzen von rohen tierischen Lebensmitteln im Haushalt empfohlen wird, während nach 10 min bei 85 °C mit einer fast vollständigen Toxininaktivierung (negativer Wert) zu rechnen war.

Die Bohnen aus der Konserve wurden ebenfalls für 2 Minuten bei 72 °C gekocht und bei 85 °C für 10 min erhitzt.

Die Milchproben wurden dagegen bei 62 °C für 30 min sowie bei 72 °C für 20 sec behandelt. Diese Temperaturbereiche entsprechen den üblichen kommerziell angewendeten Pasteurisierungsverfahren, dem Dauererhitzen bzw. der Kurzzeit-Hocherhitzung. Als negative Kontrolle wurde hier ebenfalls eine Erhitzung auf 85 °C für 10 min durchgeführt.

3 Material und Methoden

Tabelle 14: Überblick über die Erhitzungsbedingungen der Lebensmittelmatrizes für die Untersuchungen der Toxinstabilität von *C. botulinum* Toxinen

	Temperatur	Dauer	Menge
Corned Beef	a) 72 °C	2 min	0,5 ml
	b) 85 °C	10 min	0,5 ml
Bohnen	a) 72 °C	2 min	0,5ml
	b) 85 °C	10 min	0,5 ml
Milch	a) 62 °C	30 min	0,5 ml
	b) 72 °C	20 sec	100 µl
	c) 85 °C	10 min	0,5 ml

Tabelle 13 zeigt einen Überblick über die durchgeführten Erhitzungsrelationen. Alle Lebensmittelproben wurden in mehreren Versuchsansätzen mit diesen Temperatur-Zeit-Stufen behandelt und anschließend im ELISA getestet. Dabei sollten auf Grund der verschiedenen Stadien einer Toxindenaturierung Unterschiede in der Absorptionsgröße und somit der Toxinmengen erkennbar sein.

Um weitere Aussagen über die Stabilität und die Lagerungsfähigkeit der Toxine treffen zu können, wurden ebenfalls Versuche mit toxinhaltigen Kulturüberständen durchgeführt. Dafür wurden die *C. botulinum* Kulturüberstände bei +4 °C und bei -21 °C über einen Zeitraum von 20 Tagen mehrmals mit Hilfe des ELISA-Verfahrens quantifiziert und der Toxingehalt bestimmt.

3.3 Versuchsüberblick

3.3.1 Versuchsaufbau

Entwicklung von molekularbiologischen Verfahren zum Nachweis von *C. botulinum* (vegetative Zellen und Sporen) unter Berücksichtigung der verschiedenen Genome für die Toxintypen A, B, E und F

- Kontamination von Lebensmitteln (Hackfleisch, Bohnen aus der Konserve und H-Milch) mit *C. botulinum* (vegetative Formen und Sporen)
- Nachweis der Bakterien sowie der Toxingene mit Hilfe mikro- und molekularbiologischer Verfahren (Selektivplatten und PCR-Verfahren)

Untersuchungen zur Toxinbildungsfähigkeit und Stabilität von *C. botulinum* in ausgewählten Matrices (Lebensmitteln);

- Produktion von Toxinen im Kulturüberstand und deren Nachweis im ELISA-Verfahren und Mäuse-Bioassay
- Kontamination von Lebensmitteln mit Toxinen, Nachweis dieser Toxine in der Matrix mit Hilfe von ELISA-Verfahren (H-Milch, Bohnen aus der Konserve und Corned Beef)
- Toxinproduktion von *Clostridium botulinum* (vegetative Zellen) in verschiedenen Lebensmitteln (Corned Beef und Bohnen aus der Konserve) mittels ELISA

Untersuchungen zur Hitzestabilität und Prozessstabilität von BoNT mittels ELISA-Verfahren

- Stabilitätsuntersuchungen von *C. botulinum* Kulturüberständen mit gebildeten Toxinen mit Hilfe von ELISA und Mäuse-Bioassay

3 Material und Methoden

- Untersuchung der Stabilität von zugesetzten Toxinen in Lebensmitteln nach Wärmebehandlung aus Kulturüberstand (H-Milch, Bohnen aus der Konserve und Corned Beef) mittels ELISA
- Stabilitätsuntersuchungen von produzierten Toxinen durch Vegetative Formen von *C. botulinum* in den verschiedenen Lebensmitteln (Corned Beef und Bohnen aus der Konserve)
- Untersuchungen zur Lagerfähigkeit der Toxine im Kulturüberstand bei -21 °C und +4 °C

3.3.2 Eingesetzte Lebensmittel

Für die Kontamination der Lebensmittel mit *C. botulinum* (vegetative Zellen und Sporen) für die Etablierung von DNA-Extraktionsverfahren und PCR-Technik wurden verschiedene flüssige und feste Matrices ausgewählt. Als Lebensmittel tierischen Ursprungs wurden ultrahocherhitzte Milch, als feste Lebensmittel Corned Beef aus Konserven sowie Hackfleisch und als pflanzliche Produkte Bohnen aus Konserven verwendet.

Die Kontamination der Lebensmittel mit den verschiedenen Toxinen für die Etablierung eines ELISA-Verfahren zum Nachweis von aktiven BoNT erfolgt mit Corned Beef und Bohnen sowie Milch. Diese Lebensmittel wurden auch mit verschiedenen *C. botulinum*-Typen kontaminiert, um eine Toxinproduktion in den Lebensmitteln zu induzieren. Ultrahocherhitzte Milch, Corned Beef und Bohnen aus Konserven sind kommerziell sterile Lebensmittelprodukte. Sie wurden vor allem deshalb ausgewählt, um eine die Analytik möglicherweise störende Begleitflora so gering wie möglich zu halten. Hackfleisch enthält üblicherweise eine hohe Konzentration an Begleitflora.

4 Ergebnisse

4.1 *Mikrobiologischer Nachweis der vegetativen Formen von Clostridium botulinum*

4.1.1 Mikrobiologischer Nachweis aus Kulturüberstand

Zum morphologischen Nachweis von *C. botulinum* wurden verschiedene Stämme auf Schafblutagar-Platten inkubiert und anschließend untersucht.

Die Kolonieförmigkeiten von *C. botulinum* waren rund bis lappig, leicht unregelmäßig und meist erhaben. Publikationen besagen, dass der Durchmesser zwischen 1 bis 6 mm je nach Gruppe variieren kann. Die Farbe einer Bakterienkolonie kann von durchsichtig bis zu semiopak mit leicht grau-weißer Farbe reichen. Diese Eigenschaften wurden hier ebenfalls beobachtet.

4 Ergebnisse

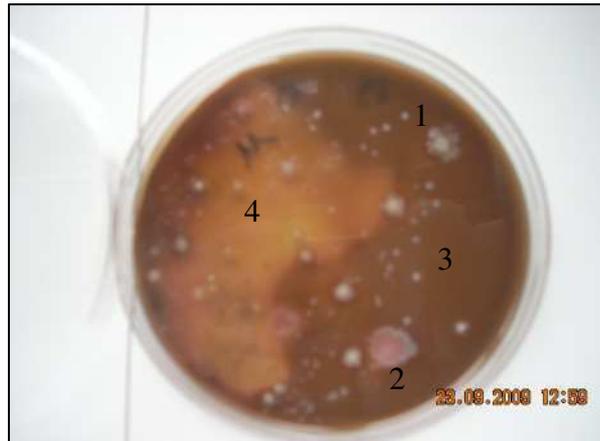


Abb. 11: Morphologie von *Clostridium botulinum* Toxintyp B, Stamm 89, auf Schafblutagar-Platten, isoliert aus künstlich kontaminiertem Hackfleisch.

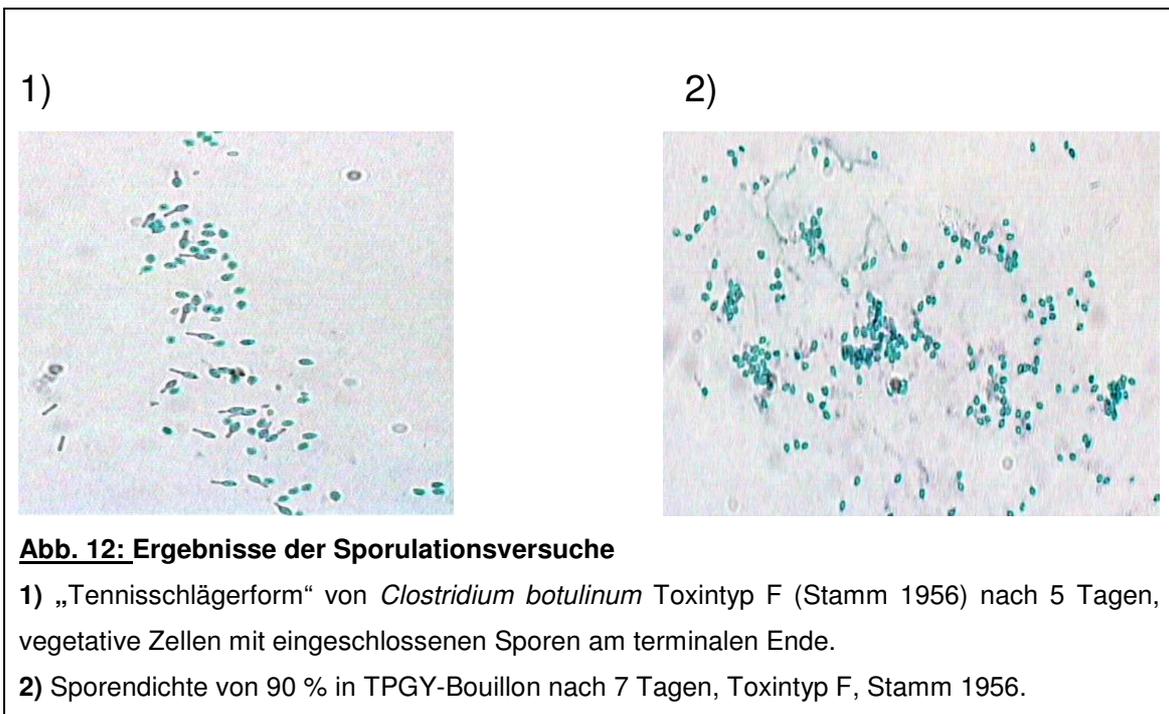
Phänotypische Identifizierung von *Clostridium botulinum*-Kolonien, **1** und **2**: grau-weißliche Kolonien mit rauer Oberfläche und lappiger Randstruktur, **3**: glatte Oberfläche und schwärmende Eigenschaften; **4**: β -Hämolyse sowie eine Vielzahl von Begleitflora.

In der Abbildung 11 ist eine Schafblutagar-Platte zu sehen, die mit einer kontaminierten Hackfleischprobe beimpft wurde. Die typische Kolonief orm von *C. botulinum* ist erkennbar, auch wenn eine Vielzahl an Begleitflora auf der Platte gewachsen war. Die Identifizierung erfolgte auf Grund der verschiedenen typischen Charakteristika einer *C. botulinum*-Kultur auf Schafblutagar-Platten. Dazu zählen vor allem die grau-weißliche Koloniefarbe mit ihrem lappigen Rand und der rauen Oberfläche (Abb. 11, Nummer 1 und 2). Des Weiteren kann man bei Nummer 3 (Abb. 11) eine stark schwärmende Struktur erkennen, die sich durch ihre sehr glatte, aber weitgefächerte Struktur auszeichnet. Auch ist auf der Platte eine deutlich ausgeprägte Hämolyse-Zone zu erkennen (Abb.11, Nummer 4).

Der Versuch einer Keimzahlbestimmung war nicht immer möglich, da die Bakterien auf Grund ihres schwärmenden Wachstums und Verhaltens häufig keine Einzelkolonien bildeten. Aber auch die Auswirkungen der Begleitflora bei Hackfleisch machten eine Keimzahlbestimmung schwierig.

4.2 Sporenerstellung

Um die verschiedenen Lebensmittel (Hackfleisch, Milch und Bohnen) mit *Clostridium botulinum*-Sporen zu kontaminieren, mussten die vegetativen Bakterienzellen zunächst zur Sporulation angeregt werden (siehe Kapitel 3.2.6). Nach der entsprechenden Vorbereitung und Erzeugung der Sporen wurden diese unter einem Mikroskop betrachtet und ausgewertet. In der folgenden Abbildung ist zu erkennen, wie die Sporulation nach verschiedenen Zeitspannen in den jeweiligen Proben vorangeschritten ist. Um eine ausreichende Sporendichte für eine Kontamination zu erzielen, wurden die Sporulationsansätze für 5 bis 7 Tage anaerob bei Raumtemperatur inkubiert.



Wie man in Abbildung 12 erkennen kann, wurde eine deutliche Veränderung der Bakterienform festgestellt und mit Hilfe der Sporenfärbung nach Rakette dargestellt. Abbildung 12, Nummer 1 zeigt, dass nach 5 Tagen noch keine vollständige Versporung vorhanden war. Die vegetativen, violetten Zellen sind noch sehr gut zu sehen, insbesondere die Ausbildung der sogenannten "Tennisschlägerform", eine vegetative Zelle mit apikaler Ausbuchtung und

deutlicher Sporenbildung. In Abbildung 12, Nummer 2 ist nach einer Dauer von 7 Tagen bei den meisten Stämmen eine Sporendichte von 80-90 % festzustellen. Im mikroskopischen Bild ist ersichtlich, dass fast alle vegetativen Formen von *C. botulinum* umgebildet wurden und nur noch die grünen Sporenkörper zu erkennen sind.

4.3 Testung und Entwicklung geeigneter DNA-Extraktionsverfahren

Die Testung verschiedener DNA-Extraktionsverfahren erfolgte zu Beginn der Untersuchungen aus reinen Kulturüberständen, um die Effektivität der einzelnen Systeme zu testen. Erst anschließend sind die Versuche mit Proben aus kontaminierten Lebensmittelmatrizes durchgeführt worden.

Es wurden verschiedene Lebensmittelmatrizes mit vegetativen Zellen und Sporen von *C. botulinum* kontaminiert. Für die Untersuchungen der Lebensmittelproben wurde eine Reihe von Extraktionsverfahren und Kits verschiedener Firmen und Anbieter für die DNA getestet (RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit von Invitex, Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit, Süd-Laborbedarf Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit, Sigma-Aldrich GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, Epicentre Biotechnologies MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit).

Die Testung dieser verschiedenen Kitsysteme ergab, dass sich zwei dieser Kits als sehr effektiv für die DNA-Extraktion herausgestellt haben. Dazu zählten das RTP-Spin Bacteria DNA Mini Kit der Firma Invitex und das Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit. Darüber hinaus wurde eine weitere Extraktionsmethode aus einer Veröffentlichung von Lindström et al. von 2001 getestet. Letztere sowie die anderen kommerziellen Kits wurden bei der DNA-Extraktion aus den verschiedenen Lebensmitteln mit mangelhaften Ergebnissen als nicht zufriedenstellend bewertet.

Folgende Ergebnisse aus den Versuchen zur DNA-Extraktion wurden erzielt:

1) RTP-Spin Bacteria DNA Mini Kit von Invitek

Das Invitek Kit wurde für die Stämme der Toxintypen A, B, E und F verwendet, um die genomische bakterielle DNA aus den Lebensmitteln zu extrahieren. Dieses Kit beruht auf einer chemischen und thermischen Lyse der Bakterienzellen (siehe Kapitel 3.2.8.1).

Fazit: Die Extraktion der DNA mit Hilfe des Invitek Kits gelang bei allen Stämmen der Toxintypen A, B, E und F gut. Die Bakterien konnten aus den Kulturüberständen der kontaminierten Lebensmittel effektiv nachgewiesen werden. Bei niedrigen Keimkonzentrationen von $<10^2$ Bakterien/g oder ml musste vorher ein Anreicherungsschritt in Selzer-Bouillon durchgeführt werden, um die DNA nachweisen zu können.

2) DNA-Extraktion mit dem Qiagen DNeasy® Blood and Tissue Kit

Für die DNA-Extraktion mit diesem Kit musste ein frischer Zell-Lysis Puffer hergestellt werden, damit die Bakterienwände zerstört (lysiert) und somit die DNA freigesetzt werden konnte (Kapitel 3.2.8.2).

Fazit: Diese Extraktionsmethode erwies sich als besonders für die DNA-Extraktion der *Clostridium botulinum*-**Stämme der Typen C und D** geeignet, da die Gene für die Toxine auf einem Phagen codiert sind. Alle anderen Toxintypen der Bakterienstämme (A, B, E und F) konnten ebenfalls einwandfrei isoliert und anschließend mit PCR-Verfahren detektiert werden.

3) DNA-Extraktion nach Lindström et al., 2001

Die Proben wurden gekocht, was zur Denaturierung der Zellen und Freisetzung der DNA durch Hitze führte. Die anschließende Zentrifugation trennte die DNA von den restlichen fragmentierten Zellbestandteilen wie RNA, Proteinen etc. (Kapitel 3.2.8.3).

Fazit: Die erzielten Ergebnisse waren dabei **nicht zufriedenstellend**, es konnte nicht immer reine DNA extrahiert werden. Damit erwies sich diese Methode als weniger geeignet, um DNA zum Nachweis der Toxingene von *C. botulinum* aus den kontaminierten Lebensmitteln zu extrahieren.

4) DNA-Extraktion mit den Kits von:

- **Süd-Laborbedarf (Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit):** Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mit Lysis Puffer und RNase Behandlung
- **Sigma-Aldrich (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit):** DNA-Extraktion mit speziellen Lysispuffer
- **Epicentre Biotechnologies (MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit):** DNA-Extraktion aus grampositiven Bakterien mittels Lysozymen

Fazit:

Die Ergebnisse waren **mangelhaft**, es konnten kaum reine DNA extrahiert und somit auch keine positiven PCR-Ergebnisse erzielt werden. Alle drei Verfahren haben sich als ungeeignet für die DNA-Extraktion aus Lebensmitteln erwiesen.

4.4 Kontamination verschiedener Lebensmittelmatrizes (Hackfleisch, Bohnen aus Konserven und H-Milch) mit vegetativen Formen und Sporen von Clostridium botulinum

Zum Nachweis von vegetativen Zellen in verschiedenen Lebensmitteln (Hackfleisch, Bohnen und Milch) wurden die Lebensmittel zunächst künstlich mit Bakterienstämmen verschiedener Botulinumtoxintypen kontaminiert.

Vor der Kontamination der Lebensmittel wurden die *C. botulinum*-Stämme mit Hilfe von flüssigen Nährmedien aktiviert. Es wurden Stämme der Toxintypen A (Stamm 7272 und 1750), B (Stamm 7273, 89 und 1944), E (Stamm 8550 und 1718) sowie F (Stamm 1692 und 1956) für das Beimpfen der Lebensmittel eingesetzt. Die Berechnung der Keimzahlen erfolgte wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben.

Dabei wurden in der Nährbouillon die folgenden Keimzahlen erreicht:

Toxintyp A: 10^8 - 10^9 KbE/ml

Toxintyp E: 10^6 - 10^7 KbE/ml,

Toxintyp: 10^8 - 10^9 KbE/ml und

Toxintyp F: 10^7 - 10^8 KbE/ml.

Die Lebensmittel sind anschließend mit einer bestimmten Kulturmenge kontaminiert worden. Es wurden Proben mit Keimzahlen zwischen 10^1 bis 10^5 KbE/g oder ml Lebensmittel hergestellt.

Die niedrigen Kontaminationsraten von 10^1 bis 10^2 Keimen pro g oder ml eines Lebensmittels ließen sich mit Hilfe der PCR sehr schlecht detektieren; es gelang kaum ein positiver Nachweis. Aus diesem Grund wurden die auf diesem Keimlevel kontaminierten Lebensmittelproben in Selzer-Bouillon vorangereichert. Durch einen 24-stündigen Anreicherungsschritt bei 37°C

erhöhte sich die Bakterienkonzentration und die Menge der zu extrahierenden DNA, um anschließend eindeutige PCR-Ergebnisse erzielen zu können.

Bei höheren Keimkonzentrationen ab 10^2 bis 10^5 kbE/g oder ml Lebensmittel, wurden positive Nachweise mit Hilfe der PCR ohne Voranreicherung erzielt.

4.5 Molekularbiologischer Nachweis von humanpathogenen *C. botulinum*-Stämmen in verschiedenen Lebensmittelmatrizes

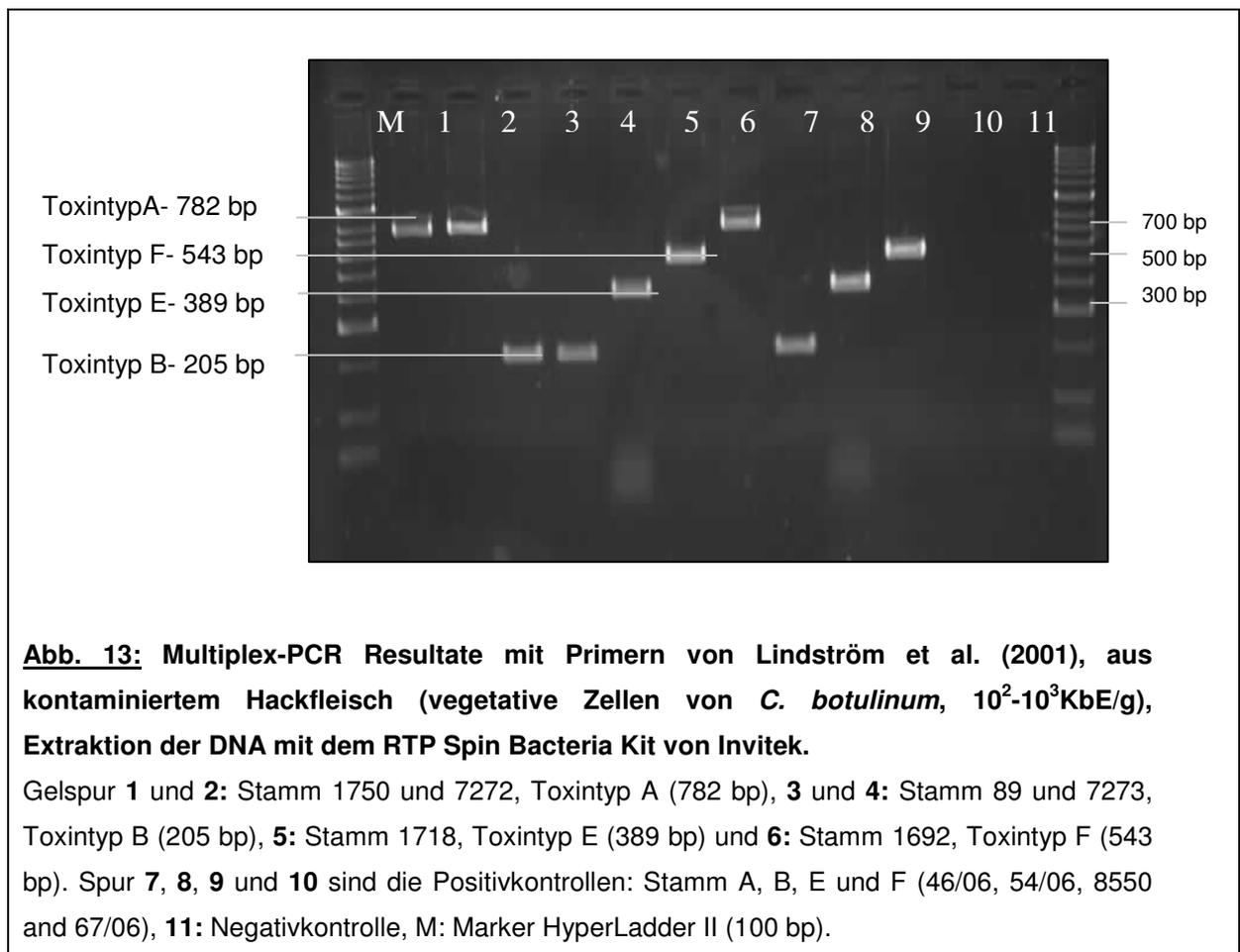
Es wurden zwei verschiedene Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) angewendet: eine Single-PCR mit Primern von Takeshi et al. (1996) und eine Multiplex-PCR-Variante mit Primern nach Lindström et al. (2001). Die PCR-Verfahren wurden an die verschiedenen Untersuchungsmatrizes angepasst und auf ihre Eignung für die Lebensmitteluntersuchungen mit verschiedenen humanpathogenen *C. botulinum*-Stämmen getestet. Es wurden die humanpathogenen Stämme der Toxintypen A, B, E und F berücksichtigt.

Beide PCR-Verfahren hatten sich beim Nachweis der Toxingene aus Kulturüberständen als zufriedenstellend und präzise erwiesen und wurden für die Detektion in verschiedenen Lebensmittelmatrizes angepasst.

Künstlich kontaminierte Lebensmittel wurden mit Hilfe der beiden PCR-Systeme (Single und Multiplex) untersucht. Die spezifischen Toxingene ließen sich präzise nachweisen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den PCRs in der Darstellung der Toxingene auf den Elektrophoresegelen. Der Nachweis aus den verschiedenen Lebensmitteln war teilweise mit der Single-PCR nach Takeshi et al. etwas exakter und deutlicher. Im Gel zeigten sich eindeutige Banden, Verunreinigungen wurden nicht festgestellt. Die Multiplex-Variante ließ im Gegensatz dazu größere Ungenauigkeiten erkennen, da durch die Vielzahl an Primern und die Einflüsse der verschiedenen Lebensmittelmatrizes teilweise ungenaue Banden entstanden waren.

4.5.1 Multiplex-PCR mit Primern von Lindström et al. zum Nachweis von vegetativen Zellen verschiedener *C. botulinum*-Stämme in Hackfleisch

Die Ergebnisse der Multiplex-PCR mit Primern nach Lindström (2001) zeigten, dass der Nachweis der Toxingene aus allen gespikten (künstlich kontaminierten) Lebensmitteln möglich war. In der folgenden Abbildungen 13 sind als Beispiele die Ergebnisse der Untersuchungen aus Hackfleisch, mit einer Ausgangskonzentration von 10^2 - 10^3 KbE/g Lebensmittel und einer vorangehenden DNA-Extraktion mit dem RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit (Invitex) dargestellt.



4 Ergebnisse

Die Abbildung 13 zeigt in den einzelnen Gelspuren den Nachweis von *C. botulinum* in der Matrix Hackfleisch. In Gelspur 1 und 2 sind die Stämme des Toxintyps A, 7272 und 1750, zu erkennen. Die Bandengröße stimmt mit der Positivkontrolle 46/06 in Gelspur 7 überein. Insgesamt hat das Gen für den Toxintypen A eine Größe von 782 bp. In Gelspur 3 und 4 sind die Toxintypen B, mit den Stämmen 7273 und 89, erkennbar. Die Banden können mit einer Größe von 205 bp als Positivkontrolle für den Toxintyp B Probe 54/06 (Gelspur 8) amplifiziert werden. In Gelspur 5 sieht man Toxintyp E, Stamm 8550, aus Hackfleisch extrahiert, und in Gelspur 9 die eigens hergestellte Positivkontrolle des Stammes 8550 aus reinem Kulturüberstand mit einer Größe von 389 bp. In Gelspur 6 ist der Toxintyp F mit dem Stamm 1692 zu sehen, die dazugehörige positive Kontrolle liegt in Gelspur 10, Stamm 67/06, mit einer Bandengröße von 543 bp. Alle humanpathogenen Stämme ließen sich mit Hilfe dieses Multiplex-PCR-Verfahrens aus den Lebensmitteln Hackfleisch (Abb. 10), Bohnen und Milch nachweisen.

