

**Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
und  
dem Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen  
der Georg-August-Universität Göttingen**

---

**Untersuchungen zu den Einflussfaktoren  
einer effizienten Bekämpfungsstrategie  
für Rinderbotulismus  
in Brasilien**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Anke Große-Herrenthey  
aus Dhaka/Bangladesh

Leipzig, 2004

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel  
Betreuer: Prof. Dr. sc. Monika Krüger  
Prof. Dr. Dr. Helge Böhnel

Gutachter: Prof. Dr. sc. Monika Krüger,  
Prof. Dr. Dr. Helge Böhnel,  
PD Dr. habil. Manfred Füll,  
Dr. Herbert Nattermann,

Institut für Bakteriologie und Mykologie  
Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig  
Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion  
in den Tropen und Subtropen,  
Georg August Universität, Göttingen  
Medizinische Tierklinik,  
Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig  
Robert Koch Institut, Berlin



*Das Copyright liegt beim Autor/ bei den Autoren. Der Leser ist berechtigt, persönliche Kopien für wissenschaftliche oder nichtkommerzielle Zwecke zu erstellen. Jede weitergehende Nutzung bedarf der ausdrücklichen vorherigen schriftlichen Genehmigung des Autors/ der Autoren.*

Inhaltsverzeichnis	Seite	
Verzeichnis der Abkürzungen		
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	2
2.1	<i>Clostridium botulinum</i>	2
2.1.1	Taxonomie	2
2.1.2	Morphologie und Stoffwechsellleistungen	4
2.1.2.1	Allgemein	4
2.1.2.2	Stämme der Gruppe I	4
2.1.2.3	Stämme der Gruppe II	5
2.1.2.4	Stämme der Gruppe III	5
2.1.2.5	Stämme der Gruppe IV	6
2.1.2.6	Atypische botulismus-auslösende Stämme	6
2.1.3	Toxine	6
2.1.3.1	Neurotoxintypen	6
2.1.3.2	Andere von <i>C. botulinum</i> gebildete Toxine	8
2.1.3.3	Wirkungsweise der BoNt-Typen	8
2.1.3.4	Genetische Grundlagen der Toxizität	10
2.1.3.5	Lage und Funktion der Progenitortoxine	11
2.2	Botulismus	12
2.2.1	Vorkommen	12
2.2.2	Pathogenese und klinisches Bild	13
2.2.2.1	Intoxikation	13
2.2.2.1.1	Wiederkäuer	14
2.2.2.1.1.1	Pathogenese in Europa	14
2.2.2.1.1.2	Pathogenese in den Tropen	15
2.2.2.1.1.3	Botulismus in Brasilien	15
2.2.2.1.2	Monogastrische Haussäugetiere	16
2.2.2.1.3	Vögel	16
2.2.2.1.4	Mensch	17
2.2.2.2	Infektion (Wundbotulismus, Shaker Foal Syndrome)	17
2.2.2.3	Toxikation	17
2.2.2.3.1	Säuglingsbotulismus	17
2.2.2.3.2	Toxikation bei Vögeln	18
2.2.2.3.3	Viszeraler Botulismus beim Rind	18
2.2.2.3.4	Equine Grass Sickness	19
2.2.3	Therapie	19
2.2.4	Prophylaxe	20
2.3	Nachweismethoden	20

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.1	Toxinnachweis	21
2.3.1.1	<i>In vivo</i>	21
2.3.1.2	<i>Ex vivo</i>	22
2.3.1.3	<i>In vitro</i>	22
2.3.2	Bakterielle Formen	23
2.3.2.1	Isolation und biochemische Differenzierung	23
2.3.2.1.1	ELISA	24
2.3.2.1.2	Gaschromatographie	24
2.3.2.1.3	PCR	25
2.3.3	Antikörper gegen <i>Clostridium-botulinum</i> -Neurotoxin	26
2.3.3.1	<i>In-vivo</i> -Nachweise	26
2.3.3.2	<i>In-vitro</i> -Nachweise	27
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b>	<b>31</b>
3.1	Allgemeine Informationen zum Standort	31
3.1.1	Topographie, Klima und Vegetation Brasiliens	31
3.1.2	Gebiet der Befragungen	31
3.1.2.1	Topographie und Klima	31
3.1.2.2	Vegetation	32
3.1.2.3	Haltungsformen	33
3.1.2.4	Rinderrassen	34
3.1.2.5	Krankheiten	34
3.2	Felduntersuchungen	35
3.2.1	Material und Methoden	35
3.2.2	Ergebnisse	35
3.2.2.1	Tierhalterbefragung	35
3.2.2.2	Botulismussituation der einzelnen Betriebe	37
3.2.3	Diskussion	40
3.2.3.1	Tierhalterbefragung	40
3.2.3.2	Botulismussituation der einzelnen Betriebe	40
3.3	Bakteriologische Untersuchungen	43
3.3.1	Material und Methoden	43
3.3.1.1	Herkunft der Referenzstämmen	43
3.3.1.2	Generation der anaeroben Atmosphäre	43
3.3.1.3	Herstellung des Bakterienpools von Referenzstämmen	43
3.3.1.4	Herstellung der Sporensuspension von Referenzstämmen	44
3.3.1.5	Sporenzählung	44
3.3.1.6	Herkunft der Antitoxine	44
3.3.1.7	Herkunft der Proben	45

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.1.8	Probennahme	45
3.3.1.8.1	Probenbearbeitung	46
3.3.1.8.2	Überprüfung der Toxizität	46
3.3.1.8.3	Identifikation des gebildeten Toxins	46
3.3.1.9	Erregerisolation	47
3.3.1.9.1	Medienversuche zur Erregerisolation	47
3.3.1.9.2	Prüfung der Proben auf wachstumshemmende Substanzen	50
3.3.1.9.3	Prüfung der Proben auf wachstumshemmende Mikroorganismen	50
3.3.1.10	Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Sporenzahl	50
3.3.1.11	Identifikation der Isolate	50
3.3.1.11.1	Überprüfung der Toxizität	51
3.3.1.11.2	Gaschromatographie	51
3.3.1.11.2.1	Vorbereitung der Kulturen	51
3.3.1.11.2.2	Extraktion der Fettsäuren	51
3.3.1.11.2.3	Gaschromatographische Analyse	52
3.3.1.11.3	PCR	53
3.3.1.12	Versuche zur Toxinbildung	54
3.3.1.12.1	Einfluss der eingesetzten Festmedien EA und BA auf die Toxinbildung	54
3.3.1.12.2	Zusatz von Eisen und Chelatbildner NTTS zum Basismedium RCM	55
3.3.2	Ergebnisse	56
3.3.2.1	Überprüfung der Toxizität und Identifikation des gebildeten Toxins	56
3.3.2.2	Medienversuche zur Erregerisolation	57
3.3.2.3	Prüfung der Proben auf wachstumshemmende Substanzen oder Mikroorganismen	61
3.3.2.4	Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Sporenzahl	61
3.3.2.5	Gaschromatographie	63
3.3.2.6	PCR zur Identifikation von <i>C. botulinum</i>	64
3.3.2.7	Versuche zur Toxinbildung	67
3.3.2.7.1	Einfluss der eingesetzten Festmedien EA und BA auf die Toxinbildung	67
3.3.2.7.2	Zusatz von Eisen und Chelatbildner NTTS zum Basismedium RCM	68
3.3.3	Diskussion	69
3.3.3.1	Identifikation des gebildeten Toxins	69
3.3.3.2	Erregerisolation	70
3.3.3.3	Andere verwendete Isolationsmethoden	71
3.3.3.4	Gaschromatographie	72

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.3.5	PCR	72
3.3.3.6	Einfluss der eingesetzten Festmedien EA und BA auf die Toxinbildung	73
3.3.3.7	Zusatz von Eisen und Chelatbildner NTTS zum Basismedium RCM	73
3.4	Impfstoffkontrolle	75
3.4.1	Material und Methoden	75
3.4.1.1	Impfung der Rinder	75
3.4.1.2	Antikörperkontrolle mittels Elisa	76
3.4.1.2.1	Vorversuch	77
3.4.1.2.2	Hauptversuch	77
3.4.1.2.3	Bestimmung des Cut-Off-Wertes	77
3.4.1.3	Antikörperkontrolle mittels Immunoblot	78
3.4.2	Ergebnisse	79
3.4.2.1	Antikörperkontrolle mittels Elisa	79
3.4.2.1.1	Ermittlung der optimalen Vorverdünnung der Seren	79
3.4.2.1.2	Serologische Untersuchung der Rinderseren	80
3.4.2.1.3	Cut-Off-Werte	87
3.4.2.2	Antikörperkontrolle mittels Immunoblot	89
3.4.3	Diskussion	91
<b>4</b>	<b>Zusammenführende Diskussion</b>	<b>94</b>
4.1	Schlussbetrachtung	94
4.2	Schlussfolgerung	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>I-XXI</b>



### Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung(en)
AG	Antigen
AK	Antikörper
BA	Blutagar
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
C.	Clostridium
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMM	Cooked Meat Medium
CMG	Cooked Meat Glucose Medium
DAB	Deutsches Arzneibuch
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol-Agar
EA	Eigelb-Agar
EAB	Europäisches Arzneibuch
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAA	Fastidious Anaerobic Agar
FAAB	Fastidious Anaerobic Agar mit defibrinierten Pferdeblut
FAAE	Fastidious Anaerobic Agar mit Eigelbsuspension
FAME	Fettsäuremethylester
FEM	Fortified Egg Meat Medium
GPP	Gelatine-Phosphat-Puffer
i.p.	intraperitoneal
ipM	intraperitoneale Applikation in die Maus
i.m.	intramuskulär
kDa	Kilodalton
LD <sub>50</sub>	tödliche Dosis für 50% der Versuchstiere
NTTS	Nitilotriaceticacidtrisodiumsalt
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCM/ RCM	Reinforced Clostridial Medium/ Reinforced Clostridial Agar
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TA	Tierarzt
Tk	Tierkörper
TPGY	Trypticase Yeast Glucose Agar
VAMP	Vesikel assoziiertes Membranprotein (Synaptobrevin)

## 1. Einleitung

Botulismus ist eine weltweit vorkommende Erkrankung, für die nahezu alle Säugetiere, Vögel und Fische empfänglich sind. Sie wird hervorgerufen durch die neuroparalytischen Eigenschaften unterschiedlicher von *Clostridium botulinum* gebildeter Neurotoxine (BoNT), welche als die stärksten biologischen Gifte gelten.

In tropischen Ländern wird Botulismus als eine sehr ernst zunehmende Bedrohung in der Rinderzucht angesehen, die durch hohe Verluste bei überwiegend adulten Rindern gekennzeichnet sein kann. Als sporadischer Botulismus tritt die Intoxikation durch Verfütterung mit BoNT kontaminierter Futtermittel, wie z.B. Silage oder Hühnermist, auf. Endemischen Charakter hat Botulismus dagegen in der extensiven Weidewirtschaft, wo Rinder durch Osteophagie versuchen, Phosphormangel auszugleichen. Beide Formen sind in Brasilien, wie auch in anderen tropischen Ländern, weit verbreitet (Döbereiner et al., 1992; Kriek und Odendaal, 1994; Bennetts and Hall, 1938).

Der in Brasilien als „doença da mão dura“ (Krankheit der steifen Vorderbeine) oder auch als „doença da vaca caída“ (Krankheit der gefallenen/ festliegenden Kuh) bekannte bovine Botulismus wurde 1970 im Staat Piauí durch Tokarnia das erste Mal beschrieben. Seitdem konnte die Intoxikation bei Rindern auch in vielen anderen brasilianischen Staaten nachgewiesen werden (Döbereiner et al., 1992). Neben Tollwut und Pflanzenvergiftungen gilt Botulismus in Brasilien als eine der drei am weitesten verbreiteten tödlichen Krankheiten adulter Rinder (Döbereiner et al., 1992). Die jährlichen Gesamtverluste werden auf etwa 1% des vorhandenen Rinderbestandes geschätzt (Dutra, 2000). In anderen tropischen Ländern, die extensive Rinderzucht betreiben, wie z.B. Australien oder Südafrika, kann boviner Botulismus durch Vakzination gut kontrolliert werden (Jansen et al., 1976; Tammemagi und Grant, 1967; Kriek und Odendaal, 1994).

Die Gründe für die weiterhin hohen Verluste durch Botulismus bei Rindern in Brasilien trotz vorhandener Impfstoffe sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu wurden drei auf dem lokalen Markt erhältliche Impfstoffe auf ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung untersucht, Proben zur Ermittlung des vorherrschenden C.-botulinum-Typs gesammelt und verschiedene Betriebstypen, bei denen Botulismus vorgekommen war, besucht, um die jeweiligen Schwachpunkte im Betriebsmanagement kennen zu lernen.

Die Untersuchungen in Brasilien wurden an der Universidade Estadual Paulista, Campus Araçatuba, mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. I. S. Dutra durchgeführt. Der Aufenthalt in Brasilien von 10/1999 bis 3/2001 wurde durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes finanziell unterstützt.

Um eine bessere Übersichtlichkeit der in drei Untersuchungsbereiche gegliederten Arbeit zu gewährleisten, werden die Unterpunkte Material und Methoden, Ergebnisse und Diskussion für jeden Teilabschnitt gesondert aufgeführt und zum Abschluss zusammenführend diskutiert.

### 2. Literaturübersicht

#### 2.1. *Clostridium botulinum*

##### 2.1.1. Taxonomie

Im „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ werden Bakterien taxonomisch aufgrund von Veröffentlichungen zu Morphologie, Biochemie und Molekularbiologie klassifiziert. Neuere Erkenntnisse führen häufig zu Umbenennungen der Spezies oder der Gattung oder sogar zur Schaffung neuer Bakteriengattungen. So ist es nicht verwunderlich, dass auch die heute als *C. botulinum* bekannte Spezies im Zuge neuer Forschungsergebnisse Änderungen erfahren hat. Botulismus wurde um 1822 von KERNER als eine Lebensmittelvergiftung beschrieben, die durch den Konsum von Wurst (lat.: botulus = die Wurst), in der sich toxische Stoffe gebildet haben, entsteht. Die erste Isolierung eines *C.-botulinum*-Stammes und damit der Nachweis der bakteriellen Ätiologie erfolgte fast ein Jahrhundert später 1895 durch VAN ERMENGEM. In seinen Untersuchungen über einen Botulismusausbruch in Ellezelles, Belgien, fand er ein sporenbildendes, anaerob wachsendes Bakterium, das er *Bacillus botulinus* nannte. 1904 fand LANDMANN dieses Bakterium in eingekochten grünen Bohnen und widerlegte das zunächst angenommene ausschließliche Vorkommen in Fleisch. LEUCHS (1910) konnte zeigen, dass die von VAN ERMENGEM und LANDMANN isolierten Stämme unterschiedliche Wachstumseigenschaften aufwiesen und nicht durch ein und dasselbe Antiserum neutralisiert werden konnten. Aufgrund unterschiedlicher Toxinbildung ordnete BURKE (1919) den bis dahin beschriebenen Stämmen die Buchstaben A und B zu. Zeitgleich 1922 wurden von BENGTON in den USA und von SEDDON in Australien zwei *C.-botulinum*- Stämme isoliert, die weder dem Toxintyp A noch dem Toxintyp B angehörten und dem Buchstaben C ( $C_{\alpha}$  und  $C_{\beta}$ ) zugeordnet wurden. 1924 schlug BENGTON eine Abtrennung der aerob wachsenden Sporenbildner von den anaerob wachsenden vor und der Gattungsname *Clostridium* wurde für die anaeroben Sporenbildner eingeführt, während der Gattungsname *Bacillus* ausschließlich den aerob wachsenden vorbehalten blieb. 1928 wurde von MEYER und GUNNISON in Südafrika ein Stamm isoliert, der sich immunologisch von allen bisherigen unterschied und der gemeinsam mit seinem Toxin mit dem Buchstaben D benannt wurde. Von GUNNISON und MEYER (1929) wurde nachträglich angenommen, dass die von LANDMANN und VAN ERMENGEM isolierten Stämme den Typen A (Landmann Isolat) und B (Isolat von van Ermengem) angehören. Im Jahr 1934 wurden in den USA und in der Ukraine zwei Stämme in Fischprodukten gefunden, die einen ganz neuen Toxintyp bildeten und Typ E genannt wurden (GUNNISON et al., 1936). 1960 wurde von MØLLER und SCHEIBEL in Dänemark der Typ F aus Leberpastete isoliert. GIMENEZ und CICARELLI isolierten 1970 einen weiteren BoNT-produzierenden Stamm, der sich sowohl immunologisch als auch biochemisch von allen vorherigen unterschied. Er erhielt aufgrund seiner Fähigkeit zur Neurotoxinproduktion zunächst die Bezeichnung *C. botulinum* Typ G, wurde aber später in *C. argentinense* umbenannt (SHUEN et al., 1988). Die Benennung der isolierten Stämme der Spezies *C. botulinum* erfolgte lange nach nur einem phänotypischen Merkmal, der Bildung von BoNT (PREVOT, 1953). Demnach wurden Stämme, die aufgrund der Stoffwechselleistungen eindeutig einem Typen von *C. botulinum* zugeordnet

werden konnten, aber kein BoNT bildeten, nicht mit dem Speziesnamen *C. botulinum* belegt. Ein weiteres Problem ergibt sich hinsichtlich der Instabilität einiger Subtypen in Bezug auf die Toxinbildung. So konnten EKLUND et al., (1974) zeigen, dass eine Konversion eines *C.-botulinum*-C-Stammes in einen von *C. novyi* A nicht mehr zu unterscheidbaren Stamm möglich ist.

Dieser Einteilung folgt ebenfalls nicht die Benennung von zwei weiteren Clostridienspezies, *C. baratii* und *C. butyricum*, von denen einige Stämme in der Lage sind, ebenfalls BoNT zu bilden, aber aufgrund zu deutlicher Unterschiede hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften nicht zu der Spezies *C. botulinum* gerechnet werden können (MCCROSKEY et al., 1986; HALL et al., 1985).

OLSEN et al. schlugen 1995 vor, den Namen *C. botulinum* ausschließlich für toxische Stämme und den Namen *C. sporogenes* für nicht toxische Stämme zu verwenden.

Die heutige Nomenklatur folgt einer Unterteilung der Typen aufgrund ihrer StoffwechsellLeistungen, insbesondere der Fähigkeit oder Unfähigkeit Proteine zu verwerten, in die Gruppen I-IV, und aufgrund ihres Toxintyps in die Typen A, B, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>, D, E, F und den Typ G (*C. argentinense*).

Genetische Analysen haben gezeigt, dass diese Nomenklatur nur unter gemeinsamer Verwendung der Speziesbezeichnung, der Gruppe und des Toxintyps auch der genetischen Verwandtheit untereinander gerecht wird. So werden zum Beispiel BoNT-Typ-B-bildende Stämme gleich benannt, können aber nur im Zusammenspiel mit der Gruppeneinteilung richtig charakterisiert werden (COLLINS und EAST, 1998). Nach Erkenntnissen von COLLINS und EAST (1998) sind nicht-proteolytische *C. botulinum* Typ B Stämme (Gruppe II) näher mit *C. butyricum* als mit proteolytischen Stämmen von *C. botulinum* Typ B (Gruppe I) verwandt.

Abb. 1 verdeutlicht die phylogenetischen Positionen der *C. botulinum* Gruppen I-IV innerhalb des *Clostridium*-Clusters I basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. Zur Erstellung des Dendrogramms wurde ein kontinuierlicher Strang von etwa 1340 Basen verglichen. An den Aufzweigungen sind die Verwandtschaftsverhältnisse in Prozent angegeben (COLLINS und EAST, 1998).

Aufgrund gravierender Unterschiede der morphologischen und biochemischen Eigenschaften wurde der Typ G gemeinsam mit einigen nicht toxischen Stämmen als eigene Spezies bezeichnet (SUEN et al., 1988). Genetische Analysen von SUEN et al. (1988) haben gezeigt, dass *C. botulinum* Typ G sehr große Ähnlichkeit mit *C. hastiforme* und *C. subterminale* aufweist, weshalb für *C. botulinum* Typ G als Neurotoxinbildner und *C. hastiforme* und *C. subterminale* der Name *C. argentinense* vorgeschlagen wurde.

Zusammenfassend muß die Spezies *C. botulinum* als eine heterogene Gruppe immunologisch und kulturell vielgestaltiger Bakterien angesehen werden, die als Merkmale das Toxinbildungsvermögen, die Fähigkeit Sporen zu bilden und die anaerobe Wachstumsweise gemein haben. Somit können aus toxischen Stämmen hervorgegangene Stämme, die ihr Toxinbildungsvermögen verloren haben, nicht mit dem Speziesnamen *C. botulinum* bezeichnet werden. Daher schlagen COLLINS und EAST (1998) vor, für die unterschiedlichen Gruppen auch unterschiedliche Speziesnamen zu verwenden und die Neurotoxinbildung zusätzlich als Variante zu kennzeichnen. HUNTER und POXTON (2002) gehen dabei soweit, eine Klassifikation allein

basierend auf der Toxinbildung als inkorrekt zu bezeichnen und schlagen ebenfalls eine Reklassifikation unter Berücksichtigung der Neurotoxinbildung vor.

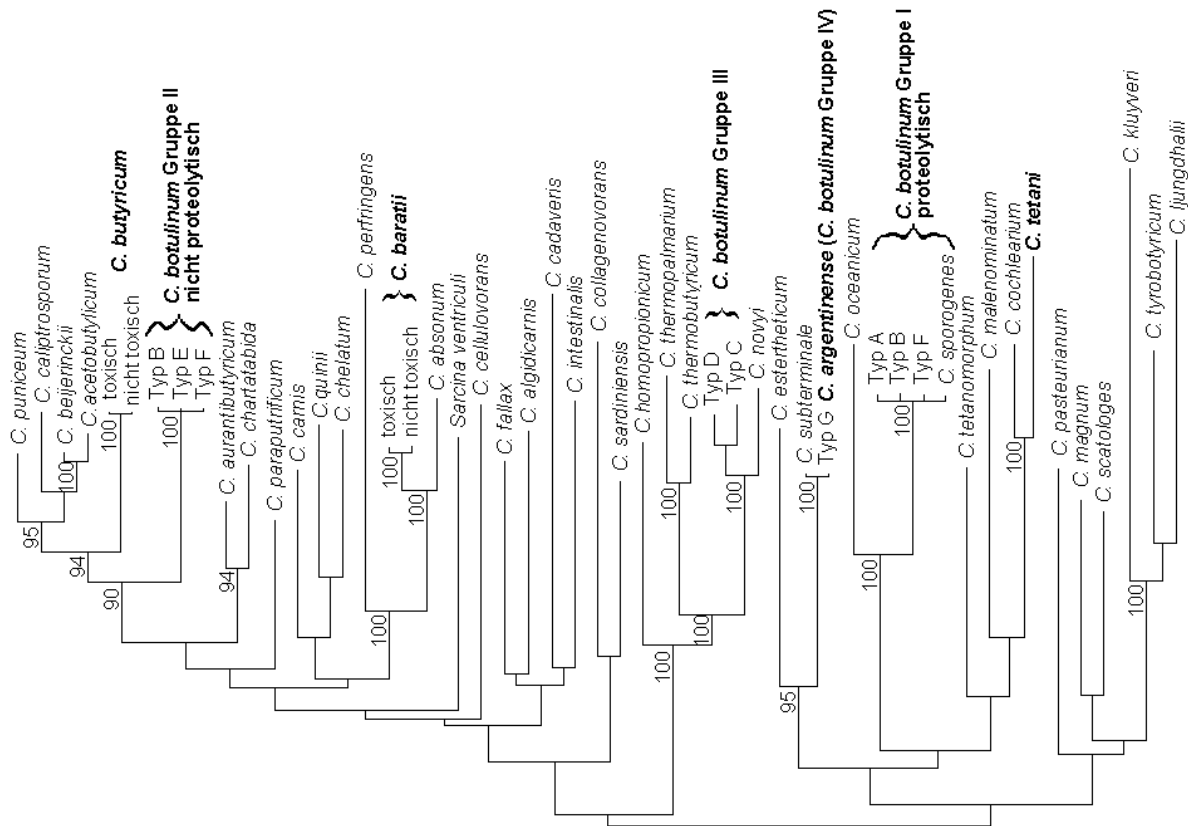


Abb. 1: Phylogenetische Position von *C. botulinum* innerhalb des Clusters I (modif. nach COLLINS und EAST, 1998)

## 2.1.2. Morphologie und Stoffwechselleistungen

### 2.1.2.1. Allgemein

Clostridien (Griechisch: das Spindelchen) sind vom Aufbau der äusseren Wandschichten zu den gram-positiven Bakterien zu zählen. Einige Spezies verlieren dieses Färbverhalten aber mit zunehmendem Alter der Kulturen und erscheinen dann gram-negativ. Normalerweise treten Clostridien als gerade oder leicht gebogene Stäbchenbakterien auf. Wenn sie beweglich sind, weisen sie eine peritriche Begeißelung auf. Die meisten Spezies sind obligate Anaerobier, obwohl einige Spezies eine größere Sauerstofftoleranz besitzen. Endsporen liegen entweder zentral, subterminal oder terminal und lassen die Bakterienzelle mehr oder weniger anschwellen. Optimale Wachstumstemperaturen liegen für die meisten Stämme bei 30-37 °C und einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7.

### 2.1.2.2. Stämme der Gruppe I

Zu dieser Gruppe gehören alle Stämme des Typs A und die proteolytischen Stämme der Typen B und F. Diese Stämme zeigen alle ausgeprägt proteolytische Aktivität und bilden aus

Kohlenhydraten keine Säure. Manche Stämme können allerdings schwach Glukose fermentieren (POPOFF, 1991). Die gram-positiven geraden bis leicht gekrümmten Stäbchen treten normalerweise einzeln auf, seltener auch zu Paaren oder kurzen Ketten (SMITH, 1977). Die Kolonien sind in der Regel rund, 2-6 mm im Durchmesser, besitzen oft ein etwas erhabenes Zentrum und sind opak bis leicht durchscheinend, mit unregelmäßig gelapptem Rand. Die Kolonien zeigen auf Blutagar eine schmale und komplette Hämolysezone, auf Eigelbagar sind die Kolonien von einer perlmuttartig schimmernden Zone umgeben. Stämme dieser Gruppe weisen eine sehr große DNA-Homologie zu *C. sporogenes* auf, von denen sie weder metabolisch noch biochemisch unterschieden werden können (CATO, 1986).

Tab.:1 Ausgewählte morphologische Eigenschaften und Stoffwechselleistungen einiger Neurotoxinbildenden Clostridien (zusammengestellt nach: POPOFF, 1995; COLLINS und EAST, 1998)

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	<i>C. argentinense</i>	<i>C. baratii</i>	<i>C. butyricum</i>
Sporen	st	st	st	st	st	c-st
Länge in $\mu\text{m}$	2-10	1,7-15,7	3,0-22	1,6-9,4	0,5-1,9	0,5-1,7
Breite in $\mu\text{m}$	0,5-2	0,8-1,6	0,5-2,4	1,3-1,9	1,6-10,2	2,4-7,6
Temperatur in $^{\circ}\text{C}$						
Optimum	30-40	25-30	30-37	30-37	30-37	30-37
Bereich	10-48	3,3-45	15-50	20-45	20-50	10-50
Beweglichkeit	+	+	+	+	-	+
Hämolyse	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	-
Proteolyse	+	-	-	+	-	-
Lipase	+	+	+	-	-	-
Lecithinase	-	-	-/+	-	+	-
Gelatine	+	+	+	+	-	-
Fleisch	+	-	+	-	-	-
Glucose	(+)	+	+/(+)	-	+	+
Fructose	-	+	-	-	+	+
Maltose	-	+	v	-	(+)	+
Mannose	-	+	(+)	-	+	+
Ribose	-	+	(+)	-	(+)	+
Stärke	-	v	-	-	v	+

Sporenposition: st: subterminal, c: zentral, +: positive Reaktion für 90-100% der Stämme (Säure gebildet pH: <5,5, (+): schwach positive Reaktion für 90-100% der Stämme (pH: 5,5-6,0), -: negative Reaktion für 90-100% der Stämme, v: variable Reaktion

### 2.1.2.3. Stämme der Gruppe II

Zu dieser Gruppe gehören die saccharolytischen, nicht-proteolytischen Stämme der Typen B und F und die Stämme des Typs E. Die geraden Stäbchen liegen in der Regel einzeln oder in Paaren. Für gewöhnlich versporen diese Stämme sehr leicht. Im Unterschied zur Gruppe I sind die Kolonien der Gruppe II kleiner (1-5mm), unregelmäßig rund, leicht erhaben und bilden unregelmäßige Ausläufer (CATO, 1986).

### 2.1.2.4. Stämme der Gruppe III

Zu dieser Gruppe zählen alle Stämme der Typen C und D, aber auch *C. novyi* Typ A. Obwohl diese Stämme in der Regel aproteolytisch sind, beschreiben SMITH und HOBBS (1974) auch das

Vorkommen von proteolytischen Varianten. Stämme dieser Gruppe fermentieren Glucose und andere Zucker (Inositol, Ribose und Xylose), sind aber in ihren biochemischen Eigenschaften sehr variabel, weshalb OGUMA et al. (1986) vorschlugen, diese Gruppe in 4 Untergruppen zu unterteilen.

Stämme der Gruppe III haben eine höhere optimale Wachstumstemperatur als andere *C. botulinum*-Stämme, die meisten wachsen gut bis 45°C (CATO et al., 1986). Auf Blutagar zeigen sie  $\beta$ -Hämolyse. Die Kolonien messen 1-5 mm im Durchmesser, sind leicht erhaben, durchscheinend grau-weiß, unregelmäßig rund und zeigen einen wurzelförmig ausgefranzten Rand. Die Stäbchen sind gerade und beweglich und kommen einzeln oder paarweise vor. Die ovalen Sporen liegen subterminal und treiben die Mutterzelle auf.

### 2.1.2.5. *Clostridium argentinense*, Gruppe IV

Nach der Erstbeschreibung von *C. argentinense* (*C. botulinum* Typ G) durch GIMENEZ und CICCARELLI (1970) wurde die ursprüngliche Gruppeneinteilung I-III um eine weitere, die Gruppe IV, von SMITH und HOBBS (1974) erweitert.

Stämme dieser Gruppe bilden im Gegensatz zu anderen *C.-botulinum*-Stämmen keine Lipase und fermentieren keine Glucose. Sie bilden gram-positive gerade Stäbchen, die einzeln oder paarweise angeordnet sind. Sporenbildung erfolgt bei diesen Stämmen nur selten. Die Kolonien sind unregelmäßig rund mit filamentösem Rand, 1-4 mm groß und zeigen auf Blutagar  $\beta$ -Hämolyse (CATO et al., 1986). Stämme dieser Gruppe schwärmen auf Festmedien häufig (CICCARELLI et al., 1977).

### 2.1.2.6. Atypische botulismus-auslösende Stämme

Einige Stämme der beiden Clostridienspezies *C. baratii* und *C. butyricum* können in seltenen Fällen ebenfalls BoNT bilden und sind fast ausschließlich im Zusammenhang mit Toxikationen beim Menschen (Adult: MC CROSKEY, 1991) und als Säuglingsbotulismus (HALL et al., 1985; AURELI et al., 1986; MCCROSKEY et al., 1986) beschrieben worden. Nicht-neurotoxin-bildende Stämme von *C. butyricum* konnten aus Käse isoliert werden, kommen aber auch in tierischen und menschlichen Faeces, Boden und marinen Sedimenten vor. *C. baratii* kann außerdem noch aus infektiösem Material isoliert werden (CATO et al., 1986).

## 2.1.3. Toxine

### 2.1.3.1. Neurotoxintypen

Die einzelnen Typen von *C. botulinum* bilden in der Regel ihren jeweils spezifischen Toxintyp (Tab.2). Es sind aber auch einzelne Stämme gefunden worden, die sowohl ihren Toxintyp als auch in kleineren Mengen das Toxin eines anderen Typs produzieren können. Mit Hilfe der PCR konnte einwandfrei geklärt werden, dass solche Stämme beide Gene für die jeweilige Toxinbildung aufweisen (GIMENEZ und CICCARELLI, 1970; HATHEWAY et al., 1981). Bei den Stämmen C und D ist auch die Bildung von Mosaiktoxinen, die aus der leichten Kette von

BoNT/C und der schweren Kette von BoNT/D bestehen, beschrieben worden (OCHANDA et al., 1984).

Um die unterschiedlichen Neutralisationseigenschaften der von BENGTON und SEDDON (1922) gefundenen Stämme zu erklären, wurden die Typen durch die Zusatzbezeichnung  $\alpha$  und  $\beta$  voneinander getrennt. JANSEN nahm 1971 an, dass  $C_{\alpha}$ - Stämme einen großen Anteil an C1-Toxin und einen geringeren Anteil an C2-Toxin bilden.  $C_{\alpha}$ -Stämme bildeten nach JANSEN (1971) auch einen geringen Anteil an D-Toxin, wie auch D-Stämme einen geringen Anteil an C1-Toxin bilden könnten.

Durch die Untersuchungen von OGUMA et al. (1980;1984) konnte jedoch nachgewiesen werden, dass einige auf den Neurotoxinkomponenten C und D gelegenen Epitope sehr ähnlich sind und es dadurch zu Kreuzreaktionen zwischen den Toxinen kommen kann. Demnach bilden Typ C-Stämme kein BoNT/ D und Typ D-Stämme kein BoNT/C. Da das C2-Toxin, welches ein Letaltoxin und kein Neurotoxin darstellt, sowohl von Typ C- als auch von Typ D-Stämmen gebildet werden kann, könnten  $C_{\beta}$ -Stämme aus beiden vorgenannten Typen, die die Fähigkeit zur Neurotoxinbildung aufgrund eines Phagenverlustes verloren haben, hervorgehen.

Tab. 2: Bildung von Neurotoxin und Letaltoxin (C2) durch ausgewählte Clostridienspezies (modif. nach BÖHNEL, 1995)

<i>Clostridium</i>	Toxintyp							
	A	B	C1	C2	D	E	F	G
<i>botulinum</i> Typ A	++							
<i>botulinum</i> Typ A Subtyp AB	++	++						
<i>botulinum</i> Typ A Subtyp Ab	++	+						
<i>botulinum</i> Typ A Subtyp Af	++						+	
<i>botulinum</i> Typ B		++						
<i>botulinum</i> Typ Ba	+	++						
<i>botulinum</i> Typ Bf		++					+	
<i>botulinum</i> Typ C-alpha			++	+				
<i>botulinum</i> Typ C-beta				+				
<i>botulinum</i> Typ D				(+)	++			
<i>botulinum</i> Typ E						++		
<i>botulinum</i> Typ F							++	
<i>argentinense</i> Typ G								++
<i>baratii</i> (einzelne Stämme)							+	
<i>butyricum</i> (einzelne Stämme)						+		

++: in großen Mengen gebildet, +: in geringen Mengen gebildet,  
(+): von einigen Stämmen gebildet

Die einzelnen Neurotoxintypen weisen untereinander sehr große strukturelle Ähnlichkeiten auf, bei denen die Struktur und das Molekulargewicht vom Aktivierungsgrad, d. h. von der Abspaltung der einzelnen Progenitortoxine, abhängig ist. Progenitortoxine und Hämagglutinine werden gemeinsam mit der toxischen Komponente gebildet und können sich als Schutzkomponente um die Neurotoxinkomponente lagern. Alle sieben (A, B, C1, D, E, F und G) BoNT bestehen aus einer leichten (etwa 50 kDa) und einer schweren (etwa 100 kDa) über Disulfidbrücken verbundenen Peptidkette. Sie werden als Einzelketten synthetisiert und erst später von einer Protease gespalten. In Kulturen vom Typ A werden Doppelketten, in Kulturen vom Typ E hauptsächlich Einzelketten gefunden. Aminosäuresequenzanalysen beider Ketten



weisen auf enge phylogenetische Ähnlichkeiten innerhalb eines antigenetischen Toxintyps hin, unabhängig davon, welcher metabolischen Gruppe der toxinproduzierende Stamm angehört (COLLINS und EAST, 1998). In den letzten Jahren sind alle BoNT codierenden Gene in ihrer Sequenz analysiert worden (THOMPSON et al.: 1990 BoNT Typ A Gruppe I; WHELAN et al.: 1992 BoNT Typ B Gruppe I; HUTSON et al.: 1994 BoNT Typ B Gruppe II; HAUSER et al.: 1990 BoNT Typ C; BINZ et al.: 1990a BoNT Typ D; MORIISHI et al.: 1996a,b BoNT C/D-Hybrid; POULET et al.: 1992 BoNT Typ E Gruppe II; ELMORE et al.: 1995 BoNT Typ F Gruppe I; EAST et al.: 1992 BoNT Typ F Gruppe II; CAMPBELL et al.: 1993 BoNT Typ G).

### 2.1.3.2. Andere von *C. botulinum* gebildete Toxine

#### C2-Toxin

Das von den C- und einigen D- Stämmen gebildete C2-Toxin hat keine paralytischen Eigenschaften und ist somit kein Neurotoxin. Im Gegensatz zum Neurotoxinen der Stämme dieser Gruppe liegt das C2-Toxigen nicht auf einem Phagen, sondern ist auf dem Bakterienzellgenom lokalisiert. Dieses Toxin wird erst bei der Sporulation freigesetzt, sodass gut versporende Stämme größere Mengen dieses Toxins produzieren (NAKAMURA et al., 1978). Es besteht wie die Neurotoxine aus einer leichten und einer schweren Polypeptidkette (FUJII et al., 1996). Beide Komponenten sind für die Ausbildung der Toxizität notwendig. Die Komponente I (C2-I) hat eine Molekülmasse von 50 kDa. C2-I ist eine ADP-Ribosyltransferase, die zelluläres, nicht muskuläres G-Aktin ribosyliert und somit die Polymerisation von Aktin verhindert, wodurch das Mikrofilamentgerüst depolymerisiert wird und die Zelle an Stabilität verliert (AKTORIES et al., 1986). Die zweite Komponente C2-II hat eine Molekülmasse von 105 kDa. C2-II hat hämagglutinierende Eigenschaften und vermittelt die Internalisation der ersten Komponente in die Zelle (CONSIDINE und SIMPSON, 1991).

C2-Toxin erhöht die vaskuläre Permeabilität, verursacht Hämorrhagien und Ödeme in der Lunge und hypotone Effekte, die zum Tode führen können.

#### C3- Toxin

AKTORIES et al. (1987) fanden bei dem Typ C ein weiteres Toxin, das C3-Toxin. Es besteht aus einer einfachen Peptidkette von 26 kDa. Das Exoenzym C3 katalysiert die Ribosylierung eines kleinen GTP-bindenden Proteins, Rho, und weniger ausgeprägt des Rac Proteins. Rho und Rac gehören zu einem Proteinkomplex, der die Polymerisation des Zell-Aktins reguliert (CHARDIN et al., 1989). Die Bedeutung des C3 Toxins im natürlichen Krankheitsgeschehen ist noch unbekannt (POPOFF, 1995).

### 2.1.3.3. Wirkungsweise der BoNT-Typen

Botulinum-Neurotoxine sind die stärksten toxischen Substanzen, die in der Natur vorkommen. Als stärkste biologische Toxine übertreffen sie sogar hochgiftige chemische Substanzen, wie zum Beispiel das Dioxin, um ein Vielfaches (SCHLATTER, 1978). Tab. 3 zeigt eine Übersicht über die minimale letale Dosis, bzw. die LD<sub>50</sub> der Toxine von *C. botulinum*.