4.5.2 Single-PCR der Toxintypen A, B, E und F mit Primern von Takeshi et al. zum Nachweis von vegetativen Zellen verschiedener *C. botulinum*-Stämme in Bohnen und Milch

Ein weiteres eingesetztes PCR-Verfahren war eine Single-PCR mit Primern aus einer Veröffentlichung von Takeshi et al. aus dem Jahr 1996. Die hieraus erzielten Ergebnisse sind in der Abbildung 14 zu erkennen. Dabei erfolgte der Nachweis aus künstlich kontaminierten Bohnen und Milch mit einem Ausgangskeimlevel von 10^2 - 10^3 kbE/g Lebensmittel und einer vorherigen DNA-Extraktion mit dem RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit (Invitex).

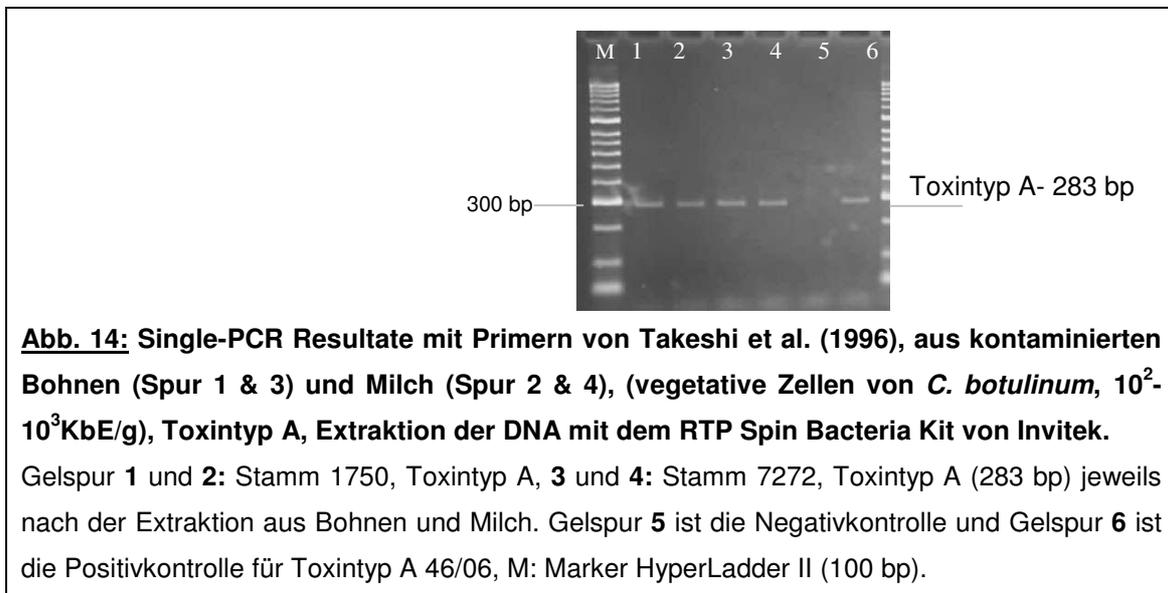
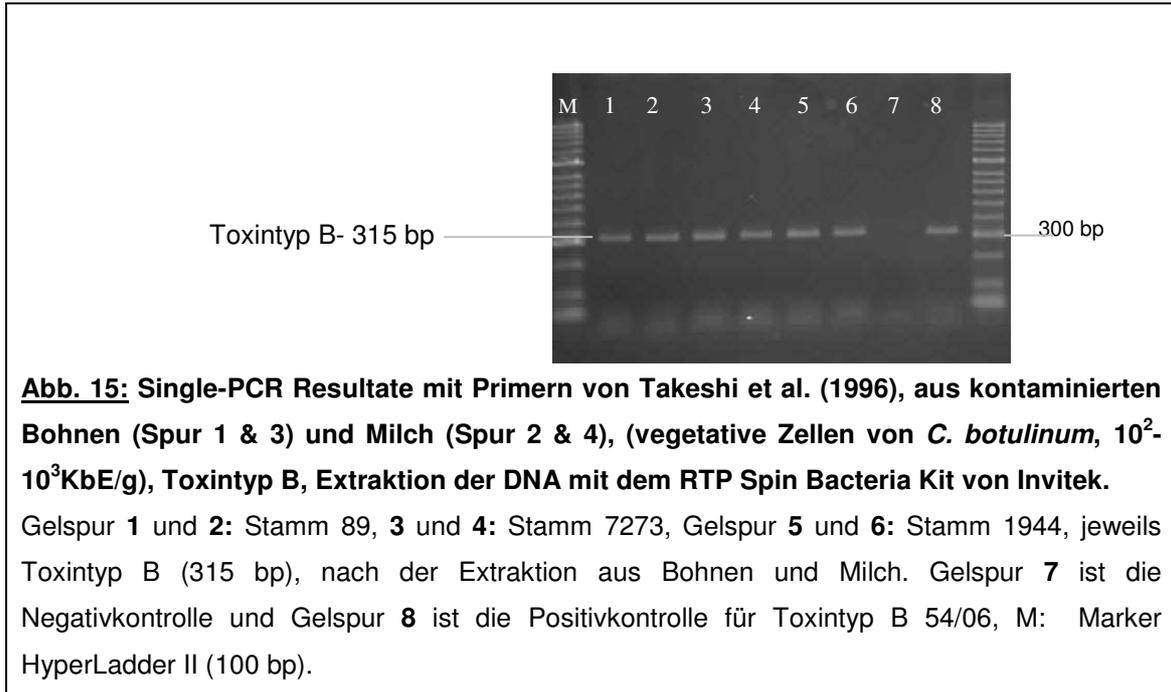


Abb. 14: Single-PCR Resultate mit Primern von Takeshi et al. (1996), aus kontaminierten Bohnen (Spur 1 & 3) und Milch (Spur 2 & 4), (vegetative Zellen von *C. botulinum*, 10^2 - 10^3 KbE/g), Toxintyp A, Extraktion der DNA mit dem RTP Spin Bacteria Kit von Invitex.

Gelspur 1 und 2: Stamm 1750, Toxintyp A, 3 und 4: Stamm 7272, Toxintyp A (283 bp) jeweils nach der Extraktion aus Bohnen und Milch. Gelspur 5 ist die Negativkontrolle und Gelspur 6 ist die Positivkontrolle für Toxintyp A 46/06, M: Marker HyperLadder II (100 bp).

In Abbildung 14 sind die erzielten Ergebnisse nach einer Konatmination von Bohnen und H-Milch mit vegetativen Zellen von *C. botulinum* zu sehen. Die Gelspuren 1 und 2 zeigen dabei den Stamm 1750 und Gelspur 3 und 4 den Stamm 7272, jeweils Toxintyp A. Die Proben stammen in der ersten Spur aus Bohnen und in der zweiten Gelspur aus kontaminiertes Milch. In Gelspur 5 ist die Negativkontrolle für die Versuchsansätze aufgetragen und in Gelspur 6 die Positivkontrolle für den Toxintyp A, die Probe 46/06 mit einer Bandengröße von 283 bp. Die Versuchsansätze wurden wieder mit einem HyperLadder II Marker durchgeführt.

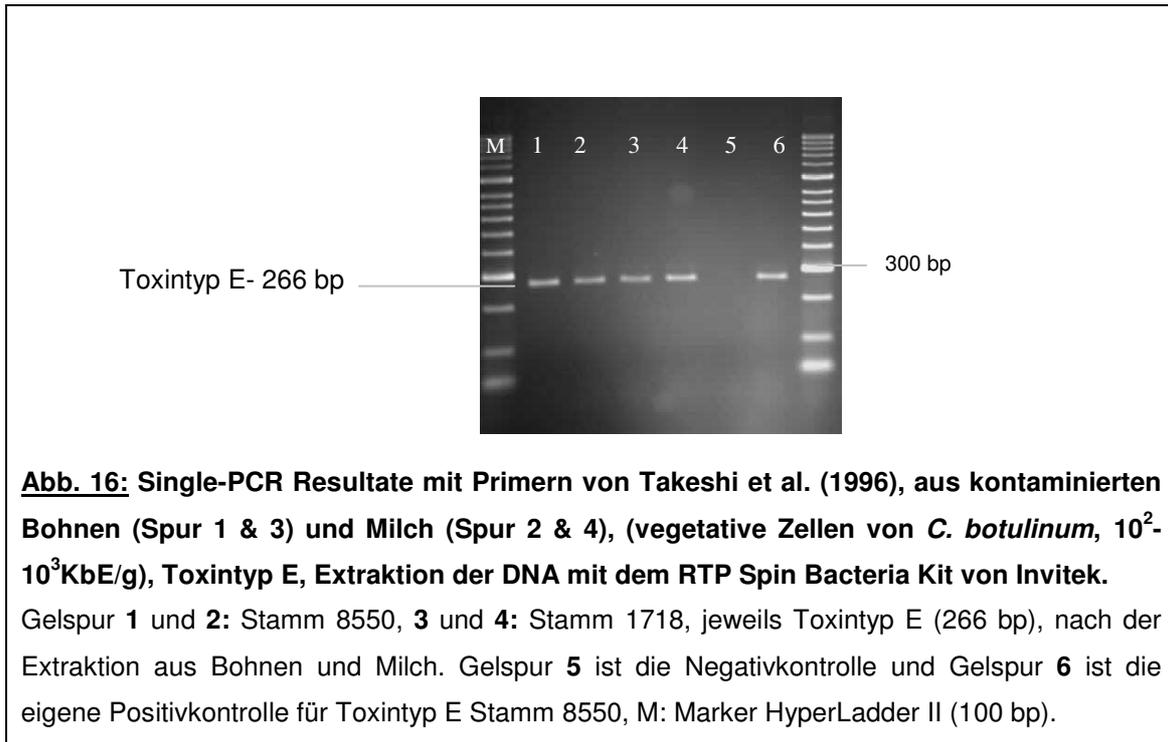
4 Ergebnisse



Die Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse nach einer Extraktion von *C. botulinum*-Bakterien aus künstlich kontaminierten Bohnen und H-Milch mit dem Toxintyp B. Dabei wurde in Gelspur 1 und 2 der Stamm 89, in Gelspur 3 und 4 der Stamm 7273 und in Gelspur 5 und 6 der Stamm 1944, jeweils Toxintyp B, aufgetragen. Gelspur 7 ist wieder eine Negativkontrolle und in Gelspur 8 erkennt man die positive Kontrolle für den Toxintyp B mit 315 bp, Probe 54/06.

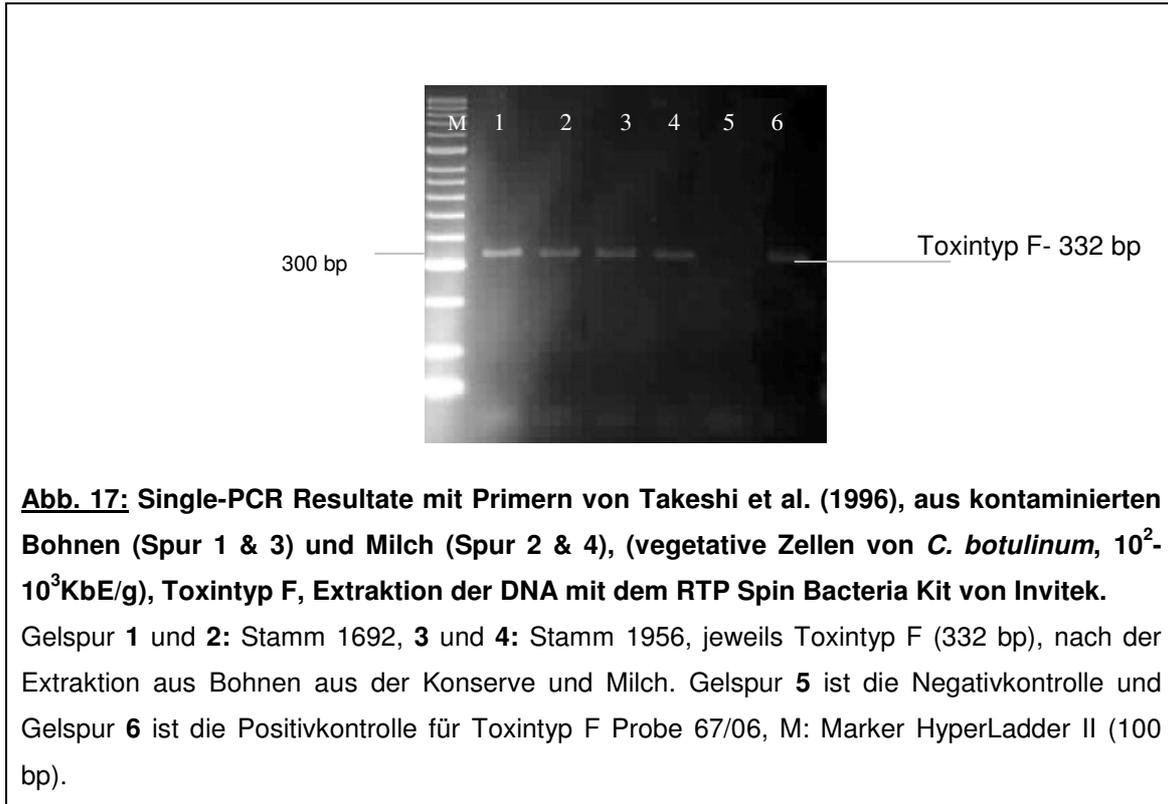
4 Ergebnisse

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse für den Toxintyp E dargestellt.



In den Gelspuren 1 und 2 wurde der Stamm 8550 und in Gelspur 3 und 4 der Stamm 1718, jeweils Toxintyp E, aufgetragen. Die Proben stammen wiederum aus künstlich kontaminierten Bohnen und Milch. In Gelspur 5 ist die Negativkontrolle und in Gelspur 6 ist die eigene Positivkontrolle für den Toxintyp E dargestellt, mit einer Bandengröße von 266 b. Diese positive Probe des Stammes 8550 wurde dabei aus reinem Kulturüberstand gewonnen und extrahiert.

4 Ergebnisse



In Abbildung 17 sind die positiven PCR-Ergebnisse nach der DNA-Extraktion aus künstlich kontaminierten Bohnen und Milch zu sehen. In der Gelspur 1 und 2 ist der Stamm 1692 und in Gelspur 3 und 4 der Stamm 1956, jeweils Toxintyp F mit einer Größe von 332 bp dargestellt. In der vorletzten Gelspur 5 ist die negative Kontrolle und in Gelspur 6 ist die Positivkontrolle für den Toxintyp F, Probe 67/06 mit einer Bandengröße von 332 bp, zu sehen. Wie in allen PCR-Verfahren wurde auch hier mit einem HyperLadder II als Größenstandard gearbeitet.

4.5.3 Multiplex-PCR mit Primern von Lindström et al. zum Nachweis von Sporen von *C. botulinum*-Stämmen in Hackfleisch und Bohnen

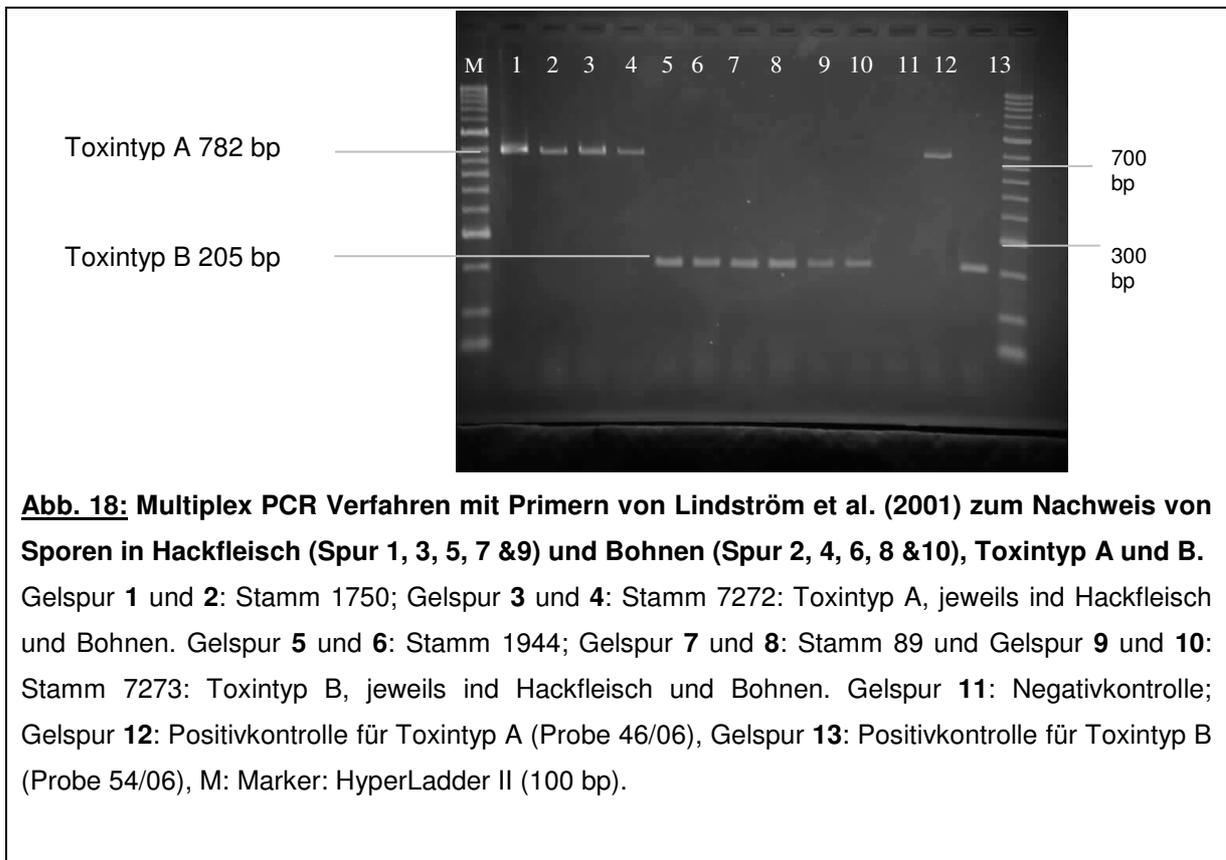
Die jeweiligen Verdünnungsstufen der Sporensuspensionen wurden für eine künstliche Kontamination von Hackfleisch und Bohnen genutzt. Der Nachweis

4 Ergebnisse

erfolgte mit Hilfe der beiden genannten PCR-Verfahren (Kapitel 3.2.9.1 und 3.2.9.2) mit Primern nach Takeshi et al. (1996) und Lindström et al. (2001).

Die Lebensmittel wurden mit Konzentrationen zwischen 10^1 bis 10^5 KbE/g oder ml Lebensmittel kontaminiert. Dabei sind als Detektionsgrenzen 10^2 KbE von *C. botulinum* in der unmittelbar durchgeführten PCR (ohne Anreicherung) erzielt worden. Bis zu einem Keimlevel von 10^2 KbE pro g oder ml Lebensmittel konnte nach einem Anreicherungsschritt in Selzer-Bouillon der Nachweis der Toxingene ebenfalls durchgeführt werden.

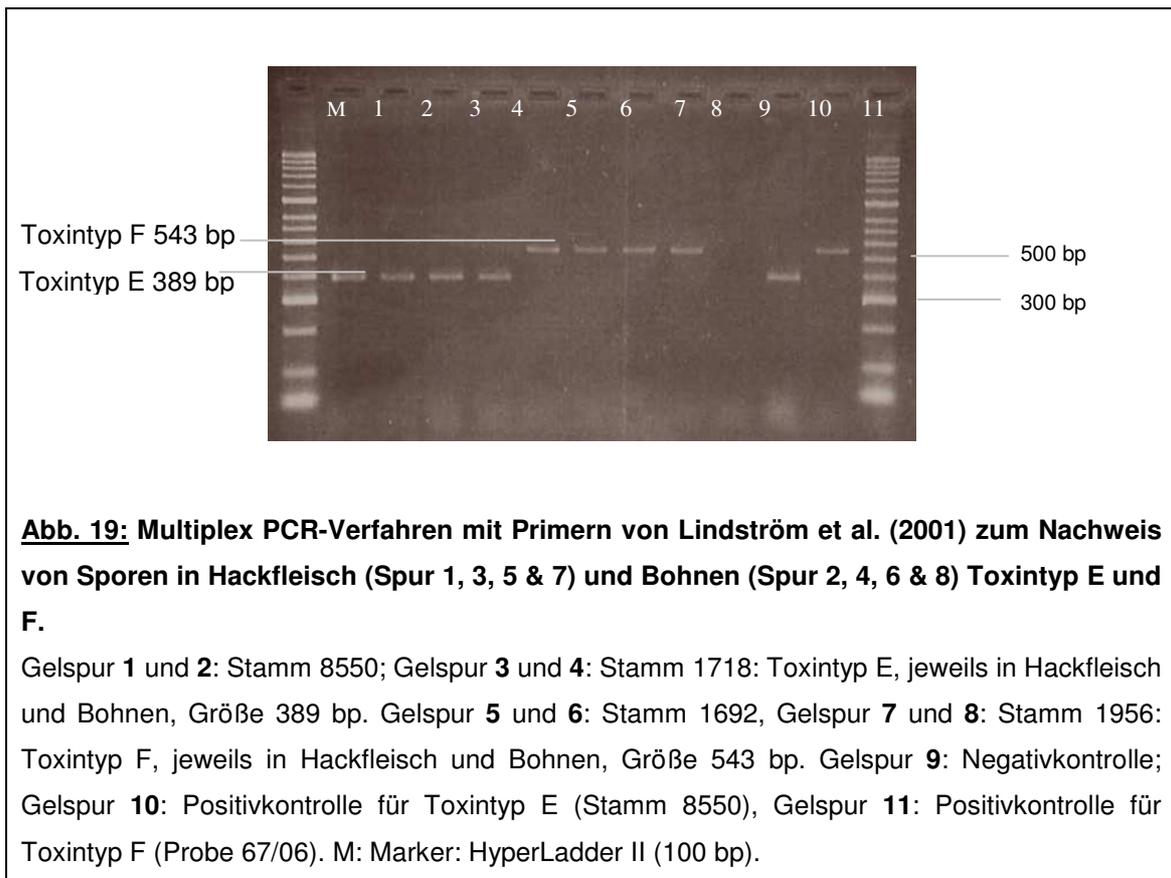
In der folgenden Abbildung 18 sind die erzielten Ergebnisse dargestellt und erläutert:



In dieser Abbildung sind die PCR-Ergebnisse zu sehen, die nach einer Extraktion aus den künstlich kontaminierten Lebensmitteln (Hackfleisch und Bohnen) gewonnen wurden. Die Gelspuren 1 und 2 zeigen die Ergebnisse für den Stamm 1750 und Gelspur 3 und 4 für den Stamm 7272, jeweils Toxintyp A.

4 Ergebnisse

Die Gelspuren 5 und 6 zeigen den Stamm 1944, die Gelspuren 7 und 8 den Stamm 89 und die Gelspuren 9 und 10 den Stamm 7273, alle vom Toxintyp B. Die Gelspur 11 zeigt die negative Kontrolle. In Gelspur 12 befindet sich die positive Kontrolle für den Toxintyp A (Probe 46/06) mit der Größe von 782 bp. In Gelspur 13 ist die Positivkontrolle für Toxintyp B (54/06) mit der Größe von 205 bp, dargestellt.



In Abbildung 19 sind die PCR-Ergebnisse für die Toxintypen E und F aus den kontaminierten Lebensmitteln Hackfleisch und Bohnen dargestellt. In den Gelspuren 1 und 2 ist der Stamm 8550 und in Gelspur 3 und 4 der Stamm 1718, beide Toxintyp E, aufgetragen. Die Gelspuren 5 und 6 wurden mit Proben des Stammes 1692 und die Gelspuren 7 und 8 mit dem Stamm 1956, jeweils Toxintyp F, dargestellt. In den darauf folgenden Gelspuren sind die Negativprobe in Gelspur 9 und die beiden Positivproben für Toxintyp E in Gelspur 10 (389 bp) und Toxintyp F in Gelspur 11 (543 bp) aufgetragen.

4.6 Differenzierungs-PCR für die Unterscheidung in proteolytische und nicht-proteolytische Stämme von *C. botulinum*

Ein weiteres angewendetes PCR-Verfahren diente zur Differenzierung von *C. botulinum*-Stämmen in proteolytische (Gruppe I) und nicht-proteolytische Stämme (Gruppe II). Für dieses PCR-Verfahren wurden Primer aus einer Veröffentlichung von Dahlsten et al. (2008) angewendet. Die Probenextrakte wurden aus reinem Kulturüberstand gewonnen und mit Hilfe des RTP Spin Bacteria DNA Mini Kits (Invitex) extrahiert.

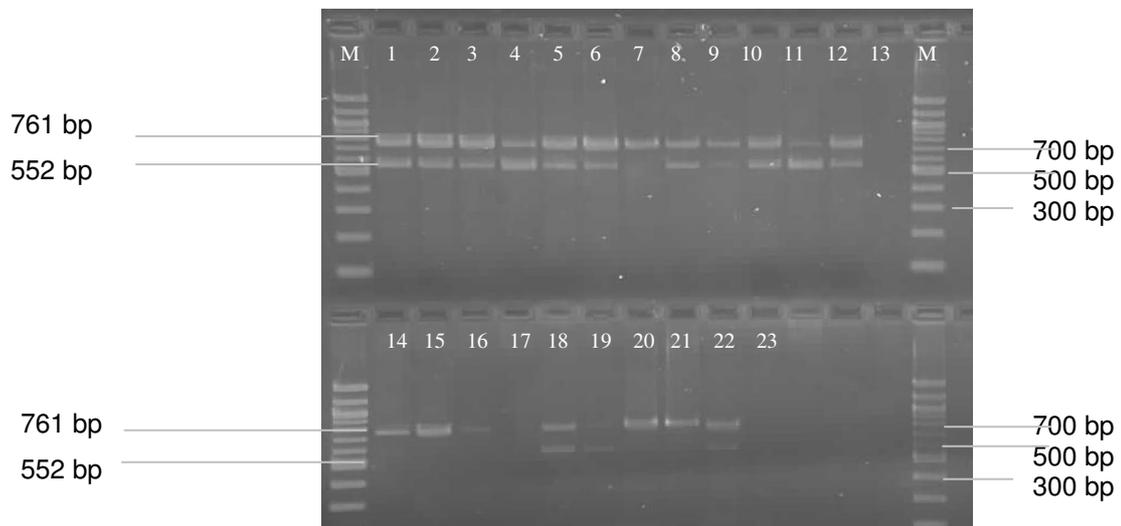


Abb. 20: PCR-Verfahren nach Dahlsten et al. (2008), Anzucht jeweils in Selzer-Bouillon und DRCM.

Alle PCR-Proben wurden in 2 unterschiedlichen Medien angezogen, dabei wurden jeweils die erste Gelspur mit Extrakten aus Selzer-Bouillon und die zweite Gelspur mit denen aus DRCM-Bouillon beladen, HyperLadder II Marker.

Toxintyp A: Gelspur 1 und 2 Stamm 1750; Gelspur 3 und 4 Stamm 7272; Gelspur 5 Kontrolle 46/06 (Typ A);

Toxintyp B: Gelspur 6 und 7 Stamm 1944 (teilweise sehr schwache Gelspur); Gelspur 8 und 9 Stamm 89; Gelspur 10 und 11 Stamm 7273, Gelspur 12 Kontrolle 54/06 (Typ B); Gelspur 13 Negativkontrolle

Toxintyp E: Gelspur 14 und 15 Stamm 1718; Gelspur 16 und 17 Stamm 8550;

Toxintyp F: Gelspur 18 und 19 Stamm 1956; Gelspur 20 und 21 Stamm 1692; Gelspur 22 Kontrolle 67/06 (Typ F), Gelspur 23 Negativkontrolle.

4 Ergebnisse

In Abbildung 20 sind die PCR-Ergebnisse für eine genauere Charakterisierung der Stämme in die beiden physiologischen Gruppen I und II dargestellt. Mit Hilfe dieser PCR wird eine genauere Aussage über das Verhalten (proteolytisch oder nicht-proteolytisch) der einzelnen Stämme möglich. Alle Stämme sind dabei in zweifachem Ansatz aufgetragen worden, wobei die erste Probe jeweils aus einer Kultur mit Selzer-Bouillon und die zweite Probe aus einer Kultur, die in DRCM-Bouillon inkubiert wurde, stammte. Man konnte ebenfalls erkennen, dass das Wachstum der Stämme nicht in jeder Bouillon gleich gut war und somit nicht immer aus beiden Proben ein zufriedenstellender Nachweis gelang. Auch hier wurde mit einem HyperLadder II 100 bp Marker gearbeitet. Die Gelspuren 1 und 2 zeigen den Stamm 1750, Gelspur 3 und 4 Stamm 7272, beide vom Toxintyp A. In der 5. Gelspur ist die dazugehörige positive Kontrolle für den Toxintyp A, Probe 46/06 dargestellt. Die Gelspuren 6 und 7 zeigen den Stamm 1944, die Gelspuren 8 und 9 den Stamm 89 und die Gelspuren 10 und 11 den Stamm 7273, alle vom Toxintyp B. In Gelspur 12 ist wieder die positive Kontrolle für den Toxintyp B dargestellt, Probe 54/06. Gelspur 13 ist als negative Kontrolle aufgetragen worden. Die Gelspuren 14 und 15 zeigen Proben vom Stamm 1718, die Gelspuren 16 und 17 den Stamm 8550, beide vom Toxintyp E. Hierbei gibt es keine positive externe Kontrolle für den Toxintyp E, der Stamm 8550 wurde als eigene Kontrolle aus reinem Kulturüberstand gewonnen und stets als Positivkontrolle eingesetzt. Die Gelspuren 18 und 19 stellen den Stamm 1956 und die Gelspuren 20 und 21 den Stamm 1692, beide Toxintyp F, dar. In der letzten Gelspur 22 ist noch die Positivkontrolle für den Toxintyp F dargestellt, Probe 67/06. In Gelspur 23 befindet sich wieder eine Negativkontrolle.

In ihrer Veröffentlichung belegen Dahlsten et al., dass Stämme, die zur Gruppe I gehören mit Hilfe der dort durchgeführten PCR 2 Banden zeigen. Diese Banden haben eine Größe von 552 bp und 761 bp. Dagegen sind die Stämme der Gruppe II mit einer einzigen Bande in der PCR dargestellt, diese liegt bei 761 bp.

4 Ergebnisse

Durch die PCR-Analysen konnte folgende Unterteilung der verschiedenen Stämme in die Gruppen I und II erfolgen:

Gruppe I, die proteolytischen Stämme: 1750 und 7272 (Toxintyp A), 1944, 89 und 7273 (Toxintyp B), 1956 (Toxintyp F)

Gruppe II, die nicht-proteolytischen Stämme: 1718 und 8550 (Toxintyp E)

4.7 Toxinnachweis von *C. botulinum* mit Hilfe des Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assays (ELISA)

Die bisher durchgeführten Nachweise mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion konnten nur das Vorhandensein der Neurotoxingene von *C. botulinum* zeigen. Die Fragestellung war nun, ob diese Bakterienstämme auch in der Lage sind, überhaupt aktive Botulinumneurotoxine zu bilden und unter welchen Bedingungen.

Als sogenannter Goldstandard zum Toxinnachweis von *C. botulinum* wird der Maus-Bioassay verwendet. Dieses Verfahren gilt als äußerst empfindlich, sicher und aussagekräftig. Problematisch sind allerdings die Tierschutzaspekte, da ein solcher Versuch erhebliches Leiden für die Mäuse bedeuten kann.

Aus diesem Grund wurde ein Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA-Verfahren) entwickelt, welcher ebenfalls in der Lage sein sollte, die aktiven Toxine in verschiedenen Lebensmittelmatrizes nachzuweisen und ggf. die Tierversuche zu ersetzen.

4.7.1 Nachweis der Toxine im Kulturüberstand mit dem ELISA und vergleichende Analysen im Mäuse-Bioassay

Der erste Versuchsansatz umfasste den Nachweis der Toxine im Kulturüberstand. Dabei wurden die *C. botulinum*-Stämme in Selzer-Bouillon angezogen und anschließend in ein spezielles Medium (MKBO) überführt, welches die Toxinproduktion der Stämme anregen sollte.

Anschließend wurden die Proben, wie im Kapitel 3.2.11 beschrieben, gewonnen, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert, bis sie im ELISA verwendet wurden. Synchron zu den ELISA-Ansätzen wurden parallel Proben für einen Mäuse-Bioassay genommen, um die Ergebnisse abzugleichen und eine Aussage über die Effektivität des ELISA-Systems treffen zu können.

Für die Versuchsansätze wurden jeweils unbehandelte, aber auch hitzebehandelte Kulturüberstände eingesetzt. Die Hitzeeinwirkung sollte dabei den üblichen Temperatur-Zeit-Verläufen bei lebensmitteltechnologischen Verfahren entsprechen. Zum Einen wurde das bei der kommerziellen Milcherhitzung früher übliche Verfahren der Dauererhitzung auf 60°C für ca. 30 Minuten, zum Anderen ein Temperaturbereich, der das Durchgaren von Fleisch (ca. 72°C für 2 Minuten) simuliert, gewählt. Die Proben für den Mäuse-Bioassay und das ELISA-Verfahren wurden gleich behandelt und mit dem jeweiligen Testsystem untersucht.

4.7.1.1 Mäuse-Bioassay

Die Ergebnisse des Mäuse-Bioassays werden immer mit einer gewissen Spannweite hinsichtlich der Mäuseletalen Dosis (MLD) angegeben. Dabei wird die Konzentration bestimmt, bei der die Mäuse im Versuch an den typischen Symptomen einer Botulinumintoxikation sterben. Auf Grund von Größe, Gewicht, des körperlichen Zustandes und des individuellen Immunstatus einer Maus wird die letale Dosis mit einer gewissen Variabilität angegeben. Sehr

4 Ergebnisse

empfindliche Mäuse können schon bei einer Dosis von 0,05 ng sterben, andere sterben erst bei einer Dosis von 2,5 ng.

Aus der Tabelle 15 sind die Spannbreiten der MLD mit den korrelierenden Toxinmengen zu ersehen.

Tabelle 15: Umrechnungstabelle zur Toxinbestimmung von Proben zwischen der Mäuseletalen Dosis (MLD) und der Toxinkonzentration in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit der Maus

Mäuseletale Dosis in Abhängigkeit von der verabreichten Verdünnungsstufe der Toxinextrakte ()	entspricht einer tödliche Dosis von 0,05-2,5 ng in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit der Maus
2-10 MLD (1 bis 1:10)	0,01-0,25 ng
10-100 MLD (1:10 bis 1:100)	0,05-2,5 ng
100-1000 MLD (1:100 bis 1:1000)	0,5-25 ng
1000-10000 MLD (1:1000 bis 1:10000)	5-250 ng
>10000 MLD (>1:10000)	>50-250 ng

Die Tabelle zeigt die Korrelation zwischen den MLD in Abhängigkeit von der Verdünnung der Probenextrakte und der im Extrakt zu erwartenden Toxinkonzentration.

Bei einer Angabe von z.B. 10-100 MLD beziehen sich diese Werte auf die Verdünnungsstufe des Toxinextraktes, der den Mäusen verabreicht wurde.

Wenn bei einer Verdünnung von 1:10 die Maus stirbt und bei der nächsten Verdünnungsstufe die Maus überlebt, wird die MLD mit einem Wert von 10-100 angegeben.

Diese Angaben korrelieren mit einer gewissen Spannbreite für die Toxinmenge, die aus der Tabelle 15 ersichtlich ist. Bei einer MLD zwischen 10 und 100 ist von einer Toxinkonzentration im Extrakt zwischen 0,05 und 2,5 ng auszugehen, je nach Empfänglichkeit und Immunstatus der Maus.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse des Mäuse-Bioassays für die verschiedenen Versuchsansätze mit Kulturüberständen (nach Hitzeeinwirkung) der jeweiligen Stämme von *C. botulinum* sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 16: Ergebnisse aus dem Mäuse-Bioassay mit den verschiedenen Proben aus Kulturüberständen (unbehandelt und hitzebehandelt)

Stammnr.	Toxintyp	Behandlung	Toxinkonzentration	Mäuseletale Dosis
1750	A	unbehandelt	0,5-25 ng	100-1000
		60 °C für 30'	5-250 ng	1000-10000
		72 °C für 2'	0,05-2,5 ng	10-100
7272	A	unbehandelt	50-250 ng	>10000
		60 °C für 30'	0,5-25 ng	100-1000
		72 °C für 2'	0,5-25 ng	100-1000
89	B	unbehandelt	5-250 ng	1000-10000
		60 °C für 30'	0,05-2,5 ng	10-100
		72 °C für 2'	negativ	0
1944	B	unbehandelt	0,5-25 ng	100-1000
		60 °C für 30'	0,05-2,5 ng	10-100
		72 °C für 2'	0,01-0,25 ng	2-10
7273	B	unbehandelt	0,5-25 ng	100-1000
		60 °C für 30'	0,5-25 ng	100-1000
		72 °C für 2'	0,01-0,25 ng	2-10
8550	E	unbehandelt	negativ	0
		60 °C für 30'	negativ	0
		72 °C für 2'	negativ	0
1718	E	unbehandelt	0,05-2,5 ng	100-1000

4 Ergebnisse

		60 °C für 30'	0,01-0,25 ng	2-10
		72 °C für 2'	negativ	0
1692	F	unbehandelt	5-250 ng	1000-10000
		60 °C für 30'	0,5-25 ng	100-1000
		72 °C für 2'	0,5-25 ng	100-1000
1956	F	unbehandelt	0,5-25 ng	100-1000
		60 °C für 30'	0,5-25 ng	100-1000
		72 °C für 2'	0,01-0,25 ng	2-10

Man kann erkennen, dass fast alle Stämme von *C. botulinum* in der Lage waren, in den Kulturüberständen Toxine zu produzieren. Einzig der Stamm 8550 vom Toxintyp E konnte unter den Versuchsbedingungen kein Toxin synthetisieren. Die Auswertung des Mäuse-Bioassays und der Vergleich mit den gemessenen Absorptionsspektren im ELISA-Test zeigten, dass die produzierten Toxinmengen in den Kulturüberständen sehr hoch waren.

Wie zu erwarten war, wiesen die unbehandelten Proben die höchste Ausgangskonzentration an Toxinen auf. Eine Ausnahme stellt der Stamm 1750 dar, der eine niedrigere Toxinkonzentration in der unbehandelten, als in der mit Hitze behandelten Probe angab. Im Nachhinein ist der Grund für diese Abweichung nicht mehr zu erklären. Im ELISA-Test war auch bei diesem Stamm die Toxinkonzentration in der unbehandelten Probe höher als in der erhitzten Probe.

Die Behandlung der Proben für 30 min bei 60 °C zeigte bei allen Stämmen eine deutliche Abnahme in den Toxinmengen im Gegensatz zu den unbehandelten Ausgangsproben. Die Erhitzung der Kulturüberstände auf eine Temperatur von 72 °C für 2 Minuten zeigte eine noch stärkere Abnahme der Toxinmengen. Bei dem *C. botulinum*-Stamm 89, Toxintyp B, und Stamm 1718, Toxintyp E, wurde keine aktive Wirksamkeit der Toxine mehr festgestellt, während der Stamm 1692, Toxintyp F, keinen Unterschied im Vergleich mit der Erhitzung bei 60 °C zeigte.

4.7.1.2 ELISA-Verfahren

Zur Bestimmung der BoNT wurde ein ELISA-System entwickelt. Alle Versuchsansätze liefen parallel zum Mäuse-Bioassay. Dabei waren die Erhitzungsparameter hinsichtlich Temperatur-Zeit-Relationen bei allen Ansätzen identisch. Die Ergebnisse von Mäuse-Bioassay und ELISA wurden miteinander verglichen.

Zur Bestimmung der Botulinumtoxin-Konzentrationen in den jeweiligen Proben, wurden käufliche Neurotoxin-Standards der Firma Metabionics eingesetzt und als Referenzwerte betrachtet. Anschließend konnte man mit Hilfe einer erstellten Standardkurve und den gemessenen Werten die Toxinkonzentrationen der Proben berechnen.

Die Kurve für die Standardwerte der jeweiligen humanpathogenen Toxintypen A, B, E und F sind in folgender Abbildung dargestellt:

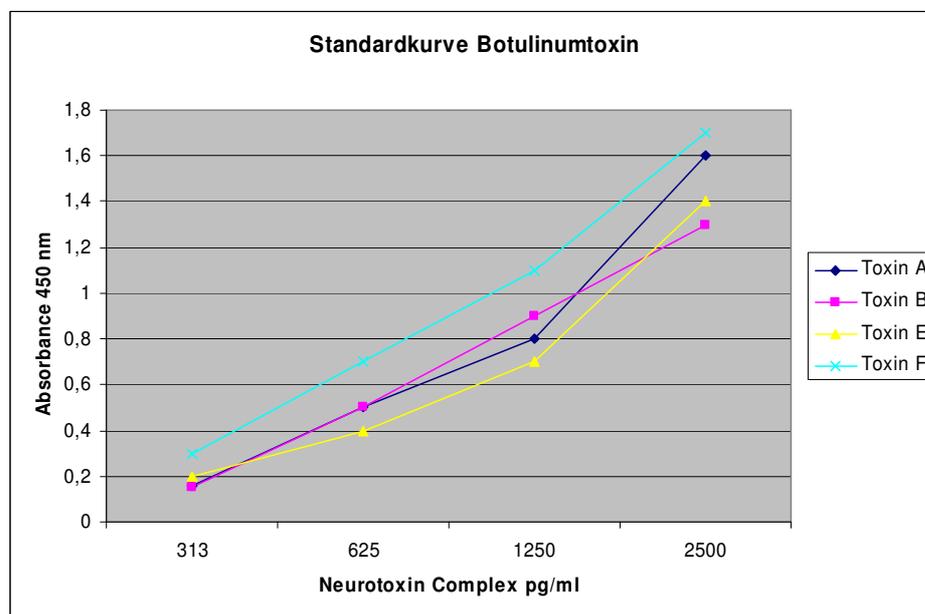


Abb.21: Standardkurven der verschiedenen Botulinumneurotoxine A, B, E und F und ihren Absorptionsspektren bei 450 nm im ELISA-Reader

Auf der x-Achse sind die Verdünnungsstufen der Toxinstandards und auf der y-Achse die Absorptionsraten bei 450 nm im ELISA-Reader abzulesen. Mit Hilfe

4 Ergebnisse

dieser Werte konnten die Toxinmengen in den Kulturüberständen genauer quantifiziert und berechnet werden.

Parallel durchgeführte Untersuchungen zum Maus-Bioassay zeigen im ELISA-Verfahren vergleichbare Ergebnisse in den Toxinkonzentrationen.

Aus der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der Versuchsansätze für die unbehandelten und die hitzebehandelten Proben im ELISA-Verfahren ersichtlich.

Tabelle 17: Ergebnisse aus dem ELISA-Ansatz mit den verschiedenen Proben (unbehandelt und hitzebehandelt)

Stammnr.	Toxintyp	Behandlung	Toxinkonzentration
1750	A	unbehandelt	98,3 ng
		60 °C für 30'	64,8 ng
		72 °C für 2'	7,65 ng
7272	A	unbehandelt	104,7 ng
		60 °C für 30'	9,2 ng
		72 °C für 2'	9,2 ng
89	B	unbehandelt	136,8 ng
		60 °C für 30'	7,6 ng
		72 °C für 2'	<0,5 ng
1944	B	unbehandelt	106,4 ng
		60 °C für 30'	7,6 ng
		72 °C für 2'	<0,5 ng
7273	B	unbehandelt	35,6 ng
		60 °C für 30'	7,6 ng
		72 °C für 2'	<0,5 ng
8550	E	unbehandelt	<0,5 ng

4 Ergebnisse

		60 °C für 30'	<0,5 ng
		72 °C für 2'	<0,5 ng
1718	E	unbehandelt	10,2 ng
		60 °C für 30'	<0,5 ng
		72 °C für 2'	<0,5 ng
1692	F	unbehandelt	180,4 ng
		60 °C für 30'	7,8 ng
		72 °C für 2'	7,8 ng
1956	F	unbehandelt	7,8 ng
		60 °C für 30'	<0,5 ng
		72 °C für 2'	<0,5 ng

Alle Versuchsansätze wurden mit Hilfe des ELISAs in vier unabhängigen Versuchsreihen quantifiziert und die erzielten Ergebnisse wurden dabei gemittelt in der Tabelle dargestellt. Die Ergebnisse des ELISA-Versuches zeigen bei allen Toxintypen eine eindeutige Hitzeinaktivierung der Toxine. Der Ausgangswert der unbehandelten Probe ist stets wesentlich höher als die Werte, die nach einer Behandlung bei 60 °C für 30 Minuten oder nach einer Hitzeeinwirkung bei 72 °C für 2 Minuten ermittelt wurden. Die Detektionsgrenze der extrahierten Proben aus den Kulturüberständen lagen bei <0,5 ng je 100 µl, eine geringere Menge an Toxinen konnte mit Hilfe des ELISA-Systems nicht bestimmt werden. Diese Grenze ist durch die Standardwerte der Toxine bestimmt; unterhalb dieses Wertes kann keine Berechnung erfolgen. Der Wert <0,5 ng wird somit auch als Negativwert angesehen, was bedeutet, dass kein Toxin mehr messbar ist.

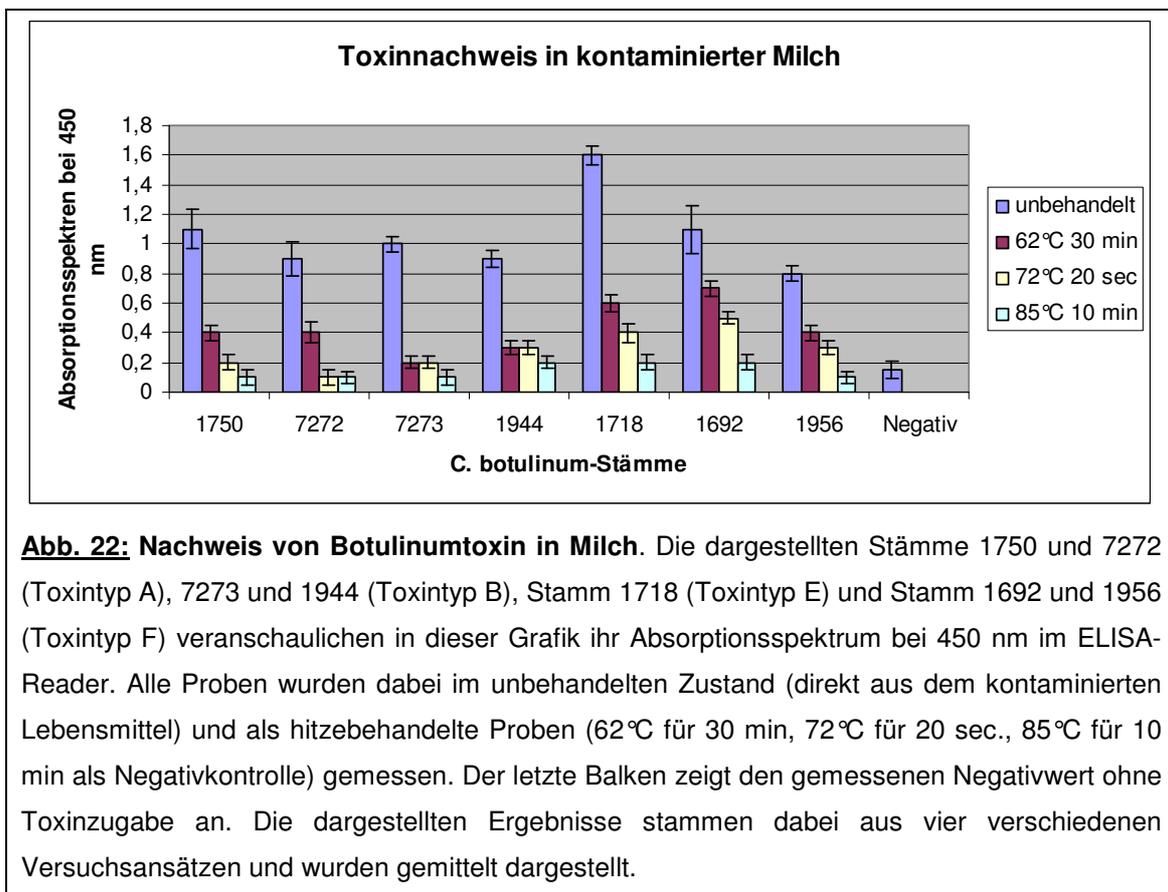
4.7.2 Nachweis von Toxinen in verschiedenen Lebensmittelmatrizes und Untersuchungen zur Stabilität der Toxine mit Hilfe des ELISA

Auf Grund der zufriedenstellenden Durchführung der Versuchsansätze zum Nachweis von Toxinen im Kulturüberstand mit dem ELISA, wurden weitere Versuche mit Lebensmitteln durchgeführt. Insgesamt wurden die im Folgenden aufgeführten Versuchsdurchläufe mindestens acht mal unabhängig voneinander ausgeführt, wobei jeweils vier Ansätze, die durchgängige aussagekräftige Ergebnisse in allen Messwerten zeigten, in die Auswertung der Ergebnisse eingeflossen sind. Sie wurden in den weiter unten abgebildeten Grafiken zusammen mit den Standardabweichung gemittelt dargestellt.

Für die Versuchsansätze wurden verschiedene Lebensmittel (H-Milch und Corned Beef) mit den Toxinen der Stämme von *C. botulinum* kontaminiert und anschließend im ELISA getestet.

4.7.2.1 Untersuchungen zur Stabilität der Toxine in kontaminierter H-Milch

In Abbildung. 22 sind die erzielten Ergebnisse für die künstliche Kontamination von Milch mit den toxinhaltigen Überständen dargestellt.



Für diese Versuchsreihe wurden alle Stämme eingesetzt, die in der Lage waren, im Kulturüberstand Toxine zu produzieren (außer Stamm 8550). Der Stamm 8550 zeigte weder im Kulturüberstand noch in den verschiedenen Lebensmitteln eine Toxinproduktion.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Kulturüberstände mit den produzierten Toxinen im ELISA gemessen und die Absorptionsspektren abgelesen. Diese Werte wurden dann anschließend für die Quantifizierung der Toxine in den verschiedenen Lebensmittelmatrixen benutzt, um eventuelle Differenzen bei der Detektion zu ermitteln.

4 Ergebnisse

Dafür wurden die Lebensmittel mit einer genau definierten Menge an Toxinen gespikt. Die Messergebnisse für die Toxinkonzentration in 100 µl Kulturüberstand lag bei einem Absorptionsspektrum von etwa 1,0 für alle Toxintypen. Die Lebensmittel wurden dann jeweils mit 1 ml der Kulturüberstände gespikt, so dass davon auszugehen war, dass die Toxinkonzentrationen vergleichbare Absorptionsspektren erzielen würden.

Die anschließende Toxinbestimmung in Lebensmitteln mit dem ELISA zeigt, dass die zugegebene Menge an Toxinen in die Matrix Milch fast identisch war mit der gemessenen Menge der Kulturüberstände, d.h. es waren nur sehr geringe Verluste und Matrixeffekte bei der Detektion festzustellen. Zum Beispiel war die Probe mit dem toxinhaltigen Überstand vom Stamm 1750 mit einem Ausgangsabsorptionswert von 1,0 bei 450 nm und in den Lebensmitteln mit einem Wert von ebenfalls $1,0 \pm 0,1$ gemessen worden. Diese Ergebnisse sind mit den anderen Werten der gemessenen Konzentrationen vergleichbar und verdeutlichen nur geringe Einflüsse durch die Matrix Milch auf die Absorptionsspektren im ELISA.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die unbehandelten gespikten Milchproben eine sehr hohe Absorption aufwiesen. Die Stämme 1750 und 1692 mit einer Absorption von 1,1 und der Stamm 1718 mit einem Spektrum von 1,6 zeigten einen deutlichen Nachweis der Toxine im Lebensmittel an. Dabei ist zu bemerken, dass vor allem der Stamm 1718 eine besonders hohe Absorptionsrate hatte und mit einer zugegebenen Toxinmenge (Absorption von 1,2) einen höheren Wert von 0,4 im Lebensmittel verzeichnete. Diese hohen Toxinwerte wurden in allen in die Auswertung einbezogenen 4 Versuchsreihen einheitlich festgestellt.

Die übrigen gemessenen Toxinmengen stimmten gut mit den zugegebenen Toxinkonzentrationen überein.

Die hitzebehandelten Proben zeigten deutlich geringere Absorptionsspektren und eine stark verringerte aktive Toxinmenge an, d.h. die Toxine waren hitzelabil und wurden denaturiert.

Die Erhitzung für 20 Sekunden auf 72°C in einem PCR-Cycler zeigte eine starke Abnahme der Toxinmengen. Teilweise führte diese Erhitzung fast zur

4 Ergebnisse

vollständigen Denaturierung der Toxine, ähnlich der Temperaturbehandlung bei 85 °C für 10 min. Dieser Erhitzungsschritt führte zur Denaturierung aller Toxine in den Proben und war mit dem Negativwert (ohne Toxinzugabe) vergleichbar.

Beispielhaft wurde aus den Absorptionsspektren für den Stamm 1750, Toxintyp A, die Toxinkonzentration in H-Milch in ng berechnet.

Die gemessenen Absorptionsspektren bei der unbehandelten H-Milch Probe lagen bei $1,03 \pm 0,13$.