Tab. 3: LD<sub>50</sub> bzw. MLD der einzelnen Toxintypen (modif. nach GILL, 1982)

Toxintyp	Maus	Meerschwein	Affe	Mensch	Rind
A	(1,2 ng, i.p.) <sup>1</sup>	(0,6 ng) <sup>a</sup>	(0,5-0,7 ng) <sup>b</sup>	(ca. 1 ng) <sup>c</sup>	
B	1,2 ng <sup>2</sup> - 2 ng <sup>3</sup> , i.p.	0,6 ng, i.p. <sup>3</sup>			
C1	1,1 ng, i.v. <sup>4</sup>	(1,1 ng) <sup>d</sup>	(0,4 ng) <sup>d</sup>		(0,388 ng) <sup>5</sup>
D	0,4 ng <sup>6</sup>	0,1 ng <sup>d</sup>	40 ng <sup>d</sup>		
E	(1,1 ng) <sup>7</sup>	0,6 ng <sup>d</sup>	1,1 ng <sup>d</sup>		
F	2,5 ng <sup>8</sup>				

Werte in Klammern: Minimale Letale Dosis (MLD)

<sup>1</sup>: LAMANNA et al., 1946; <sup>2</sup>: DUFF ET AL., 1957; <sup>3</sup>: LAMANNA und GLASSMAN, 1947; <sup>4</sup>: SYUTO und KUBO, 1977; <sup>5</sup>: MOELLER, 2003; <sup>6</sup>: CARDELLA et al., 1960; <sup>7</sup>: GERWING et al., 1965; <sup>8</sup>: OHISHI und SAKAGUCHI, 1974, <sup>a-d</sup>:

an Hand der Mäusetoxizität geschätzte Werte

<sup>a</sup>: Meyer, 1928; <sup>b</sup>: Street, 1965; <sup>c</sup>: Meyer und Eddie, 1951; <sup>d</sup>: Prevot und Brygoo, 1953

BoNT, zink-abhängige Metalloproteasen, gelangen nach der oralen Aufnahme und Resorption über die Intestinalschleimhäute schnell bis an den Zielort, die präsynaptischen Membranen der cholinergen Nervenendigungen. Dort binden sie zunächst mit dem carboxyterminalen Ende der schweren Kette an für die einzelnen Toxine unterschiedlichen Gangliosidrezeptoren und anderen bisher noch nicht näher identifizierten Proteinen der präsynaptischen Membran (ROSETTO et al., 2001) ( Abb. 2: ①). Durch rezeptorvermittelte Endozytose werden die BoNT in Vesikel internalisiert (Abb. 2: ②), welche anschließend absäuern (DOLLY et al., 1984).

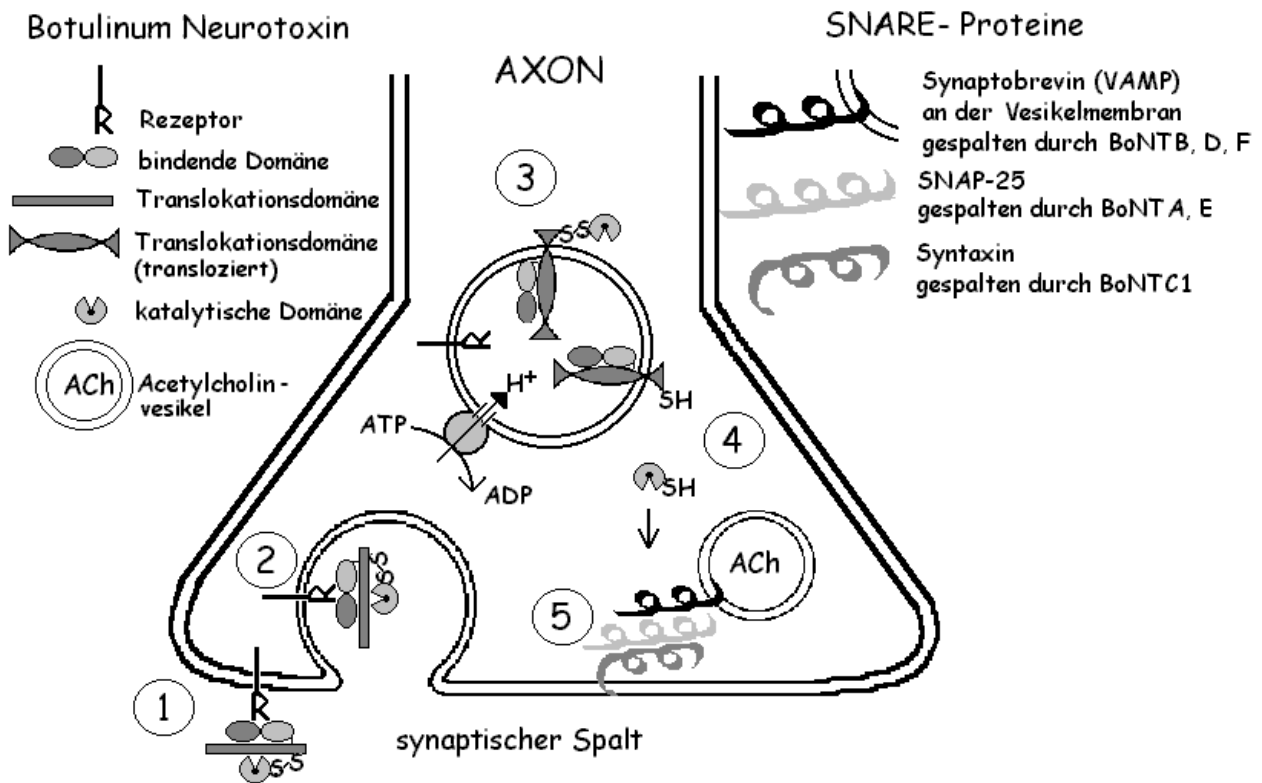


Abb. 2: Eintritt in die Nervenendigung und enzymatische Aktivität der Botulinum Neurotoxine (modif. nach ROSETTO et al., 2002). Eine Erläuterung zu den einzelnen Reaktionsschritten findet sich im Text.

Diese pH-Absenkung provoziert eine Konformitätsänderung innerhalb der für die Translokation verantwortlichen aminoterminalen Domäne der schweren Kette (Abb. 2: ③), wodurch diese hydrophobe Bereiche nach außen präsentiert und so in die Doppellipidschicht des Vesikels eintreten kann (MONTECUCCO und SCHIAVO, 1994). Man vermutet, dass dies einen Kanal für die leichte Kette vorbereitet, durch den die leichte Kette durch die Vesikelmembran geschleust werden und in das Cytosol gelangen kann (HOCH et al., 1985) (Abb. 2: ④). Im Cytosol angekommen spaltet die leichte Kette, die den eigentlichen katalytischen Teil der Metalloprotease darstellt, einzelne Proteine, die zu der für die Verschmelzung der Acetylcholinvesikel mit der präsynaptischen Membran verantwortlichen Enzymkaskade gehören (Abb. 2: ⑤).

Dadurch wird, je nach Menge des aufgenommenen Toxins, ein Ausfall in den cholinerg innervierten Muskelfasern hervorgerufen. Die einzelnen BoNT setzen dabei an unterschiedlichen Stellen dieser Enzymkaskade an. BoNT A und E spalten SNAP 25, BoNT B, D, F und G spalten VAMP/ Synaptobrevin und Typ C1 spaltet HPC-1/ Syntaxin (BINZ et al., 1994, SCHIAVO et al., 1992, YAMASAKI et al., 1994, BLASI et al., 1993).

### 2.1.3.4. Genetische Grundlagen der Toxizität

Das Vorkommen von Bakteriophagen ist für die *C. botulinum*-Typen der Gruppen I, II und III beschrieben worden (DOLMAN und CHANG, 1972; EKLUND et al., 1969; INOUE und IIDA, 1968). Bei den Stämmen C und D ist die Toxinbildung assoziiert mit der Anwesenheit von Bakteriophagen. Diese beiden Stämme konnten durch Behandlung mit UV-Licht bzw. Acridinorange von ihren Phagen befreit und somit atoxisch gemacht werden (EKLUND und POYSKY, 1974). Wurden die atoxischen Stämme wieder reinfiziert, was mit Phagen des jeweils anderen Toxintyps als auch mit einem Phagen von *C. novyi* gelang, produzierten sie anschließend das von dem jeweiligen Phagen codierte Toxin. Auf diese Weise ließ sich eine Konversion von einem *C. botulinum*-Typ-C-Stamm zu einem *C. novyi*-Typ-A-Stamm erzielen (EKLUND et al., 1974). Diese Phagenstudien lassen nach JANSEN (1971) den Schluss zu, dass C<sub>β</sub>-Stämme aus C<sub>α</sub>-Stämmen hervorgehen, die vorher ihren Phagen für die Neurotoxinproduktion verloren haben.

Plasmide lassen sich in allen vier metabolischen Gruppen von *C. botulinum* nachweisen (STROM et al., 1984). Bis auf Typen der Gruppe IV, bei denen EKLUND (1988) eine Korrelation zwischen Toxinbildung und dem Vorhandensein eines bestimmten 114 kb Plasmids feststellte, konnte jedoch bei keinem der *C. botulinum*- Stämme eine Korrelation zwischen Toxinbildung und Plasmid festgestellt werden.

Diese Erkenntnisse lassen den Schluß zu, dass bei den Gruppen I und II die Toxincodierung im Bakterienzellgenom verankert ist (BINZ et al., 1990; THOMPSON et al., 1990), jedoch bei Stämmen der Gruppe III und IV durch Bakteriophagen (Gruppe III) (HATHEWAY, 1993) bzw. durch ein Plasmid (Gruppe IV) (EKLUND, 1988) erfolgt.

Tab. 4: BoNT produzierende Clostridien, Toxintyp, Genlokalisierung und Aminosäurenlänge (modif. nach POPOFF, 1995)

<i>Clostridium</i>	Toxin	Genlokalisierung	Aminosäurenlänge
<i>botulinum</i> Typ A	BoNT/A	Chromosom	1296
<i>botulinum</i> Typ B	BoNT/B	Chromosom	1291
<i>botulinum</i> Typ C	BoNT/C	Phage	1291
<i>botulinum</i> Typ D	BoNT/D	Phage	1276
<i>botulinum</i> Typ E	BoNT/E	Chromosom	1251
<i>butyricum</i>	BoNT/E	Chromosom	1251
<i>botulinum</i> Typ F	BoNT/F	Chromosom	1274
<i>baratii</i>	BoNT/F	?	1268
<i>argentinense</i> Typ G	BoNT/G	Plasmid	1297

### 2.1.3.5. Lage und Funktion der Progenitortoxine

Die Botulinum-Toxine werden von den Bakterienzellen als nichtkovalent gebundene Enzymkomplexe (Progenitortoxine) synthetisiert (SAKAGUCHI, 1983). Dabei liegen die Gene für die Nicht-Neurotoxinkomponenten „upstream“ der eigentlichen Neurotoxine. Diese Komplexe können bei den Toxintypen A, B, C, D und G als große (L) und mittelgroße (M) Komplexe vorliegen. Sie besitzen jeweils eine molekulare Masse von 500kDa mit einem Sedimentationswert von 16S und 300kDa mit einem Sedimentationswert von 12S. Für die Toxintypen E und F sind keine großen Komplexe gefunden worden. Das Progenitortoxin von Typ A kann auch als extragroße Variante mit einer Molekülmasse von 900kDa mit einem Sedimentationswert von 19S auftreten (SAKAGUCHI, 1983). Diese Enzymkomplexe können aus einer hämagglutinierenden Komponente (HA), einer nichttoxischen nichthämagglutinierenden Komponente (NTNH) und der neurotoxischen Komponente bestehen. Die HA und NTNH der Typen C und D sind nahezu identisch, während die Neurotoxine dieser beiden Typen nur zu 52,2% identisch sind (KOUGUCHI et al., 2000). Die NTNH dieser Typen haben eine Molekülgröße von etwa 130kDa, während die aus mehreren Subkomponenten bestehenden HA Proteine Molekülgrößen von 55kDa, 33kDa, 22kDa und 17kDa besitzen.

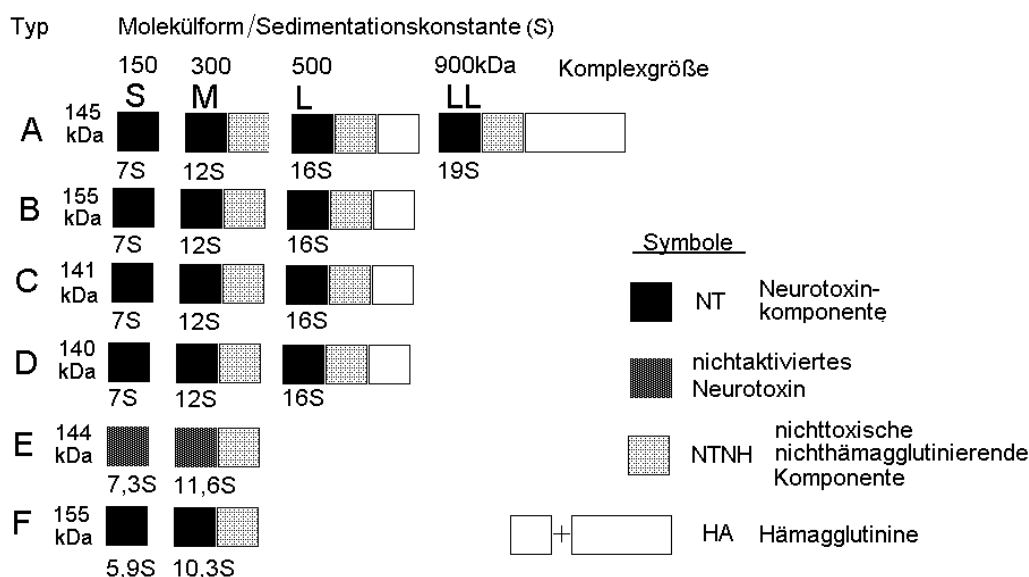


Abb 3: Schema der Molekülform von BoNT (modif. nach SAKAGUCHI, 1983)

Von diesen Progenitortoxinkomplexen kann die eigentlich toxische Komponente, das Derivat- oder Neurotoxin, mit einer molekularen Masse von etwa 150 kDa und einem Sedimentationswert von 7S in leicht alkalischem Milieu getrennt werden.

Die Nicht-Neurotoxinkomponenten der Progenitortoxine sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der oralen Toxizität. Sie stabilisieren die Neurotoxinkomponenten und schützen sie vor dem Einfluss der Magen-Darm-Enzyme. Reine Neurotoxinkomponenten zeigen oral praktisch keine Toxizität mehr, wohingegen sie parenteral ihre gesamte Wirkungskraft entfalten (OHISHI et al., 1977, Simpson, 2004).

### 2.2. Botulismus

#### 2.2.1. Vorkommen

Clostridien sind weltweit vorkommende Bodenbakterien. Sie sind beteiligt am Abbau der organischen Substanz. Die Typen *C. botulinum* A, B, E, F und G werden dabei den reinen Bodenbakterien zugerechnet, während die Typen C und D häufig im Darmtrakt von gesunden Tieren gefunden werden. Einen Überblick über die geographische Verbreitung und Epizootiologie von *C. botulinum* zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Hauptsächliche geographische Verbreitung und Epizootiologie von *C. botulinum* (modif. nach SONNENSCHNEIN, 1980 u. 1981).

Typ	Toxin	Verbreitung	Probenmaterial	Erkrankung
A	A	USA und Russland	Fleisch, Fisch, Gemüse, Wunden	Mensch, Vogel, Nerz
B	B	USA, Nord und Zentraleuropa	Fleisch und Fleischprodukte Wunden	Mensch, Vogel, Pferd, Rind
C	C( $\alpha$ ) C1,C2,D	Nord- und Südamerika, Südafrika, Australien und Europa	<i>Lucilia</i> Larven, Schlamm	Wasservögel
C	C $\beta$	Australien, Südafrika und Europa	Verdorbene Futtermittel und Kadaver	Rind, Pferd, Nerz
D	D, C1, C2	Südafrika und Russland	Kadaver	Rind
E	E	Russland, Japan, Canada, Alaska und Nordeuropa	Fisch und Fischprodukte	Mensch
F	F	Dänemark, Schottland Russland und USA	Leberpastete, Fisch	Mensch
G	G	Argentinien Schweiz	Erde Autopsiematerial	- Mensch

Die Typen A und B konnten bisher auf allen Kontinenten nachgewiesen werden, wohingegen der Typ G bisher nur aus Erdproben in Argentinien und der Schweiz isoliert werden konnte (GIMENEZ und CICCARELLI, 1970; SONNABEND et al. 1981 und 1987). Typ E ist ebenfalls weltweit verbreitet, allerdings beschränkt sich sein Vorkommen auf Proben aquatischer Herkunft. Die Typen C und D werden im Intestinaltrakt von gesunden Vögeln und Säugern weltweit gefunden und können sich enteral vermehren; acht Wochen nach erfolgter Sporenaufnahme sind sie massenhaft im Kot nachzuweisen. In Bodenproben werden sie selten gefunden, außer in Gebieten, in denen Botulismus häufig bei Tieren vorkommt (SMITH, 1975). Die anderen Typen kommen selten in tierischen Ausscheidungen vor und zählen somit zu akzidentellen Passanten (SMITH und MORYSON, 1975; NOTERMANS et al. 1979; SMITH, 1978; SMITH und YOUNG, 1980).

### 2.2.2. Pathogenese und klinisches Bild

Das klinische Bild des Botulismus ist Resultat dreier verschiedener Pathogenesen: die klassische Intoxikation, die Infektion und die Toxikoinfektion (BÖHNEL, 1995). Die Krankheitssymptome unterscheiden sich bei den drei Wegen der Krankheitsentstehung in der Stärke der Ausprägung und der Dauer der Erkrankung. Da sie alle durch die Blockierung der Reizleitungsübertragung an cholinergen Nervenfasern entstehen, werden die Symptome deshalb exemplarisch am Beispiel der Intoxikation erläutert. Zur Wirkungsweise der einzelnen Neurotoxine auf zellulärer Ebene vergl. Kapitel Toxine. Es kann besonders in der Entstehungsphase der Erkrankung zu Unterschieden in der Ausprägung der Symptome kommen, die bei der Beschreibung der verschiedenen Pathogenesen für die relevanten Tierarten und den Menschen gesondert behandelt werden müssen.

#### 2.2.2.1. Intoxikation

Die klassische Botulismuserkrankung bei Mensch und Tier ist die Intoxikation. Dabei werden in der Umwelt gebildete Neurotoxine über den Magen-Darmtrakt aufgenommen und über den Blutweg an cholinerge Nervenendungen transportiert. Durch die Hemmung des Acetylcholin-Ausstoßes in den synaptischen Spalt kommt es zu einer Unterbindung der Reizleitung an der präsynaptischen Membran. Daraus resultieren die klinischen Symptome wie z. B. die schlaffe Paralyse der Muskulatur. Es werden aber auch andere cholinerg innervierte Körpervorgänge gehemmt, wie z. B. der Speichelfluss, deren Symptome im akuten Krankheitsgeschehen aber meist durch die Muskelparalyse überlagert werden. THEILER et al. (1927) unterscheiden aufgrund des Auftretens, des Erscheinungsbildes und der Schwere der Erkrankung die perakute, die subakute, die akute und die chronische Form des Botulismus. Die experimentelle Inkubationszeit liegt zwischen 18 h und 16 d, bei natürlicher Erkrankung verschiebt sie sich auf 2-6 d. Dabei können Erkrankungsfälle bis zu 17 Tage nach dem ersten Ausbruch vorkommen. Die Dauer der Erkrankung beträgt zwischen 24 h in perakuten Fällen bis zu mehreren Wochen und ist korreliert mit der Länge der Inkubationszeit. Die Verluste bei erkrankten Tieren sind in der Regel hoch. Selten erholen sich einige Tiere, wobei die volle Belastbarkeit meist erst nach Monaten wieder erreicht werden kann.

Bei Rindern sind die ersten Krankheitssymptome Steifheit der Vorderbeine oder auch der Hinterbeine in Verbindung mit längerer Liegezeit. Probleme beim Aufstehen und steifer Gang mit gelegentlichem Überköten der hinteren Fesselgelenke werden beobachtet. Bei Fortschreiten der

Erkrankung verstärkt sich die Paralyse der Muskulatur, der Tonus des Schwanzes lässt nach und sistiert dann ganz. Schließlich erstrecken sich die Lähmungen über alle Muskelgruppen. Typisch ist die Paralyse des Schlundkopfes und der Zungenmuskulatur, wodurch Futter zunächst zwar noch aufgenommen, aber nicht mehr abgeschluckt werden kann. Bei Pferden läuft angebotenes Wasser aus den Nüstern wieder heraus. KRIEK und ODENDAAL (1994) unterscheiden Intoxikationen durch Typ B und C bei Pferden durch das bei Typ C-Intoxikationen erhaltene Schluckvermögen. Der Muskeltonus der Zunge geht vollständig verloren. Die Zunge kann nach dem Hervorziehen durch den Untersucher vom Tier nicht mehr selbständig in die Maulhöhle zurückverlagert werden. Typ-B-Intoxikationen bei Rindern unterscheiden sich von denen der Typen C und D durch den erhalten gebliebenen Muskeltonus von Schwanz und Zunge.

Menschen klagen häufig über Doppelsehen und können sich, durch Lähmungen der Kehlkopfmuskulatur, sprachlich nicht verständlich artikulieren. Die Bezeichnung toxische Bulbärparalyse für den Botulismus rührt von dieser Symptomatik her, der Lähmung der aus der Medulla oblongata (Bulbus medullae) austretenden motorischen Hirnnerven (VII-XII) bzw. deren motorischer Anteile.

Bei weiterem Fortgang der Erkrankung können die Tiere nicht mehr aufstehen und liegen zunächst in Brustlage, anschließend in Seitenlage, fest. Das Sensorium bleibt während dieser ganzen Zeit ungetrübt. Betroffene Tiere haben in der Regel keine erhöhte Temperatur. Der Tod tritt durch Atemlähmung und Kreislaufversagen ein. Die Inkubationszeit, der Verlauf und die Dauer der Krankheit sind abhängig von der Menge des aufgenommenen Toxins. In akuten Krankheitsfällen verenden die Tiere innerhalb von 3-7 d. Bei perakutem Verlauf werden Tiere sogar ohne vorherige Krankheitserscheinungen tot aufgefunden. Als Symptome milder Verlaufsformen beim Menschen werden Mundtrockenheit, Augenmuskellähmungen und Sprachschwierigkeiten beschrieben.

Charakteristische pathologisch-anatomische Veränderungen sind bei an Botulismus verendeten Tieren nicht zu finden. In akuten Fällen zeigt sich manchmal nur eine katarrhalische Enteritis und Petechien am Endocard und im Dünndarm. Chronische Fälle zeigen eher Verstopfungen, hervorgerufen durch eine Stase im Digestionstrakt. Bei Botulismusausbrüchen in Folge von Osteophagie können manchmal noch Knochenstückchen im Pansen gefunden werden (KRIEK und ODENDAAL, 1994).

### 2.2.2.1.1. Wiederkäuer

#### 2.2.2.1.1.1. Pathogenese in Europa

Beim Wiederkäuer unterscheidet sich die Pathogenese der Botulismusintoxikation in Europa und in den Tropen. In Europa ist die häufigste Ursache die Aufnahme mit BoNT kontaminierter Futtermittel. Das Vorkommen von BoNT im Futter setzt das Einarbeiten von *C.-botulinum*-sporenhaltigem Material während des Herstellungsprozesses oder der Lagerung der Futtermittel voraus. So können z. B. Tierkadaver in Silage eingebracht zu einer Bildung von BoNT führen, oder es können Tierkadaver im Heu oder Stroh versteckt aufgenommen werden (MÜLLER, 1963). NOTERMANS et al. (1985) sehen einen Zusammenhang zwischen Intoxikationen bei

Rindern und dem Ausbringen von Gülle auf die zur Futterwerbung genutzten Flächen. Durch Kadaver verunreinigte Tränken („Brunnenvergiftung“) können ebenso eine Intoxikationsquelle darstellen (DOUTRE, 1969). Mit Hühnermist gedüngte Weiden waren für Botulismusausbrüche verantwortlich, bei denen die Typen C und D nachgewiesen werden konnten (ABBITT et al., 1984; SMART et al., 1987; HOGG et al., 1990). Intoxikationen durch Masthühncheneinstreu sind auch bei dessen Verwendung als Einstreu in Liegeboxen aufgetreten (HAAGSMA et al.; 1977).

#### 2.2.2.1.1.2. Pathogenese in den Tropen

Der eher akzidentellen Aufnahme von Tierkadavern und damit Botulismuserkrankungen in Europa steht die Aufnahme von Tierkadavern zur Deckung des Phosphorbedarfs in den Tropen gegenüber. Böden in den Tropen können sehr reich an Aluminiumverbindungen sein, die sich leicht an Mineralien binden und mit diesen schwer lösliche Komplexe bilden. Dadurch sind tropische Lateritböden in der Regel sehr arm an frei verfügbarem Phosphor, welcher Futterpflanzen nicht mehr zur Verfügung steht. Werden die Tiere nun nicht in adäquater Weise mit Phosphor supplementiert, versuchen sie ihren Phosphorbedarf durch die Aufnahme von Kadavern oder Kadaverteilen zu decken. Es wurde errechnet, dass ein Gramm Gewebe eines Kadavers ausreichende Mengen Toxin enthalten kann, um ein ausgewachsenes Rind zu töten (THEILER und ROBINSON, 1927). Andere Intoxikationsquellen in den Tropen sind die Verfütterung von Masthühncheneinstreu oder auch an und in Tränkestellen verendete Rinder oder andere Tiere. Masthühncheneinstreu, das als zusätzliche Stickstoffquelle im Futter eingesetzt wird, enthält häufig die Reste von während der Mastperiode verendeter Hühner, in denen sich *C. botulinum* vermehrt und Toxin gebildet hat (EGYED, 1987; VAN DER LUGHT et al. 1996; unveröffentlichte eigene Beobachtungen).

#### 2.2.2.1.1.3. Botulismus in Brasilien

Die Erstbeschreibung des Botulismus in Brasilien erfolgte 1970 durch TOKARNIA et al. Sie diagnostizierten eine Erkrankung mit hoher Mortalität als Botulismus, die unter dem Namen „doença da mão dura“ (Krankheit der steifen Vorderbeine) seit 1960 in Brasilien bekannt war. Dieses Krankheitsbild trat überwiegend in der extensiven Weidehaltung in Regionen auf, in denen die Böden sehr arm an Phosphor sind. In den betroffenen Herden wurde Osteophagie beobachtet. Bei einigen Untersuchungen verendeter Rinder konnten Knochenstücke und Kadaverteile im Pansen gefunden werden. Im Inhalt des Magen-Darmtraktes wurden die Neurotoxintypen C und D nachgewiesen. PINHEIRO (1984), LANGENEGGER et al. (1984) und TURNES (1984) konnten in verschiedenen Regionen Brasiliens mit phosphorarmen Böden Botulismus nachweisen. LANGENEGGER und DÖBEREINER beschrieben 1988 das Vorkommen von Botulismus bei Wasserbüffeln, die im Norden Brasiliens in den Tieflandgebieten des Staates Maranhão gehalten werden. Sie führten die Intoxikationen bei Büffeln auf verunreinigte Wasserlöcher zurück, die in der Trockenzeit ausschließlich von Büffeln genutzt werden. Rinder und Pferde, die diese Wasserlöcher meiden, zeigten keine Erkrankungssymptome. LOBATO et al. (1988) und SCHOCKEN-ITURRINO (1990) konnten neben den schon vorher diagnostizierten Intoxikationen durch die Typen C und D auch solche von Typ A und Typ B nachweisen. DÖBEREINER et al. (1992) fanden Botulismus hauptsächlich auf neu kultivierten mit *Brachiaria decumbens* eingesäten Flächen des „Cerrados“, einer ursprünglichen Savannenvegetation.



LISBÔA et al. (1994, 1996) untersuchten bei an Botulismus erkrankten Tieren verschiedene Blutparameter. Magnesium, Kalium, Natrium, Chlor, sowie die alkalische Phosphatase und der Gesamtproteingehalt zeigten keine Unterschiede zu gesunden Tieren. Die betroffenen Tiere hatten allerdings eine ausgeprägte Hypocalzämie und Hypophosphatämie. DUTRA et al. (2001) beschrieben 7 unterschiedliche Botulismusfälle von verschiedenen Farmen. Als Ursache der Intoxikationen konnten sie mit Rinderkot verschmutzte stehende Gewässer, fast ausgetrocknete schlammige Tränkebecken, Rückhaltebecken gegen die Bodenerosion und Regenwassersammlungen über eingesunkenen Tierfriedhöfen identifizieren. SOUZA (2001) beschreibt das Vorkommen von *C. botulinum*-Sporen und -toxinen der Typen C und D in künstlich angelegten Wasserlöchern unterschiedlichen Alters, so genannten „Cacimbas“, auf Weidegebieten im Staat Goiás. Er untersuchte Wasser, Sediment der Wasserlöcher, Bodenproben und Kotproben aus der Umgebung des Wasserloches. Die Kotproben waren zu 31 %, die Bodenproben zu 19 %, die Sedimentproben zu 10 % mit *C. botulinum*-Sporen kontaminiert. In 2 % der untersuchten Wasserproben ließ sich freies Toxin nachweisen. Das Risiko einer Kontamination mit Sporen von *C. botulinum* erhöhte sich mit zunehmendem Alter des Wasserloches pro Jahr um 0,91 %.

### 2.2.2.1.2. Monogastrische Haussäugetiere

Bei monogastrischen Haussäugetieren sind die Intoxikationsquellen ebenfalls neurotoxinhaltige Futtermittel. Das Pferd ist am empfindlichsten (SMITH, 1957). In der Vergangenheit ist es beim Verfüttern von kontaminierter Grassilage zu Intoxikationen gekommen. Es wird auch von Fällen berichtet, bei denen in Getreidesilos verendete Kleinsäuger Intoxikationen verursachen. Als wesentliche Ursache des Botulismus bei Pferden in Spanien wird die Verfütterung von mit Katzenkot verunreinigtem Futter angesehen (BOTIJA, 1954). Bei Pferden werden überwiegend die Typen A, B, C und D gefunden (SWERCZEK, 1980; HARTIGAN, 1985; KINDE et al., 1991). Botulismus kann auch bei Hunden beobachtet werden und ist hier auf die Aufnahme verunreinigter Futtermittel zurückzuführen (SMITH, 1957; BLAKEMORE, 1977, TJALSMA, 1990). Schweine sind relativ unempfindlich für alle Neurotoxintypen, jedoch sind einige Krankheitsfälle beschrieben worden (SMITH et al., 1971). Die Symptomatik beim Schwein ist wie bei anderen Tieren durch eine schlaffe Lähmung gekennzeichnet. Die Ursache ist Intoxikation über kontaminierte Futtermittel (BEIERS und SIMMONS, 1967). Beim Nerz wird Botulismus häufiger beobachtet und ebenfalls durch die Verfütterung toxinhaltigen Materials verursacht (DINTER und KRULL, 1955).

### 2.2.2.1.2.1. Vögel

Vögel sind sehr anfällig für BoNT Typ C, wohingegen sie nur wenig empfindlich für BoNT Typ D sind. Botulismuserkrankungen bei Wassergeflügel sind ein auf der ganzen Welt beschriebenes Problem. BoNT entsteht im anaeroben Schlamm Boden der Gewässer und wird dann über kontaminierte Fische, Schnecken oder schlammige Wasserpflanzen aufgenommen. Der Tod tritt häufig durch Ertrinken ein, da sich erkrankte Tiere als Fluchtreaktion auf das Wasser zurückziehen.

### 2.2.2.1.2.2 Mensch

Die Intoxikationsquellen beim Menschen können vielfältig sein. Es stehen jedoch kontaminierte Lebensmittel im Vordergrund. Besonders sind hierbei ungenügend erhitzte oder falsch aufbereitete oder gelagerte Nahrungsmittel zu nennen. Intoxikationsquellen können sehr unterschiedlich sein. Selbst eingemachte Lebensmittel sind die häufigste Intoxikationsquelle, sporadisch sind auch industriell hergestellte Lebensmittel und frische, unzureichend gelagerte Zubereitungen die Ursache (BELL und KYRIAKIDES, 2000). In den USA war Gemüse die häufigste Quelle für BoNT, gefolgt von Fisch und marinen Säugetieren (CDC, 1998). Die Typen A, B, E und F sind die relevanten Toxintypen. Der Mensch dürfte aber ebenso empfänglich für andere Toxintypen sein.

In neuerer Zeit wird BoNT als Therapeutikum gegen Muskelerkrankungen, wie z. B. Torticollis, eingesetzt. Außerdem findet es immer häufiger in der Schönheitskorrektur zur Behandlung tiefer Falten Anwendung. Fehlapplikationen können so zu einer iatrogen erzeugten Intoxikation führen.

### 2.2.2.2. Infektion

Als das Äquivalent zur Tetanusinfektion gilt der Wundbotulismus. Dabei kommt es zur Neurotoxinbildung in verunreinigten Wunden, aus denen dort gebildetes Toxin in den Kreislauf übertritt und im betroffenen Organismus die Symptome der Intoxikation hervorrufen kann. Das „Shaker Foal Syndrome“ stellt eine Sonderform dar. Hierbei kommt es nach der Aufnahme sporenhaltigen Materials zur Besiedlung intestinaler Wunden durch *C. botulinum* und Vermehrung der Keime mit einhergehender Toxinbildung (SWERCZEK, 1980). Vereinzelt wird beim Pferd auch vom Wundbotulismus nach Kastrationen berichtet (BERNHARD, 1987). Beim Menschen ist Wundbotulismus etwa seit der Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt und häufig die Folge großer chirurgischer Eingriffe. In den letzten Jahren wird Wundbotulismus auch mit dem Gebrauch von kontaminierten Injektionsbestecken oder mit Sporen kontaminierter Drogen in Zusammenhang gebracht (MECHEM und WALTER, 1994; PASSARO et al., 1998).

### 2.2.2.3. Toxikation

#### 2.2.2.3.1. Säuglingsbotulismus (Infant Botulism) und „Infant like Botulism“ beim Erwachsenen

Seit 1976 (PICKETT et al.; MIDURA und ARNON) wird immer wieder vom Auftreten von Botulismus bei Säuglingen berichtet. Externe Intoxikationsquellen konnten nicht gefunden werden, weshalb angenommen wurde, die Toxinbildung finde im Darmlumen nach Aufnahme sporenhaltigen Materials statt. WILCKE et al. (1980) konnten die Bildung von BoNT im Darmlumen belegen. In den meisten Erkrankungsfällen von Säuglingsbotulismus werden die Toxintypen A und B nachgewiesen, es können aber auch andere Neurotoxintypen (C, E, F, G) und andere Clostridienspezies (*C. baratii*, *C. butyricum*), die Neurotoxine bilden, gefunden werden (OGUMA, 1990; AURELI et al., 1986; SUEN et al., 1988a, 1988b; HOFFMAN et al., 1985). Warum es im

Darmlumen von Säuglingen, die meist im Alter zwischen zwei Wochen und acht Monaten erkranken (SCHREINER et al. 1991), zur Auskeimung und Vermehrung von *C. botulinum* und dadurch zur Toxinbildung kommt, ist nicht bekannt. Die sich zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch vom Erwachsenen unterscheidende Darmflora hat dabei sicherlich große Bedeutung.

Die Toxinbildung im Darmlumen mit anschließender Botulismuserkrankung von Erwachsenen mit erheblich gestörter Darmflora, z. B. nach einer Antibiotikatherapie, wird von CHIA et al. (1986) beschrieben. 1999 berichteten FENICIA et al. von der intestinalen Besiedlung und Neurotoxinbildung mit *C. butyricum* (Neurotoxin Typ E) bei einem 9-jährigen Patienten und einer 19-jährigen Patientin. In beiden Fällen war das Meckel'sche Divertikel stark vergrößert und wurde als möglicher Toxinbildungsort angesehen.

### 2.2.2.3.2. Toxikation bei Vögeln

MIYAZAKI und SAKAGUCHI wiesen 1978 nach, dass *C.-botulinum*-Typ-C-Sporen im Caecum von Hühnern auskeimen und auch Toxin bilden können. SMART und ROBERTS konnten 1977 bei mehreren Botulismusausbrüchen in Broilerfarmen nur in einem Fall die Intoxikationsquelle einwandfrei bestimmen und vermuteten bei dem Rest der geschilderten Fälle ebenfalls eine Toxicoinfektion.

### 2.2.2.3.3. Viszeraler Botulismus beim Rind

SCHWAGERICK und BÖHNEL (2001) beschrieben eine bis dahin nicht bekannte Erkrankung bei Rindern und schlagen dafür den Namen „viszeraler Botulismus“ vor. Die Symptome dabei sind Verdauungsstörungen (Obstipation oder Durchfall), nicht-infektiöse chronische Laminitis, vergrößerte Venen, Ödeme, eingezogenes Abdomen, Abmagerung und Apathie. Gehäuft treten solche Fälle um die Abkalbezeit auf und führen oft zu unerwarteten Tierverlusten. In betroffenen Betrieben beobachtet man auch verzögertes Wachstum bei Färsen und abnehmende Milchleistung bei Kühen. Die Ursache für dieses Krankheitsbild konnte klinisch und mittels standardmäßiger Laboruntersuchungen nicht ermittelt werden. Spezielle Untersuchungen auf die Anwesenheit von *C. botulinum*-Sporen und -toxin ergaben das Vorkommen von freiem Toxin in den hinteren Darmabschnitten der untersuchten Tiere in den betroffenen Betrieben, während bei Tieren nicht betroffener Kontrollbetriebe kein freies Toxin gefunden werden konnte. Die Autoren halten es für sehr wahrscheinlich, dass eine andauernde Absorption von BoNT mit der neurologischen Kontrolle des Darmes interferiert. Sie vermuten aufgrund der Laborergebnisse eine Dysbiose im Verdauungstrakt mit einhergehender Vermehrung und Toxinbildung durch *C. botulinum* als Bestandteil einer multifaktoriellen Erkrankung, deren genauer Verlauf und Ursache noch näher untersucht werden muss. Ebenfalls konnten bei an dem beschriebenen Krankheitsbild erkrankten Tieren erhöhte Endotoxinwerte im Blut und Mykotoxine in Futter und Gallenflüssigkeit gefunden werden. Erhöhte Endotoxinwerte im Blut weisen auf eine Dysbiose im Darm hin (KRÜGER, 1997), während Mykotoxine durch ihre antibiotischen Eigenschaften zur Ausbildung einer unphysiologischen Darmflora beitragen können (DROCHNER, 1998). Bei deren Anwesenheit kann es zu einer möglichen Besiedlung des Darmes mit pathogenen Keimen und unter anderem auch mit Clostridien kommen.

#### 2.2.2.3.4. Equine Grass Sickness

Die Equine Grass Sickness (EGS, Equine Dystonie) ist eine Erkrankung bei Pferden, die sowohl das zentrale und periphere Nervensystem als auch das autonome Nervensystem des Darmes erfasst. Die Erkrankung kommt überwiegend in Grossbritannien vor, es sind aber auch schon Fälle in anderen europäischen Ländern, Australien und den Falkland Inseln bekannt geworden. Eine sehr ähnliche Erkrankung wird bei Pferden in Argentinien und Chile beschrieben und dort als „Mal Seco“ bezeichnet (UZAL et al., 1992, 1993).

Bei der EGS kommt es zur Degeneration und neuronalem Verlust des autonomen und enterischen Nervensystems, woraus, je nach Schwere der Erkrankung, eine Lähmung des Darmes resultiert, die in der akuten Form in der Regel tödlich verläuft. 1909 wurde die Erkrankung zum ersten Mal bei Pferden eines Militärcamps in Schottland beschrieben (TOCHER et al., 1923).