Die Werte aus der Standardkurve für den Toxintyp A waren:

Konzentration der Standardtoxine = Absorption bei 450 nm

313 pg	=	0,16
625 pg	=	0,5
1250 pg	=	0,8
2500 pg	=	1,6

Berechnung*: $1,03 \text{ nm} / 0,16 \text{ nm} = x / 313 \text{ pg}$

$$\underline{x=2014 \text{ pg}}$$

$1,03 \text{ nm} / 0,5 \text{ nm} = x / 625 \text{ pg}$

$$\underline{x= 1287 \text{ pg}}$$

$1,03 \text{ nm} / 0,8 \text{ nm} = x / 1250 \text{ pg}$

$$\underline{x=1609 \text{ pg}}$$

$1,03 \text{ nm} / 1,6 \text{ nm} = x / 2500 \text{ pg}$

$$\underline{x= 1609 \text{ pg}}$$

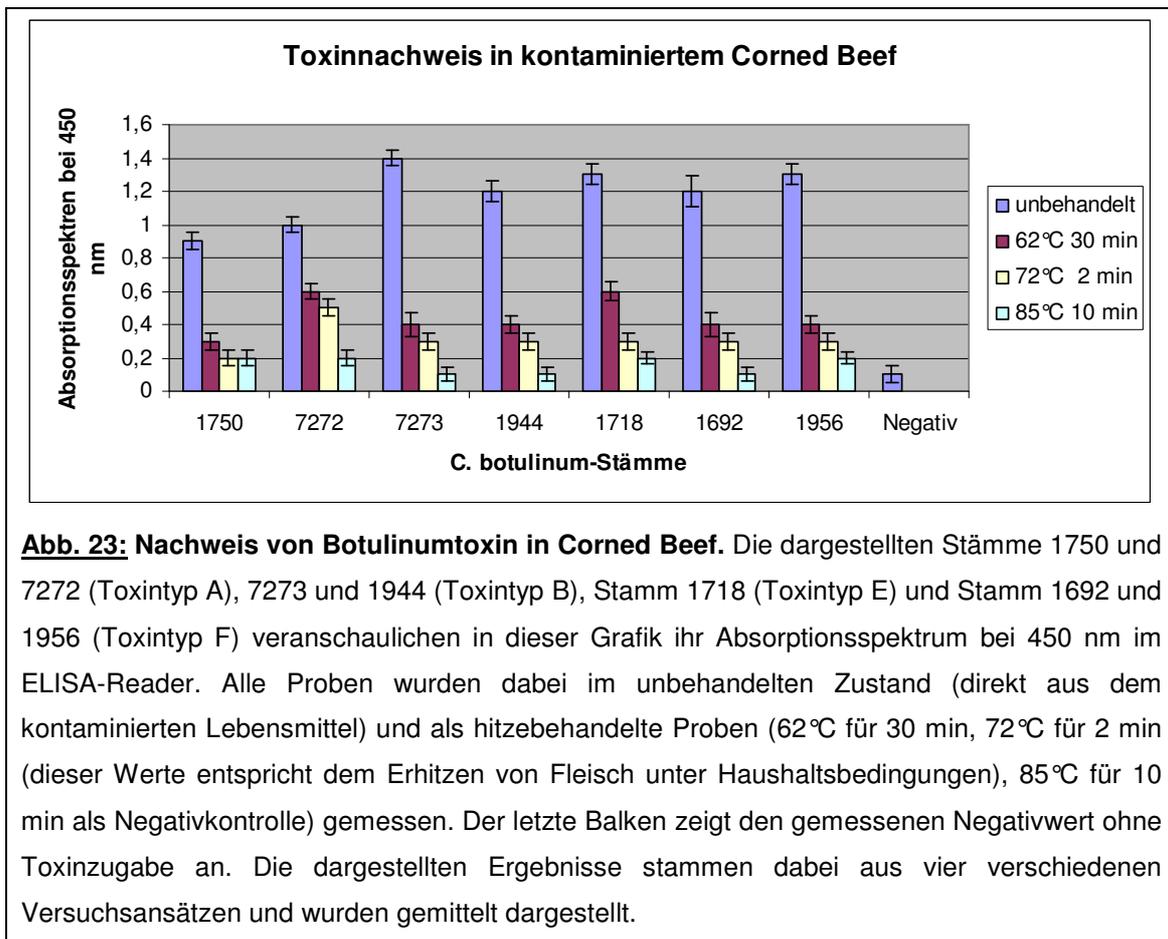
* berechnet für 4 Einzelmessungen und anschließender Mittelwertbildung

Mittelwert: $2014+1287+1609+1609 / 4 = 1629 \text{ pg} = 1,629 \text{ ng Botulinumtoxin in der unbehandelten H-Milch Probe}$

Die Berechnung erfolgte exemplarisch für den Stamm 1750, alle anderen Toxinmengen wurden mit Hilfe der Absorptionsspektren dargestellt.

4.7.2.2 Untersuchungen zur Stabilität der Toxine in kontaminiertem Corned Beef

Wie die Milchproben wurde auch das Corned Beef mit einer bestimmten Toxinmenge aus den Kulturüberständen der Toxintypen A, B, E und F gespikt. Abbildung 23 zeigt die erzielten Ergebnisse aus dem ELISA-Test für die Versuche mit künstlich kontaminierten Corned Beef-Proben mit den toxinhaltigen Überständen an.



In dieser Abbildung sind die Ergebnisse des Toxinnachweises der *C. botulinum*-Stämme in künstlich kontaminiertem Corned Beef dargestellt. Man kann im Vergleich zum Toxinnachweis in Milch eine deutlich höhere Toxinrate mit Absorptionswerten bis 1,4 in den unbehandelten Proben erkennen. Da alle Proben mit gleichen Toxinmengen (Absorptionsrate von 1,0) gespikt wurden, sind die Schwankungen in Corned Beef deutlicher zu erkennen. Die Stämme

4 Ergebnisse

7273, 1718 und 1956 zeigten z.B. Werte zwischen 1,3-1,4 im ELISA, diese Abweichungen von den zugegebenen Toxinmengen lassen sich mit Hilfe des Matrixeffektes erklären, d.h. es kann zu unterschiedlichen Reaktionen/Bindungen der Antikörper innerhalb der Lebensmittelmatrix kommen.

Eine Erhitzung auf 62°C für 30 min zeigte aber auch hier eine starke Reduktion der aktiven Toxinmengen in den Proben um etwa 50 bis 60 %. Die Erhitzung auf 72°C für 2 min verstärkte die Tendenz der Denaturierung und bei einer Erhitzung auf 85°C für 10 min liegen die Absorptionswerte unterhalb der Nachweisgrenze.

Letztendlich ist festzustellen, dass beide Versuchsansätze (H-Milch und Corned Beef) messbare Ergebnisse erzielten. Ein Toxinnachweis in beiden Lebensmittelmatrizes wurde mit dem ELISA-Test bestätigt.

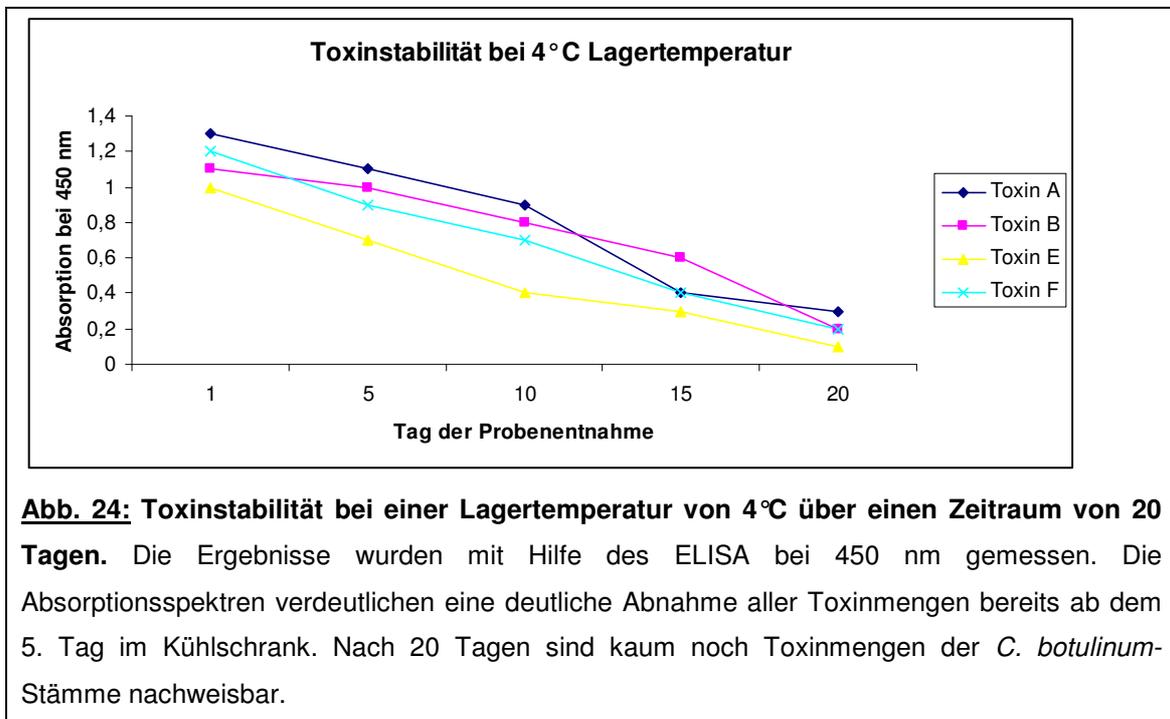
Alle Proben wurden mit der gleichen Menge an Toxinen kontaminiert. Die unterschiedlichen Absorptionsspektren lassen sich mit den Wechselwirkungen der verschiedenen Matrizes Milch bzw. Corned Beef und den Antikörpern des ELISA-Systems erklären.

Die Erhitzung der Proben hatte bei beiden Lebensmitteln eine starke Abnahme der künstlich zugegebenen Toxine bewirkt und zeigte eine deutliche Inaktivierung bzw. Denaturierung der Toxinproteine in den Lebensmittelproben. Am effektivsten waren die Erhitzungen bei 72° für 20 Sekunden bei der Milch und die Erhitzung auf 72°C für 2 min beim Corned Beef mit nur sehr geringen Mengen an aktiven Toxinen in den Proben. Durch die Erhitzung aller Proben auf 85°C für 10 Minuten konnten letztlich die restlichen aktiven Toxine vollständig denaturiert und zerstört werden.

4.7.2.3 Untersuchungen zur Stabilität der Toxine bei verschiedenen Lagertemperaturen

Zur Prüfung der Stabilität der Toxine von *C. botulinum* wurden Lagerversuche mit unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten durchgeführt. Die Proben (Kulturüberstände) wurden bei +4 °C und bei -21 °C bis zu 20 Tage gelagert.

Die Toxintypen A, B, E und F wurden jeweils zu Beginn des Versuchsansatzes im ELISA gemessen und fortlaufend am 1. , 5. , 10. , 15. und 20. Tag erneut untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind in den beiden unten dargestellten Grafiken zu erkennen.



Nach der Lagerung im Kühlschrank bei +4°C ist bereits ab dem 5. Tag der Messung eine deutliche Abnahme der Toxinmengen für alle Toxintypen zu beobachten.

Nach einer Dauer von 20 Tagen sind die Toxine soweit reduziert, dass sie bei einem Absorptionswert von 0,2 liegen. Dies entspricht einem negativen Ergebnis.

4 Ergebnisse

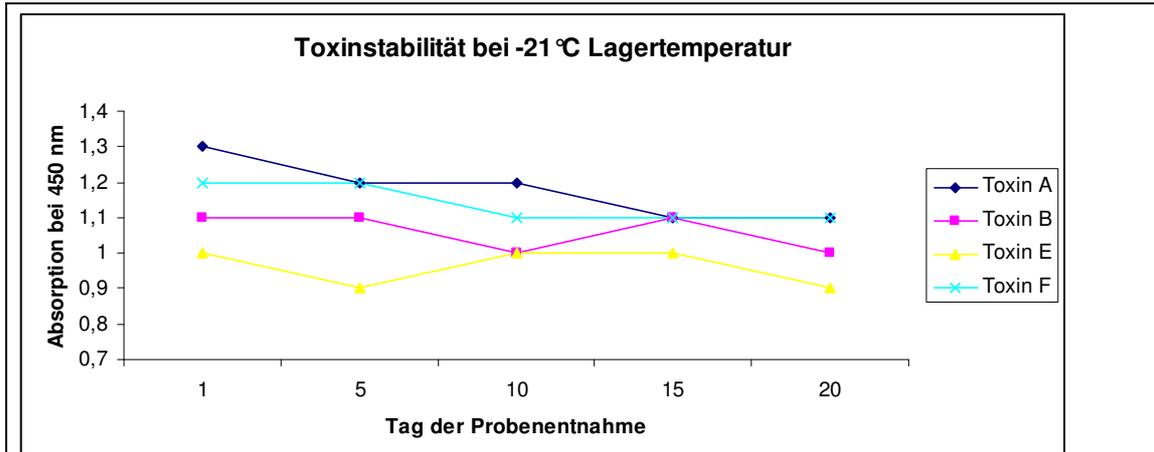


Abb. 25: Toxinstabilität bei einer Lagertemperatur von -21 °C über einen Zeitraum von 20 Tagen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des ELISA bei 450 nm gemessen. Die Absorptionsspektren verdeutlichen eine gute Stabilität der Toxine von *C. botulinum*-Stämmen. Auch nach 20 Tagen sind nur geringe Schwankungen bei den Toxinmengen nachweisbar.

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass die Konzentrationen für die Toxine bei einer Lagertemperatur von -21 °C zwar einem gewissen Schwankungsspektrum unterliegen, im Vergleich zur Ausgangskonzentration aber relativ konstant bleiben.

4.8 Toxinproduktion von *C. botulinum*-Stämmen in verschiedenen Lebensmitteln

Dieser Versuchsansatz sollte einen Einblick in die Toxinproduktion von einzelnen *C. botulinum*-Stämmen in verschiedenen Lebensmitteln geben. Dabei wurden Corned Beef und Bohnen aus der Konserve gewählt, diese wurden künstlich mit den Stämmen A, B, E und F von *C. botulinum* kontaminiert. Die Lebensmittel wurden über einen bestimmten Zeitraum gelagert, damit die Bakterien die Möglichkeit hatten, Toxine bilden zu können. Mit Hilfe des ELISA wurde gemessen, ob eine Toxinbildung stattgefunden hatte und wie hoch der Toxingehalt war.

4 Ergebnisse

Die Abbildung 26 zeigt die erzielten Ergebnisse.

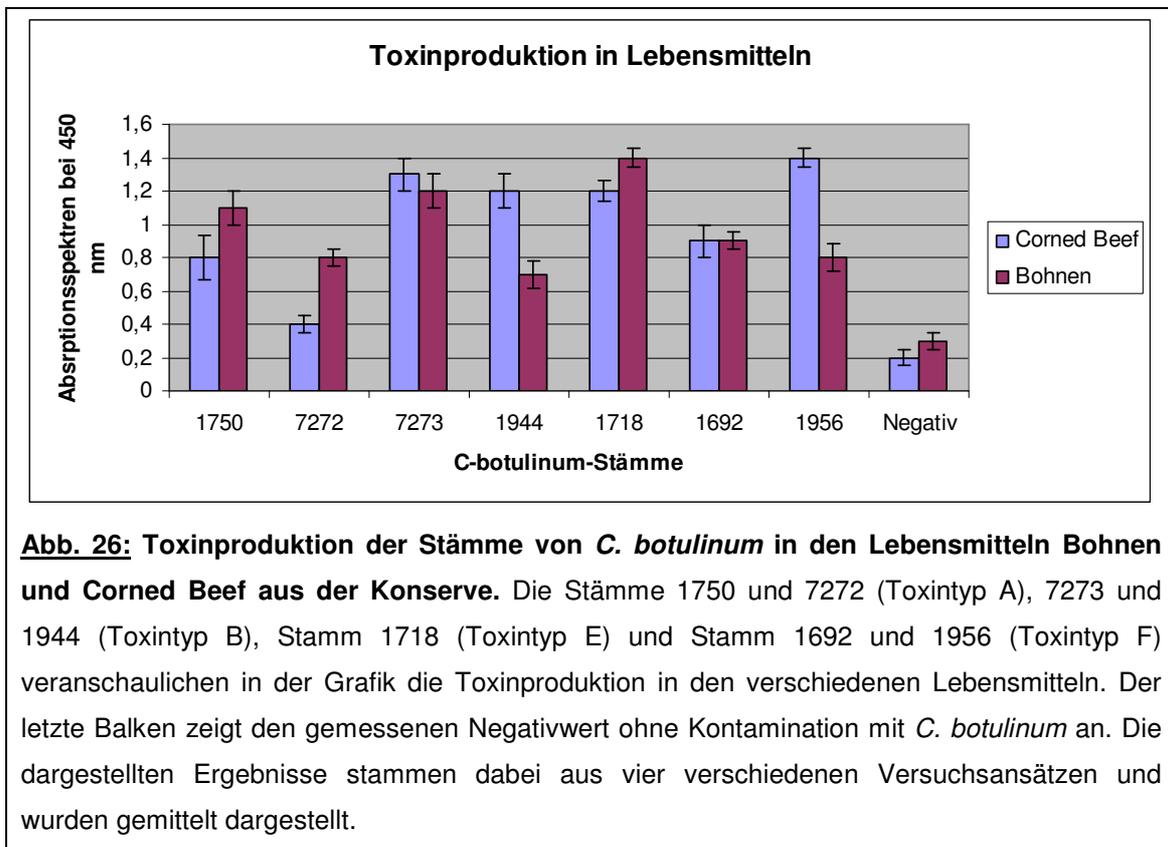


Abb. 26: Toxinproduktion der Stämme von *C. botulinum* in den Lebensmitteln Bohnen und Corned Beef aus der Konserve. Die Stämme 1750 und 7272 (Toxintyp A), 7273 und 1944 (Toxintyp B), Stamm 1718 (Toxintyp E) und Stamm 1692 und 1956 (Toxintyp F) veranschaulichen in der Grafik die Toxinproduktion in den verschiedenen Lebensmitteln. Der letzte Balken zeigt den gemessenen Negativwert ohne Kontamination mit *C. botulinum* an. Die dargestellten Ergebnisse stammen dabei aus vier verschiedenen Versuchsansätzen und wurden gemittelt dargestellt.

In dieser Abbildung sind die Absorptionsspektren bei der Toxinproduktion der verschiedenen *C. botulinum*-Stämme dargestellt.

Sowohl in Corned Beef als auch in Bohnen haben die Clostridien der verschiedenen Toxintypen hohe Toxinkonzentrationen produziert. Wie schon bei den Versuchen mit der Toxinbildung in Kulturüberständen gab es offensichtlich stammspezifische Unterschiede im Hinblick auf die Exprimierung der Toxine.

So war die Absorptionsrate bei dem Stamm 7272 des Toxintyps A insbesondere bei Corned Beef wesentlich geringer als bei dem anderen Typ A-Stamm 1750 oder den anderen Toxinbildnern. Die Stämme 1718 und 1956, die im Kulturüberstand nur eine sehr geringe Toxinbildung aufwiesen, exprimierten in Lebensmitteln Konzentrationen, die mit den anderen BoNT-Typen vergleichbar waren.

5 Diskussion

Clostridium botulinum ist ein grampositives, stäbchenförmiges, im Boden lebendes Bakterium. Die Erreger sind obligat anaerob und können unter Mangelbedingungen bzw. ungünstigen Umwelteinflüssen Sporen produzieren.

Das Besondere von vielen *Clostridium botulinum*-Stämmen ist die Fähigkeit, bei ihrer Vermehrung Toxine zu bilden und diese durch Zell-Lyse frei zu setzen (Fenicia et al., 1999; Simpson, 2004). Es gibt insgesamt 4 physiologisch unterscheidbare Gruppen (I-IV) und 7 serologische Toxintypen A-G, wobei nur die Toxintypen A, B, E und F als humanpathogen gelten (Sugiyama, 1980; Hatheway, 1988; Sharma und Whiting, 2005). Die Toxintypen C und D haben speziell bei Wasser- und Hausgeflügel sowie weiteren (Haus)-Säugetieren (insbesondere Rinder) eine Bedeutung (Rings, 2004; Smart et al., 1987).

Die Unterscheidung in die 7 Serotypen A-G kann man heute noch in 32 weitere Subtypen klassifizieren. In einer Studie von Kalb et al. (2011) wurden die Neurotoxintypen B mit Hilfe von Proteomanalysen in eine Vielzahl von Subtypen untergliedert. Auch in anderen Studien von Smith et al. (2005), Franciosa et al. (2006), Hill et al. (2007), Chen et al. (2007), Raphael et al. (2010), Böhnelt und Gessler (2010) und Macdonald et al. (2011) wurde über die verschiedenen Subtypen und Probleme bei der Diagnostik berichtet.

Da sich alle Subtypen in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, wird die Detektion der unterschiedlichen Toxine und ihrer Subtypen mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens erschwert. Es besteht die Gefahr, dass einzelne Toxin-Subtypen mit dieser Nachweisteknik nicht erkannt werden.

Die Botulinumneurotoxine (BoNT) stellen die potentesten von Bakterien produzierten Gifte dar (Lamanna, 1959). Ihre Wirkung beruht auf einer Unterbrechung der Acetylcholinausschüttung an den motorischen Endplatten. Es erfolgt keine Signalübertragung und die Muskelkontraktionen bleiben aus (Simpson, 1981 & 1982).

5 Diskussion

Die letale Dosis bei intraperitonealer Injektion in Mäuse beträgt etwa 0,3 ng/kg, ist aber in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit der Maus variabel. Die Angaben für die orale Dosis beim Menschen unterliegen starken Schwankungen. In den verschiedenen Publikationen werden Werte zwischen 0,1 µg/kg (Inhalation) bis 0,001 µg/kg bei intravenöser, subkutaner oder intraperitonealer Applikation (Gill, 1982; Johnson und Bradshaw, 2001; Sharma und Whiting, 2005; Bossi, 2004; CIDRAP, 2007) angegeben.

Die durch die Toxine verursachten Krankheitsbilder werden als Botulismus bezeichnet und stellen eine klassische lebensmittelbedingte Intoxikation dar, wobei das präformierte Toxin mit den Lebensmitteln aufgenommen wird.

Die Krankheit stellt sich beim Menschen mit folgenden Symptomen in der Anamnese dar: Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Der weitere klinische Verlauf beginnt mit einer symmetrischen Lähmung der Hirnnerven, gefolgt von einer symmetrischen absteigenden schlaffen Lähmung (Paralyse). Die Lähmung der Atemmuskulatur kann oft zu einer langandauernden künstlichen Beatmung der Patienten führen. Die Beteiligung der Hirnnerven ist hauptsächlich charakterisiert durch Dysarthrie, Diplopie, Dysphonie und Dysphagie. Die Todesursache bei Botulismus ist häufig eine Atemwegs-Obstruktion oder eine Lähmung der gesamten Atemmuskulatur.

Eine Botulismus-Erkrankung bei Tieren, insbesondere bei Rindern, zeigt sich mit sehr ähnlichen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Festliegen, Atemproblemen, Schluckbeschwerden oder Bewegungsstörungen (Ataxien).

Das Botulinumneurotoxin wird auch als mögliches bioterroristisches Agens angesehen (Arnon et al., 2001; Atlas, 2002; Gutzwiller et al., 2008). Auf Grund des ubiquitären Vorkommens des Erregers im Boden oder in Sedimenten von Gewässern, aber auch als natürlicher Kontaminant von Feldern und Futtermitteln durch Dünger, Gülle oder Tierkadavern, ist der Keim weit verbreitet und daher für eine absichtliche Ausbringung leicht zu beschaffen.

Nach dem 11. September 2001, dem Tag des Anschlags auf das World Trade Center in Amerika, wird die Gefahrenlage hinsichtlich eines Anschlags insgesamt als deutlich erhöht eingeschätzt, auch hinsichtlich des Einsatzes von biologischen Agenzien. Forschungsaktivitäten zu hochpathogenen Stoffen und Mikroorganismen treten erneut in den Vordergrund (Russmann, 2003; Arnon et al., 2001). Erstmals wurden im 2. Weltkrieg biologische Waffen eingesetzt, die im Vorfeld von ausführlichen Forschungsprojekten begleitet wurden.

Es gibt eine Vielzahl- für einen bioterroristischen Anschlag relevanter und hochpathogener bakterieller Erreger, z. B. *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera*, *Coxiella burnetii* oder *Francisella tularensis*. Auch Viren wie Ebola Virus, Pockenviren, Lassafieber- oder Gelbfieber-Viren gelten für den Menschen als hochpathogen. Auch Tiere können von einem solchen Anschlag betroffen sein: so können Krankheiten, wie die Maul- und Klauenseuche oder Schweinepest ebenfalls durch eine absichtliche Ausbringung in die Landwirtschaft ausgelöst werden. Als eine weitere wichtige Gruppe biologischer Agenzien werden Toxine z. B. Rizin, Shiga-Toxin oder das hochtoxische Botulinumneurotoxin angesehen (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta).

Das Gesamtziel dieser Arbeit war, die diagnostische Situation in Bezug auf *C. botulinum* und seine Neurotoxine zu verbessern. Auf Grund des bioterroristischen Potenzials von Botulinumtoxinen und der Möglichkeit einer absichtlichen Ausbringung in die Lebens- oder Futtermittelkette sollten geeignete und effiziente Verfahren zum Nachweis von vegetativen Formen, Sporen und Toxinen von *C. botulinum* entwickelt werden. Des Weiteren sollten diese Methoden an verschiedene Lebensmittelmatrizes angepasst werden, um ein schnelles Nachweisverfahren für eine Kontamination zur Verfügung zu haben.

5.1 Kultivierung und Wachstum von *C. botulinum*

5.1.1 Nährmedien

Es wurden verschiedene flüssige und feste Nährmedien auf ihre Eignung zur Anzucht von *C. botulinum* untersucht. Dabei wurden spezielle Medien für die kulturelle Anzüchtung der Bakterien, für die Herstellung von Sporensuspensionen sowie für die Toxinbildung im Kulturüberstand getestet.

Die Medien, die das beste Wachstum der *C. botulinum*-Kulturen zeigten, wurden für die weiteren Versuchsdurchläufe eingesetzt.

Für die Vermehrung und das Wachstum der Bakterienkulturen aus Lyophilisaten, oder der Kryo-Konservierung hatten sich Selzer-Bouillon und das Deinfoced Clostridial Medium (DRCM) als besonders geeignet herausgestellt. Diese Medien konnten auch für die Isolierung der Keime aus verschiedenen Lebensmitteln verwendet werden.

Die Induktion der Sporenbildung konnte nach Kultivierung der Bakterienstämme in Selzer-Bouillon und einem Überimpfen der Kulturen in Tryptose-Pepton-Glukose-Bouillon (TPGY) erfolgen.

Für die Toxinbildung hatte sich besonders die Modifizierte Kalbfleisch-Bouillon (MKBO) mit dem Zusatz von Cooked Meat Medium (Oxoid) als geeignet erwiesen.

Im Allgemeinen werden die Nährmedien beim Wachstum von *C. botulinum* gleichmäßig getrübt, teilweise kann es zur Flockenbildung oder Agglomeration kommen. Die Gasbildung wurde als eher mäßig bezeichnet, bei proteolytischen Stämmen war die Entstehung von ranzigem Geruch festzustellen. Anlässlich dieser Arbeit konnten bei den hier untersuchten *C. botulinum*-Stämme sowohl die Wachstumsmerkmale als auch die Geruchsbildungen festgestellt werden.

Als feste Nährmedien haben sich vor allem Schafblutagar-Platten und selektive Laktose-Eigelb-Platten als geeignet erwiesen. Die morphologischen Eigenschaften der verschiedenen *C. botulinum*-Stämme auf Schafblutagar-Platten waren bei allen Stämmen identisch. Die Kolonieförmungen waren rund bis lappig, leicht unregelmäßig und meist erhaben, sie waren durchsichtig bis

semiopak, teilweise mit grau-weißer Farbe (Smith und Hobbs, 1974). Der Durchmesser einer Kolonie variierte zwischen 1 bis zu 6 mm je nach physiologischer Gruppe. Teilweise zeigten die Stämme eine starke β -Hämolyse (Loch, 2000). Auf Laktose-Eigelb-Platten war die Morphologie sehr ähnlich, allerdings nahmen die Kolonien einen perlmuttartigen Schimmer an.

Das Optimum für die Herstellung der Ansätze wurde unter strikt anaeroben Bedingungen in der Arbeitsstation bei 37°C erreicht. Die Dauer für die Bebrütung der jeweiligen Ansätze richtete sich nach dem Ziel des Versuches. So wurden kulturelle Ansätze für die Gewinnung von Bakteriensuspensionen für mindestens 48 h inkubiert, Ansätze für die Herstellung von Sporensuspensionen und zur Toxinproduktion bis zu 7 Tagen.

5.1.2 Sporenerstellung

Zur Sporenbildung müssen bestimmte äußere Bedingungen eintreten, um die vegetativen Zellen zum Sporulieren anzuregen. Dazu zählen unter anderem Wassermangel, Hitze, niedriger pH-Wert (Smith und Sugiyama, 1988), Sauerstoff-Überschuss, toxische Substanzen oder Alterung der Zellen.

Bei verschiedenen Untersuchungen und Studien zur Hitzeaktivierung der vegetativen Zellen von *C. botulinum* zur Anregung der Sporulation wurde festgestellt, dass Gruppe I (proteolytische) Erreger bei 80°C für 10 min und Bakterien der Gruppe II (nicht-proteolytische) bei 70°C für 10 min erhitzt werden müssen, um die Bakterien zur Sporulation anzuregen (Smith und Sugiyama, 1988; Peck et al., 1995). In der Studie von Yang et al. (2009) wurden die untersuchten Bakterienstämme bei 80°C für 15 min erhitzt und anschließend bei suboptimalen Temperaturen von 30°C inkubiert (Durban et al., 1974).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Kulturen sogar auf 85°C für 15 min erhitzt, um die optimalsten Ergebnisse für die Sporulation der Stämme zu erhalten. Die anschließende Inkubation der Bakterien erfolgte unter suboptimalen Bedingungen bei einer Temperatur von 23°C über einen Zeitraum von 5-7 Tagen unter anaeroben Bedingungen.

In einer Veröffentlichung von Durban und Grecz (1969a & b) wurden Nährmedien und Zusatzstoffe für optimale Sporulationsmedien beschrieben, wie z. B. ein Zusatz von Tryptikase, Pepton oder Brühe mit Natriumthioglykolat. Auch in einer Studie von Sonnenschein aus dem Jahr 1980 und von Perkins (1965) wurde die Zugabe von Trypticase, Pepton und Glukose als optimale Sporulationsmedien angesehen. Die Verwendung von Hefeextrakt wurde ebenfalls in einer Vielzahl von Publikationen als entscheidend für eine Sporenbildung hervorgehoben (Tsuji und Perkins, 1962; Anellis et al., 1972; Roberts, 1965; Segner et al., 1971a & b; Durban et al., 1974; Roberts und Smart, 1974).

Für diese Studie wurden für die Herstellung von Sporen die TPGY-Bouillon mit Trypticase, Pepton, Hefeextrakt und Glukose eingesetzt.

Die Herstellung der Sporensuspensionen der Toxintypen A, B, E und F gelang ohne größere Probleme, wobei nach 7 Tagen in den Kulturen eine optimale Sporendichte von mindestens 80-90 % vorlag. Die Überprüfung der Sporenbildung erfolgte mikroskopisch. Die Identifizierung der Sporen und ihre Unterscheidung von den vegetativen Zellen wurden mit Hilfe einer Sporenfärbung nach Rakette durchgeführt. Die Sporen waren als grüne rundliche Strukturen und die vegetativen Zellen als lila längliche Formen zu erkennen. Vorallem bei der Bildung der Sporen war die sogenannte "Tennisschlägerform" von *C. botulinum* sehr gut erkennbar; dabei wölbte sich die vegetative Bakterienzelle apikal auf und bildete dort die rundliche Spore aus. Das Aussehen entsprach dabei einem Tennisschläger.

5.1.3 Toxinherstellung

Zur Herstellung von Toxinextrakten wurden die humanpathogenen Toxintypen A, B, E und F von *C. botulinum* in Selzer-Bouillon kultiviert und anschließend in ein spezifisches MKBO-Medium zur aktiven Toxinproduktion überführt.

Nach einer Inkubationszeit von 5-7 Tagen konnte im Medium von einer deutlichen Toxingehalt ausgegangen werden.

Zum Nachweis dieser aktiven Toxine wurde ein ELISA-Verfahren entwickelt, um die Toxinkonzentrationen in den MKBO-Medien zu testen.

Die Tests wurden sowohl bei unbehandelten toxinhaltigen Kulturüberständen als auch nach verschiedenen Hitzebehandlungsverfahren durchgeführt. Die Untersuchung zum Toxingehalt der Proben erfolgte parallel im ELISA und im Mäuse-Bioassay

Im Vergleich zwischen den *C. botulinum*-Stämmen der unterschiedlichen Toxintypen wurden Unterschiede beim Toxinbildungsvermögen festgestellt. Diese Varianz konnte sowohl in flüssigen Nährmedien (Kulturüberstand), als auch in den verschiedenen Lebensmittelmatrizes festgestellt werden. Die Unterschiede waren spezifisch für die Stämme der jeweiligen Toxintypen. So konnte z. B. ein Stamm aus der Gruppe des Toxintyps E überhaupt kein Toxin bilden (Stamm 8550). Die Produktion des aktiven Toxins konnte bei diesem Stamm weder im Kulturüberstand noch in den verschiedenen Lebensmittelmatrizes (H-Milch, Bohnen und Corned Beef) nachgewiesen werden. Diese mangelnde Fähigkeit zur Toxinbildung lässt sich mit Hilfe einer fehlenden Expressierung des Toxins erklären, da in den verschiedenen PCR-Verfahren das Toxingen nachweisbar war. Solche passiven, ruhenden (silent) Toxingene sind vielfach beschrieben. Es gibt dabei verschiedene Möglichkeiten, z. B. können Stämme 2 Toxine codieren (Hathaway und McCroskey, 1987; Franciosa et al., 1997; Kirma et al., 2004) und dabei ein aktives und ein passives Toxin synthetisieren (Franciosa et al., 1994; Kirma et al., 2004). Eine weitere Studie belegt auch, dass es möglich ist 2 Toxine zu produzieren, ein Haupt- und ein Nebentoxin (Lund und Peck, 2000).

5.1.4 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung bei vegetativen Kulturen und in den Sporensuspensionen von *C. botulinum* stellte sich als problematisch heraus. Auf Grund des starken schwärmenden Wachstums der Bakterien musste für die Bestimmung der Keimzahlen der geeignete Zeitpunkt ermittelt werden, um ein

Auszählen der Bakterien überhaupt durchführen zu können. Die Zählung konnte meist innerhalb der ersten 24h der Bebrütung erfolgen, bevor es zu einem zu starken Wachstum der Stämme und damit zum Konfluieren der Kolonien kam. Insbesondere die Keimzahlbestimmungen in den Hackfleischproben mit einer starken Begleitflora haben sich aus diesen Gründen als sehr schwierig erwiesen. Auf Grund der Begleitflora waren weder exakte Angaben zur Keimzahl möglich, noch konnten *C. botulinum*-Kolonien ohne Differenzierung allein auf Grund ihrer Koloniemorphologie als solche identifiziert werden.

Die anderen verwendeten Lebensmittelmatrizes (Bohnen, Corned Beef und H-Milch) waren frei von störender Begleitflora. Die Keimzahlbestimmungen konnten bei diesen Matrizes effektiver und genauer durchgeführt werden, als bei den Hackfleischproben. Deshalb wurde für die weitergehenden Untersuchungen, wie für die Bildung von Toxinen oder die Testung der Toxinstabilität der verschiedenen *C. botulinum*-Toxintypen, auf diese kommerziell sterilen Lebensmittel zurückgegriffen.

5.2 Analyse und Testung geeigneter DNA-Extraktionsverfahren

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden insgesamt sechs verschiedene kommerzielle Test-Kits und ein Extraktionsverfahren aus einer Veröffentlichung von Lindström et al. aus dem Jahr 2001 getestet.

Diese DNA-Extraktionsverfahren wurden auf ihre Effektivität und Anwendbarkeit im Hinblick auf die unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes analysiert.

Die verwendeten Test-Kits zur DNA-Extraktion waren das Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen), das RTP-Spin Bacteria DNA Mini Kit (Invitex), das Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (Südlabor), GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich), MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) und das Hi-Yield® Plasmid Mini Kit (SLG). Laut Angaben der Hersteller sind alle diese Kits für die Extraktion bakterieller DNA aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien geeignet.

5 Diskussion

Das Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit wird für die DNA-Extraktion aus tierischem Blut und Gewebe, aus Zellen, Hefen, Bakterien und Viren angewendet und beruht auf dem Prinzip eines chemischen Zell-Lysis-Puffers. Bei Untersuchungen mit DNA-Proben von verschiedenen Stämmen von *C. botulinum* wurde festgestellt, dass eine Extraktion zwar aus allen Stämmen möglich war, aber die besten Ergebnisse bei der Extraktion der Toxingen-Typen C und D von *C. botulinum* erzielt wurden. Aus diesem Grund ist das Kit der Firma Qiagen für die Toxintypen C & D besonders zu empfehlen.

Für die humanpathogenen Toxintypen A, B, E und hat sich das RTP-Spin bacteria DNA Mini Kit der Firma Invitex als effektiv bei der Extraktion bakterieller DNA aus Kulturüberständen und den verschiedenen Lebensmittelmatrixen erwiesen. Auch dieses Kit arbeitet mit einem Zell-Lysis Puffer. Für eine ausreichende Stabilität der Nukleinsäuren waren verschiedene Puffer bereits im DNA-Kit enthalten. Dieses Test-Kit ermöglichte eine sehr gute Detektion geringer DNA-Mengen in den verschiedenen Lebensmittelmatrixen. Die Wiederfindungsraten lagen durchschnittlich bei 10^2 KbE pro g oder ml eines Lebensmittels. Bei geringeren Keimleveln von *C. botulinum* musste für die DNA-Extraktion ein Anreicherungsschritt durchgeführt werden. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde die *C. botulinum*-Stämme in Selzer-Bouillon für mindestens 24 h inkubiert.

Das Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit der Firma Südlabor, GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich), MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) und das Hi-Yield® Plasmid Kit von SLG haben sich als ungeeignet für die DNA-Extraktion aus den verschiedenen Matrixen herausgestellt. Es ließ sich keine reine DNA aus den Proben extrahieren und nachfolgend in der PCR nachweisen. Diese Kits erwiesen sich als nicht geeignet für genauere Analyse von *C. botulinum* in den verschiedenen Lebensmittelmatrixen

Eine weitere DNA-Extraktionsvariante wurde nach einer Veröffentlichung von Lindström et al. (2001) getestet. Dabei wurden verschiedene reine Bakterienkulturen von *C. botulinum* durch thermische äußere Einflüsse lysiert

und die freigesetzte DNA direkt mit dem PCR-Verfahren von Lindström et al. (2001)

getestet. Die Testung aus Kulturüberständen war dabei sehr zufriedenstellend. Weitere Ansätze wurden dann aus verschiedenen kontaminierten Lebensmitteln durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse waren nicht zufriedenstellend, da eine Vielzahl von nicht identifizierten Banden die Ergebnisse der PCR verunreinigten. Die mangelnde Präzision und die Störfaktoren dieser DNA-Extraktionsvariante waren auf Matrix-Effekte der Lebensmittel zurückzuführen.

5.3 Testung geeigneter PCR_Verfahren zur Detektion von *C. botulinum*-Toxingenen in verschiedenen Lebensmittelmatrizes

Es ist eine sehr große Anzahl von Veröffentlichungen verfügbar, die sich mit verschiedenen molekularbiologischen Nachweismethoden beschäftigen. Vor allem sind Studien mit verschiedenen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR-Verfahren) für die Detektierbarkeit der *C. botulinum*-Toxingene darunter. Einige PCR-Verfahren wurden für diese Arbeit ausgewählt und auf ihre Effektivität für den Nachweis der verschiedenen Toxingene der humanpathogenen *C. botulinum*-Stämme untersucht. Dazu zählen PCR-Verfahren aus Veröffentlichungen von Dahlenborg et al. (2001), Fach et al. (1993), Szabo et al. (1993), Dahlsten et al. (2008), De Medici et al. (2009), Prevot et al. (2007), Franciosa et al. (1998), Takeshi et al. (1996) und Lindström et al. (2001).

Der Nachweis der Toxingene erfolgte zunächst zur Etablierung der Methoden aus Kulturüberständen, danach auch zur Untersuchung verschiedener Lebensmittelmatrizes.

Alle neun hier genannten PCR Verfahren wurden zunächst ausgiebig getestet, indem eine Untersuchung der verschiedenen Toxingene von *C. botulinum* aus Kulturüberständen mit Hilfe dieser Verfahren erfolgte. Dabei wurde eindeutig festgestellt, dass die Detektion mit Hilfe von PCR-Systemen von Dahlenborg et al. (2001), Fach et al. (1994), Szabo et al. (1993), De Medici et al. (2009),

5 Diskussion

Prevot et al. (2007) und Franciosa et al. (1998) sich als nicht zufriedenstellend erwiesen haben. Die Banden waren dabei teilweise sehr unspezifisch und unsauber.

Auf grund dieser Ergebnisse wurde besonderes Augenmerk auf die drei PCR-Verfahren gerichtet, die bereits aus Kulturüberständen sehr gute Ergebnisse erzielt hatten. Dazu zählten die Verfahren mit Primern von Takeshi et al. (1996) und Lindström et al. (2001) sowie die PCR nach Dahlsten et al. (2008).

Das Single PCR-Verfahren nach Takeshi und die Multiplex PCR-Variante nach Lindström haben sich als sehr gut geeignet für den molekularbiologischen Nachweis von *C. botulinum*-Stämmen in Kulturüberständen, aber auch in Lebensmittelmatrizes, herausgestellt: Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Unterscheidung in die physiologischen Gruppen I und II (proteolytisch oder nicht-proteolytisch) der *C. botulinum*-Stämme mit Hilfe der PCR nach Dahlsten et al. (2008) erfolgreich durchgeführt.

Die Single-PCR nach Takeshi (1996) wurde durch ein modifiziertes Cyclerprogramm und eine Hot Start Polymerase optimiert. Mit Hilfe dieser Anpassungen gelang der Nachweis der Toxingene A, B, E und F regelmäßig aus Kulturüberständen und kontaminierten Lebensmitteln.

Als zweites geeignetes Verfahren wurde die Multiplex-PCR mit Primern von Lindström et al. (2001) getestet. Auch hier erfolgten einige Anpassungen des Cyclerprogrammes und auch hier konnte der beste Nachweis mit einer Hot Start Polymerase der Firma Qiagen erfolgen.

Die Single-PCR und die Multiplex-PCR wurden jeweils in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen von vegetativen Zellen und Sporen getestet.

Im Unterschied zu der Single-PCR von Takeshi ist es mit der Multiplex-Variante von Lindström möglich, durch die Zugabe mehrerer Primerpaare für alle 4 humanpathogenen Toxintypen A, B, E und F verschiedene Toxingene in einer Lebensmittelprobe in einem Ansatz nachweisen zu können. Allerdings kam es teilweise zu unspezifischen Ergebnissen, da die Matrixeinflüsse der Lebensmittel und die Zugabe mehrerer Primer zu den Proben zu einer

5 Diskussion

ungenauen Identifikation der Gene führte. Mit einer anschließenden Durchführung einer Single PCR nach Takeshi gelang es dann, jeden einzelnen Toxintyp effektiver und spezifischer nachzuweisen.

Andere getestete PCR-Systeme (Szabo et al., 1993; Dahlenborg et al., 2001; Fach et al., 1995; Prevot et al., 2007; Franciosa et al., 1998) haben sich als unzureichend und wenig effektiv erwiesen, da sie nicht geeignet waren, exakte Analysen in kontaminierten Lebensmittelproben durchzuführen. Die Detektierbarkeit der Toxingene von *C. botulinum* unter Beeinflussung der verschiedenen Lebensmittelmatrizes erwies sich als schwierig, da es teilweise zu unspezifischen Banden oder fehlenden Banden kam, dies lässt sich durch die Wechselwirkungen mit den Lebensmitteln erklären, während der Nachweis der Gene aus Kulturüberständen auch mit diesen PCR-Systemen meistens zufriedenstellend gelang.

Das PCR-Verfahren nach Dahlsten et al. (2008) wurde zur Unterscheidung in die physiologischen Gruppen I (proteolytisch) und II (nicht-proteolytischen) von *C. botulinum*-Stämmen eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode können Untersuchungsmaterialien vorselektiert werden, um einen möglicherweise folgenden Mäuse-Bioassay hinsichtlich der Tierzahl einzuschränken. Bei den proteolytischen Stämmen kann in einem folgenden Mäuse-Bioassay die Anzahl der Versuchstiere reduziert werden, weil die Trypsinzugabe zu den Probenextrakten entfallen kann und daher die Anzahl der Extrakte für die intraperitonealen Injektionen sinkt. Nur die physiologische Gruppe II benötigt die Zugabe von Trypsin, weil diese Toxintypen nicht in der Lage sind, sich selber in den aktiven Toxinzustand zu versetzen (Holdemann et al., 1977; Wictome und Shone, 1998; Sharma und Whiting, 2005; Parpura und Chapman, 2005).

Gruppe I umfasst im Allgemeinen alle Stämme der Toxintypen A und proteolytische Stämme der Toxintypen B und F.

Zur Gruppe II zählen alle saccharolytisch und nicht-proteolytisch aktiven Stämme der Toxintypen B, E und F (Holdemann und Brooks, 1970; Smith und Hobbs, 1974; Hutson et al., 1993).

Das PCR-Verfahren von Dahlsten hat sich als geeignet erwiesen. Die verwendeten *C. botulinum*-Stämme konnten in proteolytische und nicht-proteolytische Stämme differenziert werden. Die Stämme 1750 und 7272 (Toxintyp A), 46/06 (Kontrolle Toxintyp A), die Stämme 1944, 89 und 7273 (Toxintyp B), 54/06 (Kontrolle Toxintyp B) und der Stamm 1956 (Toxintyp F) gehören zur proteolytischen Gruppe I.

Zur Gruppe II, den nicht-proteolytischen Stämmen, zählen die hier verwendeten *C. botulinum*-Stämme 1718 und 8550 (Toxintyp E) und Stamm 1692 (Toxintyp F).

Für die drei PCR-Verfahren wurden jeweils die Nachweisgrenzen bestimmt, dazu wurden Versuche mit vegetativen Zellen und Sporensuspensionen von *C. botulinum*-Kulturen durchgeführt. Bei niedrigen Keimzahlen von 10^1 bis 10^2 KbE je g oder ml Lebensmittelprobe musste der PCR ein Anreicherungsschritt in Selzer-Bouillon vorgeschaltet werden, bei höherer Konzentration ab 10^2 KbE/g bzw. ml Probe, konnte dieser entfallen.

5.4 Entwicklung eines Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) zur Bestimmung aktiver Toxine im Kulturüberstand unter Berücksichtigung der Stabilität bei Hitzeeinwirkung

Als Alternativmethode zum Mäuse-Bioassay hat sich vor allem der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) in vielen Veröffentlichungen mit guten Ergebnissen herausgestellt. Die Entwicklung und Etablierung eines stabilen sowie hinreichend sensitiven und spezifischen ELISA-Verfahrens zur Analyse von verdächtigen Lebensmittelproben ist Voraussetzung, um den aus ethischen Gründen kritisch zu beurteilenden Tierversuch zu ersetzen.

Die bekannten Probleme hinsichtlich der ELISA-Technik beim Nachweis von *C. botulinum*-Toxinen, wie der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in

5 Diskussion

verschiedenen Laboratorien, das Erreichen einer ausreichenden Sensitivität, der Einsatz unterschiedlicher Antikörper, die Verfügbarkeit von Standardtoxinen mit definierten Toxinkonzentrationen und die Bestimmung der Vielzahl der Subtypen der einzelnen Toxintypen, konnten mit dieser Arbeit nicht gelöst werden.

Ein sehr großes Problem beim Entwickeln des ELISA-Verfahrens war es, die Standardkurven zu reproduzieren und eine höhere Genauigkeit bei den Werten zu erzielen. Die kommerziell vertriebenen Standardtoxine der Firma metabiologics haben sich als sehr instabil und schwierig in der Handhabung erwiesen. Für die Erstellung der Standardkurven wurde ein sehr langer Zeitraum benötigt, um die optimalen Bedingungen für die Einstellung von Puffer, Temperaturen, Verdünnungen und optimale zeitliche Abläufe zu ermitteln. Selbst nach wochenlangen Versuchen waren die Ergebnisse nicht immer zufriedenstellend und benötigen noch weitere Anpassungen, um eine stabile Standardkurve zur Ermittlung der Toxinmengen zu erhalten.

Diese Arbeit sollte die Entwicklung eines ELISA-Systems beinhalten, welches aktive Toxine in Lebensmittelproben bestimmen und eine effektive, zeitsparende, quantitative Analyse durchführen kann.

Die Versuche mit toxinhaltigen Kulturüberständen wurden parallel auch mit dem Mäuse-Bioassay durchgeführt, um die Leistungsfähigkeit des ELISA-Verfahrens zu überprüfen (siehe Tabelle 18). Der Vergleich der Ergebnisse zeigte weitestgehende Übereinstimmungen zwischen den Tests. Die Nachweisempfindlichkeit ist beim Tierversuch jedoch höher. Bei sehr niedrigen Toxinkonzentrationen erbrachte der Mäuse-Bioassay noch positive Ergebnisse, während im ELISA die Werte bereits unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

5 Diskussion

Tabelle 18: Direkter Vergleich der Ergebnisse von Mäuse-Bioassay und ELISA-Verfahren. Proben aus Kulturüberstand der jeweiligen *C. botulinum*-Stämme. Ergebnisse un behandelter Proben und nach Hitze einwirkung für 30 min bei 60°C sowie für 2 min bei 72°C.

Stammnr.	Toxintyp	Behandlung	Toxinkonzentration	
			Mäuseassay	ELISA
1750	A	unbehandelt	0,5-25 ng	98,3 ng
		60°C für 30'	5-250 ng	64,8 ng
		72°C für 2'	0,05-2,5 ng	7,65 ng
89	B	unbehandelt	5-250 ng	136,8 ng
		60°C für 30'	0,5-25 ng	7,6 ng
		72°C für 2'	0	<0,5 ng
1944	B	unbehandelt	0,5-25 ng	106,4 ng
		60°C für 30'	0,05-2,5 ng	7,6 ng
		72°C für 2'	0,01-0,25 ng	<0,5 ng
7273	B	unbehandelt	0,5-25 ng	35,6 ng
		60°C für 30'	0,5-25 ng	7,6 ng
		72°C für 2'	0,01-0,25 ng	<0,5 ng
8550	E	unbehandelt	0	<0,5 ng
		60°C für 30'	0	<0,5 ng
		72°C für 2'	0	<0,5 ng
1718	E	unbehandelt	0,05-25 ng	10,2 ng
		60°C für 30'	0,01-0,25 ng	<0,5 ng
		72°C für 2'	0	<0,5 ng
1692	F	unbehandelt	5-250 ng	180,4 ng
		60°C für 30'	0,5-25 ng	7,8 ng
		72°C für 2'	0,5-25 ng	7,8 ng
1956	F	unbehandelt	5-250 ng	7,8 ng
		60°C für 30'	0,5-25 ng	<0,5 ng
		72°C für 2'	0,01-0,25 ng	<0,5 ng

5 Diskussion

Auffällige Befunde sind rot markiert dargestellt. Die im ELISA bestimmten Toxinmengen lagen fast immer innerhalb der aus der MLD abgeleiteten Spannbreite für die Toxinkonzentration. Abweichungen ergaben sich für Stamm 1750 und Stamm 1944. Für die unbehandelten Extrakte lagen die Toxinkonzentrationen im ELISA deutlich über denen des Tierversuches. Beim Stamm 1750 waren im Mäuse-Bioassay die Konzentrationen bei dem Extrakt, der 30 min bei 60°C behandelt wurde, deutlich höher als der unbehandelte Ausgangswert.

Diese Diskrepanz konnten im Nachhinein nicht mehr geklärt werden, aber die Ergebnisse deuteten auf Ungenauigkeiten beim Ablesen des Mäuse-Bioassays hin, z. B. einer zu späten Erkennung der klinischen Symptome oder einer untypischen Klinik bei den Tieren.

Die Tabelle zeigt deutlich, dass die unbehandelten Kulturüberstände, bis auf die Ausnahme bei Stamm 1750, einen sehr hohen Toxinwert aufwiesen, während die Konzentrationen nach den Erhitzungsschritten deutlich abnahmen.

Die Temperatureinwirkungen verdeutlichten, dass das Protein BoNT durch Hitzeeinwirkung denaturiert und zerstört wird. Bereits bei einer Hitzebehandlung von 30 min bei 60°C war bei allen Proben eine starke Abnahme der Toxinkonzentrationen zu erkennen. Bei der überwiegenden Menge der Stämme war sogar eine extrem starke Reduktion der Toxine zu sehen, so dass die Detektionsgrenzen des ELISA-Verfahrens keine genauen Messungen und Ergebnisse mehr zuließen (< 0,5 ng/ml), beim Mäuse-Bioassay aber noch geringe Werte angegeben werden konnten.

Für den Stamm 1718 ergab sich eine Abweichung, da nach Erhitzung auf 60°C für 30 min im Mäuse-Bioassay ein schwachpositives Ergebnis erzielt wurde und im ELISA ein negatives Resultat (<0,5 ng) erkennbar war. Ebenfalls waren schwach positive Ergebnisse bei den Stämmen 1944 (B), 7273 (B) und 1956 (F) im Mäuse-Bioassay und negative Ergebnisse im ELISA zu sehen. Wobei beim Stamm 1956 nach einer Erhitzung auf 60°C für 30 min im Tierversuch eine Menge von 0,5-25 ng festgestellt, aber im ELISA ein negatives Ergebnis erzielt wurde.

5 Diskussion

Diese Ergebnisse verdeutlichten die höhere Sensitivität des Tierversuches im Gegensatz zum ELISA-System. Eine Erhitzung auf 72°C für 2 min zeigte eine ebenso starke Denaturierung der Toxine, auch hier war bei 6 von insgesamt 8 getesteten Stämmen die Toxinmenge nicht mehr messbar.

Der Stamm 8550 des Toxintyps E hatte unter den Versuchsbedingungen keine messbaren Toxinmengen produziert, dies war im ELISA und im Tierversuch identisch.

Der Stamm 1718 (Toxintyp E) und der Stamm 1956 (Toxintyp F) haben ebenfalls kaum messbare Ergebnisse erzielt, bei beiden wurde nur eine sehr geringe Ausgangskonzentration der jeweiligen Toxine erreicht. Allerdings war auch bei diesen geringen Mengen durch die Hitzeeinwirkung eine Reduzierung der Toxinkonzentrationen zu erkennen.

Zusammenfassend waren die erzielten Ergebnisse des ELISA-Verfahrens hinsichtlich ihrer Konzentrationen mit den Ergebnissen aus dem Mäuse-Bioassay vergleichbar. Die in beiden Versuchsansätzen ermittelten Werte zeigten hinsichtlich der Konzentrationsbereiche Übereinstimmungen, allerdings lag die minimale Detektionsgrenze des ELISA-Verfahrens bei 0,5 ng/ml, während im Gegensatz dazu im Mäuse-Bioassay 0,01-0,25 ng erreicht wurden. Mit dem ELISA konnten aussagekräftige Messungen durchgeführt werden. Es wurde eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber dem Mäuse-Bioassay festgestellt.

Im Rahmen der Durchführung dieser Arbeit konnte die Validierung des ELISA-Verfahrens nicht abgeschlossen werden. Um eine Methode validieren zu können, müssen die Kriterien der Spezifität und der Sensitivität des Verfahrens getestet werden. Voraussetzung für die Validierung neuer Verfahren ist, dass verschiedene qualifizierte Personen aus unabhängigen Instituten den Test etablieren und ihn auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse testen und abschließend bei der Durchführung eines Ringversuches beteiligt werden. Dafür müssten definierte Standardtoxine und einheitliche Antikörper verfügbar

sein, die den ELISA in der Detektion der jeweiligen Toxintypen verbessern würden. Diese Antikörper müssten auch gegen die verschiedenen 32 Subtypen von *C. botulinum* standardmäßig hergestellt werden. Eine Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für jeden einzelnen Subtyp der Toxintypen sind, wäre der nächste notwendige Schritt, im Hinblick auf einen Ersatz des Mäuse-Bioassays.

Die bekannten Probleme hinsichtlich der ELISA Technik beim Nachweis von *C. botulinum*, wie der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Laboratorien, ausreichende Sensitivität, der Einsatz unterschiedlicher Antikörper, die Verfügbarkeit von Standardtoxinen mit definierten Toxinmengen und die Vielzahl der verschiedenen Subtypen für die einzelnen Toxintypen, sind nicht gelöst. Der Test bedarf noch einer Optimierung, die aus Zeitgründen nicht während dieser Arbeit erfolgen konnte. Es fehlen Versuche mit Feldproben und die Validierung des Verfahrens.

Aufgrund der Resultate mit den untersuchten Kulturüberständen wurde der ELISA-Test weiterentwickelt und an verschiedene Lebensmittelmatrizes angepasst.

5.5 Untersuchungen zur Stabilität der Botulinum-neurotoxine in verschiedenen Lebensmittelmatrizes

Die Vorversuche mit toxinhaltigen Kulturüberständen erbrachten mit dem ELISA-Verfahren im Vergleich zum Mäuse-Bioassay weitestgehend gute übereinstimmende Ergebnisse. Deshalb wurden die weiteren Versuchsansätze zur Stabilitätsprüfung der Toxine in Lebensmitteln aus Gründen des Tierschutzes ausschließlich mit dem ELISA-Verfahren getestet.