TOCHER et al. (1923) legten erste Beweise für die Hypothese vor, dass *C. botulinum* die Ursache der EGS sei. Trotz Isolation von *C. botulinum* aus der Milz betroffener Pferde verwendeten die Autoren einen aus den USA importierten *C. botulinum* Stamm für die Vakzineherstellung. Mit dieser Vakzine führten sie einen erfolgreichen Impfversuch durch, konnten Zweifeln an ihrer Hypothese jedoch nicht überzeugend begegnen. Erst Ende der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts ist die Frage eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen *C.-botulinum*-Intoxikation und EGS wieder aufgenommen worden (HUNTER et al., 1998; POXTON et al., 1997) und wird von einer Reihe von Autoren als wahrscheinlich angesehen (COTTRELL et al., 1999; HUNTER et al., 1999).

#### 2.2.3. Therapie

Eine Heilung an Botulismus erkrankter Tiere ist sehr schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Eine effektive Behandlung ist häufig nur bei subakuten Fällen durch eine sofortige Gabe spezifischen Antiserums möglich (JONES, 1991). Wie bereits oben erläutert, ist der Krankheitsverlauf von der aufgenommenen Toxinmenge abhängig. An die Nervenzellendigungen gebundenes und internalisiertes Toxin kann nicht mehr aus der Nervenzelle entfernt werden, weshalb in solchen Fällen jede Gabe von Antitoxin zu spät kommt. In frühen Stadien kann Antitoxin noch ungebundenes oder noch nicht aufgenommenes Toxin neutralisieren. Zweckmäßigerweise wird polyvalentes Antiserum verabreicht, da in der Regel keine Zeit bleibt, auf die Laborergebnisse zur Typbestimmung zu warten. Polyvalentes Antitoxin ist nur schwer erhältlich und überdies sehr teuer. Die Mortalitätsrate bei Pferden kann jedoch durch eine schnelle Antitoxingabe von 80 % auf 30 % gesenkt werden (SWERCZEK, 1980). Es kann versucht werden Substanzen zu applizieren, die die Transmitterabgabe an den neuromuskulären Endplatten erhöhen (QUINN et al., 2002). Tiere, die nur wenig Toxin aufgenommen haben, erholen sich manchmal nach mehreren Wochen spontan, benötigen aber in dieser Zeit intensive Pflege. An Botulismus erkrankte Menschen bedürfen, je nach Schwere des Krankheitsbildes und der betroffenen Muskelgruppen, intensivmedizinischer Betreuung. Die Möglichkeit der maschinellen Beatmung hat die Sterblichkeit der Erkrankung stark eindämmen können.

Bei den darmassoziierten Formen des Botulismus (z.B.: Säuglingsbotulismus, viszeraler Botulismus, EGS), bei denen eine für das Wachstum von *C. botulinum* im Intestinaltrakt günstige

Mikroflora besteht, kann eine Beeinflussung der Darmflora durch geeignete Präparate (Lactulose, unterstützende Mikroorganismen) hilfreich sein (KRÜGER und SCHRÖDL, 2000, 2004).

### 2.2.4. Prophylaxe

Die einzige Möglichkeit, Botulismus effektiv einzudämmen, ist eine adäquate Prophylaxe. Im Vordergrund stehen dabei die Vakzination, die ausreichende Supplementierung mit Phosphor und das Entfernen toxischen Materials aus der Umgebung der Tiere sowie adäquates Weidemanagement. In der Regel bedingen sich diese Maßnahmen gegenseitig und führen bei konsequenter gemeinsamer Durchführung zum Erfolg.

In Deutschland ist die Vakzination nur in Ausnahmefällen erlaubt, weshalb gute Futterwerbung und tiergerechte Fütterung und Tierhaltung sehr wichtig sind.

Auf dem Weltmarkt stehen verschiedene Vakzinen zur Verfügung. In den USA ist ein für Pferde zugelassener Impfstoff (BotVaxB, NEOGEN) erhältlich, der als wirksame Komponente Toxoid des Typs B enthält.

Produktionsstätten für Botulismusvakzine für Rinder befinden sich meist in Ländern, in denen Botulismus bei dieser Tierart häufig vorkommt, wie z.B. Südafrika, Australien, Brasilien und Uruguay. Es handelt sich dabei um monovalente Impfstoffe der Typen C oder D und bivalente Impfstoffe der Typen C und D. Es sind Toxoide, die an Aluminiumhydroxid adsorbiert sind. Die Impfstoffe werden in Australien oder Südafrika sehr erfolgreich eingesetzt (JANSEN et al. 1976; SMITH 1977). Impfdurchbrüche in diesen Ländern sind selten; alljährliche Impfungen werden empfohlen (SMITH 1977). Eine solide Immunität bildet sich nach zwei Injektionen im Abstand von 7-9 Wochen aus (JANSEN et al. 1976), die über das Kolostrum auch auf das Kalb übergehen kann (Behrens, 2002). In Brasilien sind verschiedene Vakzinen von den Firmen Merial (Linovac), Fort Doge (Vaxall), Vallée (Botulina), Vencofarma (Vacina contra o botulismo) und Hertabras (Botulinovac) erhältlich.

### 2.3. Nachweismethoden

Es gibt unterschiedliche Verfahren um *C. botulinum* aus Probenmaterial zu isolieren und zu identifizieren. Der Erreger kann direkt aus Probenmaterial isoliert und anschließend über kulturell biochemische Eigenschaften identifiziert werden.

Wesentlich einfacher und sicherer, bei gleicher diagnostischer Relevanz (§35LmBG), ist der indirekte Nachweis über das Toxinbildungsvermögen. Viele Autoren beschränken sich in der Botulismusdiagnostik auf den Nachweis des durch *C. botulinum* gebildeten Neurotoxins, da die Isolation des Bakteriums, insbesondere der Typen C und D, sehr schwierig ist (SMITH und SUGIYAMA, 1988). KLARMANN et al. (1988) konnten in dem von ihnen bearbeiteten Material mittels Toxinnachweis *C. botulinum* nachweisen. Die Isolation eines toxischen Stammes gelang ihnen aber in keinem Fall. DAHLENBORG et al. (2001) versuchten vergeblich mittels konventioneller Isolationsmethoden aus zuvor mit Hilfe der PCR positiv getesteten Schweinekotproben *C. botulinum* nachzuweisen.

### 2.3.1. Toxinnachweis

#### 2.3.1.1. *In vivo*

Die derzeit angewandte Methode, um von *C. botulinum* gebildetes Neurotoxin zu identifizieren und zu typisieren, ist der Tierversuch. Der sogenannte Maus Bioassay ist die gegenwärtig in Deutschland gesetzlich vorgeschriebene Methode (§ 35 LmBG). Hierbei wird zur Identifizierung und auch zur Diagnostik sowohl der Toxingehalt als auch das Toxinbildungsvermögen der Probe bestimmt. Der Maus Bioassay dauert bis zu seinem Abschluss etwa 4-7 d, wobei eine sich anschließende Typisierung das Ergebnis noch hinauszögern kann. Diese Zeit setzt sich aus der Bearbeitungszeit mit anschließender Bebrütungszeit der Probe und der Beobachtungszeit der Versuchstiere (4 d) zusammen. Abb. 4 zeigt das am Institut für Tropentierhygiene in Göttingen übliche Verfahren zur Toxinbestimmung.

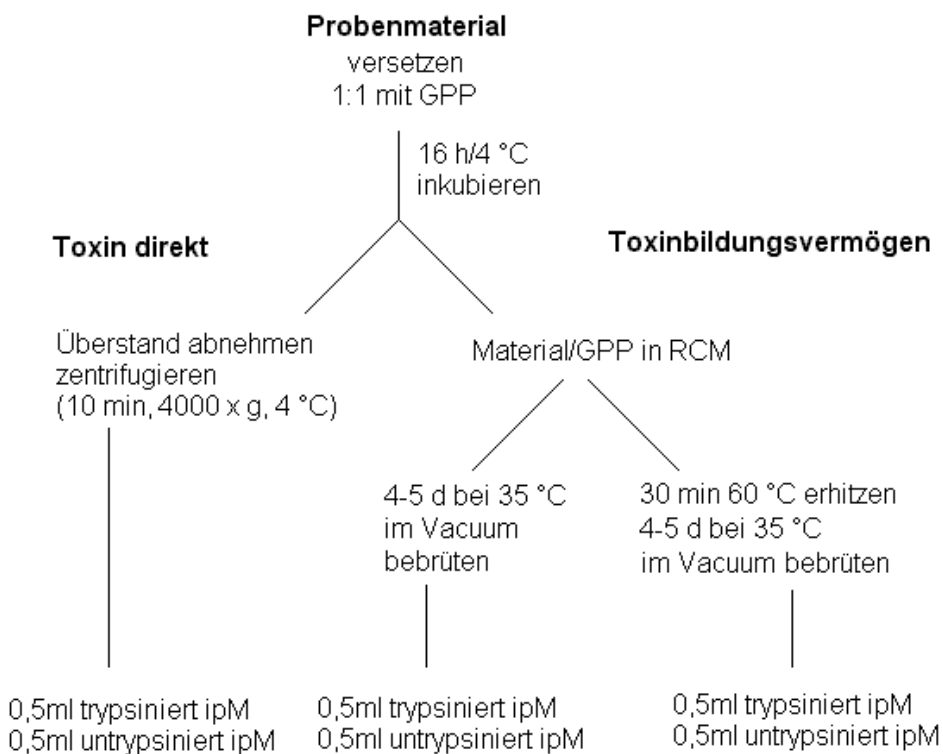


Abb. 4: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Toxinbestimmung am Institut für Tropentierhygiene in Göttingen

Die Typisierung der im Maus Bioassay positiven Proben erfolgt mittels Toxinneutralisation ebenfalls im Tierversuch (§ 35 LmBG). Dieses Verfahren wird in Varianten auch international zur Erregeridentifizierung und Toxinbestimmung angewendet (HOLDEMANN et al. 1977).

Unterschiede bestehen in der Auswahl des Toxinextraktionspuffers (GPP, PBS + Gelatine, Dilution Blanks) und des Kulturmediums (CMM, CMG, FEM, RCM). Die weitaus meisten Autoren beschränken sich bei der Charakterisierung von *C. botulinum* auf die Bestimmung des Neurotoxins, insbesondere bei der Identifikation der *C.-botulinum*-Typen C und D.

DE WAART et al. (1972) hat einige tierische Zelllinien, Protozoen und Algenspezies auf ihre Sensibilität gegenüber BoNT getestet und erreichte mit keinem dieser biologischen Testsysteme eine Empfindlichkeitsgrenze von unter 1000 MLD<sub>50</sub>/ ml.

### 2.3.1.2. *Ex vivo*

HABERMANN et al. (1980) und DREYER et al. (1984) benutzten den Hemidiaphragma-Test für die Aufklärung der Wirkungsweise von Botulinum- und Tetanus-Toxinen. Bei diesem Test werden Mäusediaphragmen samt *Nervus phrenicus* präpariert und die Einwirkungen von Neurotoxinen über Elektromyogramme direkt sichtbar gemacht.

### 2.3.1.3. *In vitro*

Der Nachweis von *C. botulinum* Toxinen ist auch mit dem ELISA möglich, jedoch wird die erforderliche Spezifität und Empfindlichkeit des Maus Bioassay beim Einsatz von polyklonalen Antikörpern nicht erreicht. Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper als Fangantikörper konnte die Sensibilität dem Maus Bioassay angenähert werden (SHONE et al. 1985b, SHONE et al. 1986). Kreuzreaktionen besonders zwischen den bei Rindern überwiegend vorkommenden Toxintypen C und D schränken den ELISA als typspezifische Nachweismethode zur Diagnostik von Botulismus beim Tier stark ein, wohingegen bei der Lebensmitteluntersuchung gute Resultate erzielt werden (BÄTZA, 1983; KOZAKI et al., 1979).

1988 entwickelten WEISS und WEISS eine Methode zum Nachweis von BoNT mittels Mikro-Wärme-Komplement-Bindungsreaktion. Damit konnten sie nach ihren Angaben eine hohe Empfindlichkeit erreichen. Bei der Anwendung hat sich jedoch gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit sehr stark von verschiedenen Faktoren geprägt ist, wie zum Beispiel dem eingesetzten hämolytischen System. Zudem ist auch hierbei die Gefahr von Kreuzreaktionen wegen der Verwendung relativ unspezifischer kommerziell erhältlicher Antitoxine hoch, sodass eine eindeutige Typisierbarkeit auch hier nicht möglich ist.

Ebenfalls 1988 versuchten SEMLER-SCHNEIDER et al. mittels der Western-Blot-Technik die Toxintypen A-E als Reintoxine und Rohtoxine zu charakterisieren. Es gelang ihnen, gereinigte Toxine mit homologem Kaninchenserum darzustellen, die einwandfreie Differenzierung von Rohtoxinen war mit dieser Technik nicht möglich.

Andere *in vitro*-Techniken wie zum Beispiel die Immunodiffusion, die passive Hämagglutination, die Immunfluoreszenztechnik und die Radioimmuntechnik konnten bisher den Tierversuch wegen mangelnder Sensitivität und Spezifität nicht ersetzen (CROWTHER und HOLBROOK 1976, NEAVES und GIBBS 1983).

Die Radioimmuntechnik erreicht zwar die nötige Empfindlichkeit (BOROFF und SHU-CHEN, 1973), die benötigten technischen Ausrüstungen, um radioaktiv markiertes Toxin herzustellen, schränken den Gebrauch dieser Technik jedoch ein.

GESSLER et al. (1998) entwickelten einen Test zum Nachweis von BoNT, bei dem in einer Säule gebundene Antikörper das in der Probe befindliche Toxin binden. Dieser Komplex wird anschließend durch eine Farbreaktion direkt in der Säule sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnte eine Empfindlichkeit von etwa 10 LD<sub>50</sub> erreicht werden.

WICTOME et al. (1999) entwickelten einen Test zum Toxinnachweis von Typ-B-Toxin aus Lebensmitteln und machten sich dabei die spezifische Endoproteaseaktivität von BoNT zu Nutze. Dabei wird eine mit einem monoklonalen Antikörper gegen Toxin Typ B beladene Immunoaffinitätsäule mit der zu testenden Probe beschickt, wobei vorhandenes Toxin an die Säule bindet. Über diese Säule wird synthetisch hergestelltes Synaptobrevin (Vesikel assoziiertes Membranprotein, VAMP), welches auch in der Nervenzelle von BoNT/B gespalten

wird, geschickt und aufgefangen. Ein anschliessendes enzymgebundenes Immunoassaysystem erkennt dann die Spaltprodukte des VAMP. Den Autoren zufolge ist dieser *in-vitro*-Test schneller durchführbar und sensitiver als der Maus Bioassay.

Wu et al. (2001) konnten mit Hilfe der Immuno-PCR die Nachweisgrenze von *C. botulinum*-Typ-A-Toxin gegenüber dem ELISA 100fach senken und erreichten dabei eine komplette Sensitivität und Spezifität. Bei der Immuno-PCR setzten sie murine monoklonale Anti-BoNT Typ A-Antikörper ein, die an doppelsträngige Reporter-DNA kovalent gebunden wurden. Anschließend wurde die Reporter-DNA im PCR-Schritt amplifiziert, die PCR-Produkte elektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.3.2. Bakterielle Formen

#### 2.3.2.1. Isolation und biochemische Differenzierung von *C. botulinum*

Die Isolation von *C. botulinum* aus Probenmaterial erfolgt nach den allgemein üblichen mikrobiologischen Grundsätzen. Dabei müssen erregerspezifische Besonderheiten, wie die strikte anaerobe Wachstumsweise, berücksichtigt werden. Die Fähigkeit von *C. botulinum*, Sporen zu bilden, kann zur Reduktion der vegetativen Begleitflora genutzt werden, indem das Probenmaterial erhitzt oder eine gewisse Zeit mit Alkohol versetzt wird. HAAGSMA et al. (1978) empfehlen Untersuchungsmaterial 30 min auf 60 °C zu erhitzen, da die Sporen einiger *C. botulinum*-Stämme hitzeempfindlicher sind als andere Stämme und so beim 20minütigen Erhitzen auf 80 °C abgetötet werden können. Das Abtöten der vegetativen Begleitflora kann auch durch Versetzen der Probe mit Alkohol erreicht werden (CATO et al., 1986). Zum Nachweis von *C. botulinum* wird von den meisten Autoren das Probenmaterial in ein Flüssigmedium gegeben und bei 30-37 °C 5-7 d bebrütet. HOLDEMAN et al. (1977) benutzen dazu ein Kochfleischmedium mit 3 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, wahlweise mit 0,5 % Glucose oder ohne Glucosezusatz. Dieses Flüssigmedium ist das in der Literatur am meisten verbreitete (DEZFULIAN, 1981; MILLS et al., 1985; SONNABEND, 1987; HALL et al., 1985; HATHEWAY und MCCROSKEY, 1987; YAMAKAWA et al., 1992). FEM wird seltener eingesetzt (KLARMANN, 1988; SEGNER, 1971). Da diese Medien jedoch Fleischpartikel, bzw. Fleisch und Eipartikel (FEM) enthalten, sind sie nur schwer standardisierbar. Andere Autoren setzen deswegen RCM (KLARMANN, 1988) ein.

MCCLUNG und TOABE (1947) haben eine Möglichkeit zur Einengung des Probenmaterials entwickelt, bei der man sich die Eigenschaft der Lipasebildung zu Nutze macht. Auf mit Eigelbemulsion versetztem Festmedium zeigt *C. botulinum* den typischen perlmuttartigen Hof. Dieses Festmedium wurde von DEZFULIAN et al. (1981) modifiziert. Sie setzten dem Medium nach dem Autoklavieren Antibiotika (Cycloserin, Sulfametoxazol und Trimetoprim) zur Unterdrückung der gegen diese Antibiotika sensitiven Begleitflora zu und konnten so erfolgreich *C. botulinum* der Typen A und B aus Stuhlproben von an infantilem Botulismus erkrankten Kindern nachweisen. Andere Autoren haben dieses Festmedium ebenfalls erfolgreich zur Isolierung von *C. botulinum* aus Stuhlproben bei infantilem Botulismus eingesetzt (MILLS et al., 1985; HALL et al., 1985; HATHEWAY und MCCROSKEY, 1987).



Die Differenzierung von *C. botulinum* erfolgt in der Regel durch die Überprüfung der makro- und mikromorphologischen als auch der metabolischen Eigenschaften des Erregers. Um einzelne Stoffwechselleistungen zu bestimmen wird häufig ein Pepton-Hefe-Medium, zu dem die einzelnen Kohlenstoffquellen gesondert zugegeben werden, verwendet. Darauf aufbauende kommerziell erhältliche Schnellsysteme (z.B.: API 20 A<sup>®</sup>, MERIEUX) können zur Differenzierung verwendet werden. Die einwandfreie Identifizierung von *C. botulinum* allein aufgrund der biochemischen Eigenschaften ist jedoch nicht möglich. Stämme innerhalb der einzelnen Gruppen können auf diese Weise nicht unterschieden werden. *C. sporogenes* zum Beispiel verhält sich biochemisch wie Stämme von *C. botulinum* der Gruppe I, *C. novyi Typ A* verhält sich wie Stämme von *C. botulinum* der Gruppe III.

Nichttoxische Varianten werden als vermeintlich toxische *C. botulinum*-Stämme erfasst. Ein Neurotoxin bildender *C. baratii*- oder *C. butyricum*-Stamm kann allein über biochemische Eigenschaften nicht von einem kein Neurotoxin bildenden Stamm unterschieden werden. Zudem können einige *C. botulinum*-Stämme auch bei gleichen Untersuchungsbedingungen zum Teil erheblich in ihren biochemischen Eigenschaften variieren (LOCH, 2000).

Die Züchtung von *C. botulinum* kann in verschiedenen flüssigen Nährmedien erfolgen. Alle diese Nährmedien müssen wegen des obligat anaeroben Stoffwechsels von *C. botulinum* jedoch besonders nährstoffreich sein. Laut KADIS et al. (1971) kann sich *C. botulinum* in einem Flüssigmedium, welches aus Aminosäuren, Zuckern, Salzen und Vitaminen besteht, vermehren und Toxin bilden, wobei unterschiedliche Stämme unterschiedliche essenzielle Aminosäuren benötigen.

Gutes Wachstum von *C. botulinum* wird in der Regel in Nährmedien mit Zusätzen tierischen Ursprungs erzielt. CATO et al. (1986) empfehlen Kochfleischbouillon (CMM) als Flüssigmedium sowohl zur Anzucht als auch zur Aufbewahrung.

### 2.3.2.1.1. ELISA

DEZFULIAN (1993) entwickelte eine Methode zur direkten Identifizierung von *C.-botulinum*-Kolonien mittels eines ELISA. Er suspendierte auf Festmedium gewachsene fragile Kolonien in Phosphatpuffer und testete den nach Zentrifugation erhaltenen Überstand auf das von den isolierten Kolonien gebildete Toxin.

### 2.3.2.1.2. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie, seit Jahrzehnten in der Anaerobierdiagnostik ein wertvolles Hilfsmittel zur Identifikation, bietet eine einfache Möglichkeit, Bakterienkulturen voneinander zu unterscheiden. Es werden zwei unterschiedliche gaschromatographische Methoden eingesetzt. Einige Autoren benutzen zur Differenzierung ausschließlich die gebildeten Fermentationsprodukte der einzelnen Bakterienkulturen, wie zum Beispiel flüchtige Fettsäuren (DOWELL und HAWKINS, 1974) und zusätzlich zu den flüchtigen Fettsäuren gebildete Alkohole (HOLDEMAN, 1977). Nach HOLDEMAN (1977) ist es möglich, die vier metabolischen Gruppen von *C. botulinum* voneinander zu unterscheiden. In Gruppe II kann *C. botulinum* Typ E durch einen von den anderen beiden Typen nur sehr schwach gebildeten Ameisensäurepeak getrennt werden. Die proteolytischen Stämme von Typ F in der Gruppe I bilden im Gegensatz zu Typ B

kein Isobutanol, keine Ameisensäure und keine Isocaprinsäure. Typ A bildet keine Ameisensäure wie Typ B, aber zusätzlich die Valeriansäure, die nicht von Typ B gebildet wird. Die Unterscheidung innerhalb der metabolischen Gruppen ist trotzdem nur bedingt möglich und wird, da nur sehr geringe Unterschiede bestehen, nicht für die Charakterisierung innerhalb der Gruppen verwendet. Die beiden Stämme der Gruppe III unterscheiden sich ganz leicht durch einen von Typ C gebildeten angedeuteten Ameisensäurepeak, der bei Typ D fehlt. *C. butyricum* kann nicht mittels Gaschromatographie von den *C. botulinum* Stämmen der Gruppe II und von *C. beijerinckii* getrennt werden, was die richtige Zuordnung zusätzlich erschwert.

Der rein qualitativen Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren nach HOLDEMAN (1977) stellten RIEKE (1981) und HOFFMANN (1984) die quantitative Erfassung gegenüber. RIEKE (1981) konnte *C. subterminale* sicher identifizieren, während GIERCKE-SYGUSCH (1987) *C. subterminale* nicht von *C. botulinum* Typ G und *C. botulinum* Typ E nicht von *C. baratii* unterscheiden konnte. Eine weitere Möglichkeit, Bakterien mit Hilfe der Gaschromatographie zu differenzieren, bietet die Analyse der länger-kettigen Fettsäuren. MOSS und LEWIS (1967) beschrieben, dass die qualitative und quantitative Bestimmung von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 10C-20C zur Differenzierung von *C. perfringens*, *C. bifermentans* und *C. sporogenes* herangezogen werden kann. *C. sporogenes* konnte durch einen im Chromatogramm von *C. botulinum* Stämmen der Gruppe II auftretenden unbekanntem Peak vor Dodecansäure von diesen getrennt werden. HEITTEFUSS (1991) konnte mit Hilfe dieser Methode, bei der die in der Zytoplasmamembran vorkommenden länger-kettigen gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren bestimmt werden, durch hohe Gehalte von Dodecan- und Tetradecansäure in den Chromatogrammen von *C. perfringens* diese Spezies sicher identifizieren. Die Auftrennung der einzelnen Subtypen von *C. botulinum* gelang jedoch nicht. Allerdings konnten in Kombination mit der Analyse der Fermentationsprodukte *C. botulinum* Stämme der Gruppe I sicher von *C. sporogenes* und *C. subterminale* abgegrenzt werden. Bei *C. botulinum* Typ C ergab sich die Schwierigkeit, dass dieser Stamm weder eindeutig zu *C. botulinum* zugeordnet werden konnte noch war er von *C. haemolyticum* zu trennen. Eine Zuordnung zu *C. novyi* konnte nicht vorgenommen werden. GHANEM et al. (1991) wiesen nach, dass die Reproduzierbarkeit der durch die gaschromatographische Fettsäureanalyse ermittelten Ergebnisse zum einen von der Bakterienanzucht und zum anderen von einer standardisierten Fettsäureextraktion abhängig ist. BÖHNEL (1995) listet die Gaschromatogramme sämtlicher *C.-botulinum*-Typen auf und unterscheidet sie mit Hilfe der Kombination aus der Analyse der Fermentationsprodukte (Head-Space-Chromatographie) und der Fettsäuremethylester der länger-kettigen Fettsäuren (FAME).

### 2.3.2.1.3. PCR

Zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zum Nachweis von *C. botulinum* mittels PCR sind verfügbar. Die direkte Extraktion der DNA von *C. botulinum* aus Bakterien und/oder Sporen enthaltendem Material oder die indirekte Extraktion der DNA von *C. botulinum* über einen Anreicherungsschritt in Flüssigmedium. Bei der direkten Methode werden jedoch auch ruhende oder tote Sporen mit erfasst und tragen so zu einem inkorrekten Ergebnis bei. Die indirekte Methode über einen Anreicherungsschritt wird von den meisten Autoren favorisiert. SZABO et al. (1994) weisen mit Hilfe der PCR aus künstlich mit *C. botulinum* Typ A, B und E

kontaminierten Lebensmitteln, Bodenproben und Stuhlproben *C. botulinum* nach. 1994 konnten sie mit Hilfe der PCR auch in Proben eines an Shaker-Foal Syndrome erkrankten Fohlens *C. botulinum* Typ B finden.

FACH (1995) konnte eine 95,6%ige Korrelation der PCR gegenüber dem Maus Bioassay in mit *C. botulinum* der Typen A, B, E, und G versetzten Lebensmitteln erreichen.

FRANCIOSA et al. (1996) haben eine Methode entwickelt, um über einen Anreicherungsschritt in unterschiedlichen Probenmaterialien *C. botulinum* Typ C nachzuweisen, wobei sich nur in 50 % der untersuchten Bodenproben *C. botulinum* fand.

HIELM et al. haben sich 1998 mit dem Nachweis von *C. botulinum* Typ E aus Fisch und Umweltprodukten befasst, aber auch hier erfolgte vor der DNA Isolierung ein Anreicherungsschritt in Kulturmedium.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Isolierung der DNA aus dem Probenmaterial. WILLIAMSON et al. (1999) identifizierten so 25 Bakterieneinheiten (vegetative Zellen und auch Sporen) von *C. botulinum* Typ C im Probenmaterial.

### 2.3.3. Gegen *C.-botulinum*-Neurotoxin gerichtete Antikörper

Der Nachweis gegen *C.-botulinum*-Neurotoxin gerichteter Antikörper wird erforderlich, um Erfolgskontrollen erfolgter Impfungen durchzuführen, aber auch um die Typenreinheit und Wirksamkeit von Hyperimmunseren zu kontrollieren. Beim Einsatz von *C.-botulinum*-Neurotoxin zu therapeutischen Zwecken in der Humanmedizin kommt es immer wieder zu Therapieresistenzen, die auf die Ausbildung von Antikörpern zurückgeführt werden können. Antikörpernachweise können auch als diagnostisches Hilfsmittel zum Nachweis eines erfolgten subklinischen oder chronischen Botulismusausbruchs innerhalb einer Population dienen.

#### 2.3.3.1. *In-vivo*-Nachweise

Zu den *in-vivo*-Methoden zum Nachweis ausgebildeter Antikörper gehört zum einen der sogenannte „Challenge Test“ als qualitativer als auch der als Standardmethode geltende Neutralisationstest als quantitativer Nachweis.

Beim „Challenge Test“, einer anerkannten Standard-Methode zur Überprüfung der Wirksamkeit bestimmter Impfstoffe in Zulassungsverfahren, werden zuvor immunisierte Versuchstiere mit einer bestimmten Menge Toxin belastet. Damit soll eine qualitative Aussage zur Immunisierung gegenüber einem oder mehreren Toxinen im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren getroffen werden. Obwohl genaue Aussagen über die Höhe der Antitoxintiter mit dem Challenge Test nicht möglich sind, werden die Titer in LD<sub>50</sub>-Werten angegeben (BÄTZA, 1982).

CARDELLA et al. (1960) testeten die Wirksamkeit von *C.-botulinum*-Typ-D-Toxoiden an Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen, während SCHICHOWSKI (1980) die Immunität von Mäusen nach der Impfung mit 2 kommerziellen und einem eigenen Toxoid verglich. 1995 benutzten MIDDLEBROOK und BROWN den Challenge Test, um die Immunogenität eines rekombinanten Impfstoffes zu testen, der aus einem Fragment der schweren Kette von *C. botulinum* Typ A hergestellt wurde, das in *E. coli* transferiert und dort exprimiert worden war.

Der Neutralisationstest oder Mäuseschutzversuch ist bis heute die im DAB (2002) und EAB zur Überprüfung von Botulinum-Antikörpern vorgeschriebene Standardmethode.

Während beim „Challenge Test“ in der Regel die Ausbildung von Antikörpern durch Impfstoffe überprüft wird, können mit dem Neutralisationstest sowohl eine unbekannte Menge Toxin als auch unbekannte Mengen Antikörper titriert werden.

Zur Bestimmung einer unbekannt Menge Toxin in einer Probe werden standardisierte Antiseren eingesetzt und diese gemeinsam mit der unbekannt Probe unter steigenden Verdünnungen einer festgelegten Menge Mäusen intraperitoneal injiziert. Übersteigt die Menge an vorhandenem Toxin in der Probe die Menge Antitoxin (Antiserum) bei einer bestimmten Verdünnung, kommt es zum Tod der Tiere und die Menge vorhandenen Toxins in der Probe kann berechnet werden.

Ebenso kann von einem unbekannt Antikörpertiter eines Serums mit Hilfe eines Challenge-Toxins und eines standardisierten Antiserums der Titer und damit der Gehalt an Internationalen Einheiten bestimmt werden. Diese Methode ist laut DAB (2002) die zur Ermittlung des Impferfolges zur Zulassung eines Impfstoffes gegen Botulismus die vorgeschriebene Methode der Wahl. In Brasilien werden kommerziell erhältliche Impfstoffe durch ein staatliches Institut (Laboratório de Referência Animal, LARA) mittels Neutralisationstest geprüft. Bei Vorliegen eines durch den zu prüfenden Impfstoff im Versuchstier ausgebildeten Antikörpertiters von über 2 IU/ml erfolgt die nationale Zulassung des Impfstoffes. Getestet wird die Ausbildung der Immunität in Meerschweinchen, deren Serum gepoolt und dann in Mäusen gegentitriert wird. LOBATO et al. (1999) verglichen so den Antikörpertiter mit monovalenter Toxoid-Vakzine der Typen C und D geimpfter Jungbullen mit dem Titer mit bivalenter Toxoid-Vakzine geimpfter Tiere.

#### 2.3.3.2. *In-vitro*-Nachweise

Zum Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Antigene von *C. botulinum* sind mehrere Methoden entwickelt worden. Der gegen BoNT gerichtete Antikörpertiter ist von der Größe des Proteins und damit der Menge der vorhandenen antigenen Epitope abhängig. Herkömmliche Impfstoffe gegen BoNT, die in der Veterinärpraxis eingesetzt werden, bestehen in der Regel aus den gereinigten toxoidierten Kulturfiltraten von *C. botulinum*. Somit enthalten sie neben toxoidiertem BoNT alle in der Kultur vorhandenen Proteine gegen die sich auch eine Antikörperreaktion ausbildet. Aus diesem Grund werden bei *in vitro*-Nachweisen auch Antikörper gefunden, die nicht unbedingt eine neutralisierende Wirkung gegenüber aktivem Toxin besitzen. Mit Hilfe der passiven Hämagglutination wiesen SAKAGUCHI et al. (1973) bei verschiedenen immunisierten Spezies Antikörper nach, indem sie Typ-E-Progenitortoxin an Schaferythrozyten banden. Spezifische Antikörper wurden so schon 9 Tage *post vaccinationem* gefunden. Ebenfalls mittels passiver Hämagglutination untersuchten OHISHI et al. (1979) Seren verschiedener überwiegend aasfressender Wildtiere und verglichen die Ergebnisse mit dem Serumneutralisationstest.

HABERMANN und BERNRATH (1975) entwickelten zwei Festphasen-Radioimmunoassays für die Ermittlung von Typ-A-Toxin-Antikörpern in Humanseren. Bei beiden Methoden handelt es sich um einen umgekehrten Festphasen- Radioimmunoassay, bei dem der zu untersuchende

Antikörper und an die Festphase gebundene Antikörper mit  $\text{Jod}^{125}$  markiertem Toxin konkurrieren.

Der Enzymimmunoassay wurde von einigen Autoren in unterschiedlichster Weise zur Bestimmung von Antikörpern verschiedener *C.-botulinum*-Typen im Blutserum verwendet. SHONE et al. (1986), SIEGEL (1988,1989), ELLIS (1989), JUBB (1993) und GREGORY (1994) adsorbierten dabei aktives Toxin, während BÄTZA (1982,1983), RUBIN et al. (1982) und ADAMI (1984) Toxoid an die Festphase banden.

KAMATA (1986), DEZFULIAN et al. (1987) und RANSOM et al. (1993) entwickelten jeweils Sandwich-ELISA, bei denen das Antigen mittels eines Fangantikörpers an die Festphase gebunden wird und dann dadurch dem zu ermittelnden Antikörper zur Verfügung steht. BÄTZA (1982,1983) fand in seinem Versuchsaufbau des ELISA mit an die Festphase adsorbierten Toxoiden der Typen C und D bei der Untersuchung von Seren vakzinierter Mäuse, Kaninchen und Ziegen keine signifikanten Unterschiede zum Mäuseschutzversuch. Kreuzreaktionen der gebildeten Antikörper mit anderen Toxintypen kamen mit Ausnahme des Antiserums C mit dem Typ F nicht vor. Da eine Kreuzreaktivität innerhalb der CD-Gruppe erwartet wurde, wurde diese nicht weiter untersucht.

ADAMI (1984) setzte die zuvor zur Immunisierung bei Ziegen verwendete Botulismusvakzine auch als Fangantigen ein und konnte so Antikörper in Serum, Milch, Kolostrum und in Seren von 7 Lämmern immunisierter Muttertiere nachweisen. Sie fand aber keine Korrelation zur Höhe der im ELISA und im Mäuseschutzversuch titrierten Antikörpermenge.

HERBST et al. (1987) benutzten diesen von ADAMI beschriebenen ELISA, um in mit Botulismus-Vakzine geimpften Hühnern Antikörper nachzuweisen.

SHONE et al. (1986) adsorbierten gereinigte Toxine der Typen A und B an die Festphase und konnten so nur eine begrenzte Korrelation zum Mäuseschutzversuch beim Nachweis von Antikörpern geimpfter Personen nachweisen.

KAMATA et al. (1986) benutzten einen monoklonalen Antikörper, E13, gegen *C.-botulinum*-Typ-E-Toxin, um einen Radioimmunoassay mit drei verschieden aufgebauten ELISA zu vergleichen. Sie setzten dabei einen direkten ELISA und einen kompetitiven ELISA ein, bei denen jeweils Toxoid und zum Vergleich auch Toxin an die Festphase gebunden wurde, und einen Sandwich-ELISA, bei dem ein polyklonaler Antitoxin-Antikörper vom Kaninchen adsorbiert wurde. Zur Antigenpräsentation wurde anschließend Toxin oder Toxoid verwendet. Bei dem direkten ELISA, bei dem statt Toxoid Toxin adsorbiert wurde, konnte keine spezifische Bindung der Serumantikörper an das Toxin festgestellt werden, was die Autoren zu dem Schluss veranlasste, dass das Toxin beim Adsorbieren überwiegend an der Stelle des aktiven Epitopes an die Festphase bindet, während vermutlich durch Konformitätsänderungen durch das Formalinisieren das aktive Epitop auch nach der Adsorption an die Festphase noch zur Verfügung steht. Dieses Phänomen konnte bei den anderen beiden ELISA-Typen, bei denen das Toxoid, bzw. Toxin jeweils in der flüssigen Phase vorhanden war, nicht beobachtet werden.

DEZFULIAN et al.(1987) konnten mit Hilfe eines Sandwich-ELISA, bei dem sie Toxin statt Toxoid als Fangantigen einsetzten, in Serum eines zuvor mit Toxoid der Typen A und E geimpften Probanden 4 Wochen nach Erstimpfung und 15 Wochen vor einem positiven Mäuseschutzversuch Antikörper nachweisen.

RANSOM et al. (1993) verwendeten den von SHONE et al. (1985) entwickelten ELISA und modifizierten ihn dahingehend, dass sie definierte Mengen von Fangantigenen als auch von

BoNT einsetzen. Die Änderung der Absorption war dabei proportional zu der Titration im Mäuseschutzversuch. Da die Verfügbarkeit von spezifischen Antisera sehr stark eingeschränkt ist, erwies sich dieser Test aber als nicht praktikabel.

SIEGEL (1988) bestimmte den Immunstatus von mit pentavalentem (Typen ABCDE) Impfstoff geimpften Probanden und evaluierte die Wirksamkeit der verwendeten Toxoidvakzine mit Hilfe eines direkten ELISA, bei dem gereinigtes A oder B Toxin als Fangantigen eingesetzt wurde. Trotz einer statistisch guten Korrelation beider Ergebnisse gab es eine sehr große Streuung der einzelnen Antikörperlevel in den getesteten Gruppen, weshalb der ELISA als nicht ausreichend zuverlässig zur Bestimmung neutralisierender Antikörper angesehen wurde.

Antikörper unvakzinierter Tiere in Enzootiegebieten gegen die vorkommenden Toxine von *C. botulinum* konnte ELLIS bereits 1989 nachweisen.

JUBB et al. (1993) benutzen einen von ELLIS (1989) entwickelten ELISA zum Nachweis gegen Toxin der Typen C und D gerichteter Antikörper, um bei einer erkrankten Rinderherde in West-Australien einen Botulismusausbruch diagnostisch zu untermauern. Es wurden Seren von 7 erkrankten und 27 gesunden Tieren untersucht, wobei in 6 aus 7 bzw 8 aus 27 Seren Antikörper gegen Toxin der Typen C und D nachgewiesen werden konnte, während weder Serum noch Pansensaft der 7 erkrankten und später verendeten Tiere im Mäusetoxizitätstest positiv waren. Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass man Botulismus mit Hilfe eines Antikörper-ELISA diagnostizieren kann und vermuteten, dass die positiven Reagenten aus der gesunden Tiergruppe eine subklinische Intoxikation durchgemacht hatten, welche zur Antikörperproduktion ausreichend gewesen war.

1996 beschrieben GREGORY et al. die Entwicklung eines spezifischen ELISA für die Antikörpertypen C und D, um Botulismuskommen bei Rindern zu untersuchen. Sie verwendeten dazu partiell gereinigte Toxine der Typen C und D als Fangantigene. Sie untersuchten Serum von 333 Rindern aus Herden, bei denen Botulismus in der Umgebung weder bei Rindern noch bei Wassergeflügel vorgekommen war, sowie Serum von 41 Herden, die entweder geimpfte Tiere hatten, aus endemischen Botulismus-Gebieten stammten oder bei denen Botulismus schon aufgetreten war. Antikörper konnten in allen vakzinieren Tieren, in 39 von 93 Tieren aus endemischen Botulismus-Regionen sowie in 9 von 83 Tieren aus Regionen, in denen Botulismus schon vorgekommen war, nachgewiesen werden. Nur 5 aus 333 Rinderseren aus Regionen, in denen Botulismus noch nie beschrieben worden war, reagierten positiv im ELISA.