Im Hinblick auf die Stabilität der Toxine unter verschiedenen äußeren Einflüssen, sind einige Studien verfügbar. Bereits in Studien von Van

5 Diskussion

Ermengen, aus dem Entdeckungsjahr des Erregers 1897 wird verdeutlicht, dass Botulinumtoxin thermolabile Eigenschaften besitzt. Dies bedeutet, dass die Toxine, aber auch in verschiedenen Vorstufen unter Hitzeinwirkung reduziert bzw. denaturiert werden können. Auch in weiteren älteren Arbeiten wurde auf dieses Phänomen hingewiesen, z. B. aus dem Jahr 1967 (a & b) von Licciardell et al. oder von Cartwright und Lauffer (1958). Diese Studien weisen darauf hin, dass BoNT auf Grund ihrer unterschiedlichen Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen eine variable Thermostabilität besitzt. Die meisten dieser Untersuchungen erfolgten in Kulturüberständen und nicht direkt aus mit Toxinen belasteten Lebensmitteln. Es gibt eine Vielzahl weiterer Veröffentlichungen (Lund, 1990; Ohye und Scott, 1953; Levetzow, 1979; Woodburn et al., 1979; Lindström et al., 2003), die verdeutlichen, dass verschiedene Temperatur-Zeit-Kombinationen zu einer Inaktivierung der Toxinmengen in den Proben führen können.

Tabelle 19 : Überblick über verschiedene Literaturangaben zu Temperatur-Zeit-Profilen für die Hitzeinaktivierung der Botulinumtoxine

Temperatur	Wirkungszeit in min	Literaturquelle
60 °C	5 min	Ohye und Scott, 1953
70-80 °C	max. 20 min	Lund, 1990
85 °C	5 min	Lund, 1990
80 °C	10 min	Pierson und Reddy, 1988
80 °C	6 min	Levetzow, 1979
79 °C	20 min	Woodburn et al., 1979
85 °C	5 min	Woodburn et al., 1979

In der Lebensmitteltechnologie werden verschiedene Wärmebehandlungsverfahren eingesetzt, die bewirken sollen, dass pathogene Keime eliminiert oder auf ein Maß reduziert werden, dass keine lebensmittelbedingten Erkrankungen auftreten. Für den Bereich der Milchpasteurisierung, zeigten die gewählten Beispiele für die Dauererhitzung (30 min bei 62 °C) und die Kurzzeit-

Hoherhitzung (72°C für 20 sec) eine deutliche Reduktion der Botulinumneurotoxine in den durchgeführten Studien.

Für die Erhitzung von Fleisch im Haushalt wird eine Kerntemperatur von 72°C für 2 Minuten empfohlen; auch bei dieser Temperatur-Zeit-Relation wurde eine deutliche Reduktion der Toxine festgestellt.

Für die hier vorliegende Arbeit wurde für die vollständige Hitzeinaktivierung der Toxine eine Temperatur von 85°C für 10 min gewählt. Mit dieser Kombination wurde eine vollständige Denaturierung der Toxine in allen Matrices erreicht.

5.5.1 Untersuchungen zur Stabilität der Botulinumneurotoxine unter Einwirkung lebensmittelrelevanter Hitzebehandlungen

Für die Analysen wurden ein festes und ein flüssiges Lebensmittel (Corned Beef und Milch) gewählt und mit bestimmten Toxinen versetzt, um diese dann anschließend mit dem ELISA-Verfahren detektieren zu können.

Die Toxinmengen wurden zuvor im reinen Kulturüberstand gemessen, um über die Werte als Vergleichswerte für die Detektierbarkeit in den Lebensmittel zu verfügen. Jede Lebensmittelprobe wurde anschließend mit einer bestimmten Menge an Toxinen kontaminiert und anschließend mit dem ELISA-Verfahren detektiert.

Die Wiederfindungsraten der zugegebenen definierten Toxinmengen wurden mit Hilfe des ELISA-Verfahrens in den Kulturüberständen und den verschiedenen Lebensmittelmatrices gemessen und zeigten sehr ähnliche Absorptionsspektren mit den entsprechenden Toxinmengen an. Ein Verlust an Toxinen in den Lebensmitteln war nicht festzustellen. Es wurde jedoch teilweise höhere Toxinmengen gemessen, als nach den zugegebenen Mengen zu erwarten waren. Dies kann nur durch Matrixeffekte der jeweiligen Lebensmittel, z.B. und durch Wechselwirkungen des ELISA mit anderen Proteinen, erklärt werden.

5 Diskussion

Alle Versuchsansätze wurden zur Anpassung der Methode und Testung des Verfahrens mindestens 8-mal unabhängig von einander durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse aus insgesamt 4 Versuchsansätzen mit durchgängig guten Ergebnissen ausgewählt und als gemittelte Werte aus den einzelnen Versuchsreihen grafisch dargestellt. Dabei sind die Standardabweichungen mit Werten von $\pm 0,04$ bis $\pm 0,09$ gering und verdeutlichen relativ heterogene und übereinstimmende Ergebnisse bei der Bestimmung der Toxinkonzentrationen.

Zur Hitzedenaturierung der Toxine wurden verschiedene Temperatur-Zeit-Kombinationen gewählt, die zum Einen lebensmitteltechnologische Verfahren, zum Anderen aber auch im Privathaushalt üblicherweise angewendeten Erhitzungsverfahren simulieren sollten.

Mit Toxinen kontaminierte Milch wurde für 30 min auf 62°C (Dauererhitzung) und für 20 sec auf 72°C (Kurzzeit-Hocherhitzung) erhitzt. Corned Beef wurden auf 72°C für 2 min erhitzt. Alle Lebensmittel wurden darüber hinaus für 10 min auf 85°C erhitzt, um die Toxine vollständig zu denaturieren (Negativkontrolle).

Die aus diesen Untersuchungen resultierenden Ergebnisse lassen Rückschlüsse über die Stabilität der Toxine zu und zeigten eine deutliche Abnahme der Toxinwerte im ELISA in Abhängigkeit von den gewählten Erhitzungsschritten. Die Toxine wurden durch die Hitze graduell denaturiert und waren nach einer Erhitzung auf 85°C für 10 min nicht mehr nachweisbar. Schon ein Dauererhitzen (62°C für 30 min) und das Kurzzeit-Hocherhitzen von Milch führten zu einem starken graduellen Absinken der Toxinkonzentrationen. Die Absorptionsspektren der verschiedenen Stämme lagen bei den unbehandelten Proben stets zwischen 0,8 und 1 bei 450 nm im ELISA-Reader. Die Hitzebehandlung führte bei allen Proben zu einer deutlichen Abnahme der Toxinkonzentrationen, wobei die Erhitzung auf 72°C für 20 sec eine noch stärkere Reduktion zeigte, als eine Dauer-Erhitzung auf 62°C für 30 min. Die Erhitzung auf 85°C zeigte, wie in allen Lebensmitteln, eine absolute Denaturierung der Toxine an.

5 Diskussion

Der Nachweis der Toxine gelang auch in Corned Beef, allerdings ist dabei im Gegensatz zur Milch eine höhere Anfangskonzentration der Toxinmengen zu erkennen. Die Werte lagen dabei zwischen 0,9 und 1,4 bei 450 nm und damit deutlich höher als bei den unbehandelten Milchproben. Alle Lebensmittel wurde zu Beginn mit einer gleichen Toxinkonzentration gespikt und sollten dementsprechend auch gleiche Absorptionsspektren aufweisen. Die erhöhten Angaben in Corned Beef lassen sich demnach nur mit einem Matrixeffekten erklären und verdeutlichen, dass die Antikörper möglicherweise nicht eindeutig binden konnten und somit die Ergebnisse leicht abweichen.

In Corned Beef konnte allerdings auch eine stärkere Abnahme der Toxinmengen bei einer Erhitzung auf 72 °C für 2 min festgestellt werden, im Gegensatz zu einer Erhitzung des Lebensmittels auf 62 °C für 30 min.

Zusammenfassend ist eine Erhitzung auf 72 °C für beide Lebensmittel (Milch und Corned Beef) mit einer höheren Toxinabnahme zu erkennen, im Gegensatz zur geringeren Erhitzungswirkung bei 62 °C für 30 min.

Bei beiden hitzebehandelten Lebensmitteln konnten mit den unterschiedlichen Temperatur-Zeit-Profilen gezeigt werden, dass es zu einer graduellen Inaktivierung bzw. Denaturierung der hitzelabilen Toxine kommt.

In einer Studie von Rasooly und Do (2010) wurde nachgewiesen, dass der Toxintyp B hitzestabil in Milch ist und der Toxintyp A denaturiert wird. Durch den Pasteurisierungsprozess bei 63 °C für 30 min konnte der Toxintyp B nicht denaturiert werden. Die durchgeführten Versuche verdeutlichten, dass die Einwirkung von Säure und Pasteurisierungstemperaturen die Inaktivierung von Botulinumneurotoxin A verursachte, allerdings blieb das BoNT B davon unbeeinflusst. Die erzielten Ergebnisse von Rasooly und Do konnten mit den in dieser Arbeit eingesetzten *C. botulinum*-Stämmen des Toxintyps B nicht reproduziert und bestätigt werden.

5.5.2 Untersuchungen zur Stabilität und Lagerfähigkeit der Botulinumneurotoxine bei verschiedenen Temperaturen

Die Untersuchungen der Botulinumneurotoxine auf ihre Lagerstabilität wurden bei 4 °C und -21 °C durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten an, dass Proben, die im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurden, bereits nach 5 Tagen eine deutliche Abnahme der Toxinkonzentrationen in den Kulturüberständen zeigten. Nach insgesamt 20 Tagen bei 4 °C, wurde eine Reduktion der Toxinmengen auf unterhalb der Nachweisgrenze festgestellt.

Im Gegensatz dazu, waren bei der Lagerung toxinhaltiger Überstände im Gefrierschrank bei -21 °C nur geringe Schwankungen in den Toxinkonzentrationen messbar. Nach einer Versuchsdauer von 20 Tagen war festzustellen, dass die Toxinkonzentrationen relativ konstant geblieben sind.

Die Toxine sind bei einer Lagertemperatur von 4 °C nicht in der Lage, über einen längeren Zeitraum aktiv zu bleiben. Aus diesem Grund empfiehlt sich bei allen Lebensmitteln, die kritisch im Hinblick auf eine mögliche Kontamination mit *C. botulinum* zu bewerten sind, eine Lagerung im Temperaturbereich <5 °C. Zu den betroffenen Lebensmitteln gehören u.a. vakuumverpackte Fischereierzeugnisse, selbst eingemachte Fleisch- und Gemüsekonserven und im eigenen Haushalt gepökelte Fleisch- und Wursterzeugnisse.

Da die Toxine bei einer Lagerung im Kühlschrank stark abgebaut und denaturiert werden, kann die Gefahr einer Intoxikation des Verbrauchers durch kontaminierte Lebensmittel reduziert werden.

Bei einer Lagerung im Gefrierschrank bei -21 °C zeigte sich, dass die Toxinkonzentrationen in den Proben erhalten blieben, die Toxine werden konserviert.

5.6 Toxinproduktion in ausgewählten Lebensmittelmatrizes

Ein weiterer Punkt dieser Forschungsarbeit war es, das Bakterium *C. botulinum* in verschiedene Lebensmittel zu überführen und es dann anschließend zur Toxinproduktion im Lebensmittel anzuregen. Dafür wurden Corned Beef und Bohnen beide aus der Konserve gewählt und mit genau definierten Mengen von vegetativen Formen von *C. botulinum*-Stämmen künstlich kontaminiert.

Für die Untersuchungen wurden diese kommerziell sterilen Lebensmittel gewählt, um eine eventuelle Begleitflora ausschließen zu können. In anderen Matrizes wie Hackfleisch ist eine sehr starke Grundkeimbelastung vorhanden, was eine Bildung von Toxinen durch *C. botulinum* möglicherweise deutlich erschwert.

Bei der kulturellen Untersuchung von Hackfleisch und bei der Keimzahlbestimmung von *C. botulinum* wurde auf dieses Problem bereits hingewiesen (Kapitel 4.1.2).

Nach ausreichender Inkubation der Lebensmittelproben wurde mit Hilfe des ELISA-Verfahrens die aktive Toxinmenge in den verschiedenen Proben ermittelt und quantifiziert.

Die daraus erzielten Ergebnisse zeigten eine sehr starke Toxinproduktion in den jeweiligen Lebensmitteln an, wobei vor allem die Stämme 7273 und 1944 (Toxintyp B), 1718 (Toxintyp E) und 1956 (Toxintyp F) eine starke Toxinproduktion in Corned Beef zeigten mit Werten von 1,2 bis 1,4. Diese Ergebnisse liegen höher als bei der Toxinproduktion in Kulturüberständen und lassen sich eventuell mit dem besseren Nährstoffangebot des Lebensmittels erklären, aber auch Wechselwirkungen der Antikörper mit anderen Proteinen könnten eine Ursache sein.

Auch in Bohnen waren die Stämme 7273 (B) und 1718 (E) sehr hoch in ihrer Toxinmenge und den Absorptionsspektren mit 1,2 bis 1,4. Der Stamm 7272 (Toxintyp A) zeigte dagegen in beiden Lebensmitteln eine eher geringe

5 Diskussion

Konzentration (Absorption von 0,4 bis 0,8), im Vergleich zum Stamm 1750 mit einer Absorption von 0,8 bis 1,2, ebenfalls Toxintyp A.

Der Stamm 8550, Toxintyp E, wurde auch hier eingesetzt konnte aber wie in allen anderen Lebensmittelmatrizes und Kultürüberständen kein Toxin produzieren und war mit Hilfe des ELISA nicht messbar.

Diese Resultate verdeutlichten erneut, dass die Bildung von Toxinen nicht nur unter den verschiedenen Toxintypen (A, B, E und F) variieren konnte, sondern auch in einer homogenen Gruppe konnte die Toxinbildungsfähigkeit abweichen und abhängig von den äußeren Einflüssen stark schwanken. Die optimalen Bedingungen zur Toxinbildung hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab (Tabelle 1), so z. B. dem pH-Wert einer Probe (Säure bei den Bohnen im Gegensatz zum Corned Beef) oder der Wasseraktivität (a_w), auch der Salzgehalt einer Probe hat entscheidenden Einfluss auf die Produktion der Toxine.

6 Zusammenfassung

Das Gesamtziel dieser Arbeit war es, die diagnostische Situation in Bezug auf *C. botulinum* und seinen Neurotoxinen zu verbessern. Dazu war es notwendig, geeignete Nachweisverfahren für Sporen, vegetative Formen und Neurotoxine von *C. botulinum* zu etablieren und zu entwickeln sowie an die verschiedenen Untersuchungsmatrizes anzupassen.

Dafür wurden zunächst verschiedene flüssige und feste Nährmedien für die kulturelle Anzucht der Bakterien, für die Bestimmung der Keimzahl und die Herstellung von Sporensuspensionen sowie für die Toxinbildung im Kulturüberstand getestet. Die Medien, die das beste Wachstum zeigten, wurden im weiteren Versuchsablauf eingesetzt. Für die Vermehrung der Bakterien wurde Selzer-Bouillon oder Clostridien Differential-Bouillon (DRCM) verwendet. Die Induktion der Sporenbildung erfolgte mit Hilfe der Selzer-Bouillon und anschließender Überimpfung in Tryptose-Pepton-Glukose-Hefe-Bouillon (TPGY). Für die Toxinbildung hatte sich Modifizierte Kochfleisch-Bouillon (MKBO) als geeignet erwiesen. Für die Keimzahlbestimmung wurden die dezimal verdünnten Lebensmittelproben im Doppelansatz auf Schafblutagar-Platten ausplattiert.

Im Vergleich zwischen allen für die Versuche eingesetzten *C. botulinum*-Stämme der unterschiedlichen Toxintypen konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich des Toxinbildungsvermögens in flüssigen Nährmedien, aber auch in Lebensmitteln festgestellt werden. Die Unterschiede waren spezifisch für die Stämme der jeweiligen Toxintypen. Der Stamm 8550 aus der Gruppe der Toxintypen E bildete im Kulturüberstand kein Toxin.

Nach einer 5- bis 7-tägigen Bebrütung bei Raumtemperatur ließen sich bei den eingesetzten Stämmen der Toxintypen A, B, E und F ohne größere Schwierigkeiten Sporen erzeugen. Die Sporulationsrate lag bei 80 bis 90 %. Bei der Keimzahlbestimmung für *C. botulinum* im Lebensmittel ergaben sich

6 Zusammenfassung

Probleme, wenn diese in Produkten mit einem hohen Anteil an Begleitflora (Hackfleisch) durchgeführt wurden. Die *C. botulinum*-Kolonien zeigten häufig ein schwärmendes Wachstum, sodass die Abgrenzung der einzelnen Kolonien für die Zählung schwierig war.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden verschiedene kommerzielle Test-Kits und ein in einer Publikation beschriebenes Verfahren zur Extraktion der bakteriellen DNA auf ihre Eignung geprüft und an verschiedene Lebensmittelmatrizes angepasst. Das RTP-Spin bacteria DNA Mini der Firma Invitex hat sich bei den Stämmen der Toxintypen A, B, E und F als effektiv erwiesen, wobei eine Konzentration von 10^2 KbE/ g oder ml der Proben eine ausreichend stabile Menge an DNA für den anschließenden Nachweis der Toxingene in der PCR erbrachte. Mit Hilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen war zwar eine Extraktion aller Stämme möglich, die besten Ergebnisse wurden jedoch für die Toxintypen C und D erzielt.

Neun verschiedene PCR-Verfahren wurden hinsichtlich ihrer Eignung zum Nachweis der Toxingene bei *C. botulinum* getestet, von denen sich drei als geeignet erwiesen. Eine Single-PCR mit Primern nach Takeshi et al. (1996) und eine Multiplex-PCR Primern von Lindström et al. (2001) wurden für den Nachweis der Toxintypen A, B, E und F modifiziert. Außerdem wurde eine PCR nach Dahlsten et al. (2008) zur Unterscheidung der physiologischen Gruppen I und II (proteolytisch oder nicht-proteolytisch) durchgeführt.

Die Single-PCR nach Takeshi wurde durch ein modifiziertes Cyclerprogramm und eine Hot Start Polymerase optimiert. Mit Hilfe dieser Anpassungen gelang der Nachweis der Toxingene auch aus den kontaminierten Lebensmittelproben. Das zweite geeignete Verfahren war eine Multiplex-PCR mit Primern von Lindström et al. (2001). Im Unterschied zu der Single-PCR war es hiermit möglich, mehrere Primerpaare für alle 4 humanpathogenen Toxintypen einzusetzen und die Toxine in einem Arbeitsschritt zu detektieren. Auf Grund der unterschiedlichen Matrixeinflüsse und des Einsatzes mehrerer Primerpaare

6 Zusammenfassung

wurden vermehrt unspezifische Reaktionen beobachtet, die zum Teil keine genaue Identifikation der Gene zuließen. Die Durchführung der Single-PCR nach Takeshi lieferte effektivere und spezifischere Ergebnisse für den Nachweis der Toxingene.

Das PCR-Verfahren nach Dahlsten et al. (2008) wurde zur Unterscheidung in die physiologischen Gruppen I (proteolytisch) und II (nicht-proteolytisch) eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode können Untersuchungsmaterialien vorselektiert werden. Bei den proteolytischen Stämmen kann in einem möglicherweise nachfolgenden Mäuse-Bioassay die Anzahl der Versuchstiere reduziert werden, weil die Dotierung der Probenextrakte mit Trypsin entfallen kann und daher die Anzahl der Extrakte für die intraperitonealen Injektionen sinkt.

Für die drei PCR-Verfahren wurden die Nachweisgrenzen bestimmt. Bei niedrigen Keimzahlen 10^1 - 10^2 KbE je g bzw. ml musste der PCR ein Anreicherungsschritt vorgeschaltet werden, bei höheren Keimzahlen ab 10^2 KbE/ g oder ml Probe konnte dieser entfallen.

Mit den anderen getesteten PCR-Systemen gelang der Nachweis der Gene in den Kulturüberständen, jedoch bei der Untersuchung von Lebensmitteln erwies sich die Matrix als störend, der Nachweis der Gene gelang häufig nicht.

Zur Messung der aktiven Toxinkonzentrationen in Kulturüberständen wurde ein Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) etabliert und anschließend an die Matrix verschiedener Lebensmittel angepasst. Die Versuche mit Kulturüberständen wurden parallel auch mit dem Mäuse-Bioassay durchgeführt, um die Effektivität des ELISA-Verfahrens zu überprüfen. Die Ergebnisse zeigten weitestgehende Übereinstimmungen, die Nachweisempfindlichkeit war beim Tierversuch jedoch höher. In niedrigen Toxinkonzentrationen erbrachte der Mäuse-Bioassay noch positive Reaktionen, während im ELISA Werte unterhalb der Nachweisgrenze gemessen wurden.

6 Zusammenfassung

Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens konnten aussagekräftige Messungen mit einer Zeitersparnis gegenüber dem Mäuse-Bioassay durchgeführt werden. Das ELISA-System als Testersatz für die Standardmethode des Tierversuchs komplett zu validieren konnte nicht vollständig durchgeführt werden. Die bekannten Probleme hinsichtlich der ELISA-Technik beim Nachweis von *C. botulinum*, wie der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Laboratorien, ausreichende Sensitivität, der Einsatz unterschiedlicher Antikörper, die Verfügbarkeit von Standardtoxinen mit definierten Toxinmengen und die Vielzahl der verschiedenen Subtypen für die einzelnen Toxintypen, sind nicht gelöst. Der Test bedarf noch einer Optimierung, die aus Zeitgründen nicht während dieser Arbeit erfolgen konnte. Es fehlen Versuche mit Feldproben und eine Validierung des Verfahrens.

Insgesamt liegen nicht sehr viele Publikationen zur Hitzestabilität von Botulinum-Neurotoxinen vor; es sind zum Teil unterschiedliche Angaben vorhanden. Die Erhitzungsversuche in dieser Studie zeigten, dass eine vollständige Denaturierung sowohl in Kulturüberständen als auch in Lebensmitteln nach einer Hitzeeinwirkung von 10 min bei 85 °C erreicht wurde. Schon ein Dauererhitzen (62 °C für 30 min) und das Kurzzeit-Hocherhitzen von Milch (72 °C für 20 sec) führten zu einem starken, graduellen Absinken der Toxinkonzentrationen. Auch die Hitzebehandlungsverfahren bei den festen Lebensmitteln mit unterschiedlichen Temperatur-Zeit-Verläufen zeigten eine graduelle Inaktivierung der Toxine.

Bei der Lagerung der Neurotoxine bei unterschiedlichen Temperaturen erwies sich die Toxinkonzentration bei -21 °C über 20 Tage als stabil, während bei +4 °C ab dem 5. Lagertag ein Absinken der aktiven Toxinmengen zu beobachten war. Am 20. Tag lag der Messwert unterhalb der Nachweisgrenze.

7 Summary

The overall objective of this study was to evaluate and to improve the diagnostic situation regarding *C. botulinum* and its neurotoxins. It was necessary to establish suitable detection methods for spores and vegetative forms of *C. botulinum* neurotoxins and to develop and adapt this to different matrices.

As a first step various liquid and solid culture media for the cultivation of bacteria, for determining the number of bacteria and the production of spore suspensions as well as for the production of toxins in the culture supernatants were tested. The media, which showed the best growth, were used in the further course of the experiment. For the proliferation of bacteria Selzer broth or differential clostridial broth (DRCM) was used. The induction of sporulation was performed using the Selzer broth with subsequent inoculation in tryptose-peptone-glucose-yeast broth (TPGY). For toxin production modified cooking meat broth (MKBO) has proved suitable. For the enumeration, the decimal diluted food samples were plated in duplicate on sheep blood agar plates.

Compared between all used *C. botulinum* strains of the different toxin types they show significant differences in toxin production assets in liquid media, but also in food. The differences were specific for the strains of the respective toxin types. The strain 8550 from the group of type E toxin were not able to form toxin in the culture supernatant.

A 5 - to 7-day incubation at room temperature for all strains of the toxin types A, B, E and F produce spores without any major difficulties. The sporulation rate was 80 to 90%. In the enumeration of *C. botulinum* in foods, there were problems when they were carried out in products with a high content of accompanying flora (minced meat). The *C. botulinum* colonies show often a swarming behaviour, so the distinction between the individual colonies was difficult for counting.

For molecular biology studies, various commercial test kits and a method described in a publication process for the extraction of bacterial DNA were tested for their

7 Summary

suitability and adapted to different food matrices. RTP spin bacteria DNA Mini kit from Invitex proved in strains of toxin types A, B, E and F to be effective, with a concentration of 10^2 CFU / g or ml of the sample, a sufficiently stable amount of DNA for the subsequent detection of the toxin genes by the following PCR.

Using the DNeasy ® Blood & Tissue Kit from Qiagen although an extraction of all strains was possible, the best results were achieved for the toxin types C and D.

Nine different PCR methods were evaluated and tested for their suitability for the detection of toxin genes in *C. botulinum*, three of them were found to be suitable. A single PCR with primers from Takeshi et al. (1996) and a multiplex PCR with primers from Lindström et al. (2001) for the detection of toxin types A, B, E and F have been modified. In addition, a PCR was performed from Dahlsten et al. (2008) to distinguish between the physiological groups I and II (non-proteolytic or proteolytic).

The single PCR by Takeshi was optimized by a modified cycler program and a hot start polymerase. With these adjustments it was able to detect the toxin type genes also from contaminated food samples.

The second method was a multiplex PCR with primers from Lindström et al. (2001). In contrast to the single-PCR, it was possible to use multiple primer pairs for all 4 human pathogenic toxin types and detect the toxins in a single step. Due to the different matrix effects and the use of multiple primer pairs increased non-specific reactions; some of them did not allow accurate identification of the genes. The implementation of the single-PCR by Takeshi delivered effective and specific results for the detection of all toxin genes.

The PCR method of Dahlsten et al. (2008) was able to distinguish the physiological groups I (proteolytic) and II (non-proteolytic). Using this method test materials can be preselected. The proteolytic strains must not be dispensed with trypsin in a subsequent mouse bioassay and so the number of animals can be reduced.

7 Summary

For the three PCR methods, the detection limits were determined. An enrichment step must be accomplished at first by low bacterial counts from 10^1 to 10^2 cfu per g or ml, with higher bacterial concentrations from more than 10^2 cfu per g or ml sample this step could be omitted.

However, the other tested PCR-systems were able to detect the toxin genes in the culture supernatants, but it was found, that the food matrices often disturbing the detection of the genes.

For the measurement of the active toxin concentrations in culture supernatants an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been established and is subsequently adjusted to the matrix of various food samples. Experiments with culture supernatants were carried out in parallel with the mouse bioassay, to verify the effectiveness of the ELISA method. The results showed most extensive similarities, the detection sensitivity was higher in animals, however. Low concentrations of the toxin in mice bioassay rendered still positive reactions, while the ELISA values were measured below the detection limit.

Using the ELISA method could meaningful measurements are performed with a time saving compared to the mouse bioassay. The ELISA system as a validated test system for a replacement of the gold standard method mouse bioassay could not be fully implemented.

The known problems with the ELISA technique for the detection of *C. botulinum*, as the reproducibility of the results in different laboratories, sufficient sensitivity, the use of different antibodies, the availability of standard toxins with defined toxin concentrations and the multiplicity of the various subtypes of the toxin types, are not solved.

The test requires further optimization which could not be made during this work because of lack of time. Tests with field samples and a full validation of this ELISA method are missing.

Overall, there are not many publications for the heat stability of botulinum neurotoxins, also there are a lot of different information available. The heating experiments in this study showed that complete denaturation in culture

7 Summary

supernatants as well as in food samples after a heat treatment of 10 min at 85° C was reached.