Mit der gleichen Methode fanden MAIN und GREGORY (1996) bei subklinisch betroffenen Tieren häufiger positive Reagenten als bei klinisch erkrankten Tieren. Sie schlossen daraus, dass subklinische Intoxikationen immunogen wirken, aber bei klinisch erkrankten Tieren die Toxinbelastung zu hoch ist, als dass freie Antikörper im Serum vorhanden wären.

DOELLGAST et al. (1994) entwickelten einen kompetitiven ELISA auf der Basis eines kommerziell erhältlichen Testkits für die Neurotoxine A, B und E. Dabei konkurrieren Antitoxin-Hühnerantikörper und RVV-XA markierte Antitoxin-Pferdeantikörper mit den im Serum zu testenden Antikörpern um die Bindungsstellen am Toxin. Somit wurde bei Vorhandensein von Antikörpern im Probandenserum die Bindung an die Mikrotiterplatte geringer, was zur Messung des Antikörpertiters benutzt wurde.

SIATKOWSKI et al. (1993) untersuchten mit Hilfe eines abgewandelten ELISA, bei dem die Festphase aus Mikrokügelchen besteht, Patientenseren, die aufgrund spastischer

Muskelerkrankungen mit BoNT behandelt wurden. Bei dieser Technik wurde Toxoid des Typs A als Fangantigen an die Mikrokügelchen gebunden und goldmarkierte Anti-Human-Antikörper der Ziege als Indikatorantikörper benutzt. Anschließend wurde die Komplexbildung an die Mikrokügelchen unter dem Elektronen-Mikroskop ausgezählt, wobei 57% der Patientenserum positiv reagierten. Es konnten jedoch keine signifikanten Beziehungen zwischen injizierter Toxindosis pro Behandlung, der Anzahl der Injektionen oder der Behandlungsdauer gefunden werden.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass sich der ELISA nicht zur genauen Bestimmung der effektiv schützenden Antikörper in einem Serum eignet. Dies liegt daran, dass bei der Vakzination, der natürlichen Exposition oder auch der Behandlung mit Toxin in der Humanmedizin bei den betreffenden Probanden polyklonale Antikörper gebildet werden, die im ELISA mit in die Messung einfließen. HATHEWAY und DANG (1994) postulierten deshalb, dass zur exakten Wiedergabe der neutralisierenden Eigenschaften eines Antiserums als Fangantigene ausschließlich diejenigen Epitope verwandt werden sollen, die für die Neutralisation des Toxins verantwortlich sind. Zur Evaluierung oder Verlaufskontrolle bei Vakzinationen (BÄTZA, 1982; ADAMI, 1984; SIEGEL, 1988) ist der ELISA als einfach durchzuführende vororientierende Methode (KOZAKI et al. 1989; EKONG 1995) dagegen durchaus geeignet. Für epidemiologische Untersuchungen (GREGORY et al. 1996) stellt der ELISA ebenfalls eine akzeptable Methode zur Antikörperbestimmung dar. Zur Unterstützung der Diagnose „Botulismus“ bei unklarem Toxinnachweis und ansonsten ungeklärtem Krankheitsbild kann der ELISA zum serologischen Screening der gesamten Herde eine wertvolle Hilfe sein (JUBB, 1993).

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. Allgemeine Informationen zum Untersuchungsgebiet

##### 3.1.1. Topographie, Klima und Vegetation Brasiliens

Brasilien ist mit etwa 8 Mio. km<sup>2</sup> das fünftgrößte Land der Erde. Es kann grob in zwei Großlandschaften unterteilt werden: das in etwa die Hälfte des Landes einnehmende äquatorial gelegene Amazonasbecken und das im Regenschatten der in nord-südlicher Richtung verlaufenden Küstenkordillere im Süden und zentral gelegene Hochplateau. Die Küstenkordillere ist die Wasserscheide zwischen dem Atlantik und dem Binnenland. Die Entwässerung des Landes erfolgt durch zwei große Flusssysteme, im Norden der Amazonas und im Süden der Paraná/Paraguay.

Brasilien erstreckt sich über fünf verschiedene Klimazonen, eine äquatoriale, eine tropische, eine feuchttropische, eine trockentropische und eine subtropische. Die durchschnittlichen Temperaturen variieren je nach Region zwischen 17 °C in den Subtropen im Süden bis hin zu 35 °C in der trockentropischen Zone im Nordosten des Landes.

Die größten Niederschlagsmengen mit bis zu 3000 mm/Jahr werden im Amazonasbecken gemessen. Die Küstenregion des Staates São Paulo zählt ebenfalls zu den regenreichen Gebieten. An den Berghängen dieser Region regnen die ins Inland ziehenden Wolken ab, sodass im zentral-brasilianischen Hochland nur Niederschlagsmengen zwischen 1000 und 1500 mm/Jahr gemessen werden (brasilianische Botschaft, 2002; Country Reports, 2002).

Klima und Topographie Brasiliens bedingen deutliche Unterschiede in der Vegetation. In den niederschlagsreichen Gebieten wachsen die immergrünen Regenwaldbäume, während im niederschlagsärmeren Tiefland eher eine Art Laubwald, der in der Trockenzeit die Blätter verliert, vorherrscht.

Im halbtrockenen Nordosten überwiegt die „Caatinga“, ein trockenes Buschland.

Den Großteil Zentralbrasiliens überzieht eine als „Cerrado“ bezeichnete Savannenvegetation, für die spärliche Baumgruppen, Gebüsch und gegen Dürre resistente Grasflur, sogenannte „Campos nativos“, charakteristisch sind. Im Süden ist das Hochland mit Nadelgehölzen bedeckt. Das in der Regenzeit überschwemmte Mato-Grosso-Sumpfland („Pantanal Mato-Grossense“), im Bundesstaat Mato Grosso und Mato Grosso do Sul an der Grenze zu Bolivien, weist überwiegend Grasland sowie verstreut wachsende Bäume auf.

#### 3.3. Gebiet der Befragungen

##### 3.3.1. Topographie und Klima

Die Staaten Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás Minas Gerais und São Paulo, in denen einzelne Betriebe besucht wurden, liegen im zentralbrasilianischen Hochland. Regen fällt überwiegend in der Zeit von Oktober bis März. Juli und August sind die trockensten Monate, in denen es aber auch vereinzelt regnen kann.

Die Temperaturen in den Sommermonaten (Oktober bis April) liegen tagsüber bei 30-35 °C, in den Wintermonaten werden 20-25 °C erreicht, wobei es sich in der Nacht bis 5 °C abkühlen kann. Das Gebiet um den Einsatzort Araçatuba im Staat São Paulo (Radius von etwa 250 km)



## 32 Allgemeine Informationen

ist leicht bis stark hügelig und von mehreren größeren Flüssen (Rio Tietê, Rio Paraná, Rio Grande und Rio Araguaia) und vielen kleineren Wasserläufen durchzogen.

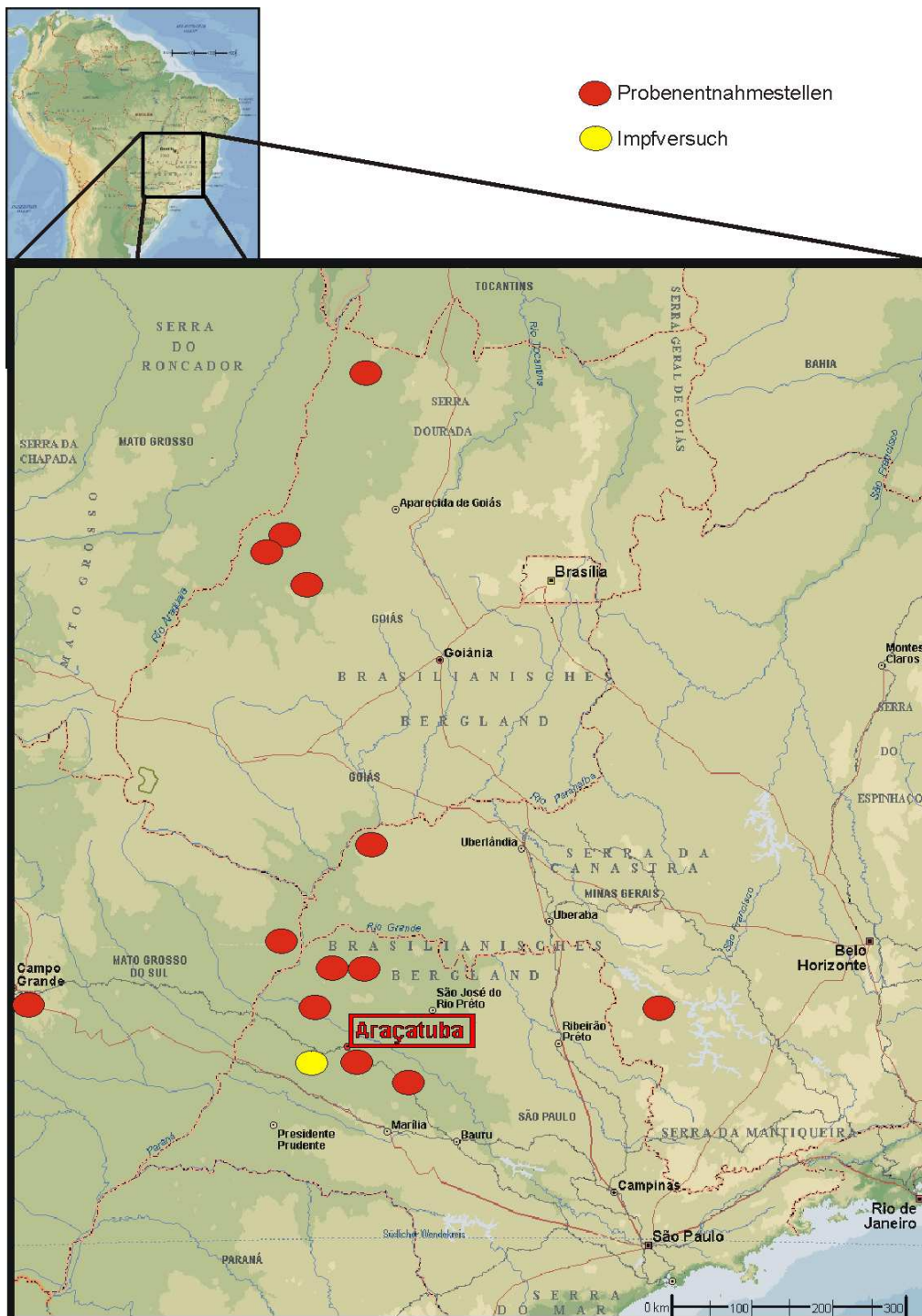


Abb. 5: Das Untersuchungsgebiet (modif. nach MICROSOFT ENCARTA WELTATLAS, 1997)

### 3.3.2. Vegetation

Die ursprüngliche Vegetation in den besuchten Regionen war eine sehr dichte Baum-Buschsavanne, der „Cerrado“ oder „Mato“, der heute riesigen Rinderweiden, Zuckerrohrplantagen oder Anbauflächen für Mais, Hirse, Soja oder anderen Feldfrüchten

gewichen ist. Der Urwald ist an vielen Stellen noch erhalten, hauptsächlich in sehr unzugänglichen Gebieten.

Eine intensivere Besiedlung des brasilianischen Hinterlandes erfolgte erst zum Anfang des 20. Jahrhunderts. Die Stadt Araçatuba entstand um 1910, als Umschlagplatz für landwirtschaftliche Güter an einer Bahnlinie.

Im Zuge der sich intensivierenden Landwirtschaft wurden große Flächen der nativen Vegetation gerodet, um als landwirtschaftliche Nutzflächen zu dienen. Nach der Rodung der Flächen wurde häufig in den ersten Jahren Trockenreis angebaut, um einen großen Teil der Rodungskosten zu decken. War das Land für Reis nicht mehr ergiebig genug sind die Flächen für die Rinderhaltung aufbereitet worden.

Durch diese Vorbehandlung der sowieso schon an Phosphor armen Böden ist es zu einer weiteren Verarmung an Phosphor gekommen (vergl. Kapitel : Botulismus in Brasilien). Um die Mitte des letzten Jahrhunderts sind zunehmend robuste und bei diesen Klimabedingungen ertragreiche Futtergräser der Gattung *Brachiaria* (überwiegend *Brachiaria decumbens*) gesät worden, die inzwischen den überwiegenden Teil des Weidegrases ausmachen. Diese Gramineen tolerieren Phosphorarmut des Bodens, weshalb sie besonders in schnellen Wachstumsphasen der Regenzeit sehr phosphorarm sind, und zählen zu den aluminium-resistenten Arten (MILES et al. 1996).

Auch auf den befragten und besuchten Betrieben waren *Brachiaria*-Arten die vorherrschenden Futterpflanzen. Nur auf einem Betrieb wurde in den letzten Jahren auch andere Futtergräser, die zu afrikanischen Panicumarten gehören, angebaut.

### 3.3.3. Haltungsformen

Die übliche Tierhaltungsform für Mastrinder in Brasilien ist die extensive Weidehaltung. Das gesamte Weideland der Betriebe wird dazu in Umtriebsweiden aufgeteilt. Tiere unterschiedlichen Alters und Nutzungsrichtung (Zucht und Mast) können so voneinander getrennt gehalten und die Parzellen im Rotationssystem beweidet werden. Die Kontrolle der Herden erfolgt in der Regel durch berittene Hirten. Bei Bedarf, z. B. zur Markierung, Impfung oder Kastration, werden die Tiere zu einem zentralen Ort zusammengetrieben, wo dann im Treibgang die gesamte Herde behandelt werden kann, während Einzeltiere mit dem Lasso gefangen werden. Eine Supplementierung mit Mineralstoffen oder Ergänzungsfuttermitteln erfolgt in der extensiven Haltungsform mit auf den einzelnen Weiden verteilten Leckstellen. Es sind meist überdachte Tröge mit unterschiedlich großem Platzangebot für das Einzeltier, die unterschiedlich oft gefüllt werden. Die Leckstellen sind in der Regel an für die Rinder gut zugänglichen Orten angelegt. In der Trockenperiode wird dort oft Kraftfutter zugefüttert, um die Gewichtsverluste während dieser Zeit möglichst gering zu halten.

Die extensive Weidewirtschaft unterliegt unterschiedlichen Managementsystemen. Auf einigen Betrieben werden Tierzukäufe möglichst vermieden und auf anderen werden regelmäßig Tiere zugekauft.

Milchvieh auf familiären Betrieben wird häufig auf die gleiche Weise gehalten, die Tiere werden dann zu den Melkzeiten zusammengetrieben, wobei die Kälber nur zu den Melkzeiten zur Kuh gelassen werden.

Großbetriebe in der intensiven Fleisch- und Milchproduktion haben sich dem nordamerikanischen bzw. europäischen Muster stark angenähert. Ein großes Problem ist hierbei die Futterbereitstellung, weshalb in manchen Feedlots für die Wiederkäuerernährung nur bedingt geeignete Futtermittel (aufgeschlossene Zuckerrohrrückstände, getrocknete Citruschalen) eingesetzt werden. Eine adäquate Grundfuttergewinnung kann in den trockeneren Gebieten nur durch Bewässerung erfolgen, die aber bedingt durch die hügelige Topographie technisch aufwendig und damit teuer ist. Gefüttert wird Grassilage (Panicumarten), manchmal auch Mais- oder Hirsesilage. Die Feedlots dienen der Endmast, die Aufzucht bis zum Alter von etwa 12 Monaten erfolgt extensiv. Häufig werden Feedlots auch ausschließlich mit billig eingekauften Tieren bestückt, bei denen auf Rasse und Gesundheitszustand wenig Wert gelegt wird.

### 3.3.4. Rinderrassen

In der extensiven Fleischproduktion dominieren Zebu der Rasse Nelore. Taurine Rassen sind Simmental, Blonde d'Aquitaine, Angus und andere Fleischrassen. Kreuzungen sind häufig, beliebt sind vor allem Simmental x Nelore oder Brahman x Angus. Auf einigen Betrieben werden mehrere Rassen zu dem dort bevorzugten robusten Fleischtyp gekreuzt und als Kreuzungsrasse weitergezüchtet. Im Feedlot finden sich in der Regel alle Rassen und Kreuzungen. Es werden Jungtiere gekauft und ausgemästet, deren Rasse offensichtlich nicht der entscheidende Faktor ist.

In der kleinbäuerlichen Milchviehhaltung wird bevorzugt ein aus Gir (indisches Zebu) x Holandes (Holstein Friesian Abkömmlinge) entstandenes Kreuzungsprodukt gehalten, welches Girolanda genannt wird und sich durch gute Milchproduktion und Robustheit auszeichnet. In der intensiven Milchviehhaltung in Großbetrieben werden aufgrund der besseren Milchproduktion vorzugsweise reinrassige Holandes genutzt.

Die wohl überwiegende Anzahl der extensiven Fleischproduktionsbetriebe hält eigene Bullen für die natürliche Reproduktion. Viele Milch- und Fleischproduktionsbetriebe betreiben auch künstliche Besamung.

### 3.3.5. Krankheiten

Wie in anderen tropischen Ländern spielen in Brasilien typische Rinderkrankheiten eine große Rolle.

Die häufigsten Ursachen für große Tierverluste in der extensiven Weidehaltung sind Botulismus, Tollwut und Pflanzenvergiftungen (DÖBEREINER et al. 1992). Ekto- und Endoparasitenbefall und die von ihnen übertragenen Krankheiten sowie Anaerobieninfektionen sind überwiegend bei Jungtieren ein großes Problem. Staatliche Bekämpfungsprogramme und jahreszeitlich festgelegte Impfungen für alle Tiere gibt es nur für Maul- und Klauenseuche. Gegen Tuberkulose und Brucellose, die weit verbreitet sind, soll ein staatliches Bekämpfungsprogramm erst ab 2003 eingeführt werden. Das Risiko der Einschleppung bei Tierzukäufen ist dadurch sehr hoch. Tierkontrollen staatlicher Veterinäre erwecken bei den Tierhaltern häufig Misstrauen. In neuerer Zeit wird von staatlicher Seite die Vernichtung von aus BSE gefährdeten europäischen Ländern importiertem Zuchtvieh propagiert.

## 3.2. Felduntersuchungen

### 3.2.1. Material und Methoden

Um einen Überblick über die Botulismussituation im Untersuchungsgebiet zu gewinnen wurden Gespräche mit verschiedenen Personen aus beteiligten Berufsgruppen geführt (In der Landwirtschaft tätige Personen, wie Hirten oder Vorarbeiter, aber auch Tierhalter und Veterinäre).

Einige Tierhalter wurden anschließend gesondert befragt um sich mit der spezifischen Situation einzelner Betriebe vertraut zu machen. Das Vorkommen von Botulismus wurde dabei nicht als ausschließliches Kriterium benutzt. Es wurde vielmehr Wert darauf gelegt, aus verschiedenen Haltungsformen einen für die Region typischen Betrieb zu identifizieren und Gründe für das Vorkommen oder Fehlen von Botulismus zu finden um anschließend mögliche Lösungsansätze erarbeiten zu können.

Die Tierhalterbefragungen wurden mittels eines Fragebogens durchgeführt (Anlage). Dieser Fragebogen beinhaltet allgemeine Angaben zum befragten Betrieb wie z. B. der überwiegend gehaltenen Tierrasse und der zur Zeit im Betrieb gehaltenen Anzahl der Tiere. Des Weiteren wurden Fragen zur Betriebsform, zur Produktionsrichtung des Betriebes und der Art der Grundfütterversorgung einschliesslich der überwiegenden Art der vorhandenen Futtergräser gestellt. Die Betriebsform wurde ebenfalls ermittelt. Dies beinhaltete Informationen zum Weidemanagement, so z. B. ob Möglichkeiten zur Bewässerung vorhanden waren und wie das Tränkwasser gewonnen wurde. Außerdem wurden Fragen zu Ergänzungsfuttermitteln und zur Mineralstoffsupplementierung der Tiere gestellt. Wichtig war auch, ob die Betriebe regelmäßige Impfungen durchführen und gegen welche Erkrankungen vakziniert wurde. Besonderer Wert wurde auf Fragen zum Botulismusgeschehen, dessen Vorbeuge, Diagnose und Bekämpfung gelegt. Gefragt wurde auch, was mit den jeweiligen Kadavern bzw. Kadavern im allgemeinen geschieht.

### 3.2.2. Ergebnisse

#### 3.2.2.1. Tierhalterbefragung

Die besuchten Betriebe lagen im Westen des Bundesstaates São Paulo (2-6) bzw. im Südwesten des Bundesstaates Goiás. Tab. 6 zeigt eine Zusammenstellung der allgemeinen Daten. Es handelte sich um drei extensiv produzierende Mastbetriebe, einen Intensivmastbetrieb, einen kleinbäuerlichen Milchproduzenten und einen Milch erzeugenden größeren familiären Betrieb.

Tab. 6: Zusammenstellung der Betriebssituation

Betrieb	Ort	Nutzungs- richtung	Haltungsform/ Grundfutter	Rasse	Anzahl der Tiere	Ergänzungs- futter	Mineral- futter	Impfungen Art/Monat
1	Santa Vittoria	Mastrinder Reproduktion	Extensiv Weide	Nelore Kreuzungs- tiere	ca. 2100	Hühner-einstreu	k.A.	MKS 2, 5, 11
2	Birigui	Milchvieh Reproduktion	Extensiv Weide	Girolanda	35 Kühe+ Nachzucht	Silage	k.A.	MKS 2, 5, 11
3	Santa Fe do Sul	Mastrinder Reproduktion	Extensiv Weide	Nelore Kreuzungs- tiere	k.A.	k.A.	Ja	MKS 2, 5, 11 Clostridiosen 2
4	Valparaiso	Mastrinder Reproduktion	Extensiv Weide	Nelore Simmental Simbrasil	ca. 3200	nur für Kälber	Ja	MKS 3, 5, 11 Brucellose 6-8 mon., Clostridiosen 30-45d, und 6-8 mon
5	Bonanza	Mastrinder	Intensiv Grassilage Maissilage Hirsesilage	Nelore Simmental Holandes Kreuzungs- tiere Simbrasil	ca. 10000	k.A.	k.A.	MKS 2, 5, 11 Clostridiosen beim Aufställen
6	Lins	Milchvieh Reproduktion	Extensiv mit starker Zufütterung	Girolanda Holandes	k.A.	Maisschrot Sojaschrot Silage	k.A.	MKS: 2, 5, 11 Brucellose Leptospirose BVD/MD IBR Clostridiose

k.A.: keine Angaben

Die Rasse Nelore war auf den überwiegend Fleisch produzierenden Betrieben die am Meisten genutzte Rasse, während auf den Milch erzeugenden Betrieben das Holandes das Girolanda, gehalten wird. Die Betriebsgrößen waren sehr unterschiedlich. Der Betrieb Nr. 5 kaufte ausschließlich Tiere hinzu, während die anderen Betriebe die eigene Nachzucht selbst produzierten.

### 3.2.2.2. Botulismussituation der einzelnen Betriebe

In Tab 7a wird die Botulismussituation der besuchten Betriebe dargestellt. Aufgeführt ist, auf welchen der Betriebe schon Botulismuserkrankungen vorkamen und welche Quellen dafür in Frage kamen. Des Weiteren ist der Verbleib der anfallenden Kadaver auf den Betrieben dargestellt.

Alle Betriebe hatten bestimmte abgeteilte Areale zur Kadaverbeseitigung. Zwei Betriebe verbrachten die Kadaver an einen dafür bestimmten Platz und ließen sie oberirdisch verwesen. Ein Betrieb hat die Kadaver zunächst verbrannt und anschließend vergraben, während ein anderer Betrieb die Kadaver nur vergraben hat. In einem Fall war ca. 6 Wochen vor dem Ausbruch gegen Botulismus geimpft worden. Bei drei der vier betroffenen Betriebe konnte jeweils von den verbliebenen Kadavern Proben genommen werden. Bei zwei Betrieben konnte von Kulturen Toxin der Typen C und D neutralisiert werden. Bei einem anderen Betrieb konnte aus Erdproben, die an der Stelle, wo die Kadaver vergraben worden waren, entnommen wurde, aus Kulturen der Toxintyp A neutralisiert werden und ein BoNt Typ A bildender Stamm isoliert werden (siehe Kap.4.2.1.8). Bei einem Betrieb konnte in keiner genommenen Probe BoNT nachgewiesen werden. Tab. 7b zeigt das angewendete Impfprogramm, die Anzahl der Fälle nach erfolgter Impfung, sowie wie lange geimpft wurde, warum die regelmäßige Impfung ausgesetzt wurde und ob neue Fälle von Botulismus aufgetreten sind oder nicht und wie viele neu aufgetretene Fälle es gab.

Die Diagnose Botulismus war in allen Fällen vom Tierarzt des Betriebes festgestellt und anhand von Laboruntersuchungen bestätigt worden (Tab. 7a). Die Verluste der Betriebe variieren stark, wie auch die Letalität. In den Milch liefernden Betrieben haben einige Tiere die Erkrankung überlebt, während in den Mastbetrieben alle erkrankten Tiere verendet sind. Impfungen wurden in der Regel erst nach dem erfolgten Ausbruch durchgeführt, ein Betrieb hatte vor dem Ausbruch bereits geimpft. Die Impfungen wurden meist ein bis zwei Jahre durchgeführt und dann ausgesetzt.

Tab. 7a: Botulismussituation der einzelnen Betriebe

Betrieb	Botulismusfälle Monat/Jahr	Quelle der Intoxikation	Probennahme/ Gespräch Monat/ Jahr	Tote/ Erkrankte Tiere	Verbleib anfallender Kadaver	Probenart	Toxintyp	Diagnose
1	Nov 99	Masthühner Einstreu	Jan 00	242/ ?	Kadaverplatz	Kadaver Boden	C/D	TA/ Labor
2	Aug 99	Silage	Nov 99	9/14	Kadaverplatz	Kadaver Boden	C/D	TA/ Labor
3	Nov 99	Osteophagie	Jan 00	12/12	Verbrannt	-	-	TA/ Labor
4	-	-	-	-	Verbrannt Asche vergraben	-	-	
5	Aug 99	Silage	Dez 99	k.A.	Vergraben	Boden Knochenteile	A/D	TA/ Labor
6	Jun 00	?	Jun 00	1/4	-	Kot Vogelkadaver Sojaschrot Maisschrot	-	TA/ Labor

k.A.: keine Angaben

Tab. 7b: Impfregime der besuchten Betriebe

Betrieb	Impfung		Impfstoff	Anzahl der Fälle nach erfolgter Impfung	Wie lange wurde geimpft	Gründe für das Aussetzen der Impfung	Weitere Fälle/ nach x Jahren
	vor Ausbruch	nach Ausbruch					
1	Nein	Ja	Botulina	0	direkt nach dem Ausbruch	Tierbesitzer glaubt nicht der Diagnose Botulismus	k.A.
2	Ja	Ja	C/D Toxoid	14	schon vor Ausbruch	Kein Aussetzen	k.A.
3	Nein	Ja	Vaxall/ Botulina	0	2 Jahre	Tierbesitzer glaubte nicht mehr an das Risiko	02. Mai
4	-	-	-	-	-	-	-
5	Nein	Ja	?	0	betroffene Tiergruppe	turnusmäßiger Wechsel der Tiere	k.A.
6	Nein	Ja	Botulina	0	nach dem Ausbruch	k.A.	k.A.



### 3.2.3. Diskussion

#### 3.2.3.1. Tierhalterbefragung

Es zeigte sich, dass die Tierhalter der Befragung sehr skeptisch gegenüber standen. Telefonisch war eine Befragung nicht erwünscht und konnte somit auf den Betrieben nur persönlich durchgeführt werden.

Die allgemein beschriebene Situation der Tierhalter deckte sich in etwa mit der im Kapitel „allgemeine Standortbedingungen“ geschilderten Situation in Brasilien. Die überwiegende Nutzungsrichtung ist die Fleischproduktion mit den weitaus größeren Tierzahlen auf den einzelnen Betrieben. Die bevorzugt gehaltene Rasse für die Fleischproduktion ist das Nelore, deren Ursprung das indische Ongole ist. Von den insgesamt ca. 160 Mio. Rindern in Brasilien sind etwa 100 Mio. der Rasse Nelore zuzurechnen (OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, 1997). Zunehmend werden auch Kreuzungstiere aus Nelore und Fleischrassen des taurinen Typs gehalten, um den Heterosis-Effekt auszunutzen. Ergänzungsfuttermittel werden in der Regel bei der Extensivhaltung nicht eingesetzt. Je nach Bestandsgröße und vorhandener Weidefläche ist allerdings in der Trockenzeit eine Supplementierung notwendig. Einige Betriebe füttern in der Trockenzeit zu, um nicht zu deutliche Gewichtsabnahmen bei den Tieren zu haben. Aufgrund des geringen Gehaltes an frei verfügbarem Phosphor im Boden muss Mineralfutter supplementiert werden. Es zeigte sich, dass Leckstellen mancher Betriebe ungünstig konstruiert sind. Teilweise ist das Platzangebot pro Tier nicht groß genug oder die Leckstellen haben kein Dach, sodass die Mineralien bei Regen weggespült werden. DUTRA (2001) beschreibt, dass 89 % der untersuchten Betriebe keine korrekte Mineralstoffversorgung durchführen.

Die angegebenen Impfungen gegen die Maul- und Klauenseuche entsprechen den staatlichen Richtlinien für das Bekämpfungsprogramm (KRZYZANIAK et al., 2001). Als Kontrolle der erfolgten Impfung nutzt der Staat ausschließlich die von den pharmazeutischen Zwischenhändlern ausgestellten Rechnungsbelege. Die Impfung wird meist von Angestellten des Betriebes selbst durchgeführt und unterliegt keiner weiteren Kontrolle. Bemerkenswert war, dass die Tierhalter immer wieder berichteten, viele andere Tierbesitzer würden zwar den Impfstoff kaufen, um den Beleg zu erhalten, jedoch die Tiere nicht impfen. Um die Arbeit des Zusammentreibens zu sparen würde der gekaufte Maul- und Klauenseuche-Impfstoff vernichtet. Staatliche Bekämpfungsprogramme gegen andere Rinderkrankheiten wie z. B. Brucellose und Tuberkulose sind zur Zeit im Aufbau.

#### 3.2.3.2. Botulismussituation der einzelnen Betriebe

Bei der Betrachtung der Botulismussituation der einzelnen Betriebe wird deutlich, dass die Tierbesitzer über die Pathogenese des Botulismus sehr wenig informiert sind, obwohl Botulismus, neben Tollwut und Pflanzenvergiftungen, zu den Krankheiten gehört, die bei adulten Rindern die meisten Totalverluste hervorrufen (DÖBEREINER et al., 1992). Die Kadaverbeseitigung erfolgt auf dem Betrieb entweder auf einem separaten Kadaverplatz oder die Tiere werden verbrannt oder vergraben. Wie schon erwähnt, konnten aus allen

Kadaverproben und auch aus den vergrabenen Kadavern lebende Sporen von *C. botulinum* nachgewiesen werden. Das Risiko, dass aasfressende Gürteltiere die Kadaver oder Teile davon verbreiten oder wieder ausgraben und damit eine Intoxikationsquelle für Weidetiere schaffen, ist relativ groß (DUTRA, 2001). Manchmal werden Kadaver auch gar nicht beseitigt, sondern einfach auf der Weide liegen gelassen, damit aasfressende Tiere wie Geier oder Gürteltiere die Beseitigung übernehmen. Geier können Rinderhaut mit ihren Schnäbeln nur an weicheren Stellen wie Maul oder After öffnen, sodass sie den Kadaver nur teilweise fressen können, der weitaus größere Teil bleibt für Aasinsekten und die bakterielle Zersetzung.

Der Kadaverbeseitigung kommt eine große Bedeutung zu, können doch auf der Weide liegen gelassene oder wieder ausgegrabene Kadaverteile bei phosphor-insuffizienten Tieren zu Osteophagie und zum erneuten Ausbrechen der Krankheit führen (DÖBEREINER et al., 1992; KRIEK und ODENDAAL, 1994).

Nur in einem Fall wurde vor den Ausbrüchen schon geimpft, was darauf schließen lässt, dass die Tierbesitzer nicht präventiv arbeiten, sondern erst aktiv werden, wenn es zu größeren Verlusten gekommen ist. Eine durchschnittliche Sterblichkeitsrate von etwa 3 % bei adulten Rindern wird in vielen Betrieben als normal angesehen und nicht weiter verfolgt. DUTRA (2001) beschreibt, dass 95,79 % der von ihm untersuchten Betriebe vor dem Botulismusausbruch nicht vakziniert hatten. Das plötzliche Auftreten von Krankheiten wird als ein akutes Problem der vorhandenen Tiere angesehen, sodass davon ausgegangen wird, man könne durch einen Tierwechsel das Botulismusproblem beheben. Bei einer Bodenseuche im Gegensatz zu einer reinen Infektionskrankheit ist dies aber nicht der Fall, was besonders bei Betrieb 3 deutlich wird, wo es fünf Jahre nach Aussetzen der Impfung wieder zu den ersten Fällen gekommen war. Leider konnten die Betriebe nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, um beurteilen zu können, ob sich auf solchen Betrieben die Botulismusfälle häufen, oder ob durch besseres Management Botulismus verhindert werden kann. Besonders interessant gestaltete sich die Situation bei Betrieb 1. Die Tiere wurden aufgrund fehlender Weidemöglichkeit mit Hühnermist gefüttert und entwickelten drei Tage später die ersten Symptome. Aufgrund des klinischen Bildes diagnostizierte der hinzugezogene Tierarzt Botulismus und riet die Tiere zu impfen und den Hühnermist nicht weiter zu verfüttern. Der Tierbesitzer ließ die Tiere impfen und den Lagerbereich des Hühnermistes abzäunen. Trotz der Abzäunung hatten sich die Tiere weiterhin Zugang zu dem Hühnermist verschafft. Es traten aber keine weiteren Fälle von Botulismuserkrankungen auf. Trotz offensichtlicher Schutzwirkung der Vakzine glaubte der Tierbesitzer der Diagnose des Tierarztes nicht.

Bei zwei Betrieben war das Verfüttern schlechter Silage der Grund für das Auftreten von Botulismus. In beiden Fällen wurde dieser Verdacht durch Laboruntersuchungen bestätigt (DUTRA, 2000). Botulismusausbrüche durch fehlgelegene Silage sind in Brasilien häufiger zu beobachten. DUTRA et al. (2001) berichten von drei Ausbrüchen, in denen sowohl in der Silage als auch in Proben der verendeten Tiere BoNT Typ C oder D und Sporen dieser Typen nachweisbar waren. Insgesamt sind bei diesen Ausbrüchen auf drei Betrieben 521 Tiere verendet, was einer Mortalität von 6,36 % entsprach.

## 42 Felduntersuchungen

---

Bei einem Betrieb (6) konnte keine Intoxikationsquelle gefunden werden. Untersuchte Futtermittel, wie auch ein in der Silage gefundener Vogelkadaver zeigten keine Hinweise auf das Vorhandensein von *C. botulinum*. Die Tiere hatten keinen Zugang zu stehenden oder fließenden Gewässern, sodass die Ursache für diesen Ausbruch unklar bleibt. Die Intoxikation der Tiere war eher als subakut einzustufen. Die vier erkrankten Tiere zeigten nur milde Krankheitssymptome und erholten sich alle bis auf eines, welches geschlachtet wurde.

Der besuchte Betrieb (4), auf dem bisher kein Fall von Botulismus aufgetreten war, hatte im Unterschied zu den anderen extensiven Betrieben überwiegend afrikanische *Panicum*-Gräser als Weidegras, während die anderen Betriebe (bis auf den im Feedlot fütternden Betrieb) überwiegend *Brachiaria*-Arten als Futtergräser angebaut haben. Ebenso war die Mineralstoffversorgung der Tiere auf diesem Betrieb gut organisiert. Durch andere Erkrankungen anfallende Kadaver wurden zuerst verbrannt und dann die Überreste tief vergraben.

### 3.3. Bakteriologische Untersuchungen

#### 3.3.1. Material und Methoden

Eine Übersicht über sämtliche verwendeten Gerätschaften, Kulturmedien, Reagenzien und Nachweissubstanzen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden, findet sich in alphabetischer Reihenfolge im Anhang.

##### 3.3.1.1. Herkunft der Referenzstämmen

Für morphologische und gaschromatographische Vergleiche sowie als positive Kontrolle in der Toxinneutralisation und PCR wurden die in Tab. 8 aufgelisteten *C. botulinum*-Stämme als Referenzstämmen benutzt.

Tab. 8: Herkunft der als Referenzstämmen benutzten *C. botulinum*-Stämme

Nummer <sup>1</sup>	Bakterienspezies	Ursprungsbezeichnung	Herkunft
2298	<i>C. botulinum</i> Typ A	62 A	Japan <sup>2</sup>
2299	<i>C. botulinum</i> Typ B	Okra	Japan <sup>2</sup>
2300	<i>C. botulinum</i> Typ C	003-9	Japan <sup>2</sup>
2301	<i>C. botulinum</i> Typ D	CB-16	Japan <sup>2</sup>
2302	<i>C. botulinum</i> Typ E	35396	Japan <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Stammsammlungsnummer Institut für Tropentierhygiene

<sup>2</sup> Osaka Prefecture University, Osaka; freundlicherweise von S. Kozaki zur Verfügung gestellt

##### 3.3.1.2. Herstellung der anaeroben Atmosphäre

Die anaerobe Atmosphäre in den Anaerobentöpfen wurde bei den Versuchen in Deutschland mit dem Anoxomat® (MART) hergestellt. Spezielle Vakuumpexiglastöpfe derselben Firma dienen als Anaerobenkammer, in die Petrischalen und Kulturröhrchen zur anaeroben Inkubation gestellt werden konnten. Die im Topf befindliche Luft wurde über eine Vakuumpumpe abgesaugt und mit N<sub>2</sub> ersetzt. Dieser Vorgang wurde zur weiteren Reduzierung des Restsauerstoffes 2 x wiederholt. Zum Abschluss wurde ein Gasgemisch (aus 90 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 10 % H<sub>2</sub>) eingeleitet. Mit im Topfdeckel befestigten Platinkatalysatoren reduzierte der Wasserstoff im Gasgemisch den Restsauerstoff zu Wasser. Da dieses Gasgenerationssystem in Brasilien nicht zur Verfügung stand, musste bei den dort durchgeführten Versuchen auf die Gasgenerationssysteme AnaeroGen® (OXOID) und Anaerocult® (MERCK) zurückgegriffen werden.

Soweit im Folgenden nicht abweichend vermerkt, wurden sämtliche Inkubationsschritte unter anaerober Atmosphäre 48 h bei 37 °C durchgeführt.

##### 3.3.1.3. Herstellung des Bakterienpools aus den Referenzstämmen

Jeweils ein Röhrchen (2mL) der Stämme wurde aus der Stammsammlung (Lagerung bei -80 °C) entnommen und im Wasserbad bei 37 °C 15 min aufgetaut. Anschließend wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens in ein 5 mL RCM enthaltendes Kulturröhrchen einpipettiert. Zum

Anwachsen der Kultur wurde das inokulierte Röhrchen anaerob bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die gut gewachsene Kultur mit der Glaspipette durchmischt und jeweils 2 mL auf zwei weitere Kulturröhrchen mit 20 mL RCM gegeben und wieder anaerob inkubiert. Die so erhaltenen 40 mL wurden als Ausgangsmaterial zu 1 mL in sterile Plastikröhrchen (Polypropylen Twist Top<sup>®</sup> Vials, ROTH) abgefüllt und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.3.1.4. Herstellung der Sporensuspension von Referenzstämmen

Jeweils ein 1 mL Röhrchen des Bakterienpools wurde bei 37 °C 15 min im Wasserbad aufgetaut und der gesamte Inhalt in ein 5 mL RCM Röhrchen überführt. Nach anaerober Inkubation wurde 0,1 mL der gut gewachsenen Kultur auf eine Blutagarplatte pipettiert, mit einem Drigalskispatel ausgespatelt und die Agarplatte zunächst 48 h anaerob bebrütet. Von den auf den Blutagarplatten gewachsenen Kolonien wurden Objektträgerausstriche angefertigt und die Platten sofort wieder in anaerober Atmosphäre inkubiert. Mit Hilfe der mit Sporenfärbungen (modif. nach Rackett) gefärbten Objektträger wurde das Verhältnis Zellzahl/Sporen geschätzt. Dies wurde nach weiteren 48 h Bebrütungszeit wiederholt. Waren auf dem gefärbten Objektträger kaum noch vegetative Zellen zu finden (ca. 5-7 d Bebrütungszeit), wurden die Agarplatten mit wenig GPP gespült und die Kolonien mit Hilfe eines sterilen Spatels gelöst. Die so erhaltene Suspension wurde in sterile Schraubdeckelröhrchen abgefüllt und auf  $1,1-1,5 \times 10^4$  Sporen/mL mit GPP eingestellt. Die Sporensuspensionen wurden zu 1 mL in Polypropylenröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.1.5. Sporenzählung (MPN-Methode)

In 2 mL Schraubdeckelröhrchen wurde jeweils 0,9 mL Medium abgefüllt. Die Sporensuspension wurde zur Aktivierung der Sporen 30 min bei 60 °C im Wasserbad erhitzt und 0,1 mL in das erste Verdünnungsröhrchen pipettiert. Nach heftigem Schütteln wurde dem ersten Verdünnungsröhrchen 0,1 mL entnommen und dem 2. Verdünnungsröhrchen zugegeben. Dieser Vorgang wurde bis zur 9. Verdünnungsstufe wiederholt und weitere 4 Verdünnungsreihen auf die gleiche Weise angesetzt. Alle so erhaltenen Röhrchen wurden dann anaerob inkubiert.

Die Kalkulation der Menge der enthaltenen Sporen erfolgte nach der Wahrscheinlichkeitstabelle nach GRADY (CRUICKSHANK et al.; 1975). Dazu wurde die Anzahl der bewachsenen Kulturröhrchen in jeder Verdünnungsstufe notiert. Hieraus kann anhand der Wahrscheinlichkeitstabelle die Sporenanzahl abgelesen werden.

### 3.3.1.6. Herkunft der Antitoxine

Da die Versuche z.T. in Deutschland und z. T. in Brasilien durchgeführt worden sind, musste zur Identifikation der Toxintypen das im jeweiligen Land zu beschaffende Antitoxin verwendet werden. Eine Übersicht über die zur Neutralisation eingesetzten Antitoxine gibt Tab. 9.

Tab. 9: Herkunft der zur Neutralisation verwendeten Antitoxine

	Deutschland		Brasilien	
	Titer IU/mL	Herkunft	Titer IU/mL	Herkunft
<i>C. botulinum</i> Typ A	10	CDC	13400	Lelystad
<i>C. botulinum</i> Typ B	10	CDC	25600	Lelystad
<i>C. botulinum</i> Typ C	1000	Onderstepoort	1000	Onderstepoort
	10	CDC		
<i>C. botulinum</i> Typ D	1000	Onderstepoort	1000	Onderstepoort
	10	CDC		
<i>C. botulinum</i> Typ E	10	CDC	25600	Lelystad
<i>C. botulinum</i> Typ F	10	CDC	20060	Lelystad
<i>C. botulinum</i> Typ G	10	CDC	unbekannt	Lelystad

### 3.3.1.7. Herkunft der Proben

Bei dem untersuchten Probenmaterial handelte es sich um Erd- und Kadaverproben. Die Probennahme erfolgte während des Aufenthaltes in Brasilien. Die Proben wurden auf Betrieben genommen, die bis zu 2 Jahre zurückliegende Botulismusausbrüche gehabt hatten (Tab. 10).

Tab. 10: Herkunft der Proben

Ort	Datum	Nummer	Kadaveralter	Probenart
Faz. São Antonio	22.10.99	01	1997	Boden mit Knochenteilen
Birigui	01.11.99	02-08, 25	6 Wochen	Boden, Panseninhalt, Knochen
Jucelândia	15.11.99	09-12	10 Monate	Boden, Panseninhalt
Juçara	15.11.99	13	?	verbrannter Tierkörper
Saõ Miguel do Araguaia	17.11.99	14-19	ca. 6 Monate	Boden, Panseninhalt
Britânia	15.11.99	20-24	5 Wochen	Boden
Faz. Bonança	14.12.99	26-28	6 Monate	Erdaushub mit Knochen
Santa Vitoria	28.01.00	29-58	8 Wochen	Boden, Panseninhalt
Fernandopolis	16.02.00	59-63	12 Monate	Boden; Knochenteile
Jales	11.05.00	64-68	8 Monate	Boden, Knochenteile, Hundekot
Lins	01.06.00	69-73	-	Futterproben
Campo Grande	14.08.00	74-76	-	Knochen/Boden
Araçatuba	1.06.00	77	-	Kot, klinisch erkranktes Rind
Passos	23.08.00	78, 79	-	Hühnereinstreu, Sojaschrot
Anlieferung Labor	24.08.00	1793	unbekannt	Vogelkadaver

### 3.3.1.8. Probennahme

Die Probennahme richtete sich nach der jeweiligen Probenart. Bodenproben wurden unter dem Kadaver oder aus einem Umkreis von ca. 20 cm um den Kadaver gezogen. Die Bezeichnung Panseninhalt beschreibt ehemals pflanzliches Probenmaterial, welches aus der Pansenregion

des Kadavers entnommen wurde. Die Proben wurden nach der Entnahme zu jeweils ca. 250 g in Plastiktüten verpackt. Nach dem Transport ins Labor erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C. Mit den Futterproben wurde gleich verfahren. Proben, die im Labor der Universität Araçatuba angeliefert wurden, lagerten bis zur Aufarbeitung ebenfalls bei -20 °C.

### 3.3.1.8.1. Probenbearbeitung

Nach dem Auftauen der Proben wurde etwa 5 g entnommen, in ein steriles Reagenzglas gegeben und mit 5 mL GPP versetzt. Die Probe wurde durch vorsichtiges Schütteln mit GPP vermengt und über Nacht bei +4 °C gelagert. Der verbleibende Rest der Probe wurde wieder eingefroren. Am darauf folgenden Tag wurden 0,5 mL des Probe/GPP-Gemisches in 5 mL Flüssigmedium gegeben. Die Probe wurde dann 30 min im Wasserbad bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe auf RT abgekühlt und je nach Versuchsaufbau 2-7 d anaerob bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurde die Mischkultur auf ein Festmedium ausgestrichen und weiter 2 d anaerob bei 37 °C bebrütet. Der nach Zentrifugation (4000 x g, 5 min) erhaltene Überstand der ersten Flüssigkulturen wurde auf vorhandene Toxizität überprüft. Im Mäusetest toxische Proben wurden zur Bestimmung des Toxintyps neutralisiert.

### 3.3.1.8.2. Überprüfung der Toxizität

Die Überprüfung der Toxizität der nach der ersten Inkubation der Proben erhaltenen Mischkulturen erfolgte anhand des Maus Bioassay in Anlehnung an das bei HOLDEMANN (1977) beschriebene Verfahren.

Nach Zentrifugation der Flüssigkulturen (4000 x g, 5 min) wurden 0,5 mL des Überstandes dem Versuchstier (NMRI-Maus, 20-25 g) intraperitoneal injiziert. Die Beobachtungszeit der Versuchstiere betrug 4 d. Verendete das Versuchstier innerhalb der Beobachtungszeit oder zeigte sich bei dem Versuchstier die für Botulismus typische Wespentaille, schloss sich eine Charakterisierung des gebildeten Toxins mit Hilfe der Neutralisation an.

### 3.3.1.8.3. Identifikation des gebildeten Toxins

Im Tierversuch positive Proben wurden zur Identifikation des gebildeten Toxins mit *C. botulinum*-Antitoxinen neutralisiert. Die Durchführung erfolgte je nach verwendetem Toxin den Herstellerangaben entsprechend nach folgendem Muster: 0,5 mL der zu testenden Probe wurde mit Antitoxin des zu testenden Typs versetzt und zur Bildung des Toxin-Antikörper-Komplexes inkubiert (siehe Tab. 11). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Probe-Antitoxin-Gemisch Mäusen i.p. injiziert. In Abwandlung der bei HOLDEMAN (1977) beschriebenen Durchführung der Neutralisation wurde nicht für jedes Antitoxin ein Versuchstier verwendet, sondern es wurden die Antitoxine A, B, und E und die Antitoxine C und D gemeinsam neutralisiert, so dass für jede Neutralisation nur 3 Versuchstiere genutzt wurden: die positive Probe als Kontrolle, die positive Probe neutralisiert mit den Antitoxintypen A, B und E und die positive Probe neutralisiert mit den Antitoxintypen C und D. Lag nach der ersten Neutralisation noch kein Ergebnis vor, da alle Versuchstiere einschließlich der positiven Kontrolle verendet waren, wurde die Probe in einzelnen Verdünnungsschritten 1:2, 1:5 bis 1:10 verdünnt und die Neutralisation in oben geschilderter Weise wiederholt.

Tab. 11: Mengenangaben der zur Neutralisation verwendeten Antitoxine

Antitoxine	$\mu\text{L}$ Antitoxin pro 0,5 mL Probe	Inkubation
Lelystad	25	2 h bei Raumtemperatur
Onderstepoort	25	2 h bei Raumtemperatur
CDC	125	30 min bei 37 °C

### 3.3.1.9. Erregerisolation

Die Erregerisolation erfolgte den allgemein üblichen Grundsätzen über die Vereinzelnung von Mischkulturen auf Festmedien. Die im Tierversuch und der anschließenden Neutralisation positiv auf *C. botulinum* getesteten Mischkulturen wurden mit einer Pasteurpipette dem Flüssigmedium entnommen, auf Festmedium aufgebracht und mit einer Platinimpföse vereinzelt. Je nach Versuchsansatz wurden dazu unterschiedliche Festmedien verwendet, die bei der Beschreibung der einzelnen Versuche aufgeführt werden.

Die in Pufferlösung angesetzten und über Nacht bei 4 °C gelagerten, zuvor positiv getesteten Proben wurden in Flüssigmedium gegeben und nach 2-5tägiger Bebrütungsdauer unter anaerober Atmosphäre und bei 33-37 °C auf Festmedien gebracht, ein Verdünnungsausstrich angelegt und nach 2tägiger anaerober Bebrütung bei 37 °C die so erhaltenen Platten beurteilt. Jede verdächtige (*C.-botulinum-*) Kolonie wurde in Flüssigmedium verbracht und sofort wieder unter anaerober Atmosphäre bei 37 °C 2-5 d inkubiert. Zur mikromorphologischen Beurteilung wurde von jeder Kolonie ein Objektträgerausstrich angefertigt und nach Gram gefärbt. Nach weiterer Bebrütungszeit im Flüssigmedium wurde die erhaltene Kultur nochmals auf Eigelbagar, Blutagar und DST ausgestrichen, anaerob und aerob (DST) bebrütet und die Reinheit über die Koloniemorphologie und einen nochmals angefertigten Objektträgerausstrich überprüft. Die so erhaltenen Kulturen wurden zunächst morphologisch mittels Gramfärbung und dem Wachstumsverhalten auf den Festmedien und biochemisch bezüglich der Bildung von Lipase, Lezithinase und Proteolyse auf Eigelbagar beurteilt. Alle gram-positiven bis gram-labilen anaerob wachsenden und lipase- und oder lezithinase-bildenden Kulturen wurden als verdächtige *C. botulinum-* Kolonien weiter untersucht (vergl. folgende Kapitel).

#### 3.3.1.9.1. Medienversuche zur Erregerisolation

Den vielfältigen Literaturangaben zu optimalen Isolationsmedien folgend, wurden unterschiedliche Versuchsansätze mit variierenden Fest- und Flüssigmedien auf ihre Eignung zur Isolation von toxischen Kulturen von *C. botulinum* Typ C und D getestet. Die Stämme 2300 (*C. botulinum* Typ C) und 2301 (*C. botulinum* Typ D) dienten dabei als positive Kontrollstämme. 10 g sterile Erde wurde mit 1 mL Sporensuspension der Stämme 2300 und 2301 versetzt und nach dem in Tab. 12 beschriebenen Standardansatz sowie mit den ebenfalls aufgeführten Variationen die Reisolierung versucht. Die gesammelten Proben wurden anschließend entsprechend untersucht.



Tab. 12: Methoden zur Erregerisolation

	Probenver- dünnungspuffer	Flüssigmedium Probe	Bebrütungsdauer/ -temperatur	Festmedien	Bebrütungsdauer/ -temperatur	Flüssig medium	Bebrütungsdauer/ -temperatur
a) Standard	GPP	RCM	5d, 37 °C	EA, BA, DST	2d, 37 °C	RCM	5d, 37 °C
b) Variation	GPP	RCM	5d, 37 °C	TPGY mit/ ohne AB	2d, 37 °C	RCM	5d, 37 °C
c) Variation	GPP	RCM/CMM	2d , 37 °C	EA mit / ohne AB, BA, DST	2d, 37 °C	CMM	5d, 37 °C
d) Alkoholbe- handlung	GPP	CMM	2d, 37 °C	EA, BA, DST	2d, 37 °C	CMM	5d, 37 °C
e) direkte Inokulation	-	CMM	1d, 37 °C	FAAB, FAAE	1d, 37 °C	CMM	3d, 37 °C
f) Über- schichten mit DTT	GPP	CMM	2d, 37 °C	RCA plus DTT	2d, 37 °C	CMM	5d, 37 °C
g) Eingiessen	GPP	CMM	2d, 37 °C	TPGY mit AB	2d, 37 °C	CMM	5d, 37 °C
h) Über- schichten mit spez. AK	GPP	CMM	2d, 37 °C	TPGY mit AB	2d, 37 °C	CMM	5d, 37 °C

Die Reinheitskontrolle erfolgte jeweils auf EA, BA, DST, 2d, bei 37 °C

zu d) Alkoholbehandlung

1 mL Kulturbouillon wird bei RT mit 1 mL 96%igem Alkohol vermischt und 1 h unter gelegentlichem Rühren stehen gelassen. Gemisch bei 4000 x g 10 min zentrifugieren und Überstand abnehmen. Pellet in 1 mL sterilem GPP resuspendieren und Agarplatten beimpfen.

zu f) Überschichtung mit DTT

In Abweichung zu den zuvor beschriebenen Versuchen wurden die Referenzstämme und ausgewählte positive Proben weiteren Versuchen zur Erregerisolation unterzogen. Dabei wurde die in Flüssigmedium angezogene Kultur auf Festmedium ausgestrichen und sofort mit DTT überschichtet. Das verwendete Festmedium RCA war zur besseren Erkennbarkeit der *C. botulinum* Kolonien mit Eigelbsuspension und zur Unterdrückung der Begleitflora mit Antibiotikazusatz versehen. Die Agarplatten wurden, sobald der Overlay erhärtet war, inkubiert. Nach 48 h wurden lipase/lecithinase-positive Kolonien mit Hilfe einer Pasteurpipette durch den Overlayagar ausgestochen und im Flüssigmedium inkubiert.

zu g) Eingiessen in Festmedium

Zur Reduktion des während des Ausstreichens auf die Kulturen einwirkenden Sauerstoffs wurden die Referenzstämme 2300 und 2301 und parallel dazu einige ausgewählte Proben in das Festmedium eingegossen. Dazu wurden die Proben wie oben beschrieben in GPP angesetzt. Nach 2 d Bebrütungszeit wurde aus der Flüssigkultur 1 mL entnommen und dezimale Verdünnungen in mit 0,9 mL RCM gefüllten Schraubdeckelröhrchen bis zur Verdünnungsstufe  $10^5$  angelegt. In einem Vorversuch wurde die einzusetzende günstigste Verdünnungsstufe ermittelt, mit der in dem ausgegossenen Festmedium noch einzelne Kolonien voneinander abtrennbar sind. Das zuvor in 20 mL Schraubdeckelröhrchen zu 10 mL abgefüllte und autoklavierte Festmedium (TPGY) wurde im Wasserbad wieder verflüssigt und dann auf 55 °C abgekühlt. Der Antibiotikazusatz und die Eigelbemulsion wurden dem Festmedium den Herstellungsvorschriften entsprechend zugegeben und so lange vorsichtig auf dem Röhrchenschüttler (Vortex) geschüttelt bis eine homogene Lösung entstand. Die Verdünnungen  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  der Vorkulturen wurden zu je 0,01 und 0,05 mL dem Festmedium (10 mL) zugesetzt, geschüttelt und in sterile Plastikpetrischalen gegossen. Nach Aushärten des Agars wurden die Platten sofort inkubiert. Nach 48 h Bebrütungszeit wurden lipase/lecithinase-positive Kolonien mit Hilfe einer Pasteurpipette ausgestochen und im Flüssigmedium inkubiert.

zu h) Überschichtung mit spezifische Antikörper enthaltendem Agarosegel

Dazu wurden frisch in RCM angesetzte Kulturen der Referenzstämme und einiger ausgewählter Proben nach 5 d Bebrütungszeit im Flüssigmedium zunächst 1:100 verdünnt und anschließend von dieser Verdünnung 0,1 mL auf RCA ohne Zusätze mittels Glasspatel ausgespatelt und 2 d inkubiert. Anschließend an die erste Bebrütungszeit wurden die bewachsenen Agarplatten mit Agarosegel, welches mit Antiserum der Typen C und D (Onderstepoort) versetzt war, überschichtet. Nach weiteren 2 d Bebrütungszeit wurden die überschichteten Agarplatten begutachtet und jede Kolonie mit einem Präzipitathof im Agarosegel mittels Pasteurpipette ausgestochen und in Flüssigmedium weiter bebrütet.

### 3.3.1.9.2. Prüfung der Proben auf *C.-botulinum*-wachstumshemmende Substanzen

Zur Überprüfung, ob Substanzen in der Kulturbouillon gebildet werden, die das Wachstum von *C. botulinum* hemmen, wurde je 1 mL sterilfiltrierter Kulturüberstand auf zwei EA-Platten (ohne AB) pipettiert und mit Hilfe eines Drigalskispatels verteilt. Nach dem Einziehen der Flüssigkeit in den Agar wurden auf je einer Agarplatte die Referenzstämme 2300 und 2301 (*C. botulinum* C und D) ausgespatelt. Die dazu verwendeten Kulturen waren jeweils am Vortag aus dem Bakterienpool entnommen und frisch angezüchtet worden. Anschließend wurden die Platten anaerob inkubiert und nach 2 d begutachtet. Das Wachstum der Referenzstämme auf den behandelten Agarplatten wurde mit der Anzahl der gleichzeitig ausgestrichenen unbehandelten EA-Platten verglichen.

### 3.3.1.9.3. Prüfung der Proben auf *C.-botulinum*-wachstumshemmende Mikroorganismen

In den Mischkulturen der Proben gewachsene Bakterien wurden auf ihr Potential, das Wachstum von *C. botulinum* zu hemmen, überprüft. Die verwendeten Mischkulturen waren wie zur Erregeridentifikation (vergl. Kapitel 3.3.1.8.3.) 4 d in RCM anaerob bebrütet worden. Diese Mischkultur wurde aufgeschüttelt und dezimal bis zu  $10^{-4}$  in GPP verdünnt. In einem Vorversuch wurde ermittelt, welche Konzentration gerade noch einzelne Kolonien auf einer ausgestrichenen Agarplatte bei 2tägigem Wachstum erzeugt. 0,1 mL der  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  Verdünnungen wurden dazu auf EA-Platten (ohne AB) ausgespatelt und anaerob 2 d bebrütet. Nach der Bebrütungszeit wurden die Platten mit einem *C.-botulinum*-enthaltendem Agar (Stämme 2300 und 2301) übergossen und wieder für 2 d inkubiert. Die Stämme 2300 und 2301 wurden dazu frisch angezüchtet (vergl. vorhergende Kapitel) und 1 mL der gewachsenen Kulturbouillon in 10 mL sterilen, flüssigen und auf 50 °C gekühlten Agar (E A Base, ohne Eigelb und AB) einpipettiert, geschüttelt und auf den mit der Mischkultur bewachsenen Agar aufgegossen. Die Platten wurden dann für weitere 2 Tage bebrütet und begutachtet.

### 3.3.1.10. Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Sporenzahl

Die Gesamtsporenzahl in einigen ausgewählten Proben wurde mit Hilfe der im Kapitel „Sporenzählung“ beschriebenen Methode ermittelt. Dazu wurde die in GPP angesetzte und über Nacht bei 4 °C gelagerte Probe 30 min bei 60 °C im Wasserbad erhitzt und in RCM verdünnt. Um abschätzen zu können bis zu welcher Verdünnungsstufe noch *C. botulinum*-Sporen in der Kulturbouillon vorhanden waren, wurden sämtliche bewachsenen Röhrchen aus den Verdünnungsreihen einiger Proben zur Toxinbildung 5 d bebrütet und im Tierversuch auf gebildetes Toxin getestet.

### 3.3.1.11. Identifikation der Isolate

Die Identifikation der erhaltenen Isolate bis zur Genus-Ebene erfolgte über das Wachstumsverhalten, das mikromorphologische Erscheinungsbild und über ausgewählte biochemische Leistungen.

Es wurden die Koloniemorphologie und die ausschliessliche anaerobe Wachstumsweise beurteilt. Mit Hilfe der Gramfärbung und der Sporenfärbung (nach Rakette) erfolgte die Beurteilung des mikromorphologischen Erscheinungsbildes.

Die Beweglichkeit einzelner Kulturen wurde mit der Technik des hängenden Tropfens überprüft. Dazu wurden die zu testenden Kulturen frisch in einem 5 mL Schraubdeckelröhrchen mit RCM angezogen und 24 h bei 37 °C im Anaerobentopf bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurde den zu testenden Kulturröhrchen nach vorsichtiger Durchmischung mit der Pasteurpipette ein Tropfen Flüssigkeit entnommen und auf ein Deckglas gegeben. Ein zuvor in der Größe eines Deckgläschens mit Vaseline eingefasster Hohlsliffobjektträger wurde dann auf das mit dem Tropfen Kulturbouillon versehene Deckglas aufgedrückt, umgedreht und unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Verdächtige Kulturen wurden weiteren Untersuchungen unterzogen.

#### 3.3.1.11.1. Überprüfung der Toxizität

Die Toxizität der Reinkulturen wurde im Tierversuch geprüft. Die Kulturen wurden dazu auf CMM überimpft und 7 d im Anaerobentopf bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden die festen Bestandteile des Mediums bei 4000 x g/ 5 min vorsichtig abzentrifugiert und 0,5 mL des Überstandes einem Versuchstier intraperitoneal injiziert. Die Beobachtungszeit der Versuchstiere betrug 4 d. Zeigte das Versuchstier Botulismussymptome (s.o.) oder verendete während der Beobachtungszeit, wurde mittels Neutralisation der Toxintyp ermittelt (vergl. Identifikation des Toxintyps).

#### 3.3.1.11.2. Gaschromatographie

Um die, wie in Kapitel 3.3.1.9 beschrieben, erhaltenen Isolate bis zur Speziesebene zu identifizieren, wurden die in der Zytoplasmamembran der Bakterienzellen enthaltenen längerkettigen Fettsäuren bestimmt (HEITFUSS, 1991). Bei diesem Verfahren werden die schwer flüchtigen langkettigen Fettsäuren zunächst durch alkalische Verseifung als Carbonsäuresalze freigesetzt, welche dann in einem Methylierungsschritt in Methylester umgewandelt und anschliessend gaschromatographisch erfasst werden.

##### 3.3.1.11.2.1. Vorbereitung der Kulturen

Um möglichst mit der am Institut für Tropentierhygiene vorhandenen Datenbank vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die zu prüfenden Kulturen bis zur gemeinsamen Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden am Tag 0 aufgetaut und 2 mL Kulturbouillon in 5 mL RCM verbracht. Die Inkubation erfolgte im Anaerobentopf. Am Tag 2 wurden 2 mL der Proben auf 20 mL RCM überimpft und ebenfalls für 2 d anaerob inkubiert.

##### 3.3.1.11.2.2. Extraktion der Fettsäuren

Von jeder wie oben angezüchteten Probe wurden 20 mL bewachsene Kulturbouillon auf je zwei Zentrifugieröhrchen (Pyrex) mit Schraubdeckel und Teflondichtung verteilt und bei 4000 x g 15

min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 5 mL physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und die Zellsuspension in ein einzelnes Pyrexröhrchen vereinigt. Anschließend wurde erneut bei 4000 x g 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 1 mL Reagenz 1 (siehe Anhang) resuspendiert, gründlich auf dem Vortex gemischt und 5 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. Nach nochmaligem Durchmischen wurde die Probe 25 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt um die Fettsäuren vollständig zu verseifen. Danach wurde die Probe sofort im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Methylierung der nun vorliegenden Fettsäuresalze wurde der Probe 2 mL Reagenz 2 zugegeben und nach gründlicher Durchmischung auf dem Vortex 10 min im Wasserbad bei 80 °C erhitzt, wonach die Probe sofort wieder im Eiswasser auf Raumtemperatur gekühlt wurde. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des Reagenz 3, von welchem 1,25 mL der Probe zugegeben und die Lösungen vorsichtig auf dem Rotationsschüttler im Pyrexröhrchen für 10 min durchgemischt wurden. Folgend wurde die Probe 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurde anschließend vorsichtig die untere wässrige Phase abgenommen und verworfen.

Um restliche vorhandene Verunreinigungen aus den in der organischen Phase vorliegenden Fettsäuremethylestern zu entfernen wurde den Proben 3 mL Reagenz 4 zugesetzt. Danach wurden die Proben 5 min auf dem Rotationsschüttler vorsichtig gemischt, anschließend 5 min bei 4000 x g zentrifugiert und sofort bei -20 °C eingefroren. Die obere organische Phase gefriert dabei nicht und kann direkt zur Analyse abgenommen werden.

### 3.3.1.11.2.3. Gaschromatographische Analyse

Der Gaschromatograph Sigma 2000 (PERKIN-ELMER, PVMS-54 (5 % Phenyl-Vinyl-Methyl-Silica-Quarzkapillarsäule, Länge 25 m, Filmdicke 0,32 µm ID 0,2 mm) wurde täglich mit einem FAME-Standard geeicht. Ultrareiner Stickstoff diente als Trägergas.

Über einen Split-Injektor ohne Glaswolle wurden pro Analyse jeweils 1 µL der aufbereiteten Probe in den vorgeheizten und geeichten Gaschromatographen injiziert. Das Temperaturprogramm des Gaschromatographen wurde wie folgt gewählt:

Anfangstemperatur	100 °C
1. Heizrate	4 °C/min
1. Endtemperatur	220 °C
2. Heizrate	30 °C/min
2. Endtemperatur	280 °C
Dauer	3 min
Injektortemperatur	350 °C
Detektortemperatur	350 °C
Detektor Auto Zero	0 min, 5 min
Gesamtdauer der Analyse	35 min.

Die durch die hohen Temperaturen in den gasförmigen Zustand übergehenden Fettsäuremethylester durchlaufen in je nach Fettsäure charakteristischer Zeit die Säule, was vom Detektor aufgezeichnet wird. Die gemessenen Zeiten werden dann mit denen des eingesetzten Standards verglichen und den Peaks der einzelnen Fettsäuremethylester zugeordnet. Die Toleranzgrenze (Component Tolerance) liegt dabei bei 0,008 min. Konnte ein in der Probe

vorhandener Fettsäuremethylester nicht zugeordnet werden, wurde der ihm zugeordnete Peak als unbekannt eingestuft.

Um für bekannte und unbekannte Peaks den prozentualen Anteil ihrer Peakflächen bestimmen zu können, wurde die Gesamtfläche der entstandenen Peaks gleich 100 % gesetzt.

### 3.3.1.11.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt um Isolate zu charakterisieren und um festzustellen, ob sie Träger des Gens für die Toxinbildung sind. Zur besseren Übersicht werden die unterschiedlich angewendeten Methoden vor der Darstellung des Ergebnisses beschrieben.

Für die Amplifizierung der Template-DNA wurden die von TAKESHI et al. (1995) entwickelten Primer verwendet (siehe Anhang).

Bei der DNA-Isolation kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung, die DNA-Freisetzung durch Kochen der Probe oder mit Hilfe eines Testkits (Nucleospin Tissue, MACHEREY UND NAGEL). Die Durchführung der beiden Methoden wird im Anhang aufgeführt.

#### DNA-Amplifizierung

Je zu testende Probe (zuzüglich Nullwert) wurde folgender Mastermix eingesetzt (entspricht den Vorgaben des Herstellers, Dynazyme II DNA Polymerasekit, FINNZYMES):

- 5 µL Reaktionspuffer 511
- 1 µL dNTPmix (10mM)
- 1 µL Primer 1
- 1 µL Primer 2
- 0,5 µL DNA Polymerase
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (steril).

Zuerst wurden 3 µL Template-DNA in 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und bis zum Einpipettieren des fertigen Mastermix bei 4 °C gelagert. Dann wurden je nach zu testender Probenmenge die Reagenzien des Mastermix in ein der benötigten Menge entsprechendes Reaktionsgefäß pipettiert. Währenddessen wurden die Reaktionsgefäße mit den Reagenzien und dem Mastermix auf Eis gelagert. Anschließend wurden zu den vorgelegten 3 µL Proben-DNA 47 µL Mastermix hinzupipettiert, geschüttelt und die Probengefäße in den Thermocycler (Primus/MWG BIOTECH) eingesetzt. Nach einer anfänglichen 10minütigen Denaturierungsphase bei 94 °C wurden 30 Zyklen mit 1 min und 94 °C zur Denaturierung, 1 min bei 55 °C zur Anlagerung der Primer und 1 min bei 72 °C zur Extension gefahren. Abschließend wurden die Proben noch 10 min bei 72 °C gehalten um die amplifizierten DNA-Fragmente zu verlängern.

#### Elektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurden 18µL der erhaltenen Amplifikate mit 2 µL Probenpuffer vermischt und in die Vertiefungen der horizontal angeordneten 1%igen

Agarosegele einpipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer bei 0,2 A und 50 V je nach Lauf des Probenpufferfarbstoffes für ca. 30-45 min.

Die Ergebnisse wurden unter ultraviolettem Licht fotografisch dokumentiert.

### 3.3.1.12. Versuche zur Toxinbildung von *C. botulinum*

Mit Hilfe der Referenzstämme 2300 und 2301 wurde ermittelt, ob die verwendeten Festmedien BA und EA die Toxinbildung in RCM stabilisieren. Des Weiteren wurde untersucht, welche Medienzusätze geeignet sind, eine Stabilisierung und Steigerung der Toxinbildung zu erreichen. Es wurde überprüft, welche in der Literatur angewendeten Festmedien und welche Flüssigmediumzusätze zu RCM geeignet sind, die Bildung des Neurotoxins zu verstärken bzw. einzuschränken.

Die Menge des gebildeten Toxins wurde mit Hilfe eines am Institut für Tierhygiene entwickelten Testsystems (Dynabead-Methode) ermittelt (GESSLER, unveröffentlicht).

Dieses Testsystem basiert auf einem ELISA-System. Dabei wird zunächst das zu bestimmende Toxin an monoklonale Anti-Toxin-Mäuseantikörper gebunden. Dann wird ebenfalls an das Toxin ein biotinylierter polyklonaler Anti-Toxin-Ziegenantikörper angelagert. Anschließend werden die so gebildeten Ziegen-AK-Toxin-Mäuse-AK-Komplexe mittels eines Magneten durch an Magnetkügelchen (Dynabeads) gebundene Anti-Mäuse-Antikörper in der Lösung aufkonzentriert. An das Biotin des polyklonalen Anti-Toxin-Ziegenantikörpers wird Streptavidin angelagert, das einen Farbstoff umsetzt, dessen Menge fotometrisch bestimmt werden kann. Die Menge des ursprünglich in der eingesetzten Probe vorhandenen Toxins kann dann über eine Eichreihe errechnet werden.

#### 3.3.1.12.1. Einfluss der eingesetzten Festmedien EA und BA auf die Toxinbildung

Um den Einfluss der eingesetzten Festmedien auf die Toxinbildung zu überprüfen, wurde der Stamm 2300 in einem 10 mL Röhrrchen RCM angezüchtet und unter anaerober Atmosphäre bebrütet. Am Tag 2 wurde 1 mL der Bakteriensuspension in ein 10 mL RCM Röhrrchen überimpft. Beide Röhrrchen wurden dann zur Toxinbildung weitere 2 d bebrütet. So wurde Toxinhaltiger Kulturüberstand von 2- und 4tägiger Wachstumszeit erhalten.

Dann wurden die Röhrrchen zentrifugiert (4000 x g, 10 min), der Überstand abgenommen, mit einem Filter (Porengröße von 0,2 µm, SARTORIUS) steril filtriert und anschließend zu je 1 mL in Polypropylenschraubdeckelröhrrchen aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Das Pellet des nur 2 d gewachsenen Stammes wurde in 1 mL steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschüttelt. Von dieser Suspension wurden je 0,1 mL auf 4 Eigelagarplatten und 4 Blutagarplatten pipettiert und mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Die Platten wurden dann unter anaerober Atmosphäre 2 d bebrütet.

Danach wurden die bewachsenen Platten kontrolliert und zwei der ursprünglich vier EA-platten wieder für 2 d inkubiert. Von den übrigen Agarplatten wurden die gewachsenen Kolonien mit einem Glasspatel vorsichtig von der Agaroberfläche gelöst und in jeweils 1 mL steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde in gleicher Weise, wie oben beschrieben, wieder auf frischen Agarplatten ausgespatelt. Die vom Eigelagar

stammende Suspension wurde wieder auf Eigelbagar ausgestrichen, während die vom Blutagar stammende Suspension sowohl auf Eigelb als auch auf Blutagar ausgespatelt wurde. Diese Agarplatten wurden ebenfalls 2 d inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden von den so erhaltenen Agarplatten die gewachsenen Kolonien wiederum vorsichtig mit einem Glasspatel von der Agaroberfläche gelöst und in 1 mL steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde 1:1 mit RCM verdünnt. Von jeder dieser auf unterschiedlichen Festmedien gewachsenen Bakteriensuspensionen des Stammes 2300 wurden je 100 µL in sechs 1 mL RCM enthaltende Schraubdeckelröhrchen pipettiert, von denen in vier zusätzlich 100 µL der sterilfiltrierten Toxinlösung (2 und 4 d Toxinbildung) zugegeben wurden. In je zwei unbeimpfte 1 mL enthaltende RCM Röhrchen wurde von jeder Toxinlösung 100 µL einpipettiert. Alle so erhaltenen Röhrchen wurden 4 d unter anaerober Atmosphäre bei 37 °C bebrütet und anschließend die gebildete Toxinmenge mit der Dynabead-Methode kalkuliert (Tab.13).

Tab. 13: Beimpfungsschema der Flüssigkultur mit den auf unterschiedlichen Festmedien gewachsenen Referenzstämmen

Verwendetes Festmedium	Toxin 2d <sup>1</sup>	Toxin 4d <sup>2</sup>	ohne
EA 4 d bebrütet	2 <sup>a</sup>	2	2
EA 2 d bebrütet → auf frischem EA 2 d bebrütet	2	2	2
BA 2 d bebrütet → auf EA 2 d bebrütet	2	2	2
BA 2 d bebrütet → auf frischem BA 2 d bebrütet	2	2	2
Kontrolle	2	2	1

<sup>a</sup>: Anzahl der beimpften Röhrchen, <sup>1</sup>: Toxin nach 2tägiger Bebrütungszeit, <sup>2</sup>: Toxin nach 4tägiger Bebrütungszeit

### 3.3.1.12.2. Zusatz von Eisen und Chelatbildner NTTS zum Basismedium RCM

Mit dem Chelatbildner NTTS (Nitrilotriaceticacidtrisodiumsalt) wurde überprüft, welche Wirkung zusätzlich dem Medium zugeführtes Eisen auf die Toxinbildung von *C. botulinum* hat. Dazu wurde RCM nach der im Anhang beschriebenen Anleitung hergestellt und zu je 5 mL in Schraubdeckelröhrchen abgefüllt. Vor dem Autoklavieren wurde einem Teil dieser Röhrchen der Chelatbildner NTTS in 3 mM bzw. 14 mM Endkonzentration zugegeben.

Die eisenhaltige Vorratslösung (2,5 mg in 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) wurde steril filtriert. Nach dem Autoklavieren wurde einigen noch nicht mit dem Chelatbildner versetzten RCM-Röhrchen sterilfiltriertes NTTS ( 3mM bzw. 14 mM) und 100µL der Eisenlösung (Endkonzentration 0,005 g/L Medium) steril zugegeben (siehe Tab. 14). Anschließend wurde 0,5 mL des frisch in RCM angezüchteten und 2 d gewachsenen Stammes 2300 auf die unterschiedlichen RCM-Röhrchen überimpft. Die Inkubationszeit betrug hierbei 5 d unter anaerober Atmosphäre. Die gebildete Toxinmenge wurde mit der Dynabead-Methode bestimmt.



Tab.14: Zusätze zu RCM (Eisen bzw. Chelatbildner)

Röhrchen nummer	RCM mit Zusatz von				
	Fe	NTTS 3 mM autoklaviert	NTTS 3 mM steril filtriert	NTTS 14mM autoklaviert	NTTS 14 mM steril filtriert
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-
5	+	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-
7	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	+
9	+	-	-	+	-
10	+	-	-	-	+

+ = Zugabe

### 3.3.2. Ergebnisse

#### 3.3.2.1. Überprüfung der Toxizität und Identifikation des gebildeten Toxins

Durch den Maus Bioassay und die anschließende Toxinneutralisation konnten bei den untersuchten 80 Proben insgesamt 26 mäusetoxische Proben gefunden werden. Von diesen 26 Proben ließen 25 für Botulismus typische Symptome bei den Versuchstieren erkennen. In Tab. 15 sind die Proben, die in der Anreicherungsbouillon Toxin gebildet haben, aufgelistet.

Alle anderen untersuchten Proben waren im Maus Bioassay nicht mäusetoxisch und wurden somit in Tab.15 nicht mit aufgeführt. Alle 25 positiven Proben konnten mit Botulinumantitoxin der Typen C, D und in einem Fall mit Antitoxin des Typs A neutralisiert werden. Von den 24 mit den Antitoxinen C und D neutralisierbaren Proben waren vier nur mit dem Antitoxin C, sechs nur mit dem Antitoxin D und 14 ausschließlich mit beiden Antitoxinen gemeinsam neutralisierbar. Jede positive Probe wurde mit der gleichen Methode ein zweites Mal getestet. Die Probe Nr. 42, die sich beim ersten Test nur mit den Antitoxintypen C und D neutralisieren ließ, konnte bei der Wiederholung mit dem Antitoxintyp D neutralisiert werden.

Eine Probe (Nr. 16) war nach der Anreicherung in RCM zwar mäusetoxisch, das Versuchstier verendete aber nicht mit den für Botulismus typischen Symptomen. Diese Probe ließ sich nicht mit einem Botulinumantitoxin neutralisieren.