A continuous heating (62° C for 30 min), and the short-term high temperature method from milk on 72° C resulted in a strong gradually decrease in toxin concentrations. Also, the heat treatment process in the solid foods with different time-temperature curves showed a gradually inactivation of the toxins.

When storing the neurotoxins at different temperatures, the concentration of toxins was stable at -21° C for 20 days, while at 4° C from the 5th day of storage a decrease of the active toxin concentrations was observed. On day 20 the toxin level was below the detection limit.

8 Literaturverzeichnis

Adler, S., Bicker, G., Bigalke, H., Bishop, C., Blumel, J., Dressler, D., Fitzgerald, J., Gessler, F., Heuschen, H., Kegel, B., Luch, A., Milne, C., Pickett, A., Ratsch, H., Ruhdel, I., Sesardic, D., Stephens, M., Stiens, G., Thornton, PD., Thurmer, R., Vey, M., Spielmann, H., Grune, B., & Liebsch, M., 2010: The current scientific and legal status of alternative methods to the LD50 test for botulinum neurotoxin potency testing. The report and recommendations of a ZEBET Expert Meeting. *Altern. Lab Anim*, 38(4):315-330.

Akbulut, D., Grant, KA., & McLauchlin, J., 2004: Development and application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism. *Foodborne Pathog. Dis*, 1(4): 247-257.

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

Aktorics, K., Weller, U., Chatwal, GS., 1987: *Clostridium botulinum* type C produces a novel ADPribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Letters.*;212:109-13.

Alam, SI., Kumar, B., & Kamboj, DV., 2012: Multiplex detection of protein toxins using MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry: application in unambiguous toxin detection from bioaerosol. *Anal Chem.* 2012 Dec 4;84(23):10500-7.

Alpers K, Van Treeck U., & Frank C, 2005: Outbreak of wound botulism in injecting drug users in Germany, October–December 2005. *Euro Surveill*, 10.

Alsallami, AA., & Kotlowski, R., 2001: Selection of primers for specific detection of *Clostridium botulinum* types B and E neurotoxin genes using PCR method. *Int J Food Microbiol*, 69(3): 247-253.

Anellis, A., Berkowitz, D., Kemper, D., & Rowley, DB., 1972: Production of types A and B spores of *Clostridium botulinum* by the biphasic method: effect on spore population, radiation resistance, and toxigenicity. *Appl Microbiol*, 23(4): 734-739.

Arnon, SS., Midura, TF., Clay, SA., Wood, RM., & Chin, J., 1977: Infant botulism. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects. *JAMA*, 237(18):1946-1951.

Arnon, SS., Midura, TF., Damus, K., Thompson, B., Wood, RM., & Chin, J., 1979: Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *J Pediatr*, 94(2): 331-336.

Arnon, SS., Schechter, R., Inglesby, TV., Henderson, DA., Bartlett, JG., Ascher, MS., Eitzen, E., Fine, AD., Hauer, J., Layton, M., Lilliebridge, S., Osterholm, MT., O'Toole, T., Parker, G., Perl, TM., Russel, PK., Swerdlow, DL., & Tonat, K., 2001: Working Group on Civilian Biodefense: Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 28; 285(8):1059-70.

Atlas, RM., 2002: Bioterrorism: from threat to reality. *Annu Rev Microbiol*, 56: 167-85.

Aureli, P., Fenicia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, LM., & Hatheway, CL., 1986: Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxic Clostridium butyricum in Italy. *J Infect Dis*, 154(2): 207-211.

Aureli, P., Franciosa, G., & Fenicia, L., 2002: Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *Pediatr Infect Dis J*, 21(9): 866-868.

Baldwin, MR., Bradshaw, M., Johnson, EA., & Barbieri, JT., 2004. The C-terminus of botulinum neurotoxin type A light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. *Protein Expr.Purif.*, 37(1): 187-195.

Baldwin, MR., Tepp, WH., Pier, CL., Bradshaw, M., Ho, M., Wilson, BA., Fritz, RB., Johnson, EA., & Barbieri, JT., 2005: Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. *Infect Immun.*, 73(10): 6998-7005.

Baumgart, J., 1999: Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln. Studienausgabe, 4. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg.

Bartolome, G., & Schröter-Morasch, H., 2006: Schluckstörungen, Diagnostik und Rehabilitation. Urban & Fischer Verlag.

Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, TC., Jahn, R., & Niemann, H., 1994: Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem* 269, 1617-1620.

Boroff, DA., Raynaud, M., & Prevot, AR., 1952: Studies of toxin of *Clostridium botulinum* type D. J Immunol., 68(5): 503-11.

Boyer, AE., Gallegos-Candela, M., Lins, RC., Kuklennyik, Z., Woolfitt, A., Moura, H., Kalb, S., Quinn, CP., & Barr, JR., 2011: Quantitative Mass Spectrometry for Bacterial Protein Toxins — A Sensitive, Specific, High-Throughput Tool for Detection and Diagnosis. Molecules, 16, 2391-2413.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Stellungnahme Botulismus, 2009

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Stellungnahme Botulismus, 2002, http://www.bfr.bund.de/cm/343/viszeraler_botulismus.pdf

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2004;

http://www.bfr.bund.de/cm/343/viszeraler_botulismus_ein_neues_krankheitsbild.pdf

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Stellungnahme Botulismus, 2012:

<http://www.bfr.bund.de/cm/343/frage-und-antworten.zum-chronischen-botulismus.pdf>

Blasi, J., Chapman, ER., Link, E., Binz, T., De, CP., Sudhof, TC., Niemann, H., & Jahn, R., 1993: Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. Nature, 365(6442): 160-163.

Böhnel, H., Schwagerick, B., & Gessler, F., 2001b: Visceral botulism--a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 48(6): 373-383.

Böhnel, H., Wernery, U., & Gessler, F., 2003: Two cases of equine grass sickness with evidence for soil-borne origin involving botulinum neurotoxin. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 50(4): 178-182.

Böhnel, H., & Gessler, F., 2003: [Diagnosis of botulism since 1995. Report of test results]. Berl Munch.Tierarztl. Wochenschr, 116(7-8): 269-273.

Böhnel, H., Neufeld, B., & Gessler, F., 2005: Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism. Vet J, 169(1): 124-125.

- Böhnel**, H., & Gessler, F., 2005: Botulinum toxins--cause of botulism and systemic diseases? *Vet Res Commun.*, 29(4): 313-345.
- Böhnel**, H., & Gessler, F., 2010: Botulinumtoxikosen- Infektionsrisiken für Mensch und Tier. *Nutztierpraxis Aktuell*, 33: 14-17.
- Boroff**, DA., Raynaud, M., & Prevot, AR., 1952: Studies of toxin of *Clostridium botulinum* type D. *J Immunol*, 68(5): 503-511.
- Bossi**, P., 2004: Bichat-Leitlinien zur klinischen Behandlung von Botulismus und mit Bioterrorismus zusammenhängendem Botulismus. *Eurosurveillance* 2004.
- Brooks**, CE., Clarke, HJ., Finlay, DA., McConnell, W., Graham, DA., & Ball, HJ., 2010: Culture enrichment assists the diagnosis of cattle botulism by a monoclonal antibody based sandwich ELISA. *Vet Microbiol*, 144(1-2): 226-230.
- Brooks**, CE., Clarke, HJ., Graham, DA., & Ball, HJ., 2011: Diagnosis of botulism types C and D in cattle by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Vet Rec.*, 168(17): 455.
- Brown**, LW., 1979: Commentary: infant botulism and the honey connection. *J Pediatr*, 94(2): 337-338.
- Brown**, LW., 1981: Infant botulism. *Adv Pediatr*, 28: 141-157.
- Brunger**, AT., Jin, R., & Breidenbach, MA., 2008: Highly specific interactions between botulinum neurotoxins and synaptic vesicle proteins. *Cell Mol.Life Sci*, 65(15): 2296-2306.
- Brunt**, J., Webb, MD., & Peck, MW., 2010: Rapid affinity immunochromatography column-based tests for sensitive detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins and *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol*, 76(13): 4143-50
- Burgen**, AS., Dickens, F., & Zatman, LJ., 1949: The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *J Physiol*, 109(1-2): 10-24.
- Cadieux**, B., Blanchfield, B., Smith, JP., & Austin, JW., 2005: A rapid chemiluminescent slot blot immunoassay for the detection and quantification of *Clostridium botulinum* neurotoxin type E, in cultures. *Int J Food Microbiol*. 2005 May 1;101(1):9-16.

Cai, S., Sarkar, HK., & Singh, BR., 1999: Enhancement of the endopeptidase activity of botulinum neurotoxin by its associated proteins and dithiothreitol. *Biochemistry*, 38(21): 6903-10.

Cai, S., Singh, BR., & Sharma, S., 2007: Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit Rev Microbiol*, 33(2): 109-125.

Cartwright, TE., & Lauffer, MA., 1958: Temperature effects on botulinum A toxin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958 Jun;98(2):327-30..

Cato, EP., George, WL., Finegold, SM., 1986: Genus *Clostridium botulinum*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Sneath, PHA., Mair, NS., Sharpe, ME. Et al. (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1141-1200.

CDC-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

CDC-Homepage: <http://www.cdc.gov/>

Chiao, DC., Wey, JJ., & Tang, SS., 2008: Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay for Detection of Botulinum Neurotoxin Type A. *Hybridoma*, 27(1): 43-47.

Chai, Q., Arndt, JW., Dong, M., Tepp, WH., Johnson, EA., Chapman, ER., & Stevens, RC., 2006: Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature*, 444(7122): 1096-1100.

Chen, S., Kim, JJ., & Barbieri, JT., 2007: Mechanism of substrate recognition by botulinum neurotoxin serotype A. *J Biol Chem*, 282(13): 9621-9627.

Chen, Y., Korkeala, H., Aarnikunnas, J., & Lindstrom, M., 2007: Sequencing the botulinum neurotoxin gene and related genes in *Clostridium botulinum* type E strains reveals orfX3 and a novel type E neurotoxin subtype. *J Bacteriol*, 189(23): 8643-8650.

Chen, Y., Korkeala, H., Linden, J., & Lindstrom, M., 2008: Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis reveals stable and prolonged neurotoxin cluster gene activity in a *Clostridium botulinum* type E strain at refrigeration temperature. *Appl Environ Microbiol*, 74(19): 6132-6137.

CIDRAP; www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/botulism/biofacts/botulismfactsheet.htm
I. Botulism: current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis and treatment.2007.

Collins, MD., & East, AK., 1998: Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. J Appl Microbiol, 84(1): 5-17.

Dahlenborg, M., Borch, E., & Radström, P., 2001: Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* Types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. Appl Environ Microbiol. 2001 Oct;67(10):4781-8.

Dahlsten, E., Korkeala, H., Somervuo, P., & Lindstrom, M., 2008: PCR assay for differentiating between Group I (proteolytic) and Group II (nonproteolytic) strains of *Clostridium botulinum*. Int J Food Microbiol, 124(1): 108-111.

Das Gupta, BR., Sugiyama, H., 1972: Role of a protease in natural activation of *Clostridium botulinum* neurotoxin. Infect Immun, 6(4): 587-90.

De Medici, D., Anniballi, F., Wyatt, GM., Lindstrom, M., Messelhausser, U., Aldus, CF., Delibato, E., Korkeala, H., Peck, MW., & Fencia, L., 2009: Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. Appl Environ Microbiol, 75(20):6457-6461.

Dembek, ZF., Smith, LA., & Rusnak, JM., 2007: Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster. Med Public Health Prep., 1(2): 122-134.

Dezfulian, M., Hatheway, CL., Yolken, RH., & Bartlett, JG., 1984: 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, 20(3):379-383.

Dezfulian, M., & Bartlett, JG., 1984: Detection of *Clostridium botulinum* type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunologically tolerant animals. J Clin Microbiol, 19(5): 645-648.

Dezfulian, M., & Bartlett, JG., 1991: Identification of toxigenic *Clostridium botulinum* type E by enzyme immunoassay. Diagn Microbiol Infect Dis, 14(1): 11-15.

Doellgast, GJ., Triscott, MX., Beard, GA., Bottoms, JD., Cheng, T., Roh, BH., Roman, MG., Hall, PA., & Brown, JE., 1993: 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, 31(9): 2402-2409.

Doellgast, GJ., Brown, JE., Koufman, JA., & Hatheway, CL., 1997: Sensitive assay for measurement of antibodies to *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E: use of hapten-labeled-antibody elution to isolate specific complexes. J Clin Microbiol, 35(3): 578-583.

Dong, M., Tepp, WH., Johnson, EA., & Chapman, ER., 2004: Using fluorescent sensors to detect botulinum neurotoxin activity in vitro and in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 12;101(41): 14701-6.

Dorner, MB., Schulz, KM., Kull, S., & Dorner, BG., 2013: Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;364: 219-55..

Dressler, D., Lange, M., & Bigalke, H., 2005: Mouse diaphragm assay for detection of antibodies against botulinum toxin type B. Mov Disord, 20(12):1617-9.

Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L., & Hubalek, M., 2012: Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. Letters in Applied Microbiology, 55(1):40–46.

Duff, JT., Wright, GG., & Yarinsky, A., 1956: Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J Bacteriol, 72(4): 455-60.

Durban, E., & Grecz, N., 1969a: Resistance of spores of *Clostridium botulinum* 33A to combinations of ultraviolet and gamma rays. Appl Microbiol., 18(1): 44-50

Durban, E., Goodnow, R., & Grecz, N., 1969b: Changes in resistance to radiation and heat during sporulation and germination of *Clostridium botulinum* 33A. J Bacteriol. 102(2): 590-2.

Durban, E., Durban, EM., & Grecz, N., 1974: Production of spore spheroplasts of *Clostridium botulinum* and DNA extraction for density gradient centrifugation. *Can.J Microbiol*, 20(3): 353-358.

Dürre, P., 2005: Handbook on Clostridia, CRC Press.

EFSA (European Food Safety Authority) 2004: Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Biologische Gefahren auf Ersuchen der Kommission über *Clostridium spp.* In Lebensmitteln. Frage Nr. EFSA-Q-2004-009.EFSA J. 199, 1-65.

Eklund, MW., & Poysky, FT., 1972: Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. *Appl Microbiol*, 24(19): 108-13.

Eklund, MW., Poysky, FT., Mseitif, LM., Strom, MS., 1988: Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. *Appl Microbiol*, 54(6): 1405-8.

Ekong, TA., Feavers, IM., & Sesardic, D. 1997: Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for *Clostridium botulinum* type A toxin endopeptidase activity in vitro. *Microbiology*, 143 (Pt 10): 3337-3347.

Ellison, JS., & Kautter, JA., 1970: Purification and Some Properties of Two Botocins. *J Bact*, 104:19-26.

Ellison, JS., Mattern, CFT., & Daniel, WA., 1971: Structural Changes in *Clostridium botulinum* Type E After Treatment with Botocin S51. *J Bact.*;108: 526-34.

Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch Institut (RKI): Zu einer Häufung von Wundbotulismus in Nordrhein-Westfalen. *Epid Bull* 2005; 45:420.

Fach, P., Hauser, D., Guillou, JP., & Popoff, MR., 1993: Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food samples. *J Appl Bacteriol.*, 75: 234-239.

Fach, P., Gibert, M., Griffais, R., Guillou, JP., & Popoff, MR., 1995: 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*, 61(1).389-92.

Fach, P., Micheau, P., Mazuet, C., Perelle, S., & Popoff, M., 2009: Development of a real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. J Appl Microbiol, 107(2): 465-73.

Fach, P., Fencia, L., Knutsson, R., Wielinga, P. R., Anniballi, F., Delibato, E., Auricchio, B., Woudstra, C., Agren, J., Segerman, B., De, MD., & van Rotterdam, BJ., 2010: An innovative molecular detection tool for tracking and tracing *Clostridium botulinum* types A, B, E, F and other botulinum neurotoxin producing Clostridia based on the GeneDisc cyclor. Int J Food Microbiol, 1; 145 Suppl 1:S145-51..

Fencia, L., Franciosa, G., Pourshaban, M., & Aureli, P., 1999: Intestinal toxemia botulism in two young people, caused by *Clostridium butyricum* type E. Clin Infect Dis, 29(6): 1381-1387.

Fencia, L., Anniballi, F., De, MD., Delibato, E., & Aureli, P., 2007: SYBRgreen real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. Appl Environ Microbiol, 73(9): 2891-2896.

Foster, JW., & Wynne, ES., 1948: Physiological Studies on Spore Germination, with Special Reference to *Clostridium botulinum*: IV. Inhibition of Germination by Unsaturated C(18) Fatty Acids. J Bacteriol., 55(4): 495-501.

Foster, SJ. & Johnstone, K., 1990: Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. Mol Microbiol. 1990;4:137-41.

Franciosa, G., Ferreira, JL., & Hatheway, CL., 1994: 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, 32(8): 1911-1917.

Franciosa, G., Fencia, L., Caldiani, C., & Aureli, P., 1996: PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. J Clin Microbiol, 34(4): 882-885.

Franciosa, G., Fenicia, L., Pourshaban, M., & Aureli, P., 1997: Recovery of a strain of *Clostridium botulinum* producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. *Appl Environ Microbiol*, 63(3): 1148-1150.

Franciosa, G., Hatheway, CL., & Aureli, P., 1998: The detection of a deletion in the type B neurotoxin gene of *Clostridium botulinum* A (B) strains by a two-step PCR. *Lett Appl Microbiol*, 26(6): 442-446.

Franciosa, G., Pourshaban, M., De, LA., Buccino, A., Dallapiccola, B., & Aureli, P., 2004: Identification of type A, B, E, and F botulinum neurotoxin genes and of botulinum neurotoxic clostridia by denaturing high-performance liquid chromatography. *Appl Environ Microbiol*, 70(7): 4170- 4176.

Franciosa, G., Floridi, F., Maugliani, A., & Aureli, P., 2004: Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl Environ Microbiol*, 70(12): 7192-7199.

Franciosa, G., Maugliani, A., Floridi, F., & Aureli, P., 2006: A novel type A2 neurotoxin gene cluster in *Clostridium botulinum* strain Mascarpone. *FEMS Microbiol Lett*, 261(1): 88-94.

Franz, D., Jahrling, P., Friedlander, A., 1997: Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA*, 278: 399-411.

Fujinaga, Y., Takeshi, K., Inoue, K., Fujita, R., Ohyama, T., Moriishi, K., & Oguma, K., 1995: Type A and B neurotoxin genes in a *Clostridium botulinum* type AB strain. *Biochem Biophys Res Commun.*, 213(3): 737-745.

Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., & Oguma, K., 1997: The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology*, 143 (Pt 12): 3841-3847.

Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, JC., Popoff, MR., Kozaki, S., & Oguma, K., 2000: Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett*, 467(2-3): 179-183.

Fujinaga, Y., Inoue, K., Watarai, S., Sakaguchi, Y., Arimitsu, H., Lee, J.C., Jin, Y., Matsumura, T., Kabumoto, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Nishikawa, A., & Oguma, K., 2004: Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology*, 150(Pt 5): 1529-1538.

Fujinaga, Y., Matsumura, T., Jin, Y., Takegahara, Y., & Sugawara, Y., 2009: A novel function of botulinum toxin-associated proteins: HA proteins disrupt intestinal epithelial barrier to increase toxin absorption. *Toxicon*, 54(5): 583-586.

Fujinaga, Y., 2010: Interaction of botulinum toxin with the epithelial barrier. *J Biomed. Biotechnol*, 2010: 974943.

Ganapathy, R., Padmanabhan, S., Eric, Y.P., Moochhala, S., Lionel, L.K., Ponnampalam, G., 2008: Rapid detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F by optical immunoassay. *Front Biosci*, 13: 5432-40.

Gessler, F., Behrens, S., Loch, P., & Böhnel, H., 1998: [Development of an in vitro assay for the detection of Botulinum Neurotoxins]. *ALTEX.*, 15(5): 62-64.

Gessler, F., Hampe, K., & Böhnel, H., 2005: Sensitive detection of botulinum neurotoxin types C and D with an immunoaffinity chromatographic column test. *Appl Environ Microbiol*, 71(12): 7897-7903.

Gessler, F., Hampe, K., Schmidt, M., & Böhnel, H., 2006: Immunomagnetic beads assay for the detection of botulinum neurotoxin types C and D. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 56(3): 225-232.

Gessler, F., Pagel-Wieder, S., Avondet, M. A., & Böhnel, H., 2007: Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 57(3): 243-249.

Gill, D.M., 1982: Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev.* 46(1): 86-94

Gould, G.W., 2000: Bacterial Endospores. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.168-73.

Grate, JW., Warner, MG., Ozanich, RM., Miller, KD., Colburn, HA., Dockendorff, B., Antolick, KC., Anheier, NC., Lind, MA., Marks, JD., & Bruckner-Lea, CJ., 2009: Renewable surface fluorescence sandwich immunoassay biosensor for rapid sensitive botulinum toxin detection in an automated fluidic format. *Analyst*, 134(5): 987-96.

Gutzwiller, FS., Steffen, R., Mathys, P., Walser, S., Schmid, H., & Mütsch, M., 2008: Botulismus: Prävention, Diagnostik, Therapie und mögliche Bedrohungslagen, *Dtsch. Med Wochenschau*, 133: 840-845

Hall, JD., McCroskey, LM., Pincomb, BJ, & Hatheway, CL., 1985: Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J Clin Microbiol*, 21: 654-655.

Harris, AJ., & Miledi, R., 1971: The effect of type D botulinum toxin on frog neuromuscular junctions. *J Physiol*. 1971 Sep;217(2):497-515.

Hashimoto, T., Frieben, WR., & Conti, SF., 1969: Germination of single bacterial spores. *J Bacteriol*, 98(3): 1011-20.

Hatheway, CL., 1988: Botulism. In: Balows, A., Hausler Jr, WJ., Ohashi, M. and Turano, A., Editors, 1988. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, pp. 111-133.

Hatheway, CL., 1990: Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*, 3(1): 66-98.

Hatheway, CL., 1995: Botulism: the present status of the disease. *Curr.Top.Microbiol Immunol*, 195: 55-75.

Hatheway, CL., & Ferreira, JL., 1996: Detection and identification of *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Adv Exp.Med Biol*, 391: 481-498.

Hatheway, CL., & McCroskey, LM., 1987: Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients. *J Clin Microbiol*, 25(12): 2334-8.

Hanson, MA., & Stevens, RC., 2002: "Structural view of botulinum neurotoxin in numerous functional states" in *Scientific and therapeutic aspects of Botulinum Toxin*, M. Brin, J., Jonkovic, M. Hallett (Eds.); Lippincott, Williams & Wilkins:Philadelphia, pp. 11-27.

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

Hill, KK., Smith, TJ., Helma, CH., Ticknor, LO., Foley, BT., Svensson, RT., Brown, JL., Johnson, EA., Smith, LA., Okinaka, RT., Jackson, PJ., & Marks, JD., 2007: Genetic diversity among *Botulinum Neurotoxin*-producing clostridial strains. *J Bacteriol.*, 189(3): 818-832.

Holdemann, LV., & Brooks, JB., 1970: Variation among strains of *Clostridium botulinum* and related clostridia. In M. Herzberg [ed] *Proc. First U.S. - Japan Conf. on Toxic Microorganisms*. Unnumb. Pub. [InPress] U.S. Dept. of Interior and UJNR Panels on Toxic Microorganisms.

Holdemann, LV., Cato, EP., & Moore, WEC., 1977: *Anaerobic Laboratory Manual* (4th edn.). Blacksburg, USA. 7.

Holzer, E., 1962: Botulismus durch Inhalation. *Med Klin*, 57: 1735-1738.

Hutson, RA., Thompson, DE., Lawson, PA., Schocken-Ilturino, RP., Bottger, EC., & Collins, MD., 1993: Genetic interrelationships of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F and other members of the *Clostridium botulinum* complex as revealed by small subunit rRNA gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64: 273-283.

Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Inoue, K., & Oguma, K., 1996: Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect Immun.*, 64(5): 1589-1594.

Inoue, K., Fujinaga, Y., Yokota, K., & Oguma, K., 1997: [Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxins]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 42(13): 2049-2060.

Jacob, Cl., 2003: Botulinum neurotoxin type B- a rapid wrinkle reducer, *Semin Cutan Med Surg.*, 22(2):131-5.

Johnson, EA., & Bradshaw, M., 2001: *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*, 39(11): 1703-22.

Kahl, S., Kähler, G., Dormann, A., 2006: Interventionelle Endoskopie. Lehrbuch und Atlas. Elsevier, Urban&Fischer, S. 249.

Kalb, SR., Santana, WI., Geren, IN., Garcia-Rodriguez, C., Lou, J., Smith, TJ., Marks, JD., Smith, LA., Pirkle, JL., & Barr, JR., 2011: Extraction and inhibition of enzymatic activity of botulinum neurotoxins /B1, /B2, /B3, /B4, and /B5 by a panel of monoclonal anti-BoNT/B antibodies. BMC Biochem., 15;12:58.

Kalb, SR., Baudys, J., Rees, JC., Smith, TJ., Smith, LA., Helma, CH., Hill, K., Kull, S., Kirchner, S., Dorner, MB., Dorner, BG., Pirkle, JL., & Barr, JR., 2012: De novo subtype and strain identification of botulinum neurotoxin type B through toxin proteomics. Anal Bioanal Chem. 2012 Apr;403(1):215-26.

Kautter, DA., Harmon, SM., Lynt, RK., Jr, Lilly, T., Jr, 1966: Antagonistic effect on *Clostridium botulinum* type E by organisms resembling it. Appl Microbiol, 14(4):616–622.

Kerner, J., 1817: Vergiftung durch verdorbene Würste. Tubinger Blätt Naturwissenschaften Arzneykunde;3:1–25.

Kerner, CAJ, 1820: Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödtlichen Vergiftung durch den Genuss geräucherter Würste. Tübingen: CF Osiander, 1820.

Kerner, J., 1822: Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus ein Beytrag zur Untersuchung des in verdobenen Würsten giftig wirkenden Stoffes. Stuttgart, Tübingen: Cotta, 1822.

Kirchner, S., Kramer, KM., Schulze, M., Pauly, D., Jacob, D., Gessler, F., Nitsche, A., Dorner, BG., & Dorner, MB., 2010: Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. Appl Environ Microbiol, 76(13): 4387-4395.

Kirma, N., Ferreira, JL., & Baumstark, BR., 2004: Characterization of six type A strains of *Clostridium botulinum* that contain type B toxin gene sequences. FEMS Microbiol Lett, 231(2): 159-164.

Köhler, B., 1984: Botulismus, in: Infektionskrankheiten der Haustiere, Hrsg. Beer, Fischer Verlag Jena.

Köhler, B., 2010: Bemerkungen zu aktuellen Problemen des Botulismus bei Tieren und Wechselwirkungen mit der Umwelt. Agrar- und Veterinär- Akademie (AVA) Tagung Chronischer Botulismus, Nutztierpraxis Rind.

Krüger, M., 2010: Chronischer Botulismus in Milchviehbeständen Schleswig-Holsteins. Nutztierpraxis Aktuell, 33/ 2010.

Krüger, M., 2010: Aktuelle Erkrankungen im Milchviehbetrieb. Nutztierpraxis Aktuell, 33/ 2010.

Krüger, M., Große-Herrenthey, A., Schrödl, W., Gerlach, A., & Rodloff, A., 2012: Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany: prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust. Anaerobe. 2012 Apr;18(2):221-3.

Kull, S., Pauly, D., Störmann, B., Kirchner, S., Stämmler, M., Dorner, MB., Lasch, P., Naumann, D., & Dorner, BG., 2010: Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Anal Chem., 1; 82(7):2916-24.

Lacy, DB., Tepp, W., Cohen, AC., DasGupta, BR., & Stevens, RC., 1998: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. Nat Struct Biol, 5(10): 898-902.

Lacy, DB., & Stevens, RC., 1999: Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. J Mol Biol, 3; 291(5): 1091-104.