Tab. 15: Die im Maus Bioassay positiven Proben

Probennummer	Probenart	Toxintyp
03	Boden	C
04	Boden	D
07	Boden	D
08	Panseninhalt/Boden	C
21	Panseninhalt	CD
24	Boden/Panseninhalt	C
27	Boden	A
28	Boden/Knochen	D
30	Boden, unterhalb TK	CD
31	Boden, 30 cm Umgebung	CD
32	Panseninhalt	CD
34	Boden, 30 cm Umgebung	CD
37	Boden, 30 cm Umgebung	CD
40	Boden, 30 cm Umgebung	CD
42	Boden, unterhalb TK	CD <sup>1</sup>
43	Boden, 30 cm Umgebung	CD
46	Boden, 30 cm Umgebung	CD
48	Boden, unterhalb TK	CD
49	Boden, 30 cm Umgebung	D
52	Boden, 30 cm Umgebung	CD
54	Boden, unterhalb TK	CD
55	Boden, 30 cm Umgebung	CD
57	Boden, unterhalb TK	CD
58	Boden, 30 cm Umgebung	D
1793	Vogelkadaver	C

<sup>1</sup>: Ergebnis bei Wiederholung des Toxintests Typ D

### 3.3.2.2. Medienversuche zur Erregerisolation

Für die Erregerisolation wurden diejenigen Proben eingesetzt, welche mäusetoxisch waren und sich in der vorhergehenden Toxinneutralisation mit einem BoNT-Antitoxin neutralisieren ließen. Nicht *C. botulinum* enthaltende Proben wurden nicht weiter untersucht. Mit den getesteten Isolationsmethoden wurden insgesamt 403 Isolate aus den gesammelten Proben erhalten. Die so erhaltenen mäusetoxischen Isolate sind in Tabelle 16a/b bis 20a/b. dargestellt. Dabei wurden bei der Verwendung des Standardansatzes (Tab. 16a/b), bei dem RCM zum Vorkultivieren der Probe als auch zum Isolieren verwendet wurde, vier Isolate von 89 überimpften Kolonien gewonnen. Die Kulturen ließen sich bei drei Isolaten mit A, bzw. ABE und in einem Fall mit CD neutralisieren. Von diesen Proben (Isolat-Nummer 5) konnte ein C.

## 58 Bakteriologische Untersuchungen-Ergebnisse

*botulinum* Typ A-Stamm isoliert werden, der sich auch in der PCR als A Toxin-Bildner darstellen ließ (vergl. Kapitel 3.3.2.6.). Die anderen drei toxischen Isolate lagen zunächst nicht in Reinkultur vor und wurden deshalb mit einer Mischung aus BoNT-Antitoxinen neutralisiert. Alle aus diesen Subkulturen gewonnenen Isolate zeigten kein Toxinbildungsvermögen mehr. Die *C.-botulinum*-Typ-C- und Typ-D-Stämme 2300 und 2301 konnten mit Hilfe der Standardmethode reisoliert werden.

Tab. 16a.: Koloniemorphologie und Toxintyp der Isolate, gewonnen unter Verwendung des Standardansatzes mit RCM

Isolat-Nr.	Probe	Agar	Koloniemorphologie	Toxin Typ
5	27	BA	rundlich, grau weiß durchsch., $\beta$ -Häm	A
16	08	EA	rund m. Ausläufern, grau, durchsch., lip-positiv	CD
61	08	EA	grau, durchsch., unregelm. rund, lip-positiv	n nb
213	08	EA	grau, durchsch., unregelm. rund, lip-positiv	ABE

durchsch.: durchscheinend; Häm.: Hämolyse; lip.: Lipase; n nb: nicht neutralisierbar, unregelm.: unregelmäßig;

Tab. 16b.: Mikromorphologie der Isolate, gewonnen unter Verwendung des Standardansatzes mit RCM

Isolat- Nr.	Gramfärbung	Form	Sporen	
			Lage	Form
5	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
16	gram-lab.	ST lange Fäden	subt. auftr. -	oval -
61	gram-lab. gram-lab.	ST ST	term. auftr. subt. auftr.	oval
213	gram-lab.	ST	-	-

auftr.: auftreibend; lab.: labil, ST: Stäbchen; subt.: subterminal; term.: terminal

Die über TPGY-Agar gewonnenen 2 toxischen Isolate von 23 überimpften Kolonien sind in Tab. 17a/b. dargestellt. Eines dieser Isolate (6) konnte mit dem Antitoxin A neutralisiert werden und stammte von derselben Probe wie das Isolat 5. Ein weiteres Isolat aus der Probennummer 48 konnte mit Hilfe der Toxinneutralisation nicht charakterisiert werden. Das Isolat 6 wurde unter Verwendung des TPGY-Agars mit Antibiotikazusatz erhalten, während das Isolat 225 von TPGY-Agar ohne Antibiotikazusatz entstammt.

Tab. 17a: Koloniemorphologie und Toxintyp der von TPGY-Agar überimpften Isolate

Isolat-Nr.	Probe	Agar	Koloniemorphologie	Toxin Typ
6	27	TPGY AB	rundlich grau weiß durchsch., lip.-positiv	A
225	48	TPGY	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv	n nb

durchsch.: durchscheinend; lip.: Lipase; n nb: nicht neutralisierbar, unregelm.: unregelmäßig;

Tab. 17b.: Mikromorphologie der von TPGY-Agar überimpften Isolate

Isolat- Nr.	Gramfärbung	Form	Sporen	
			Lage	Form
6	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
225	gram-lab.	ST	subt. auftr	oval

auftr.: auftreibend; lab.: labil, ST: Stäbchen; subt.: subterminal;

In Tabelle 18a/b sind die toxischen Isolate dargestellt, bei denen die Ausgangsprobe in RCM und die auf Agar gewachsenen Kolonien in CMM überimpft worden waren. Von insgesamt 45 Kolonien bildeten 3 Isolate (70, 71, 87) Toxin, von denen 2 mit Antitoxin ABE neutralisiert werden konnten und ein Isolat nicht neutralisierbar war.

Tab. 18a: Koloniemorphologie und Toxintyp der Isolate der in RCM vorkultivierten Proben, Isolate in CMM subkultiviert

Isolat-Nr.	Probe	Agar	Koloniemorphologie	Toxin Typ
70	08	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv	ABE
71	08	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv.	?
87	08	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv.	ABE

durchsch.: durchscheinend; lip.: Lipase; nnb: nicht neutralisierbar, unregelm.: unregelmäßig;

Tab. 18b: Mikromorphologie der Isolate der in RCM vorkultivierten Proben, Isolate in CMM subkultiviert

Isolat- Nr.	Gramfärbung	Form	Sporen	
			Lage	Form
70	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
	gram-lab.	ST	term auftr.	rund
71	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
	gram-lab.	ST	term auftr.	rund
87	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
	gram-neg.	ST	kokkoid	-

auftr.: auftreibend; lab.: labil, ST: Stäbchen; subt.: subterminal;

Mit in CMM vorkultivierten Proben und CMM subkultivierten Kolonien konnten von insgesamt 127 Subkulturen vier toxische Isolate gewonnen werden. Von diesen Isolaten ließen sich alle vier mit Antitoxin (ABE gemischt) neutralisieren. Bei einer Probe wurden einzelne Antitoxine verwendet. Sie wurde mit Antitoxin Typ A neutralisiert (Tab. 19a/b).

Tab. 19a: Koloniemorphologie und Toxintyp der Isolate der in CMM vorkultivierten Proben, Isolate in CMM subkultiviert

Isolat-Nr.	Probe	Agar	Koloniemorphologie	Toxin Typ
100	08	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv.	ABE
134	48	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv.	A
140	48	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv.	ABE
141	48	EA	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv.	ABE

durchsch.: durchscheinend; lip.: Lipase; unregelm.: unregelmäßig;

## 60 Bakteriologische Untersuchungen-Ergebnisse

Tab. 19b: Mikromorphologie der Isolate der in CMM vorkultivierten Proben, Isolate in CMM subkultiviert

Isolat- Nr.	Gramfärbung	Form	Sporen	
			Lage	Form
100	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
	gram-lab.	ST	term. auftr.	rund-oval
134	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
	gram-lab.	ST	term. auftr.	rund
140	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
141	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval

auftr.: auftreibend; lab.: labil, ST: Stäbchen; subt.: subterminal; term.: terminal

In der Tabelle 20 a/b sind die drei toxischen Subkulturen (von insgesamt 20), die mit Hilfe des FAA isoliert werden konnten, dargestellt. Von diesen Isolaten konnte keine Typbestimmung durchgeführt werden. Eine Subkultur (344) ließ sich sowohl mit den Antitoxinen ABE als auch C und D neutralisieren, während die anderen beiden zunächst toxischen Isolate ihre Toxizität verloren und eine Neutralisation nicht mehr möglich war.

Tab. 20a: Koloniemorphologie und Toxintyp der mittels FAA erhaltenen Isolate

Isolat-Nr.	Probe	Agar	Koloniemorphologie	Toxin Typ
343	04	FAAB	grau durchsch. unregelm. rund, $\beta$ -Häm.	n nb
344	08	FAAE	grau durchsch. unregelm. rund, lip.-positiv, lez-positiv	ABECD
346	49	FAAB	grau durchsch., unregelm. rund, lip.-positiv	n nb

durchsch.: durchscheinend; lip.: Lipase; n nb: nicht neutralisierbar, unregelm.: unregelmäßig;

Tab. 20b: Mikromorphologie und Toxintyp der mittels FAA erhaltenen Isolate

Isolat- Nr.	Gramfärbung	Form	Sporen	
			Lage	Form
343	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
344	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval
346	gram-lab.	ST	subt. auftr.	oval

auftr.: auftreibend; lab.: labil, ST: Stäbchen; subt.: subterminal;

### Versetzen der Proben mit Alkohol

Durch das Versetzen der Vorkulturen mit 96%igem Alkohol, dem anschließenden Ausstreichen auf EA und BA und dem folgenden Kultivieren der Isolate in CMM konnte kein toxisches Isolat gewonnen werden.

### Überschichtung mit DTT

Mit dieser Methode konnte kein toxisches Isolat gewonnen werden. Die einzelnen auf dem Agar gewachsenen Kulturen konnten nicht differenziert werden. Bei EA konnte die Lipase- bzw. Lezithinasereaktion nicht voneinander unterschieden werden. Bei dieser Technik wurden sehr häufig nicht mit der Koloniemorphologie von *C. botulinum* übereinstimmende Subkulturen erhalten. Von insgesamt 24 angelegten Subkulturen wurden bei 14 gram-positive, aerob wachsende sporenbildende Isolate gefunden und als *Bacillus* spp. eingruppiert.

### Eingiessen in Festmedium

Auf diese Weise konnte von den eingesetzten Proben keine toxische Subkultur gewonnen werden. Die im Vorversuch ermittelten Verdünnungsstufen, mit denen gerade noch einzelne Kolonien voneinander abgrenzbar sind, lag bei  $10^4$ . Diese Verdünnungsstufe stellt den Grenzbereich dar, bei dem in Flüssigkultur noch eine Toxinbildung festzustellen ist. Auch bei dieser Technik konnten die Lecithinase bildenden Kolonien nicht von den Lipase bildenden unterschieden werden. Die erhaltenen Subkulturen wurden zur Morphologiebestimmung nochmals auf Eigelbagar und DST ausgestrichen und die Mikromorphologie beurteilt. Von 42 Isolaten wurden sechs als *C. botulinum* verdächtig eingestuft, die aber alle keine Toxinbildung zeigten.

### Überschichtung mit spezifischen Antikörpern

Auch mit dieser Methode konnten keine verwertbaren Isolate erhalten werden. Keine der auf dem Agar gewachsenen Kolonien zeigte eine erkennbare Präzipitatbildung im Agarosegel. Erhaltene Isolate entsprachen nicht der für *C. botulinum* typischen Morphologie.

### 3.3.2.3. Prüfung auf wachstumshemmende Substanzen oder Mikroorganismen

Bei der Überprüfung auf wachstumshemmende Substanzen in der Kulturbouillon der in RCM kultivierten Proben konnte bei den getesteten Referenzstämmen 2300 und 2301 kein Unterschied zu mit sterilfiltrierter Kulturbouillon überschichteten Agarplatten und unbeimpften Platten festgestellt werden. Die Referenzstämmen zeigten auf allen beimpften Platten ein vergleichbares Wachstum.

Wie auch bei dem oben geschilderten Versuch konnten in den untersuchten Proben keine Kolonien gefunden werden, die das Wachstum der Referenzstämmen 2300 und 2301 behindert hätten. Bei allen Proben war ein deutlicher Rasen in dem mit den Referenzstämmen versetzten überschichteten Agar festzustellen.

### 3.3.2.4. Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Sporenzahl

Eine Sporenzählung zur Bestimmung der Gesamtsporenzahl und der Toxin bildenden Sporen wurde bei einigen ausgewählten Proben (03, 04, 27, 49 und 1793) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 21a-e dargestellt. Bei der Bestimmung der Sporenanzahl mit Toxinbildungsvermögen wurde willkürlich angenommen, dass eine überimpfte *C. botulinum* Spore in 5 Tagen Bebrütungszeit ausreichend Toxin bildet, um im Toxintest toxische Verdünnungsstufen zu erzeugen. Bei allen Proben fällt auf, dass die Gesamtsporenzahl deutlich höher ist ( $\log 2$ - $\log 4$ ) als die Anzahl der Sporen, die in der Lage sind, Toxin zu bilden. Eine Typisierung der in den einzelnen Verdünnungsstufen gebildeten Toxine wurde nicht durchgeführt. Die getesteten Proben waren, unverdünnt eingesetzt, alle mit spezifischem *C. botulinum* Antiserum neutralisierbar. Getestet wurden die Probe, die mit Antitoxin Typ A neutralisierbar war, zwei Proben (03 und 1793), die mit Antitoxin Typ C neutralisiert werden konnten und zwei Proben (04 und 49), die mit Antitoxin D neutralisierbar waren.

## 62 Bakteriologische Untersuchungen-Ergebnisse

Tab. 21a: Verdünnungsreihe der Probe 1793

1793	Verdünnungsreihe				
Verdünnungssufe	1	2	3	4	5
10 <sup>-1</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-2</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-3</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-4</sup>	t	t	w	w	w
10 <sup>-5</sup>	t	w	w	w	w
10 <sup>-6</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-7</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-8</sup>	w	-	-	-	-
10 <sup>-9</sup>	-	-	-	-	-
Gesamt	5 x 10 <sup>8</sup> Sporen/g				
Toxin bildende	7 x 10 <sup>4</sup> Sporen/g				

Tab. 21b: Verdünnungsreihe der Probe 03

03	Verdünnungsreihe				
Verdünnungssufe	1	2	3	4	5
10 <sup>-1</sup>	ni	ni	ni	ni	ni
10 <sup>-2</sup>	t	t	ni	ni	t
10 <sup>-3</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-4</sup>	s	w	t	t	w
10 <sup>-5</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-6</sup>	-	w	w	w	w
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-9</sup>	-	-	-	-	-
Gesamt	1,3 x 10 <sup>7</sup> Sporen/ g				
Toxin bildende	8 x 10 <sup>4</sup> Sporen/ g				

Tab. 21c: Verdünnungsreihe der Probe 04 60°

04 60°	Verdünnungsreihe				
Verdünnungssufe	1	2	3	4	5
10 <sup>-1</sup>	ni	t	ni	ni	t
10 <sup>-2</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-3</sup>	t	w	t	t	w
10 <sup>-4</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-5</sup>	w	w	w	w	-
10 <sup>-6</sup>	-	-	w	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-9</sup>	-	-	-	-	-
Gesamt	1,7 x 10 <sup>6</sup> Sporen/ g				
Toxin bildende	8 x 10 <sup>3</sup> Sporen/ g				

Tab. 21d: Verdünnungsreihe der Probe 49 60°

49 60°	Verdünnungsreihe				
Verdünnungssufe	1	2	3	4	5
10 <sup>-1</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-2</sup>	t	t	t	t	t
10 <sup>-3</sup>	w	t	w	t	w
10 <sup>-4</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-5</sup>	w	w	-	w	w
10 <sup>-6</sup>		w	-	w	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-9</sup>	-	-	-	-	-
Gesamt	2,5 x 10 <sup>6</sup> Sporen/ g				
Toxin bildende	5 x 10 <sup>3</sup> Sporen/ g				

Tab. 21e: Verdünnungsreihe der Probe 27

	Verdünnungsreihe				
Verdünnungssufe	1	2	3	4	5
10 <sup>-1</sup>	w	t	w	t	t
10 <sup>-2</sup>	w	w	w	w	t
10 <sup>-3</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-4</sup>	w	w	w	w	w
10 <sup>-5</sup>	w	w	-	-	w
10 <sup>-6</sup>	-	w	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-
10 <sup>-9</sup>	-	-	-	-	-
Gesamt	1,0 x 10 <sup>4</sup> Sporen/g				
Toxin bildende	nicht bestimmbar				

Legende:

t: Mäusetoxisch, Maus tot

s: Botulismussymptome, überlebt

w: gewachsen, aber nicht toxisch

-: nicht gewachsen

ni: nicht ipM, aber gewachsen

### 3.3.2.5. Gaschromatographie

Tab. 22 zeigt die mit der Gaschromatographie differenzierten Isolate. Von den 35 untersuchten Subkulturen konnten bei 8 Isolaten hohe Übereinstimmungen (Korrelationskoeffizient höher als 0,950) mit verschiedenen *C. botulinum* Referenzstämmen gefunden werden. Bei allen Isolaten außer bei Nr. 161 konnte keine Toxinbildung festgestellt werden. Die Isolate Nr. 172 und 186 sind Subkulturen toxischer Isolate, deren Nummer in Klammern hinter der Isolatnummer (Tab. 22) angegeben ist.

Tab. 22: Ergebnis der gaschromatographischen Differenzierung

Isolat-Nr.	Probe (Toxintyp)	aus Isolat (Toxintyp)	Korrelationskoeffizient	Typstamm (Stammsammlungsnummer)
12	04 (D)	-	0,982	<i>C. novyi</i> (1082)
103	48 (CD)	-	0,995	<i>C. botulinum</i> Typ C (1030)
104	08 (C)	-	0,950	<i>C. botulinum</i> Typ C (2256)
105	49 (D)	-	0,977	<i>C. botulinum</i> Typ D (1031)
106	08 (C)	-	0,985	<i>C. botulinum</i> Typ C (1030)
161	27 (A)	-	0,989	<i>C. botulinum</i> Typ F (2272)
172	08 (C)	87 (ABE)	0,962	<i>C. botulinum</i> Typ A (2298)
186	08 (C)	70 (ABE)	0,971	<i>C. botulinum</i> Typ C (2300)

Die Isolat-Nr. 161, deren gebildetes Toxin mit dem Antitoxin A neutralisiert werden konnte, stimmte dabei zu 98,9 % mit dem gaschromatographischen Fettsäuremuster von *C. botulinum* Typ F überein.

Isolat-Nr. 12, die in der Kultur kein Toxin bildete, deren in der Vorkultur gebildetes Toxin aber mit Antitoxin Typ D neutralisierbar war, zeigte eine 98,2 %ige Übereinstimmung mit den Fettsäuremustern von *C. novyi*.

Bei einer Subkultur aus der Proben-Nr. 48, welche in der Vorkultur mit den beiden Antitoxinen C und D neutralisierbar war, fanden sich 99,5 %ige Übereinstimmungen mit dem Fettsäuremuster von *C. botulinum* Typ C.

Die beiden Toxin bildenden Subkulturen 172 und 186, die mit den Antitoxinen A, B und E neutralisiert wurden, stimmten zu 96,2 % (172) mit *C. botulinum* Typ A bzw. 97,1 % (186) mit *C. botulinum* Typ C überein. Deren Vorkultur aus der Probe 08 war mit dem Antitoxin Typ C neutralisiert worden.

Das atoxische Isolat 105 aus der Probe 49 stimmte zu 97,7 % mit dem Fettsäuremuster von *C. botulinum* Typ D überein. Die Vorkultur der Probe 49 war mit Antitoxin Typ D neutralisiert worden.

Subkulturen (104 und 106) aus der Probennummer 08, die in der Vorkultur mit dem Antitoxin C neutralisierbar gewesen war, konnten zu 95,0 % (105) bzw. 98,5 % in Übereinstimmung mit dem Fettsäuremuster von *C. botulinum* Typ C gebracht werden.



3.3.2.6. PCR zur Identifikation von *C. botulinum*

Mit Hilfe der PCR wurde zunächst überprüft, ob die angewendete Standardmethode zur Identifikation von *C. botulinum* aus Boden geeignet ist. Dazu wurde 10 g steriler Boden mit 10 mL steriler GPP und 2 mL einer zuvor 5 d unter anaeroben Bedingungen bebrüteten Kultur des Stammes 2300 versetzt und 2 min geschüttelt. Von dieser Suspension wurden je 0,5 mL in 2 Röhrcchen RCM pipettiert und 2 BA- Platten beimpft. Die BA- Platten wurden 1 d bebrütet, die gewachsenen Kolonien in RCM überimpft und 1 d unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Aus den gewachsenen RCM-Röhrcchen wurde die DNA isoliert, die PCR durchgeführt und anschließend elektrophoretisch die gebildeten DNA Fragmente dargestellt. Das Ergebnis ist in Abb. 6 dargestellt.

Bahn 1 zeigt die positive Kontrolle, Bahn 2 blieb frei und in Bahn 3 sind die Amplifikate des Impfstammes zu sehen. Die Bahnen 4 und 5 zeigen die Amplifikate der mit dem beimpften Boden versetzten RCM, die Bahnen 6 und 7 zeigen die Amplifikate der von den BA-Platten reisolierten und in RCM angezogenen Kolonien. In Bahn 8 ist der Leerwert ohne Template-DNA.

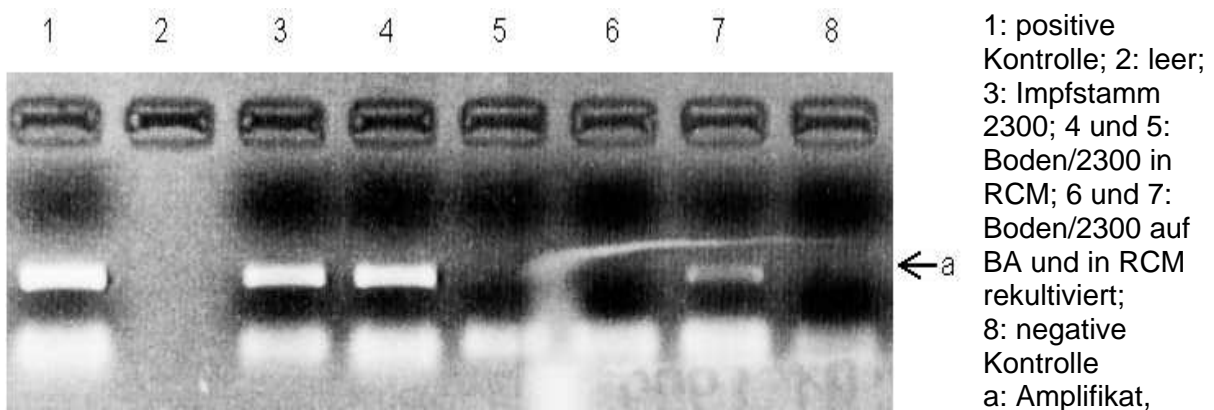


Abb. 6: PCR Gel, sterilisierter Boden beimpft mit dem Referenzstamm 2300

In den Bahnen 3, 4 und 7 findet sich jeweils ein in der PCR gebildetes Amplifikat, welches sich auf gleicher Höhe mit dem der positiven Kontrolle befindet. Auffallend ist dabei das unterschiedliche Ergebnis der jeweils gleich beimpften Proben in den Bahnen 4 und 5 bzw. 6 und 7. Bei beiden angewendeten Methoden ist jeweils eine der Proben ohne gebildetes Amplifikat.

Die Wiederholung dieses Versuchs in leicht abgewandelter Form erbrachte ein ähnliches Ergebnis.

Dazu wurde, wie im vorhergehenden Versuch, sterilisierter Boden mit den Referenzstämmen 2300 und 2301 beimpft, mit GPP vermischt und auf Kulturmedium gebracht. Es wurden je 2 Röhrcchen RCM mit 0,5 mL dieses Gemisches beimpft und auf jeweils 2 BA und 2 EA- Platten ein Verdünnungsausstrich angefertigt. Die Platten wurden 1 d unter anaerober Atmosphäre bebrütet und am folgenden Tag von den jeweiligen Agarplatten Kolonien in RCM subkultiviert, welche ebenfalls einen Tag bebrütet wurden. Nach der DNA-Isolierung wurde die PCR durchgeführt und die entstandenen Amplifikate in der Elektrophorese aufgetrennt.

In Abb. 7 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Hierbei sind ausschließlich gebildete Amplifikate bei den positiven Kontrollen der beiden Referenzstämmen 2300 und 2301 zu erkennen. Bei den anderen getesteten Proben konnte keine Amplifikatbildung festgestellt werden.

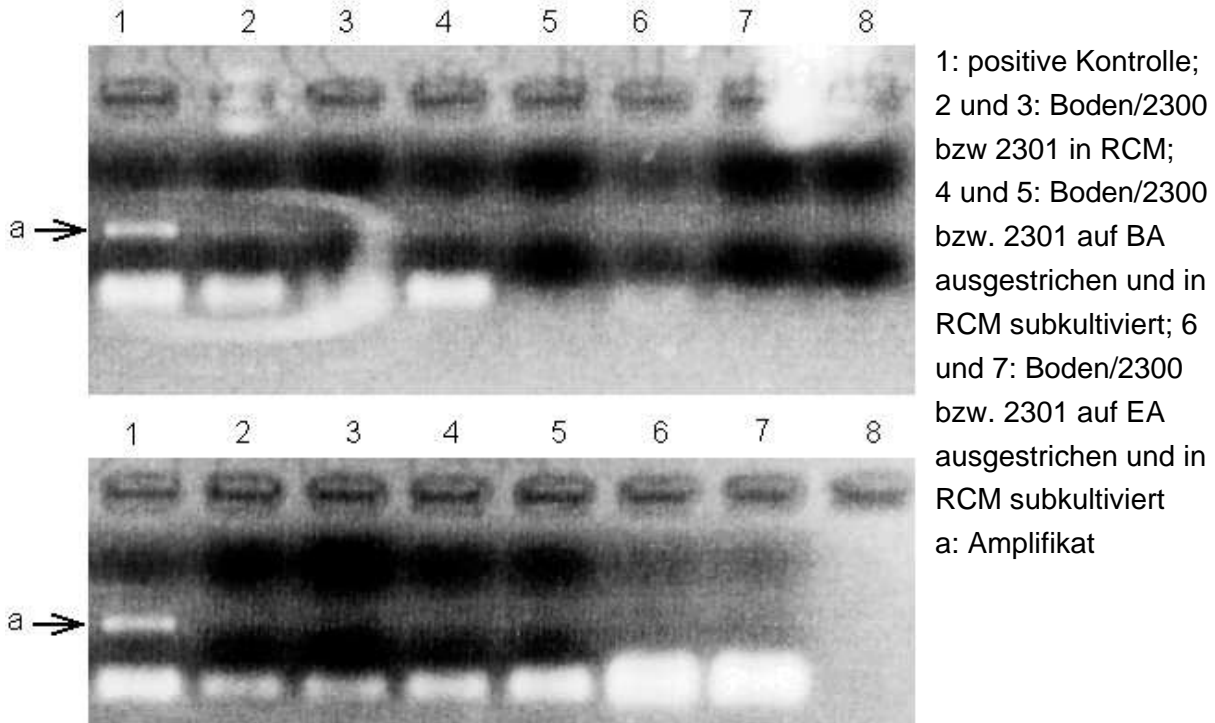


Abb. 7: Referenzstämmen 2300 (oberer Teil) und 2301 (unterer Teil) vermischt mit sterilem Boden und auf unterschiedlichen Medien subkultiviert.

Identifikation des Toxintyps mittels PCR direkt aus Bodenproben

In Abb. 8 sind die Ergebnisse der PCR von verschiedenen Subkulturen dargestellt, deren Vorkultur im Neutralisationstest mit den Antitoxinen C oder D neutralisierbar war.

Tab. 23: Belegung der einzelnen Bahnen aus Abb. 8.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	kb-St.	pos.	03 (C)	04 (D)	08 (C)	42 (D)	49 (D)	55 (CD)	57 (CD)	Kontr.

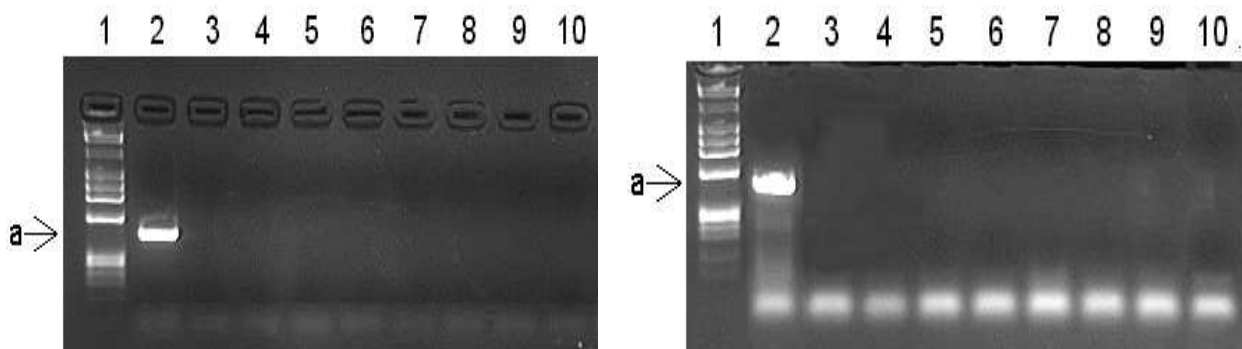


Abb. 8: Ergebnis der PCR einiger Subkulturen mit den Primern C11 und C22 (links) bzw. D11 und D22 (rechts)

Es handelt sich dabei um Proben, die wie oben beschrieben in RCM bebrütet und zur Eliminierung eventuell die PCR störender Bodenpartikel aus der Originalkultur vor der DNA-Isolation zweifach über RCM passagiert worden sind. Bei der ersten Passage wurde die Toxinbildung überprüft, die in allen Fällen erhalten war. Die zweite Passage wurde zur DNA-Isolation nur 1 d bebrütet, auf die Toxizitätsprüfung wurde deshalb verzichtet. Eine Amplifikatbildung findet sich hier nur bei der positiven Kontrolle.

PCR zur Identifizierung der Isolate

In der PCR wurde kontrolliert, ob die mittels Toxinneutralisation eingeordneten Isolate ein positives Signal erzeugen. Getestet wurden ein Isolat aus der Probe 27, dessen Toxin sich mit Antitoxin Typ A neutralisieren ließ und einige toxische Subkulturen, deren Vorkulturen mit den Antitoxinen C und D neutralisierbar gewesen waren.

Abb. 9 zeigt das Ergebnis der PCR einer toxischen und mit Antitoxin A neutralisierbaren Subkultur (Nr. S96) aus dem Isolat Nr. 6 (Probe 27). In den Bahnen 3 und 4, der positiven Kontrolle (Stamm 2298) und in den Bahnen 5 und 6 (S96) findet sich ein Amplifikat.

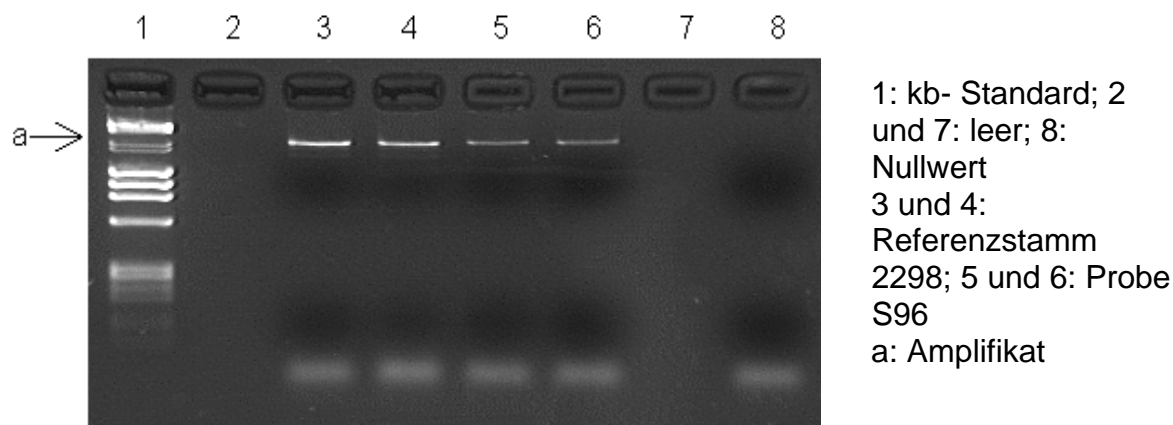


Abb. 9: PCR zur Identifikation der Subkultur S96 (Probe 27)

In Abb. 10 a/b ist das Ergebnis der PCR einiger Isolate aus den Probennummern 03, 04, 08, 49 und 58, die auf FAA kultiviert wurden, dargestellt. Die untersuchten Isolate waren zuvor im Maus Bioassay toxisch getestet, konnten aber mittels Toxintest nicht identifiziert werden, da sie keine Mäusetoxizität mehr zeigten. In der PCR konnten diese Isolate kein Signal erzeugen.

Tab. 24a: Belegung der einzelnen Bahnen aus Abb. 21a.

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8
Probe	kb-St.	03	04	08	49	58	pos.	neg.

Tab. 24b: Belegung der einzelnen Bahnen aus Abb. 21b

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8
Probe	kb-St.	pos.	03	04	08	49	58	neg.

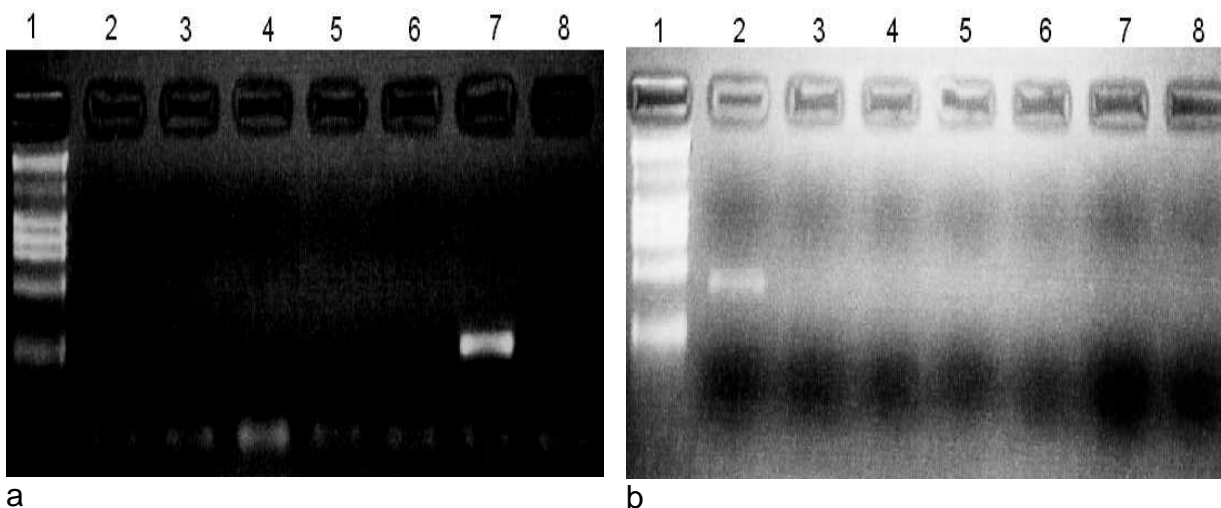
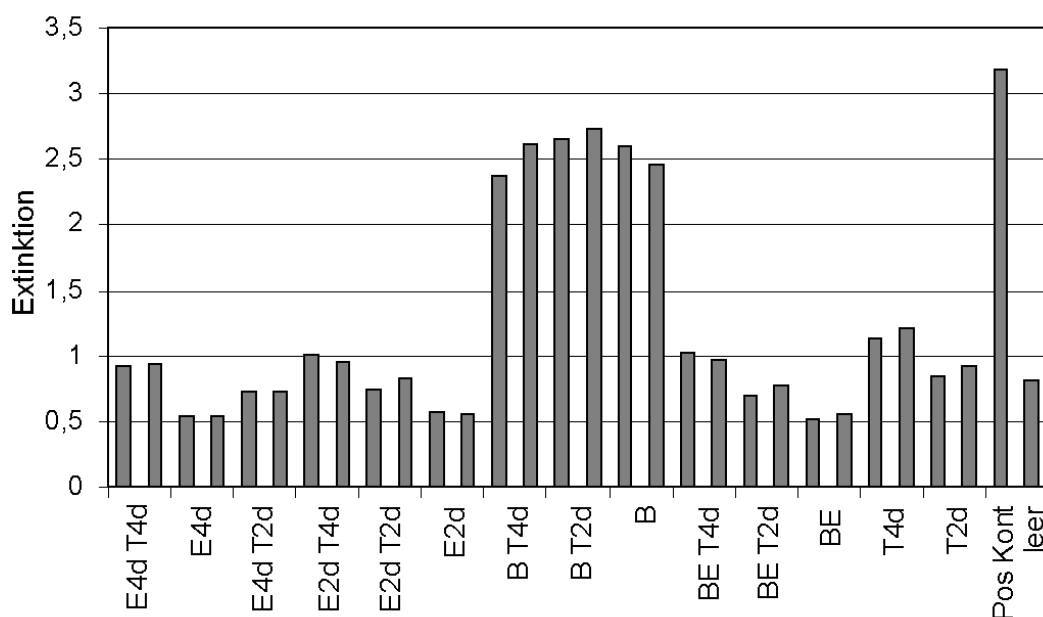


Abb. 10 a/b: PCR-Gel von einigen Isolaten aus Toxintyp C bzw. D bildenden Vorkulturen (a: Primer C11/22, b: Primer D11/22)

### 3.3.2.5. Versuche zur Toxinbildung

#### 3.3.2.5.1. Einfluss der eingesetzten Festmedien auf die Toxinbildung

Der Einfluss von BA und EA auf die Toxinbildung des Referenzstammes 2300 ist in Abb. 11 dargestellt. Die Ergebnisse des Dynabeadstests zeigen einen negativen Einfluss des EA auf die Toxinbildung. Wurde der Referenzstamm 2300 über diesen Agar passagiert, konnte keine Toxinbildung in der anschließenden Flüssigkultur mehr gefunden werden. Bei einer Passagierung über BA blieb die Toxinbildung erhalten. Bei Zugabe von Toxin dieses Stammes zu der Flüssigkultur erhöhte sich die gemessene Toxinmenge nicht wesentlich.



E: 2/4d auf Eigelbagar bebrütet; B: 2d auf BA bebrütet; BE: 2d auf BA und 2d auf EA bebrütet; T: Zugabe einer sterilfiltrierten, 2/4d gewachsenen Kultur des Referenzstammes 2300

Abb 11. Einfluss von BA und EA auf die Toxinbildung des Stammes 2300

3.3.2.7.2. Zusatz von Eisen und Chelatbildner NTTS zum Basismedium RCM

Die Wirkung von Eisen auf die Toxinbildung wurde mit Hilfe des Chelatbildners NTTS ermittelt. Unterschiedliche Mengen von zugesetztem NTTS sollten das durch das Fleischpepton natürlicher Weise im Medium vorhandene Eisen neutralisieren. Eisen wurde dann dem RCM wieder zugegeben, das Medium mit dem Stamm 2300 beimpft und anhand der gebildeten Toxinmenge die Wirkung des Eisens ermittelt. Um mögliche Beeinträchtigungen des Chelatbildners durch das Autoklavieren auszuschließen, wurde NTTS teilweise mit dem Medium zusammen autoklaviert oder nach dem Autoklavieren dem Medium sterilfiltriert zugesetzt. Das zusätzliche Eisen wurde nach dem Autoklavieren des Mediums sterilfiltriert zugegeben.

Abb. 12 zeigt die Toxinbildung des Referenzstammes 2300 in RCM und bei der Zugabe von Eisen und NTTS.

Die Proben Nr. 7 und 9 und die Probe Nr. 8 der Reihe 2 zeigten nach 5tägiger Bebrütungszeit keine Trübung des Mediums. In diesen Proben ist der Impfstamm nicht gewachsen. In allen anderen Proben, der Probe Nr. 8 Reihe 1 und in beiden Proben Nr. 10 war eine deutliche Trübung sichtbar.

Bei diesem Versuch lässt sich feststellen, dass bei den Proben mit der höheren Konzentration des zugegebenen Chelatbildners (außer Nr. 10) nur eine sehr geringe Toxinbildung aufgetreten ist. Hier kann extra zugegebenes Eisen die Wirkung des Chelatbildners teilweise aufheben.

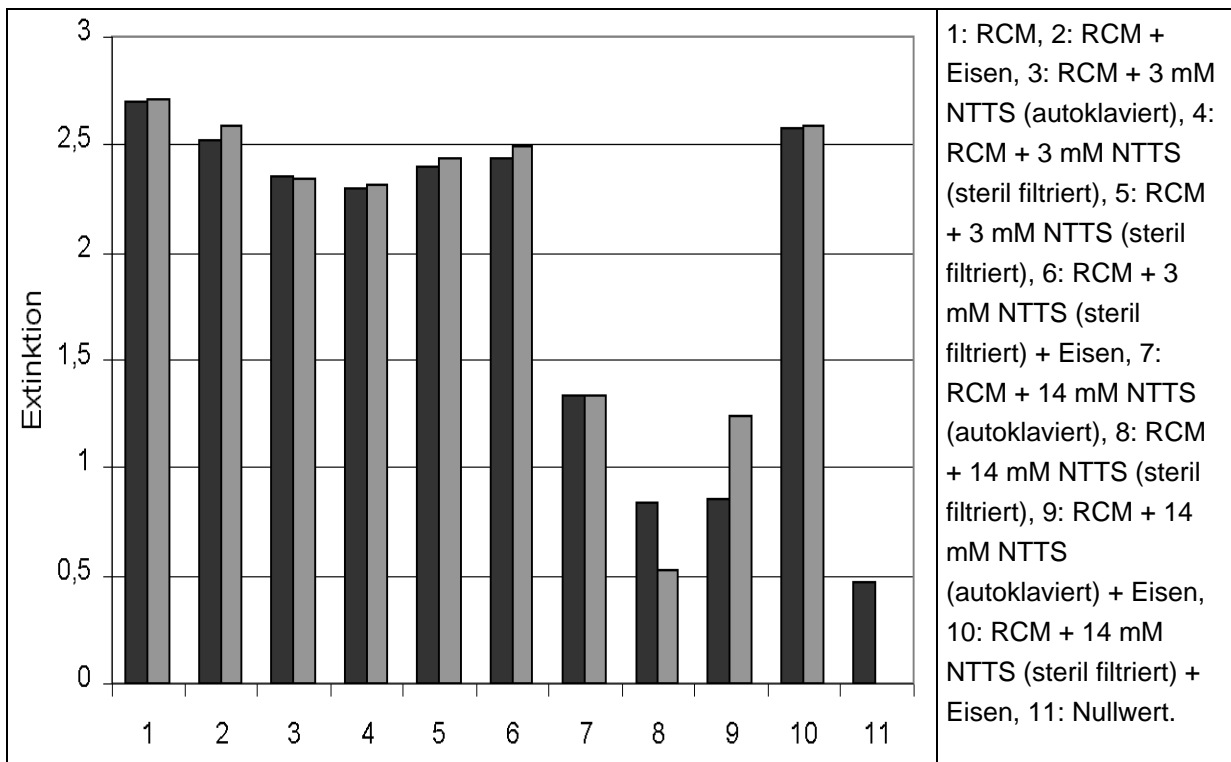


Abb. 12: Toxinbildung des Referenzstammes 2300 unter Zugabe von Eisen und/oder NTTS zum RCM (Doppelansatz)

### 3.3.3. Diskussion

#### 3.3.3.1. Identifikation des gebildeten Toxins

Zur Identifikation des gebildeten Toxins wurde der Maus Bioassay verwendet, da dieser Test die derzeit sensitivste Methode zur Bestimmung des von *C. botulinum* gebildeten Toxins in Mischkulturen ist. Diese Methode ist einfach anwendbar und auch in Brasilien jederzeit durchführbar. Darüber hinaus gilt der Maus Bioassay als gegenwärtig gesetzlich vorgeschriebene Methode zur Botulismusdiagnostik in Deutschland (§35 LmBG).

Mit Hilfe des Maus Bioassay konnten in 25 der gesammelten Proben BoNT-Bildung nachgewiesen werden. Insgesamt konnte in vier Proben Toxintyp C, in sechs Proben Toxintyp D und in einer Probe der Toxintyp A gefunden werden. 15 Proben konnten nur mit den beiden Antitoxinen C und D zusammen neutralisiert werden. Sechs dieser Toxin bildenden Proben stammen aus Betrieben, bei denen die Intoxikation der Rinder vermutlich durch kontaminierte Silage verursacht wurde (DUTRA, 2000), zwei Proben stammten von einer neben einer Straße aufgefundenen verendeten Nelore-Kuh (mit Fötus). Eine Probe, in der Toxinbildung festgestellt werden konnte, war ein Vogelkadaver. Alle anderen Proben stammten von einem Botulismusausbruch, der durch die Verfütterung von Hühnermist verursacht worden war. Die Proben Nr. 27 und 28, bei denen Toxin vom Typ A bzw. D gefunden wurde, wurden 6 Monate nach dem Ausbruch gesammelt. An der Stelle, wo die Kadaver vergraben worden waren, wurden Knochenteile und Erde ausgegraben und untersucht. Bei diesen Proben ist unsicher, welcher *C.-botulinum*-Typ für den Ausbruch verantwortlich war. In der Regel werden die Typen C und D in Brasilien für den Botulismus bei Rindern verantwortlich gemacht (DÖBEREINER et al. 1992; LOBATO et al. 1995). Der Typ A wurde ebenfalls schon als Auslöser gefunden (SCHOCKEN-ITURRINO, 1990; LOBATO et al., 1988). Bei diesem Ausbruch wäre denkbar, dass der Typ D für die Intoxikation verantwortlich war, der Typ A aber durch eine sekundäre Kontamination während des Verwesungsprozesses in der Erde an die Proben heran gekommen ist.

Bei der Probe Nr. 1793 handelte es sich um einen Vogelkadaver, bei dem in der Vorkultur der *C.-botulinum*-Toxintyp C neutralisiert werden konnte. Der *C.-botulinum*-Typ C wird sehr häufig bei Botulismusausbrüchen gefunden, die im Zusammenhang mit Geflügel zu sehen sind. Hühner können *C. botulinum* Typ C im Kropf oder auch im Caecum beherbergen, wobei es dann bei Produktion von BoNT zu Toxikationen und zu massenhaftem Verenden in der Broilerproduktion kommen kann (SMART und ROBERTS, 1977). Verbleiben verendete Tiere in der Einstreu, kann es zur Bildung von BoNT in den Kadavern kommen, die dann mit der Einstreu an Rinder verfüttert werden, welche dann erkranken (HOGG et al., 1990).

Nicht nur in Brasilien, sondern auch in anderen Ländern (Israel, Niederlande, Südafrika), in denen Hühnermist, oder besser die Einstreu aus der Broilerproduktion, an Rinder verfüttert wird, hat es Intoxikationen durch den Typ C oder D gegeben (LOBATO et al.; 1988; EGYED, 1987; VAN DER LUGT, 1996; KRIEK und ODENDAAL, 1994). Dies hat in einigen Ländern dazu geführt, dass Hühnereinstreu nicht mehr oder nur noch ausreichend erhitzt an Rinder verfüttert werden darf (KRIEK und ODENDAAL, 1994). Hühner sind relativ unempfindlich gegenüber BoNT Typ D. Kontaminierte Exkremente können so in die Einstreu gelangen und nach Verfütterung an Rinder zu Intoxikationen führen. Dieser Intoxikationsweg zeigte sich bei den Proben 29-58, die von

einem Betrieb stammten, der Masthühncheneinstreu, in Brasilien als „cama de frango“ bezeichnet, aus eigener Produktion verfüttert hatte. Nach den Angaben des Betriebsleiters erkrankten die Tiere etwa 3 Tage nach Zufütterung der Einstreu. Durch Toxinneutralisation wurde in drei Proben Typ D ermittelt, während 13 Proben nur mit den beiden Antitoxinen Typ C und D zusammen neutralisiert werden konnten.

Bei den Proben Nr. 21-24 handelte es sich um einen neben einer Straße abgelegten Rinderkadaver unbekannter Herkunft. Warum dieses Tier verendet war, konnte im Nachhinein nicht mehr festgestellt werden, jedoch konnten aus Probenmaterial der BoNT Typ C und der CD-Komplex neutralisiert werden. Dieses Tier war zudem zum Todeszeitpunkt tragend. DÖBEREINER et al. (1992) fanden eine erhöhte Mortalitätsrate durch Botulismus bei tragenden oder schnell wachsenden Tieren. Da tragende Tiere einen erhöhten Phosphorbedarf haben, versuchen sie über Osteophagie ihren Phosphorbedarf zu decken. Befindet sich toxisches Material unter den aufgenommenen Kadaverteilen, können sie an Botulismus erkranken. Es könnte sich deshalb um Botulismus als Todesursache gehandelt haben.

### 3.3.3.2. Erregerisolation

In der Literatur als vorteilhaft beschriebene Medien und unterschiedliche Methoden wurden zur Isolation von *C. botulinum* angewendet. Die verwendeten Festmedien waren der von McCLUNG und TOABE (1947) entwickelte und von DEZFULIAN et al. (1981) modifizierte mit Eigelb versetzte Agar, Blutagar mit RCM als Basis, TPGY Agar und FAA mit Eigelb oder defibriniertem Pferdeblut als Zusatz. Als Flüssigmedien wurden RCM und CMM verwendet, welche von einigen Autoren in der Vergangenheit bereits erfolgreich zur Isolation von *C. botulinum* eingesetzt worden waren (DEZFULIAN, 1981; MILLS et al. 1985; SONNABEND, 1987; HALL et al. 1985; HATHEWAY und MCCROSKEY, 1987; YAMAKAWA et al. 1992).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich keine der getesteten Isolationsmethoden zuverlässig für die Isolation von toxischen Stämmen von *C. botulinum* Typ C oder D eignet, obwohl diese Medien durchaus geeignet sein können, toxinproduzierende Stämme von *C. botulinum* Typ A zu isolieren. Aus 25 nachweislich *C. botulinum* der Typen A, C und D enthaltenden Proben konnte lediglich der in Probe Nr. 27 gefundene Typ A-Stamm isoliert und bis zur Reinkultur Toxin bildend gezüchtet werden. Ein Isolat aus Probe Nr. 08, welches zunächst Toxin bildete und mit CD-Antitoxin neutralisiert werden konnte, verlor während der Anzüchtung zur Reinkultur die Fähigkeit, Toxin zu bilden. Aus den Proben 08 und 48 konnten, obwohl diese in der Vorkultur BoNT vom Typ C bzw. CD-Komplex gebildet hatten, ebenfalls Toxin bildende Isolate gewonnen werden, die mit einer Mischung aus den Antitoxinen A, B und E neutralisiert werden konnten. Beide Proben waren zusammen mit den Kadaver umgebendem Boden aufgenommen worden. Es müssen sich in dieser Erde einige Sporen von anderen *C. botulinum* Typen befunden haben, die dann isoliert wurden.

Zwischen den einzelnen verwendeten Medien konnten, was die Isolation des Stammes *C. botulinum* A betraf, keine Unterschiede festgestellt werden. Dieser Stamm konnte unter Verwendung jedes Voranreicherungsmediums in Kombination mit EA, TPGY und BA isoliert werden.

Zur Unterdrückung der Begleitkeime wurden die Proben 30 min bei 60 °C erhitzt, mit Alkohol versetzt oder dem Festmedium Antibiotika beigesetzt. Alle drei Methoden zeigten bei dem Probenmaterial keine Vorteile gegenüber unbehandelter Proben. Das Erhitzen, bzw. das Versetzen mit Alkohol, dient der Abtötung vegetativer Zellen. In den Proben überwiegend vorhandene Sporenbildner wurden dadurch nicht beeinträchtigt.

### 3.3.3.3. Andere verwendete Isolationsmethoden

Um die schädigende Einwirkung des Sauerstoffs auf die vegetativen Zellen während der Beurteilung der Morphologie der einzelnen Kolonien zu vermeiden, wurden verschiedene Überschichtungstechniken zur Isolation verwendet.

Die auf EA ausgespatelten Vorkulturen wurden mit einem ein Reduktionsmittel enthaltenden Agar überschichtet. Bei dieser Technik konnte die sonst auf EA gut zu erkennende Lipasebildung nicht von einer Lecithinasebildung unterschieden werden, weshalb diese Technik zur sicheren Isolation von *C. botulinum* als eher ungeeignet erscheint.

Ein ähnliches Ergebnis wurde durch das Eingießen der Proben in das Festmedium erzielt. Auch dabei konnten keine toxischen Isolate gewonnen werden. Bei dieser Technik konnte das morphologische Erscheinungsbild der Kolonien nicht beurteilt werden, so daß die Fehlerquote, nicht *C. botulinum*-ähnliche Kolonien zu isolieren, sehr hoch war.

Um eine für *C. botulinum* spezifische Präzipitatbildung zu erhalten und so von anderen Clostridien unterscheiden zu können wurde eine von SONNABEND et al. (1981) erfolgreich zur Isolation von *C. botulinum* Typ G eingesetzte Methode für die Isolation von *C. botulinum* Typ C und D getestet. Auf RCA ausgespatelte Proben wurden 2 d bebrütet, mit einem Antitoxin Typ C bzw. D enthaltenden Agarosegel überschichtet und zur Präzipitatbildung weitere 2 d bebrütet. Das im Agarosegel enthaltene spezifische Antiserum soll dabei von *C. botulinum* gebildete Toxine präzipitieren und *C.-botulinum*-Kolonien sichtbar machen. Referenzstämme und Proben wurden parallel getestet, wobei die Referenzstämme 2300 und 2301 jeweils ein schwaches Präzipitat zeigten. Bei den eingesetzten Proben konnte keine Präzipitatbildung um die einzelnen Kolonien festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für das besonders schlechte Ergebnis dieser Überschichtungstechniken ist, dass die Verdünnung der Proben bei diesen Versuchen sehr hoch gewählt werden musste. Dies war erforderlich, um voneinander abgegrenzte Kolonien zu erhalten. Wurde die Verdünnungsstufe zu niedrig gewählt, verliefen die Kolonien ineinander. Die Sporenzählungen der Gesamtsporenzahl und der toxin-bildenden Sporen zeigten, dass die Fähigkeit einer Probe innerhalb 5 d Bebrütungszeit BoNT zu bilden im Durchschnitt schon bei einer 1:1000 Verdünnung stark abnahm und bei der 1:10000 Verdünnung kaum noch vorhanden war. Die Anzahl der vorhandenen Sporenbildner insgesamt war etwa um 2-3 10er Potenzen höher. Die Verdünnung, bei der gerade noch voneinander abgegrenzte Kolonien erkennbar waren, lag bei den getesteten Proben eine 10er Potenz höher als die Verdünnung, in der noch Toxin gebildet werden konnte. Die Wahrscheinlichkeit bei den Überschichtungstechniken, noch toxinbildende Kolonien auf den Agarplatten anzutreffen, war also sehr gering.



### 3.3.3.4. Gaschromatographie

Mit Hilfe der gaschromatographischen Fettsäureanalyse konnten einige toxische und nicht toxische Isolate identifiziert werden.

Stamm 161, der als *C. botulinum* Typ F identifiziert wurde, wurde mittels Toxinneutralisation und PCR als *C. botulinum* Typ A charakterisiert. Diese Typen können beide der Gruppe I (proteolytische Stämme) zugeordnet werden. Innerhalb der Stämme der einzelnen Gruppen von *C. botulinum* ist eine sichere Identifikation ausschließlich mittels Gaschromatographie, aber auch anderer biochemischer Leistungen, nicht möglich, wie die Untersuchungen einiger Autoren belegen (GIERCKE-SYGUSCH, 1987; HEITEFUSS, 1991, LOCH, 2000). Ein Grund dafür ist sicherlich die sehr nahe Verwandtschaft untereinander (COLLINS und EAST, 1997). Eine sichere und die entscheidende Charakterisierung dieser Typen kann nur mittels Toxinneutralisation oder der Darstellung des Gens für die Toxinbildung mittels PCR erfolgen. Ein weiteres toxisches Isolat, neutralisierbar mit den Antitoxinen ABE, wurde in der Gaschromatographie als *C. botulinum* Typ A charakterisiert. Dieses Isolat stammte ursprünglich aus einer mit dem Antitoxin C neutralisierbaren Vorkultur (Probe 08). Die Charakterisierung als Typ A unterstreicht das in der Toxinneutralisation gefundene Ergebnis. Drei weitere Isolate konnten mit der Gaschromatographie als *C. botulinum* Typ C bzw. D charakterisiert werden, was bei diesen Proben mit den in der Vorkultur gefundenen toxin-bildenden Erregern im Einklang steht. Diese Isolate zeigten allerdings keine Toxizität. Hierbei stösst die Verwendung der Gaschromatographie an ihre Grenzen, eine Unterscheidung der toxin-bildenden Stämme zu ihren atoxischen Varianten ist nicht möglich.

### 3.3.3.5. PCR

Die PCR ist heute eine in vielen Bereichen einsetzbare Technik zur Darstellung genomischen Materials aus verschiedensten Materialien. Der Vorteil dieser Methodik ist, dass geringe Mengen DNA ein für den betreffenden Nachweis spezifisches Ergebnis erbringen können.

Für die Darstellung von Bakterien können verschiedene DNA-Abschnitte verwendet werden. Besonders eignen sich dafür Bereiche, die für diese Spezies charakteristische Merkmale codieren. Zur Identifikation von *C. botulinum* werden daher in der Regel Abschnitte amplifiziert, die auf dem Gen für die Toxinbildung liegen (TAKESHI et al., 1996; FRANCIOSA et al., 1996; SZABO et al., 1994).

Verschiedene Autoren haben bisher *C. botulinum* mittels PCR in den unterschiedlichsten Materialien, wie z.B. Lebensmittel (FACH et al., 1995; FERREIRA et al., 1993) Boden (SZABO et al., 1994; FRANCIOSA et al., 1996) oder Faezes (DAHLENBORG et al., 2001; SZABO et al., 1994) darstellen können, während andere Autoren mit Hilfe der PCR die unterschiedlichen Typen von *C. botulinum* spezifizieren (TAKESHI et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit sollten gewonnene Isolate mit Hilfe der PCR charakterisiert werden. Die Referenzstämme 2300 und 2301 konnten nach Beimpfung steriler Erde nicht in jeder Probe sicher nachgewiesen werden. Ob bei den Subkulturen, die als DNA-Template verwendet wurden, das Gen für die Toxinbildung verloren gegangen ist oder die PCR durch im Boden vorhandene Stoffe gestört wurde, konnte nicht geklärt werden. Eine Toxizitätsprüfung wurde bei den getesteten Kulturen nicht durchgeführt.

Proben, deren Vorkultur mit den Antitoxinen C oder D neutralisierbar war, konnten in der PCR kein positives Signal erzeugen. Die Proben waren zur Elimination eventuell störender Beimengungen mehrfach überimpft worden. Da es sich bei diesen Kulturen um eine Mischkultur gehandelt hat, könnte *C. botulinum* einen Wachstumsnachteil gehabt haben, sodass nicht genug amplifizierbare DNA zur Verfügung stand.

Das aus der Probe 27 gewonnene Isolat S96, dessen Toxin mit dem Antitoxin A neutralisiert wurde, konnte in der PCR zweifelsfrei als *C. botulinum* Typ A charakterisiert werden. Isolate, die ihre Toxizität während den Aufreinigungsschritten verloren haben, konnten in der PCR kein positives Signal erzeugen.

Insgesamt bleibt anzumerken, dass die PCR eine für die Charakterisierung von *C. botulinum* Typen geeignete Methode ist. Mit ihrer Hilfe kann ein vorhandenes Toxigen sicher gefunden werden und somit einen Tierversuch zur Typidentifikation überflüssig machen. Diese Methode stösst jedoch dann an ihre Grenzen, wenn *C.-botulinum*-Stämme ihr Gen für die Toxinbildung, das die PCR nachweist, verloren haben.

### 3.3.3.6. Einfluss der eingesetzten Festmedien auf die Toxinbildung

Die Ergebnisse belegen einen negativen Einfluss des von MCCLUNG und TOABE (1947) für die Differenzierung von *C. botulinum* und anderen Clostridienspezies entwickelten Mediums. Der Stamm 2300 (*C. botulinum* Typ C) konnte nach einer zwei- bzw. viertägigen Bebrütungszeit auf diesem Agar im anschließend beimpften Flüssigmedium kein Toxin mehr bilden. Die Toxinbildung bei einer Passage über BA blieb im Gegensatz dazu vollständig erhalten. Eine Erklärung für die fehlende Toxinbildung könnte sein, dass dieser Agar die Weitergabe des Toxingens an die auf diesem Agar wachsenden Zellen unterdrückt, wodurch ein *C.-botulinum*-Stamm ohne das für die Toxinbildung codierende Gen entstehen würde. Die *C.-botulinum*-Stämme C und D verlieren das durch einen Phagen codierte Toxinbildungsgen relativ schnell, was die Untersuchungen von EKLUND und POYSKY (1974) belegen. In diesen Untersuchungen konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das Gen für die Toxinbildung nach der EA-Passage nicht mehr vorhanden war oder nur nicht exprimiert wurde.

Möglicherweise ist der EA in dieser Zusammensetzung demzufolge ungeeignet für die Isolation von toxischen *C.-botulinum*-Stämmen der Gruppe CD. Andere Autoren haben dieses Medium mit Erfolg zur Isolation von toxischen Stämmen der Gruppe I und II (proteolytische A, B, F und saccharolytische B, E, F) eingesetzt (DEZFULIAN, 1981; MILLS et al., 1985; HALL et al., 1985; HATHEWAY und MCCROSKEY, 1987). Für diese Stämme ist allerdings eine chromosomal gebundene Toxinbildung belegt (BINZ et al., 1990; THOMPSON et al., 1990), die eine größere Stabilität besitzen.

### 3.3.3.7. Zusatz von Eisen und Chelatbildner NTTS zum Basismedium RCM

Bei Vorhandensein einer 14mM Endkonzentration NTTS im Medium ist die Toxinbildung des Stammes 2300 (*C. botulinum* C) deutlich verringert. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von BHATTACHAYYA und SUGIYAMA (1989), die eine Inaktivierung von BoNT und TeNT feststellen

konnten. Eine geringere Menge NTTS scheint keinen Einfluss auf die Toxinbildung dieses Stammes zu haben. Die Zugabe von Eisen konnte teilweise eine bessere Toxinbildung hervorrufen.

Alle BoNT als Metalloproteasen besitzen Zink in ihrem reaktiven Zentrum. Durch die Zugabe eines relativ unspezifisch Metallionen bindenden Chelatbildners könnten die für die Toxinbildung notwendigen Zinkionen aus dem Medium entfernt werden und die Toxinbildung auf diese Weise gehemmt werden. Geringe Mengen des Chelatbildners können durch die im Medium enthaltenen Mengen an Metallionen aufgefangen werden. Das zusätzlich zum Chelatbildner zugegebene Eisen könnte durch Besetzung der Bindungsstellen des Chelatbildners zur Schonung der Zinkionen und damit zu einer besseren Toxinbildung beitragen.

### 3.4. Impfstoffkontrolle

#### 3.4.1. Material und Methoden

##### 3.4.1.1. Impfung der Rinder

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der auf dem lokalen Markt erhältlichen Impfstoffe wurden drei Vakzinen namhafter Firmen ausgewählt, die sich im Preis pro Dosis zum Teil erheblich voneinander unterschieden (Tab. 25). Alle Vakzinen waren durch das Landwirtschaftsministerium (Ministério de Agricultura) in Brasilien zugelassene Impfstoffe.

Tab.25: Die verwendeten Vakzinen

Impfstoff	Hersteller	mL/Dosis	Preis/Dosis R\$ (€)	Adjuvans/Zusatzstoffe
Botulina	Vallée	5	0,18 (0,05)	Aluminiumhydroxid
Linovac	Merial	5	0,75 (0,21)	Aluminiumhydroxid
Vaxall	Fort Dodge	5	0,80 (0,23)	Aluminiumhydroxid/ Timerosal

Ein Impfstoff wurde importiert (Vaxall, Fort Dodge), die beiden anderen wurden im Land hergestellt. Diese Impfstoffe enthielten laut Herstellerangaben formalinisierte Toxoide der Botulinum Neurotoxintypen C und D, die alle mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid versetzt waren.

Die Impfdosis pro Tier betrug bei allen drei Impfstoffen 5 ml, subkutan injiziert. Laut Herstellerangaben sollte die Boosterimpfung 30 d nach der ersten Impfung erfolgen. Die wegen der sommerlichen Temperaturen erforderliche Kühlung der Impfstoffe war sowohl vor den Impfungen als auch während der Impfungen gewährleistet.

Ausgewählt wurde eine Jungbullenherde mit 60 Tieren, die zum Zeitpunkt der ersten Impfung 6-8 Monate alt waren. Es wurden jeweils drei verschiedene Impfstoffe getestet, wobei jeweils 15 Tiere einer Gruppe mit demselben Impfstoff geimpft wurden. Eine Gruppe aus 15 nicht geimpften Tieren bildete die Kontrollgruppe. Da die Antikörpertiter naturgemäß über ein Jahr hinweg Schwankungen unterliegen, wurde der Mittelwert jeden Entnahmetages der nicht geimpften Kontrollgruppe als Basisantikörperlevel der gesamten Gruppe gleichgesetzt und zur Ermittlung des Antikörpertiterverlaufs der immunisierten Rinder herangezogen.

Die Tiere wurden zur einwandfreien Identifizierung mit großen gelben Ohrmarken versehen. Die Herde bestand aus Tieren unterschiedlicher Rassen und Kreuzungen, überwiegend Nelore und deren Kreuzungsprodukten. Der Betrieb befand sich etwa eineinhalb Autostunden entfernt, sodass die entnommenen Blutproben mittels Kühlakkumulatoren sicher ins Labor transportiert werden konnten.

Sowohl die Impfungen als auch die Blutprobenentnahmen wurden mit den regelmäßigen Impfungen, den Entwurmungen oder anderen an den Tieren durchzuführenden Maßnahmen koordiniert um zu häufige stressintensive Auftriebe zu vermeiden.

Die Serumproben wurden am Tag der ersten Impfung und am Tag der Boosterimpfung (30 d) genommen. Die folgende Blutabnahme erfolgte 60 d nach der Erstimpfung, alle weiteren nach jeweils 60 Tagen. Am Tag 360 erfolgte die letzte Blutabnahme. Benutzt wurden sterile Glasröhrchen mit Gummistopfen ohne Zusatz eines Antikoagulans. Nach der Blutabnahme wurden die Proben gekühlt ins Labor transportiert und am selben oder darauffolgenden Tag zentrifugiert. Das Serum wurde in sterile Plastikröhrchen zu jeweils 1 mL abgefüllt und bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Der Transport nach Deutschland erfolgte in mit Trockeneis gefüllten Isolierbehältern, sodass die Proben vor dem Auftauen geschützt waren. Die Einfuhrgenehmigung der zuständigen Veterinärbehörde für die Serumproben lag vor. Die Serumuntersuchungen zur Bestimmung des Antikörpertiters bei mit den oben angeführten Impfstoffen geimpften Rindern und Meerschweinchen sind von FONSECA (2001) mittels dem für die nationale Impfstoffzulassung in Brasilien verwendeten Verfahren, dem Challenge-Test in der Maus, bestimmt worden. Die Ergebnisse sollen hier unterstützend herangezogen werden.

#### 3.4.1.2. Antikörperkontrolle mittels ELISA

Die Rinderseren wurden alle gegen die Antigentypen C und D titriert und die Extinktionen gemessen. Die Untersuchungen des Serums mittels ELISA wurden nach einem in Anlehnung an KEMENY (1994) am Institut für Tropentierhygiene der Universität Göttingen entwickelten und erprobten Standardprotokoll durchgeführt (BEHRENS, 2000). Es handelt sich dabei um einen indirekten ELISA, bei dem Kulturüberstand von *C. botulinum* Typ C und D Kulturen als Fangantigen eingesetzt wurde (Abb. 13).

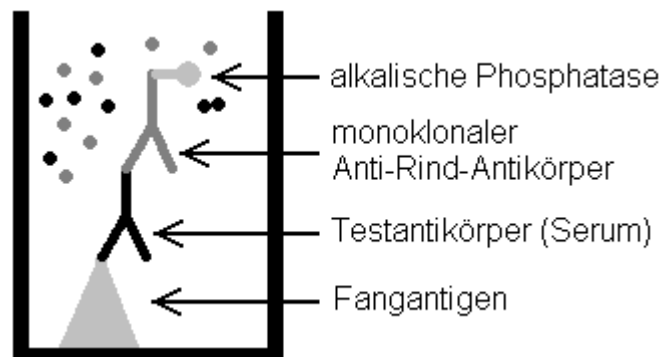


Abb. 13: Schematische Darstellung des indirekten ELISA

Zum Einsatz kamen 96-Loch Polysorb Mikrotiterplatten (NUNC). Vorschriften für die Herstellung der einzelnen Komponenten sowie Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Fertigreagenzien finden sich im Anhang. Die Serumproben wurden vor der Verwendung 30 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert um eventuell vorhandene Enzymaktivitäten im Serum zu inaktivieren.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit Kulturüberstand von *C. botulinum* der Typen C und D (Nr. 2300 und 2301, hauseigene Stammsammlung, Kap. 4.1.1.). Ein bei -80 °C eingelagertes Röhrchen des entsprechenden Stammes (Inhalt 2 mL) wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und zur Anzucht in 5 mL RCM überführt. Jeder Stamm wurde für 48 h bei 37 °C unter Stickstoff-Kohlendioxid-Wasserstoff- (80 %-10 %-10 %) Atmosphäre angezüchtet, anschließend zur Toxinproduktion in 20 ml RCM verbracht und 5 d bei 37 °C unter anaeroben

Bedingungen inkubiert. Zur Reinigung des Fangantigens schloss sich die Filtration zur Entfernung der in der Kultur befindlichen Bakterien an. Anschließend erfolgte die Aliquotierung zu je 1 mL in 2-mL-Polypropylen Twist Top<sup>®</sup> Vials (ROTH) und bis zum Gebrauch die Lagerung bei -80 °C.

Die Toxizität des Toxins wurde im Maus Bioassay überprüft und der Toxingehalt bestimmt. Dazu wurde die filtrierte Kulturflüssigkeit dezimal verdünnt und die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$ -  $10^{-5}$  den Versuchstieren intraperitoneal injiziert. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde der Kulturüberstand im Verhältnis 1:40 mit Beschichtungspuffer pH 9,6 verdünnt, dann 100 µL pro Vertiefung pipettiert (8-Kanalpipette Impact, MATRIX) und über Nacht bei +4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit Waschpuffer (3x200 µL) gewaschen und anschließend mit Magermilchblockierungspuffer blockiert. Danach erfolgte ein nochmaliges Waschen (3x200 µL) und die Lagerung der Platten bei -20 °C bis zum Gebrauch.

#### 3.4.1.2.1. Vorversuch zur Ermittlung der Reaktivität des Serums

Ein Vorversuch, bei dem ein ausgewähltes Serum bezüglich der Reaktivität getestet wurde, diente zur Bestimmung der idealen Verdünnungsstufe der Seren im Hauptversuch. Dabei kamen die Verdünnungsstufen 1:5, 1:10 und 1:20 der Seren zum Einsatz.

#### 3.4.1.2.2. Hauptversuch zur Bestimmung des Antikörpertiters

Die Durchführung des Hauptversuches erfolgte wie der Vorversuch. Zunächst wurde die Serumprobe entsprechend der Ergebnisse des Vorversuches 1:10 verdünnt und als Vierfach-Bestimmung in je 4 Vertiefungen der mit dem Toxintyp C beschichteten Platte und in je 4 Vertiefungen der mit Toxintyp D beschichteten Platte einpipettiert. Es wurden jeweils drei Serumproben aller erfolgten Entnahmetage auf einer Platte getestet. Die Plattenbelegung erfolgte bei beiden verwendeten Toxintypen gleich und für die entsprechenden Serumproben am gleichen Tag. Zur Komplexbildung des zu ermittelnden Antikörpers mit dem auf der Platte adsorbierten Toxin wurden die Platten zunächst mit Folie bedeckt und dann 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzugabe des mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Antikörpers (monoklonal Antirind Clone Bg 18, 100 µL pro Kavität) mit anschließender Inkubation (1 h bei 37 °C) und Zugabe des Farbstoffs (p-Nitrophenolphosphat, 100 µL pro Kavität, 1 h bei 37 °C) konnte die Absorption bei 405 nm und 492 nm mit Hilfe eines ELISA Readers (ASYS: Digiscan Asys Hightech, Software: Asys Digiwin) gemessen werden. Zwischen jedem Reaktionsschritt erfolgte dreimaliges Waschen der Kavitäten mit jeweils 200 µL Waschpuffer. Durch Zugabe von 3 M Natriumhydroxid-Lösung nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Umsetzung des Farbstoffs gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte unmittelbar nach der Natriumhydroxidzugabe. Die Reaktivität des Testsystems wurde zu jedem Test einer Funktionsprüfung unterzogen.

#### 3.4.1.2.3. Bestimmung des Schwellen- und des Cut-off-Wertes

Der Schwellenwert errechnet sich aus dem arithmetischen Mittel der Normal- bzw. Nullwerte zuzüglich der einfachen Standardabweichung.

Die Unterscheidungsgrenze, bei der vernachlässigbar falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse zwischen positiven und negativen Proben bestimmt werden, wird als Cut-off-Wert

bezeichnet. Dieser Wert errechnet sich aus dem arithmetischen Mittel der Kontrollwerte zuzüglich der dreifachen Standardabweichung.

Zwischen dem Cut-off-Wert und dem Schwellenwert liegende Werte werden als zweifelhaft eingestuft.

#### 3.4.1.3. Antikörperkontrolle mittels Immunoblot

Auf den Ergebnissen des Elisa basierend wurden 6 Seren zur weiteren Bearbeitung im Immunoblot ausgewählt. Es wurde jeweils das Serum eines Tieres (Tiernummern 13, 30 und 37) aus jeder Impfgruppe vor der Impfung (Tag 0) und nach erfolgter Boosterimpfung (Tag 60) verwendet. Die Untersuchungen der Seren mittels Immunoblot wurden nach einem am Institut für Bakteriologie und Mykologie der veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, entwickelten Standardprotokoll durchgeführt (SCHRÖDL, W., Leipzig, 2003). Als positive Kontrollantikörper dienten Antiserum vom Pferd (ONDERSTEPOORT) und aus Hühnereigelb gewonnene Antikörper (TROPENTIERHYGIENE, Göttingen) der Typen Anti-C und Anti-D. Als Antigene dienten die im ELISA verwendeten Kulturüberstände der *C. botulinum* Typen C und D (C- bzw. D-Dialysat) und hauseigenes gereinigtes Toxin der Typen C und D (C- bzw. D-Toxin). Die Herstellung des Kulturüberstandes wird im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Im Anschluss an die Filtration wurde der Überstand mithilfe eines Dialysierschlauches (Porengrösse 10 kDa) dialysiert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der eingesetzten Proben erfolgte nach dem BCA (bicinchinonic acid) Protein Assay (PIERCE BIOTECHNOLOGY).

Für den Elektrophoreseschritt wurden die Antigene zunächst 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und 30 min bei 45 °C gelagert. Durch die Zugabe von Jodacetamid zum Probenpuffer wurde eine Auftrennung der Disulfidbrücken der in den Proben vorhandenen Proteine erreicht. Die Rezeptur und die Herstellungsweise für die Gele findet sich im Anhang. Anschließend wurden die Antigene auf das Polyacrylamidgel aufgegeben und die Elektrophorese zunächst bei 40V und nach Übertritt der Proben vom Probengel in das Trenngel bei 80V 30 min durchgeführt. Danach wurde das Gel in Transferpuffer für den Blot 2x15min äquilibriert. Als Markersubstanz wurde ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (ROTH) verwendet.

Für den Blot wurde die PVDF- Membran zunächst auf die benötigte Grösse zugeschnitten und für 2-3 sec in 100%igem Methanol geschwenkt. Dann wurde die Membran für 5 min in H<sub>2</sub>O dest. gespült und danach für etwa 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Schichtung erfolgte nach dem in Abb. 14 dargestellten Schema. Der Transfer erfolgte bei 100mA für 2,5 Stunden. Die PVDF Membran wurde bis zur Weiterbearbeitung getrocknet und unter Lichtabschluss gelagert.

Die mit den Antigenen beladene PVDF-Membran wurde markiert und in Streifen geschnitten. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mittels Blockierungspuffer (30 min) blockiert. Die zu testenden Seren und das verwendete IgY wurden 1:40, das Antiserum vom Pferd wurde 1:100 mit Assaypuffer verdünnt und auf die vorbereiteten PVDF Streifen gegeben. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Anschließend wurden die Proben 3x mit Waschpuffer gewaschen.

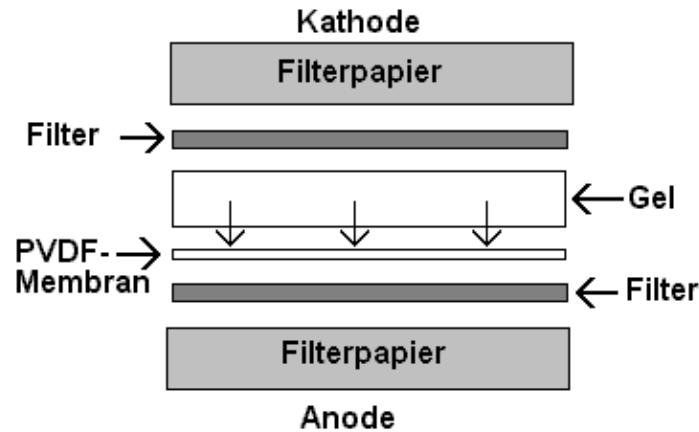


Abb. 14. Schematische Darstellung des Proteintransfers auf die PVDF-Membran

Die mit Peroxidase gekoppelten Konjugate (Anti-Rind, Anti-Pferd und Anti-IgY) wurden ebenfalls mit Assaypuffer 1:500 verdünnt und für 30 min auf die PVDF-Membran gegeben. Nach abwaschen ( 3x mit Waschpuffer) nicht gebundenen Konjugates wurde Aminoethylcarbazol (SIGMA) in Substratpuffer gelöst zugegeben und mit  $H_2O_2$  die Farbreaktion sichtbar gemacht.

### 3.4.2. Ergebnisse

#### 3.4.2.1. Antikörperkontrolle mittels ELISA

##### 3.4.2.1.1. Ermittlung der optimalen Vorverdünnung der Seren

Zur Bestimmung der optimalen Verdünnung der Seren wurde ein Serum eines erwartungsgemäß gut antigenen Impfstoffes ausgewählt und alle Entnahmetage dieses Serums getestet. Wie auch im anschließenden Hauptversuch wurde jede Probe dieses Serums in einer Vierfach-Bestimmung untersucht und aus den 4 resultierenden Werten der arithmetische Mittelwert gebildet. Offensichtliche Ausreißer wurden dabei aus der Berechnung des Mittelwertes ausgeschlossen. In Abb. 15 a,b findet sich eine graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Vorversuch.