Lamanna, C., 1959: The most poisonous poison. Science, 130: 763-772.

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch LFGB), Bundesministerium der Justiz Deutschland, 01.09.2005.

Levetzow, R., 1979: *Clostridium botulinum* – Intoxikationen. In: Grossklaus D, editor. Geflügelfleischhygiene. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1979. p.335-6.

Li, L., & Singh, BR., 1999: High-level expression, purification, and characterization of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain. Protein Expr Purif., 17(3):339-44.

Licciardello, JJ., Ribich, CA., Nickerson, JT., & Goldblith, SA., 1967: Kinetics of the thermal inactivation of type E *Clostridium botulinum* toxin. *Appl Microbiol.* 1967 Mar;15(2):344-9.

Licciardello, JJ., Ribich, CA., Nickerson, JT., & Goldblith, SA., 1967: Thermal inactivation of type E botulinum toxin. *Appl Microbiol.* 1967 Mar;15(2):249-56.

Lindström, M., Mokka, M., Skytta, E., Hyytiä-Trees, E., Lahteenmaki, L., Hielm, S., Ahvenainen, R., & Korkeala, H., 2001: Inhibition of growth of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B in sous vide cooked meat products is achieved by using thermal processing but not nisin. *J Food Prot.* 64(6): 838-844.

Lindström, M., Keto, R., Markkula, A., Nevas, M., Hielm, S., & Korkeala, H., 2001: Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol.* 67(12): 5694-5699.

Lindström, M., Nevas, M., Hielm, S., Lahteenmaki, L., Peck, M. W., & Korkeala, H., 2003: Thermal inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products. *Appl Environ Microbiol.* 69(7): 4029-4036.

Lindström, M., Vuorela, M., Hinderink, K., Korkeala, H., Dahlsten, E., Raahenmaa, M., & Kuusi, M., 2006: Botulism associated with vacuum-packed smoked whitefish in Finland, June-July 2006. *Euro.Surveill.* 11(7): E060720.

Lindström, M., Myllykoski, J., Sivela, S., & Korkeala, H., 2010: *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 50(4): 281- 304.

Liu, W., Montana, V., Chapman, E. R., Mohideen, U., & Parpura, V. 2003: Botulinum toxin type B micromechanosensor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 13621-5.

Livesey, CT., Sharpe, RT., & Hogg, RA., 2004: Recent association of cattle botulism with poultry litter. *Vet Rec.* 154(23): 734-735.

Loch, PV., 2000: Kulturell-biochemische und molekularbiologische Untersuchungen sowie Pathogenitätsprüfung von *Clostridium botulinum*: ein Beitrag zur Taxonomie; [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2000.

Lund, BM., 1990: Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet*, 336(8721): 982-6, Review.

Lund, BM., & Peck, MW., 2000: *Clostridium botulinum*. In *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Vol. II, pp. 1057–1109. Edited by B. M. Lund, T. C. Baird-Parker & G. W. Gould. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.

Macdonald, TE, Helma, CH., Ticknor, LO., Jackson, PJ., Okinaka, RT., Smith, LA., & Hill, KK., 2008: Differentiation of *Clostridium botulinum* serotype A strains by Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Appl Environ Microbiol*, 74 (3): 875-82.

Macdonald, TE., Helma, CH., Shou, Y., Valdez, YE., Ticknor, LO., Foley, BT., Davis, SW., Hannett, GE., Kelly-Cirino, CD., Barash, JR., Arnon, SS., Lindstrom, M., Korkeala, H., Smith, LA., Smith, TJ., & Hill, KK., 2011: Analysis of *Clostridium botulinum* serotype E strains by using multilocus sequence typing, amplified fragment length polymorphism, variable-number tandem-repeat analysis, and botulinum neurotoxin gene sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 77(24): 8625-8634.

Madigan, MT., Martinko, JM., & Parker, J., 2001: Kontrolle des mikrobiellen Wachstums. In: Madigan MT, Martinko JM, Parker J, editors. *Mikrobiologie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2001. p.825-62.

McCroskey, L M., Hatheway, CL., Fencia, L., Pasolini, B., & Aureli, P., 1986: Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J Clin Microbiol*, 23(1): 201-202.

Midura, T. F., Snowden, S., Wood, R. M., & Arnon, S. S., 1979: Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey. *J Clin Microbiol*, 9(2): 282-283.

Montecucco, C., & Schiavo, G., 1994: Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol.*, 13(1): 1-8.

Montecucco, C., & Schiavo, G., 1995: Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys*; 28(4): 423-72.

Montecucco, C., & Molgo, J., 2005: Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*, 5, 274-279.

Nakamura, S., Okado, I., Nakashio, S., & Nishida, S., 1977: *Clostridium sporogenes* isolates and their relationship to *C. botulinum* based on desoxyribonucleic acid reassociation. *J Gen Microbiol*, 100: 395-401.

Nevas, M., Hielm, S., Lindstrom, M., Horn, H., Koivulehto, K., & Korkeala, H., 2002: High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*, 72(1- 2): 45-52.

Nevas, M., Lindstrom, M., Hautamaki, K., Puoskari, S., & Korkeala, H., 2005: Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. *Int J Food Microbiol*, 105(2): 145-151.

Nevas, M., Lindstrom, M., Horman, A., Keto-Timonen, R., & Korkeala, H., 2006: Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environ Microbiol*, 8(6): 1085-1094.

Novartis Behring, 2006: Fachinformation Botulismus-Antitoxin Behring Trivalent (equin) Typen A, B und E (Deutschland).

Ohishi, I., & Sakaguchi, G., 1977: Activation of botulinum toxins in the absence of nicking. *Infect Immun*, 17(2): 402-7.

Ohishi, I., Sugii, S., & Sakaguchi, G., 1977: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size. *Infect Immun*, 16(1): 107-9.

Ohishi, I., Hayashi, K., Sakaguchi, G., & Tokuchi, M., 1981: Toxicities of *Clostridium botulinum* type C toxins of different molecular sizes in geese. *Infect Immun*. 1981 Aug;33(2): 623-4.

Ohishi, I., 1983: Lethal and vascular permeability activities of botulinum C2 toxin induced by separate injections of the two toxin components. *Infect Immun*, 40(1): 336-9.

Ohishi, I., 1984a: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type A and B toxins from different strains. *Infect Immun*, 43(2): 487-90.

Ohishi, I., 1984b: Production of C2 toxin by *Clostridium botulinum* types C and D as determined by its vascular permeability activity. *Infect Immun*, 35 (1): 1-4.

Ohishi, I., & Odagiri, Y., 1984c: Histopathological effect of botulinum C2 toxin in mouse intestines. *Infect Immun*, 43 (1): 54-8.

Ohye, DF. & Scott, WJ., 1953. The temperature relations of *Clostridium botulinum* types A and B. *Aust.J Biol Sci*, 6(2): 178-189.

Ohye, DF. & Scott, WJ. Studies in the physiology of *Clostridium botulinum* type E. *Austr J Biol Sci*. 1957;10:85-94.

Oguma, K., Syuto, B., Iida, H., & Kubo, S., 1980: Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. *Infect immun*, 30(3): 656-60.

Oguma, K., Murayama, S., Syuto, B., Iida, H., & Kubo, S., 1984: Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies, *Infect Immun*, 43(2): 584-8.

Oguma, K., Yamaguchi, T., Sudou, K., Yokosawa, N., & Fujikawa, Y., 1986: Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their non-toxigenic derivatives. *Appl Environm Microbiol*, 51: 256-260.

Oguma, K., Fujinaga, Y., & Inoue, K., 1995: Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. *Microbiol Immunol*, 39: 161-68.

Ozanich, RM. Jr., Bruckner-Lea, CJ., Warner, MG., Miller, K., Antolick, KC., Marks, JD., Lou, J., & Grate, JW., 2009: Rapid multiplexed flow cytometric assay for botulinum neurotoxin detection using an automated fluidic microbead-trapping flow cell for enhanced sensitivity. *Anal Chem*. 15;81(14):5783-93.

Parpura, V., & Chapman, ER., 2005: Detection of botulinum toxins: micromechanical and fluorescent-based sensors. *Croat Med J*, 46(4): 379- 91.

Peck, MW., Lund, BM., Fairbairn, DA., Kaspersson, AS., & Undeland, PC., 1995: Effect of heat treatment on survival of, and growth from, spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* at refrigeration temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 61(5): 1780-1785.

Peck, MW., 2009: Biology and genomic Analysis of *Clostridium botulinum*. Institute of Food Research, *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 55, 183-265.

- Peck**, MW., Plowman, J., Aldus, CF., Wyatt, GM., Izurieta, WP., Stringer, SC., & Barker, GC., 2010: Development and application of a new method for specific and sensitive enumeration of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* types B, E, and F in foods and food materials. *Appl Environ Microbiol*, 76(19): 6607-6614.
- Pellett**, S., Tepp, WH., Stephen, IT., & Johnson, EA., 2010: Comparison of the primary rat spinal cord cell (RSC) assay and the mouse bioassay for botulinum neurotoxin type A potency determination. *J of Pharmacol and Toxicol Methods*, 61: 304-310.
- Perkins**, WE., & Tsuji, K., 1962: Sporulation of *Clostridium botulinum*. II. Effect of arginine and its degradation products on sporulation in a synthetic medium. *J Bacteriol.*, 84: 86-94.
- Perkins**, WE., 1965: Production of Clostridial Spores. *J Appl Bact.*, 28: 1-6.
- Pierson**, MD., & Reddy, NR., 1988: *Clostridium botulinum*. *Food Technol*, 42(4): 196.
- Poras**, H., Ouimet, T., Orng, SV., Fournie-Zaluski, MC., Popoff, MR., & Roques, BP., 2009: Detection and quantification of botulinum neurotoxin type A by a novel rapid in vitro fluorimetric assay. *Appl Environ Microbiol.*, 75(13): 4382-90.
- Popoff**, MR., 2003: Detection of toxigenic clostridia. *Methods Mol.Biol*, 216: 137-152.
- Popoff**, MR., 1995: Ecology of neurotoxicogenic strains of clostridia. *Curr.Top.Microbiol Immunol*, 195: 1-29.
- Popoff**, MR., & Bouvet, P., 2009: Clostridial toxins. *Future Microbiol*, 4(8):1021-1064.
- Prändel**, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., & Sinell, HJ., 1988: *Handbuch der Lebensmitteltechnologie*, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Prevot**, V., Tweepenninckx, F., Van, NE., Linden, A., Content, J., & Kimpe, A., 2007: Optimization of polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* type C and D in bovine samples. *Zoonoses.Public Health*, 54(8): 320-327.
- Raphael**, BH., Joseph, LA., McCroskey, LM., Luquez, C., & Maslanka, SE., 2010: Detection and differentiation of *Clostridium botulinum* type A strains using a focused DNA microarray. *Mol.Cell Probes*, 24(3): 146-153.

- Rasooly**, R., & Do, P.M., 2010: *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type B Is Heat-Stable in Milk and Not Inactivated by Pasteurization. J Agric Food Chem., 58 (23), pp 12557–12561.
- Reeves**, P., 1965: The bacteriocins. Bacteriol. Rev.;29: 24-45.
- Rings**, D.M., 2004: Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. Vet Clin North Am Food Anim Pract., 20(2): 379-viii.
- Roberts**, T.A., 1965: Sporulation of *Clostridium botulinum* Type E in Different Culture Media. J Appl. Bact., 28: 142-6.
- Roberts**, T.A. & Smart, J.L., 1974: Inhibition of spores of *Clostridium spp.* by sodium nitrite. J Appl Bacteriol., 37(2): 261-264.
- Rodloff**, A.C., & Krüger, M., 2012: Chronic *Clostridium botulinum* infections in farmers: Anaerobe.,18(2): 226-8.
- Russell**, A.D., 1990: Bacterial spores and chemical sporicidal agents. Clin Microbiol., 3(2): 99-119.
- Russmann**, H.,2003: Toxine - Biogene Gifte und potenzielle Kampfstoffe. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 46 (11)
- Sakaguchi**, G., & Sakaguchi, S., 1974: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type E toxina of different forms. Jpn J Med Sci Biol, 27: 241-244.
- Sakaguchi**, G.,1983: *Clostridium botulinum* toxins. Pharmacol Ther, 19: 165-194.
- Schiavo**, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino deLaureto, P., DasGupta, B.R., & Montecucco, C., 1992: Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature, 359, 832-835.
- Schiavo**, G., Rossetto, O., Catsicas, S., Polverino deLaureto, P., DasGupta, B.R., Benfenati, F., & Montecucco, C., 1993: Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. J Biol Chem, 268, 23784-23787.
- Schiavo**, G., Shone, C.C., Bennet, M.K., Scheller, R.H., & Montecucco, C., 1995: Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys_Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxin. J Biol Chem, 270, 10566-10570.

Schiavo, G., Matteoli, M., Montecucco, C., 2000: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*, 80(2): 717-66

Scotcher, MC., Cheng, LW., & Stanker, LH., 2010: Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD(50) levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. *PLoS One*. 2010 Jun 10;5(6): e11047.

Seidel, G., 1992: *Clostridium botulinum*. In: Seidel G, Kiesevalter J, editors. Bakterielle Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen. 3rd ed. Berlin: Akademie-Verlag; 1992. p.336-62.

Segner, WP., Schmidt, CF., & Boltz, JK., 1966: Effect of sodium chloride and pH on the outgrowth of spores of type E *Clostridium botulinum* at optimal and suboptimal temperatures. *Appl Microbiol*, 14(1): 49-54.

Segner, WP., Schmidt, CF., & Boltz, JK., 1971a: Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C. *Appl Microbiol*, 22(6): 1017-1024.

Segner, WP., Schmidt, CF., & Boltz, JK., 1971b: Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. *Appl Microbiol*, 22(6): 1025-1029.

Shapiro, RI., Hatheway, C., Becher, J., & Swerdlow, DI., 1997: Botulism surveillance and emergency response. a public health strategy for a global challenge. *JAMA*, 278: 433-435.

Shapiro, RI., Hatheway, C., Becher, J., & Swerdlow, DI., 1998: Botulism in the United States: A Clinical and Epidemiologic Review. *Ann Intern Med*, 129: 221-228

Sharma, SK. & Singh, BR., 2004: Enhancement of the endopeptidase activity of purified botulinum neurotoxins A and E by an isolated component of the native neurotoxin associated proteins. *Biochemistry*, 43(16): 4791-4798.

Sharma, SK., Eblen, BS., Bull, RL., Burr, DH., & Whiting, RC., 2005: Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. *Appl Environ Microbiol*, 71(7): 3935-3941.

- Sharma**, SK., & Whiting, RC. 2005. Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods, J Food Prot, 68(6): 1256-63.
- Sharma**, SK., Ferreira, JL., Eblen, BS., & Whiting, RC., 2006: 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, 72(2): 1231-1238.
- Shin**, NR., Shin, JH., Chun, JH., Yoon, SY., Kim, BS., Oh, HB., & Rhie, GE., 2006: Determination of neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type A by quantitative RT-PCR. Mol.Cells, 22(3): 336-342.
- Shin**, NR., Yoon, SY., Shin, JH., Kim, YJ., Rhie, GE., Kim, BS., Seong, WK., & Oh, HB., 2007: Development of enrichment semi-nested PCR for *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F and its application to Korean environmental samples. Mol.Cells, 24(3): 329-337.
- Simpson**, LL., 1981: The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. Pharmacol rev, 33(3): 155-88.
- Simpson**, LL., 1982: A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C1 and C2 toxins. J Pharmacol Ther, 223(3): 695-701.
- Simpson**, LL., 1986: Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 26: 427-453.
- Simpson**, LL., Maksymowych, AB., & Hao, S., 2001: The role of zinc binding in the biological activity of botulinum toxin. J Biol Chem, 276 (29): 27034-41.
- Simpson**, LL., 2004a: Identification of the major steps in botulinum toxin action. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 44: 167-193.
- Simpson**, LL., Maksymowych, AB., Park, JB., & Bora, RS., 2004b: The role of the interchain disulfide bond in governing the pharmacological actions of botulinum toxins. J Pharmacol Exp Ther, 308(3): 857-64.
- Singh**, BR., 2000: Intimate details of the most poisonous poison. Nature Struct Biol, 7: 617-619.

Singh, BR., 2006: Botulinum neurotoxin structure, engineering, and novel cellular trafficking and targeting; *Neurotox Res.* 9(2-3): 73-92. Review.

Smart, JL., Jones, TO., Clegg, FG., & McMurtry, MJ., 1987: Poultry waste associated type C botulism in cattle. *Epidemiol Infect.* 98(1): 73-79.

Smith, DS., Hobbs, G., 1974: Genus III *Clostridium* Prazmowski 1880, 23. In R. E. Buchanan, N. E. gibbons (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition. William & Wilkins, Baltimore. pp. 551–572.

Smith, LDS., & Sugiyama, H., 1988: *Botulism: the organism, its toxins, the disease.* Charles C. Thomas, Springfield, Ill.

Smith, TJ., Lou, J., Geren, IN., Forsyth, CM., Tsai, R., LaPorte, SL., Tepp, WH., Bradshaw, M., Johnson, EA., Smith, LA., & Marks, JD., 2005: Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun.* 73(9): 5450-5457.

Smith, TJ., Hill, KK., Foley, BT., Detter, JC., Munk, AC., Bruce, DC., Doggett, NA., Smith, LA., Marks, JD., Xie, G., & Brettin, TS., 2007: Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids. *PLoS.One*, 2(12): e1271.

Smith, LD., & Holdeman, LDV., 1968: *The Pathogenic Anaerobic Bacteria.* Charles C. Thomas, Publ., Springfield, Ill., 423 p.

Sobel, J., 2005: Botulism. *Clin Infect Dis*, 41: 1167-1173.

Sonnenschein, B., 1980: *Clostridium botulinum.* In: Blobel H, Schließer T, editors. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.* Vol 2. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; p.691-745.

Sotos, JG., 2001: Botulinum Toxin in Biowarfare. *JAMA*, 285: 2716-2716.

Sojka, B., 1996: Die Auswirkungen hohen hydrostatischen Druckes auf die Inaktivierung und auf Stoffwechselforgänge während der Auskeimung von Bakteriensporen. *Dissertation rer. Nat., Heidelberg: Universität Heidelberg.*

Strasidine, GA., 1967: Rapid Germination of *Clostridium botulinum* Type E Spores. J Fish Res Bd Can. 1967;24:595-606.

Stringer, SC., & **Peck**, MW., 2008 (unpublished data) Foodborne clostridia and the safety of in-pack preserved foods. In: In-Pack Processes Foods: Improving Quality. 251-276, Woodhead, Cambridge

Sugiyama, H., 1980: *Clostridium botulinum* neurotoxin. Microbiol Rev, 44(3): 419-448.

Szabo, EA., **Pemberton**, JM., & **Desmarchelier**, PM., 1992: Specific detection of *Clostridium botulinum* type B by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, 58(1): 418-420.

Szabo, EA., **Pemberton**, JM., & **Desmarchelier**, PM., 1993: Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, 59(9): 3011-3020.

Szabo, EA., **Pemberton**, JM., **Gibson**, AM., **Eyles**, MJ., & **Desmarchelier**, PM., 1994: Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B and E in food, soil and infant faeces. J Appl Bacteriol., 76(6): 539-545.

Takeshi, K., **Fujinaga**, Y., **Inoue**, K., **Nakajima**, H., **Oguma**, K., **Ueno**, T., **Sunagawa**, H., & **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.

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

Tsuji, K. & **Perkins**, WE., 1962: Sporulation of *Clostridium botulinum*. I. Selection of an aparticulate sporulation medium. J Bacteriol., 84: 81-85.

Turton, K., **Chaddock**, JA., & **Acharya**, KR., 2002: Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends Biochem Sci, 27(11): 552-8.

Van Ermengen, E., 1897: Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. Z. Hyg. Infektionskr. 26: 1-56.

Volland, H., **Lamourette**, P., **Nevers**, MC., **Mazuet**, C., **Ezan**, E., **Neuburger**, LM., **Popoff**, M., & **Creminon**, C., 2008: A sensitive sandwich enzyme immunoassay for free or

complexed *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. J Immunol Methods, 330(1-2): 120-129.

Wang, HH., Riding, S., & Singh, BR., 2010: Endopeptidase activities of botulinum neurotoxin type B complex, holotoxin, and light chain, Appl Environ Microbiol, 76(19): 6658-63.

Wein, LM. & Liu, Y, 2005: Analyzing a bioterror attack on the food supply: the case of botulinum toxin in milk. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 9984-9989.

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

Woodburn, M., Schantz, EJ. and Rodriguez, J., 1979: Thermal Inactivation of Botulinum Toxins in Canned Salmon. Home Economics Research Journal, 7(3): 171-178.

Woodburn, MJ., Somers, E., Rodriguez, J., & Schantz, EJ., 1979: Heat inactivation rates of botulinum toxins A, B, E and F in some foods and buffers. J of Food Science, 44(6):1658–1661. E Pub 2006.

Yang, WW., Crow-Willard, EN., & Ponce, A. 2009: Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. J Appl Microbiol, 106(1): 27-33.

Zilinskas, RA., 1997: Iraq's biological weapons. The past as future? JAMA, 278: 418-424.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.

10 Versicherung

Erklärung

gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007 des Fachbereichs
Biologie, Chemie, Pharmazie.

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**"Entwicklung und Etablierung verschiedener Nachweisverfahren für
Clostridium botulinum und aktiver Toxinnachweis mit ELISA-Verfahren in
unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes sowie Untersuchungen zur
Stabilität der Toxine"**

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Datum

Unterschrift

11 Anhang

Tabelle 20: Ergebnisse der ELISA-Ansätze bei unterschiedlichen Hitzebehandlungen der verschiedenen *Clostridium botulinum* Stämme im Lebensmittel Milch

Stamm	Milch			
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
1750	1,00	0,40	0,20	0,10
	0,90	0,40	0,10	0,20
	1,20	0,50	0,20	0,10
	1,00	0,40	0,20	0,20
Mittelwert	1,03	0,43	0,18	0,15
Standardabw	0,13	0,05	0,05	0,05
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
7272	0,70	0,40	0,10	0,20
	0,90	0,30	0,20	0,10
	0,90	0,40	0,10	0,10
	1,00	0,50	0,20	0,10
Mittelwert	0,88	0,40	0,15	0,13
Standardabw	0,11	0,07	0,05	0,04
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
7273	0,90	0,20	0,30	0,10
	1,00	0,20	0,20	0,20
	1,00	0,20	0,20	0,20
	0,90	0,30	0,20	0,10
Mittelwert	0,95	0,23	0,23	0,15
Standardabw	0,05	0,04	0,04	0,05
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
1944	1,00	0,30	0,30	0,10
	0,90	0,30	0,30	0,20
	1,00	0,40	0,20	0,10
	0,90	0,30	0,30	0,10
Mittelwert	0,95	0,33	0,28	0,13
Standardabw	0,06	0,05	0,05	0,04
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
1718	1,50	0,60	0,40	0,20
	1,50	0,50	0,30	0,20
	1,60	0,50	0,40	0,10
	1,60	0,60	0,30	0,10
Mittelwert	1,55	0,55	0,35	0,15
Standardabw	0,06	0,06	0,06	0,05
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
1692	0,90	0,60	0,50	0,20
	1,30	0,70	0,50	0,10

11 Anhang

	1,20	0,70	0,40	0,20
	1,00	0,60	0,50	0,20
Mittelwert	1,10	0,65	0,48	0,18
Standardabw	0,16	0,05	0,04	0,05
	u.b.	62° 30 min	72° 20 sec	85° 10 min
1956	0,80	0,40	0,30	0,10
	0,90	0,40	0,30	0,20
	0,80	0,50	0,20	0,10
	0,80	0,40	0,30	0,10
Mittelwert	0,83	0,43	0,28	0,13
Standardabw	0,05	0,05	0,05	0,04
Negativ	0,1			
	0,2			
	0,1			
	0,2			
	0,1			
Mittelwert	0,15			
Standardabw	0,06			

Tabelle 21: Ergebnisse der ELISA-Ansätze bei unterschiedlichen Hitzebehandlungen der verschiedenen *Clostridium botulinum* Stämme im Lebensmittel Corned Beef

Stamm	Corned beef			
	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
1750	1,00	0,30	0,20	0,20
	0,90	0,40	0,30	0,10
	0,90	0,30	0,20	0,10
	0,90	0,30	0,20	0,20
Mittelwert	0,93	0,33	0,23	0,15
Standardabw	0,05	0,05	0,05	0,05
7272	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
	1,00	0,50	0,40	0,20
	0,90	0,60	0,50	0,20
	0,90	0,50	0,50	0,10
	1,00	0,60	0,40	0,10
Mittelwert	0,95	0,55	0,45	0,15
Standardabw	0,05	0,05	0,05	0,05
7273	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
	1,40	0,40	0,30	0,10
	1,30	0,30	0,20	0,10
	1,30	0,40	0,30	0,10
	1,40	0,50	0,20	0,20
Mittelwert	1,35	0,40	0,25	0,13
Standardabw	0,05	0,07	0,05	0,04
	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
1944	1,10	0,40	0,30	0,10
	1,20	0,40	0,30	0,10
	1,20	0,50	0,20	0,20

11 Anhang

	1,10	0,40	0,30	0,10
Mittelwert	1,15	0,43	0,28	0,13
Standardabw	0,06	0,05	0,05	0,04
	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
1718	1,20	0,60	0,20	0,20
	1,30	0,60	0,20	0,20
	1,20	0,50	0,20	0,10
	1,30	0,50	0,30	0,20
Mittelwert	1,25	0,55	0,23	0,18
Standardabw	0,06	0,06	0,05	0,04
	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
1692	1,20	0,40	0,30	0,10
	1,20	0,30	0,20	0,20
	1,00	0,40	0,30	0,10
	1,20	0,50	0,20	0,10
Mittelwert	1,15	0,40	0,25	0,13
Standardabw	0,09	0,07	0,05	0,04
	u.b.	62° 30 min	72° 2 min	85° 10 min
1956	1,20	0,40	0,30	0,20
	1,30	0,40	0,30	0,20
	1,20	0,50	0,20	0,20
	1,30	0,40	0,30	0,10
Mittelwert	1,25	0,43	0,28	0,18
Standardabw	0,06	0,05	0,05	0,04
Negativ	0,10			
	0,20			
	0,10			
	0,10			
Mittelwert	0,13			
Standardabw	0,05			

Tabelle 22: Ergebnisse der ELISA-Ansätze bei der Produktion von Toxinen durch Clostridium botulinum Bakterien in Corned Beef und Bohnen

Toxinproduktion	Corned Beef	Bohnen
1750	0,80	1,30
	0,70	1,30
	0,90	1,10
	1,00	1,30
Mittelwert	0,85	1,25
Standardabw	0,13	0,10
7272	0,40	0,80
	0,40	0,80
	0,50	0,90
	0,40	0,80
Mittelwert	0,43	0,83
Standardabw	0,05	0,05
7273	1,20	1,10
	1,40	1,30

11 Anhang

	1,40	1,30
	1,30	1,20
Mittelwert	1,33	1,23
Standardabw	0,10	0,10
1944	1,10	0,60
	1,20	0,80
	1,30	0,70
	1,30	0,70
Mittelwert	1,23	0,70
Standardabw	0,10	0,08
1718	1,20	1,40
	1,10	1,30
	1,20	1,30
	1,10	1,40
Mittelwert	1,15	1,35
Standardabw	0,06	0,06
1692	0,80	1,00
	0,90	0,90
	0,80	0,90
	1,00	0,90
Mittelwert	0,88	0,93
Standardabw	0,10	0,05
1956	1,40	0,80
	1,30	0,90
	1,40	0,70
	1,30	0,80
Mittelwert	1,35	0,80
Standardabw	0,06	0,08
Negativ	0,20	0,30
	0,20	0,20
	0,10	0,30
	0,20	0,30
Mittelwert	0,18	0,28
Standardabw	0,05	0,05