Da sich im Vorversuch die Serum-Verdünnung 1:10 als die günstigere erwies, wurde sie für den Hauptversuch ausgewählt. Die Extinktionen der Verdünnungen 1:5 und 1:10 verhielten sich in etwa äquivalent, jedoch gab es bei der Verdünnung 1:10 bei dem eingesetzten Serum die geringsten Unterschiede zwischen den einzelnen gemessenen vier Werten. Die Verdünnung 1:20 zeigte insgesamt nicht so deutliche Unterschiede in den Extinktionen zwischen Nullwert (Tag der ersten Impfung) und den Werten der Seren nach der 1. respektive 2. Impfung.



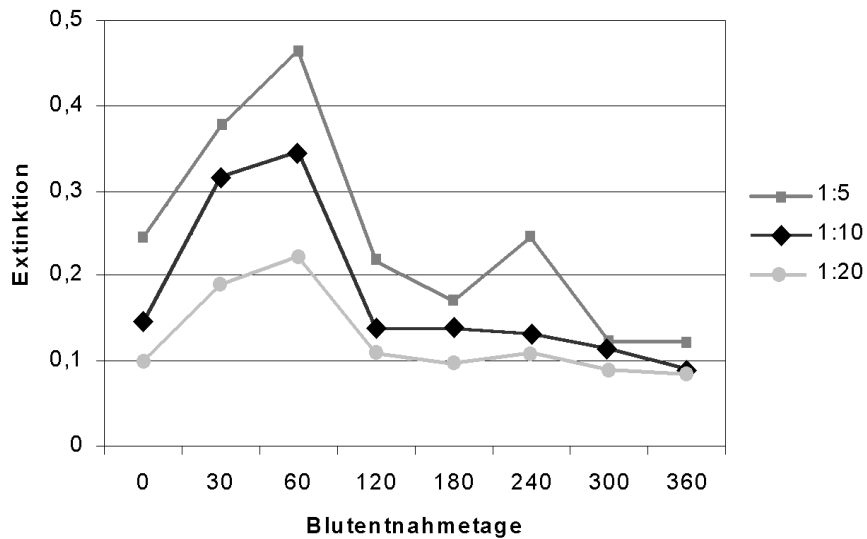


Abb. 15a: Serum Nummer 1 gegen Antigen Typ C titriert

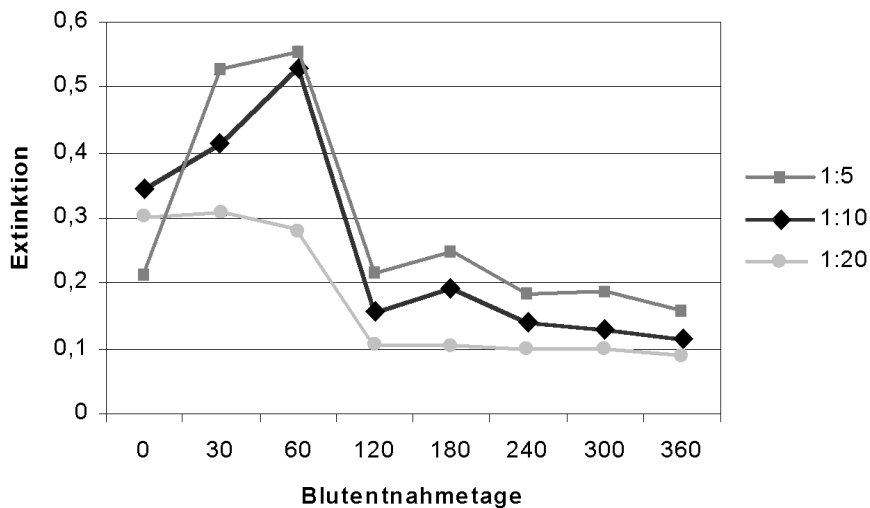


Abb. 15b: Serum Nummer 1 gegen Antigen Typ D titriert

### 3.4.2.1.2 Serologische Untersuchung der Rinderseren

Die Impfstoffe T1 und T3 erzeugten gut messbare Antikörpertiter. Nach der ersten und nach der zweiten Impfung war ein deutlicher Boostereffekt zu erkennen. Die Antikörpertiter beider Impfstoffe (T1 und T3) fielen im Verlauf des Jahres langsam ab, lagen aber während der gesamten Beobachtungsperiode und auch am Ende des Beobachtungsjahres über dem Basislevel der nicht immunisierten Rinder. Dies ist jeweils für beide verwendeten Antigene zutreffend. Allerdings bildete Impfstoff T3 deutlich höhere Antikörpertiter aus als Impfstoff T1. Bei Impfstoff T2 liegen die Antikörpertiter über das gesamte Jahr hinweg auf oder unter dem Niveau der nichtgeimpften Kontrolltiere. Dieser Impfstoff ruft weder gegen Antigen C noch gegen Antigen D bei den geimpften Tieren eine messbare Antikörperproduktion hervor.

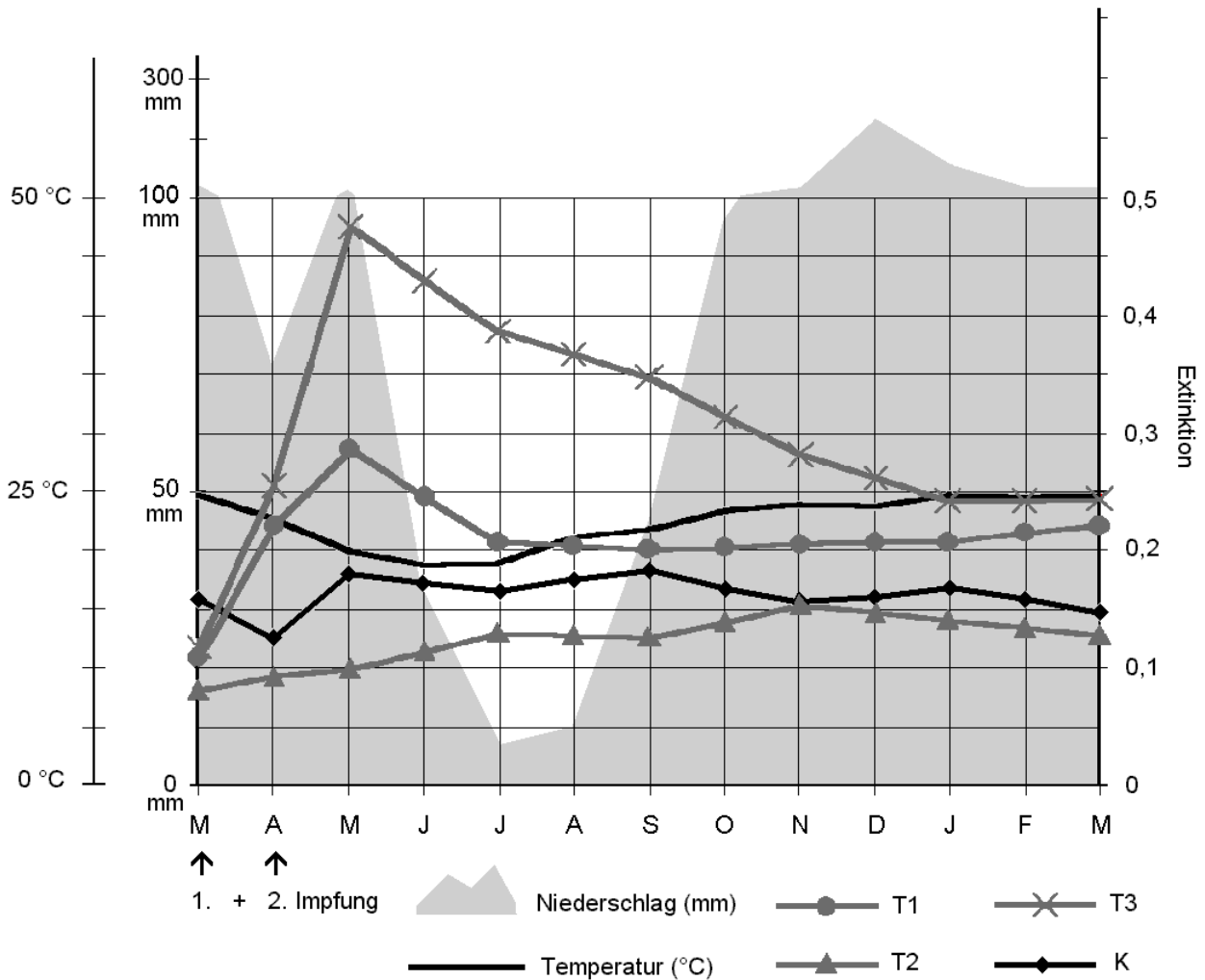


Abb. 16a: Antikörpertiter (Typ C) in Beziehung zu Niederschlag, Temperatur und Jahreszeit

In Abb. 16a und 16b sind die Antikörpertiter aller untersuchten Tiere vergleichend mit den Durchschnittswerten für den Niederschlag und die Temperatur aufgeführt. Bei einzelnen Seren (Tiernummer: 1, 3, 7, 8, 31, 32) ist um den Entnahmetag 240 bis 300 ein leichter Anstieg der Antikörpertiter zu verzeichnen, der aber im Gesamtverlauf der einzelnen Gruppen nicht ins Gewicht fällt. Impfstoff T3 kann gegen Toxintyp C bei den geimpften Tieren über etwa 5 Monate hinweg einen AK-Titer halten, der auf dem höchsten gebildeten Titer des Impfstoffes T1 liegt. Die AK-Titer der Impfstoffe T1 und T3 gegen Antigen D sind höher ausgebildet als gegen Antigen C. Impfstoff T1 liegt jedoch in der AK-Produktion unter der von T3, die Kurvenverläufe sind jedoch weitgehend gleich. Die Antikörperbildung gegen Typ-C-Toxoid fällt bei allen Tieren deutlich schwächer aus als gegen Typ-D-Toxoid des Impfstoffes. Die Tiere 9 und 15 zeigen auf Impfstoff T1 keine Antikörperbildung gegen Typ C, während bei Typ D eine schwache Antikörperbildung erkennbar ist. Bei allen anderen Tieren ist, verglichen mit der ungeimpften Kontrollgruppe, bis zur 3. Blutabnahme ein deutlicher Anstieg der gebildeten Antikörper messbar, der dann im Verlaufe des Jahres langsam abfällt. Die Extinktionswerte der Seren titriert gegen Antigen D sind insgesamt deutlicher ausgeprägt. Die Titerunterschiede zwischen den einzelnen Entnahmetagen fallen höher aus als bei Antigen C. Alle Tiere dieser Impfgruppe (ausgenommen Nr.9) zeigen eine Titererhöhung nach der zweiten Impfung und einen langsamen Abfall zum Ende der Kontrollperiode.

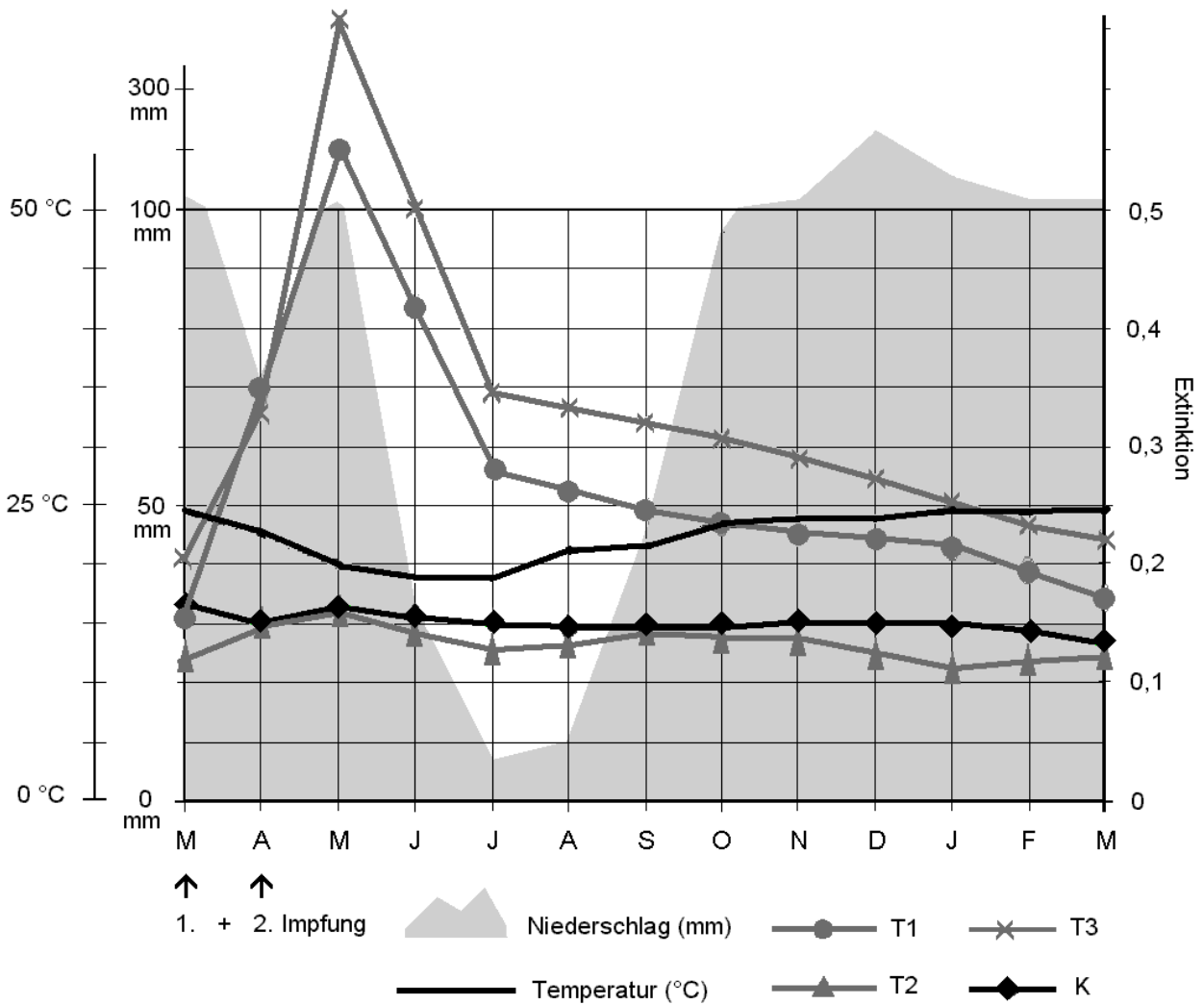


Abb. 16: Die Antikörpertiter (Typ D) in Beziehung zu Niederschlag, Temperatur und Jahreszeit

Die Antikörpertiter der mit Impfstoff T2 geimpften Tiere liegen insgesamt auf niedrigerem Niveau als die ungeimpften Kontrolltiere.

Die Antikörpertiter gegen Antigen D sind höher als die gegen Antigen Typ C. Die Tiere Nr. 27, 29 und 30 reagieren auf die Impfung mit einem leichten Titeranstieg, bleiben aber mit den nichtgeimpften Kontrolltieren vergleichbar. Bei den mit Impfstoff T3 geimpften Tieren findet sich ein deutlich höherer Antikörpertiter als bei allen anderen Gruppen. Dies gilt sowohl für Antikörper gegen Antigen C als auch für Antikörper gegen Antigen D.

In den folgenden Abbildungen (17a/b-20a/b) sind die Schwankungsbreiten der Antikörpertiter innerhalb der jeweiligen Impfgruppe und des getesteten Antigentyps dargestellt. Angegeben sind der Minimal- und Maximalwert sowie der Mittelwert in Relation zum Nullwert. Der Nullwert ist der Mittelwert der Extinktionen der ungeimpften Kontrollgruppe.

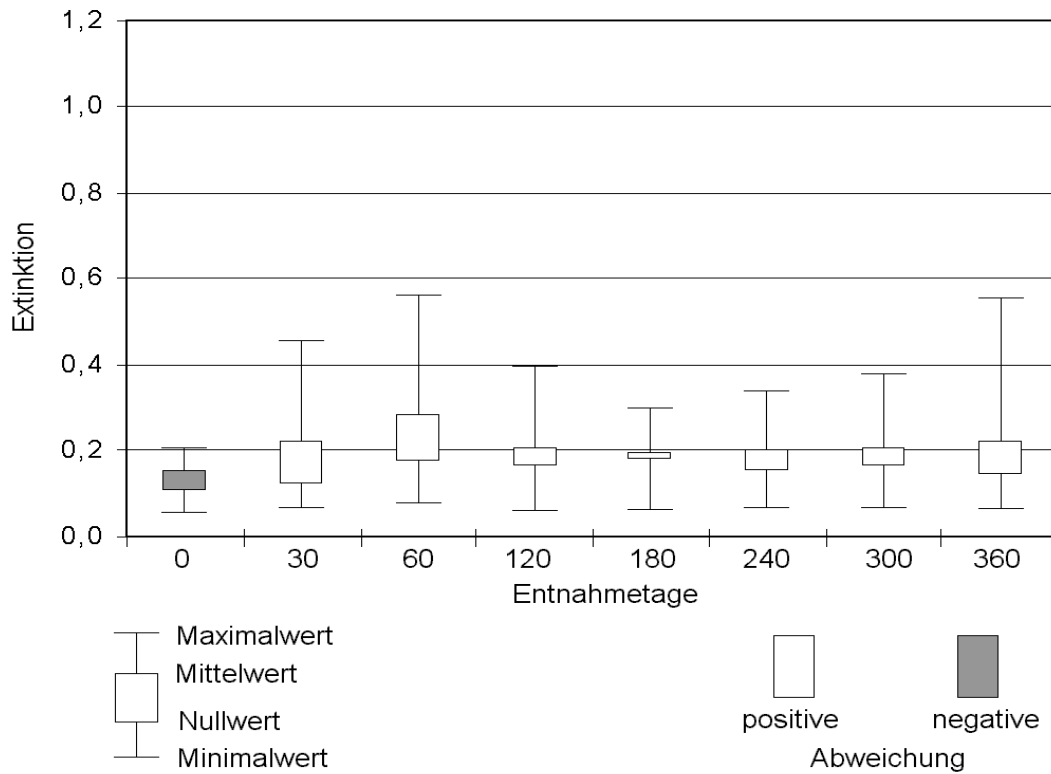


Abb. 17a: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter von Impfstoff T1 (Antigen C) in Beziehung zum Nullwert

Die Antikörpertiter der mit den Impfstoffen T1 und T3 geimpften Tiere unterliegen hohen Schwankungen. Einige Tiere bilden überhaupt keinen messbaren Antikörperspiegel. Der Minimalwert der einzelnen Entnahmetage liegt unter dem Mittelwert der Antikörperspiegel der Seren der ungeimpften Kontrollgruppe.

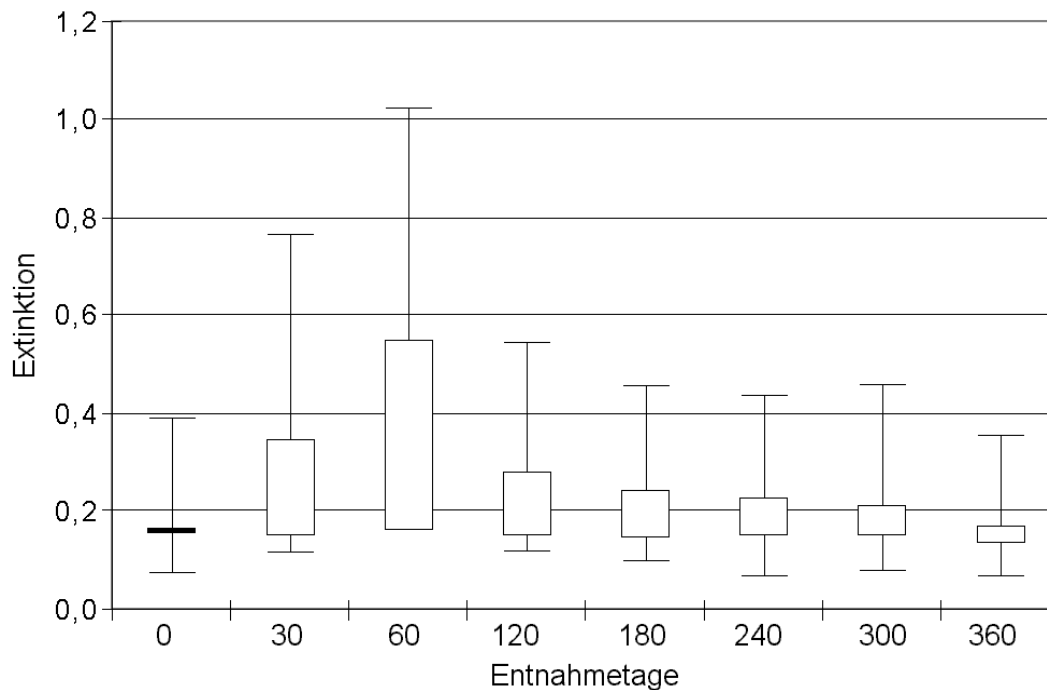


Abb. 17b: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter von Impfstoff T1 (Antigen D) in Beziehung zum Nullwert (Legende siehe Abb.17a)

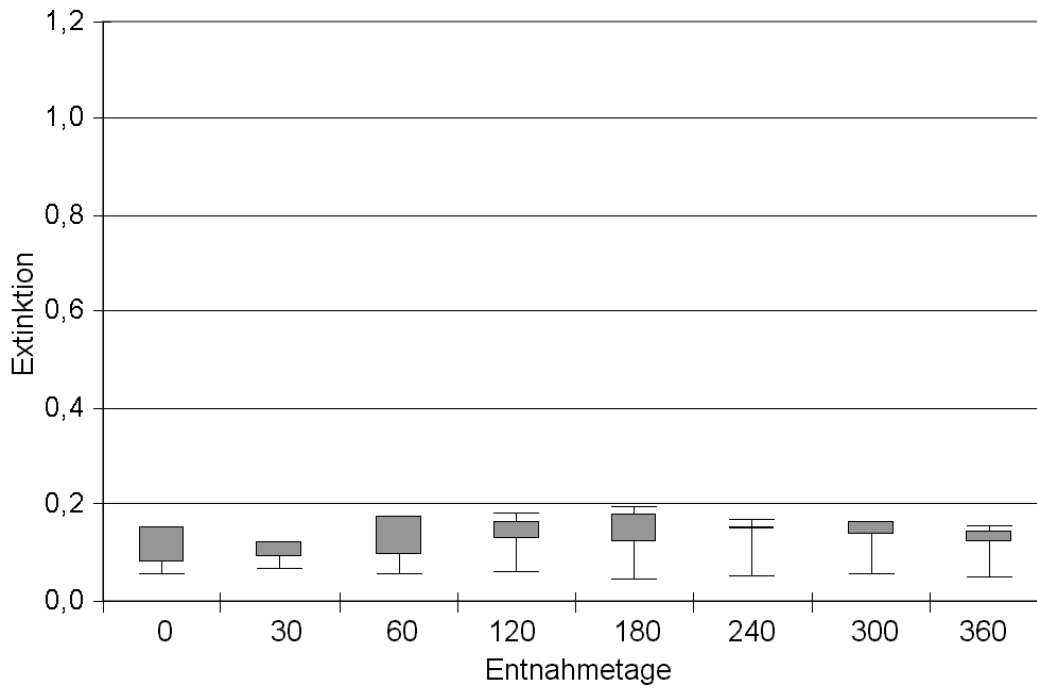


Abb. 18a: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter von Impfstoff T2 (Antigen C) in Beziehung zum Nullwert (Legende siehe Abb.17a)

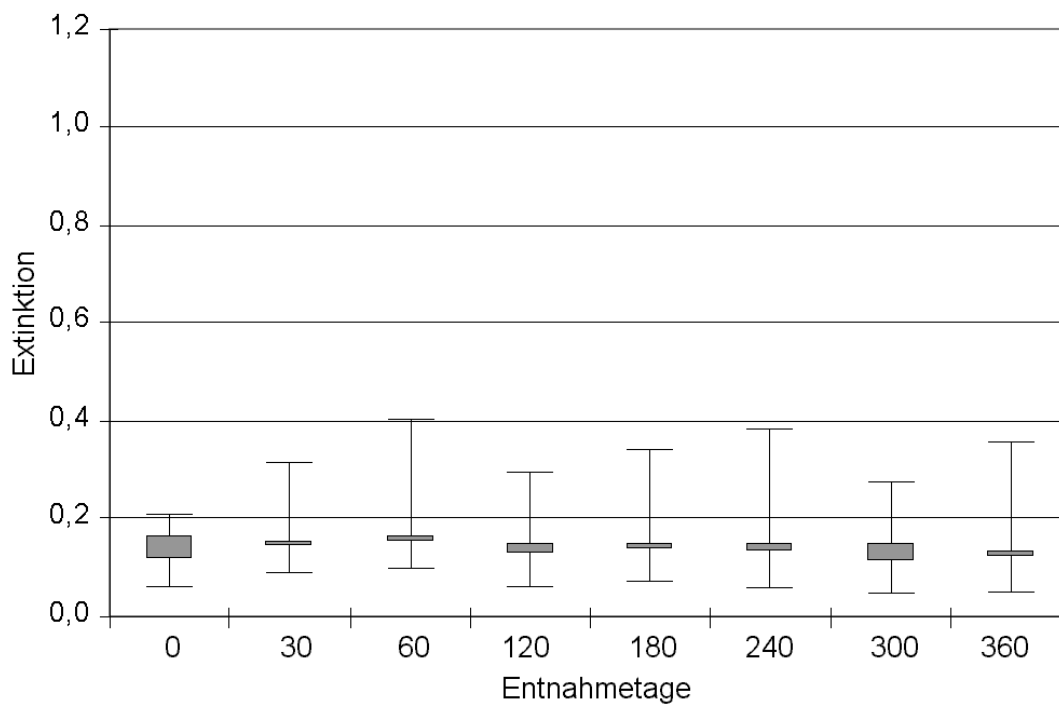


Abb. 18b: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter von Impfstoff T2 (Antigen D) in Beziehung zum Nullwert (Legende siehe Abb.17a)

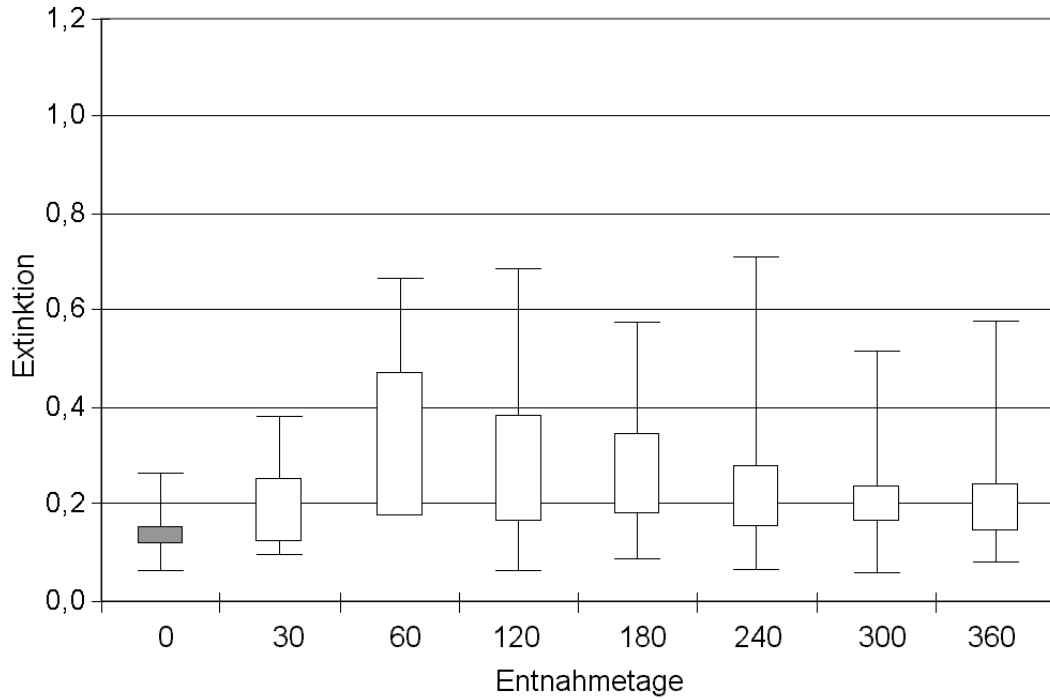


Abb. 19a: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter von Impfstoff T3 (Antigen C) in Beziehung zum Nullwert (Legende siehe Abb.17a)

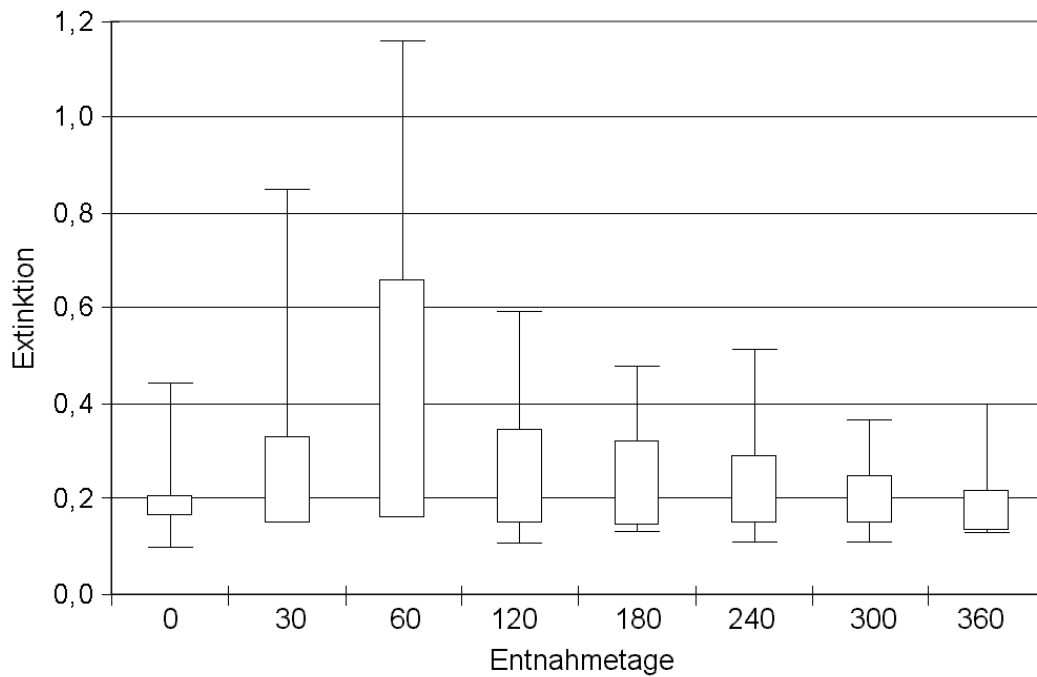


Abb. 19b: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter von Impfstoff T3 (Antigen D) in Beziehung zum Nullwert (Legende siehe Abb.17a)

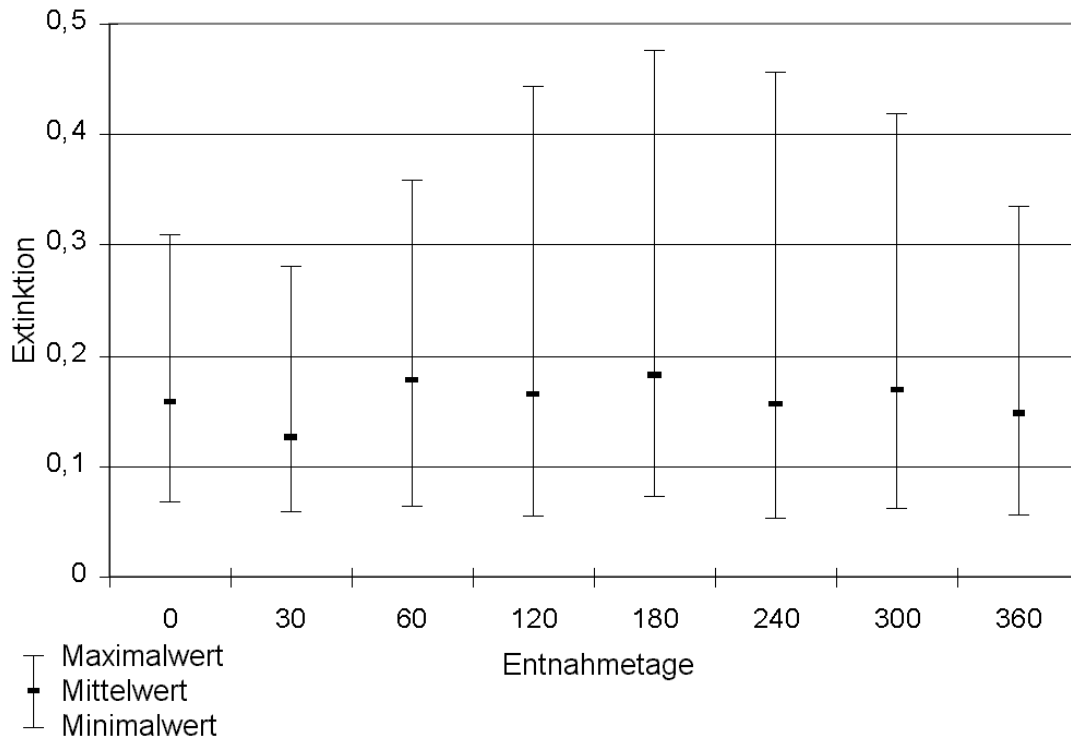


Abb. 20a: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter der ungeimpften Kontrolltiere (Antigen C)

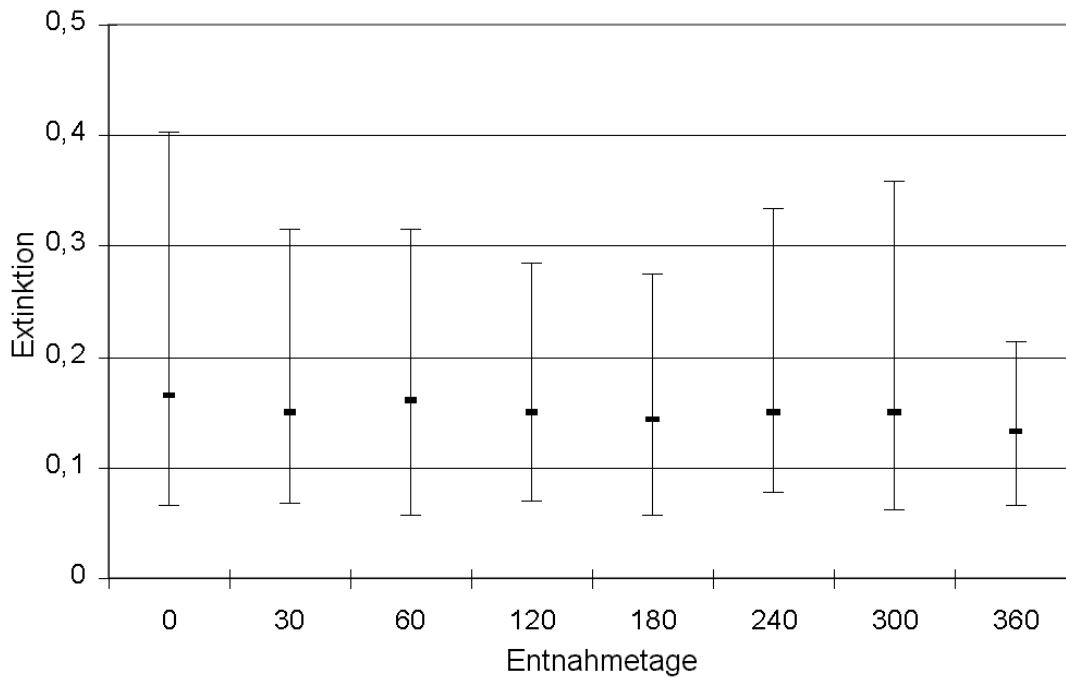


Abb. 20b: Schwankungsbreiten der Antikörpertiter der ungeimpften Kontrolltiere (Antigen D)  
 (Legende siehe Abb.:20a)

3.4.2.1.3. Bestimmung der Cut-Off-Werte

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Seren der ungeimpften Kontrollgruppe wurden jeweils zur Ermittlung des Schwellenwertes und des Cut-Off-Wertes herangezogen. Ausreißerwerte wurden bei dieser Berechnung ausgeschlossen. Die Berechnungen wurden für jeden Antigentyp gesondert durchgeführt und sind in Tab. 9 dargestellt. Die Einstufung des jeweiligen Serums am entsprechenden Entnahmetag findet sich in Tab.10a-f.

Tab. 26: Cut-Off-Werte

	Antigen C	Antigen D
Mittelwert	0,107	0,119
Standardabweichung	0,06	0,053
Schwellenwert	0,167	0,173
Cut-Off-Wert	0,287	0,279

Tab. 27 a-f.: Bewertung der Serumantikörpertiter der mit T1, T2, T3 vakzinierten Tiere (Nr 1-45) unter Einbeziehung des Schwellenwertes (a, c, e: Antigen C; b, d, f: Antigen D).  
(n: negativ, p: positiv, z: zweifelhaft, x: verendet)

a)

T1 C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	pos	ges
0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	n	z	n	0	15
30	z	<b>p</b>	z	z	z	z	z	z	n	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	n	4	15
60	z	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	z	z	n	n	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	n	6	15
120	z	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	n	n	n	n	z	z	z	z	z	n	2	15
180	z	z	<b>p</b>	z	n	n	n	n	n	z	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	n	4	15
240	z	z	<b>p</b>	n	z	n	n	n	n	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	n	4	15
300	n	z	<b>p</b>	n	z	n	n	n	n	n	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	n	5	15
360	n	z	z	n	n	n	n	n	n	n	z	<b>p</b>	z	<b>p</b>	n	2	15

b)

T1 D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	pos	ges
0	n	n	n	n	n	n	n	n	z	n	n	n	n	n	n	0	15
30	n	<b>p</b>	n	z	z	n	z	z	n	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	n	4	15
60	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	<b>p</b>	z	n	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	12	15
120	n	<b>p</b>	z	n	z	z	n	z	n	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	4	15
180	z	<b>p</b>	n	z	n	n	n	n	n	<b>p</b>	n	z	<b>p</b>	z	n	3	15
240	n	<b>p</b>	n	n	z	n	n	n	n	<b>p</b>	n	z	<b>p</b>	<b>p</b>	n	4	15
300	n	<b>p</b>	n	n	z	n	n	n	n	<b>p</b>	n	z	<b>p</b>	z	n	3	15
360	n	z	n	n	z	n	n	n	n	z	n	z	z	n	n	0	15



c)	T2 C	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	pos	ges
	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	0	15
	30	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	0	15
	60	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	0	15
	120	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	n	1	15
	180	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	n	1	15
	240	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	n	1	15
	300	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	1	15
	360	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	1	15

d)	T2 D	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	pos	ges
	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	n	n	n	z	0	15
	30	n	z	n	n	n	n	n	n	z	n	n	z	n	z	z	0	15
	60	n	n	n	n	n	z	n	n	z	n	z	z	n	z	<b>p</b>	1	15
	120	n	z	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	<b>p</b>	z	1	15
	180	n	n	n	n	n	z	n	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	z	1	15
	240	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	1	15
	300	n	z	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	z	0	15
	360	n	<b>p</b>	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	1	15

e)	T3 C	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	pos	ges
	0	n	n	n	n	n	z	n	n	n	n	n	n	n	n	n	0	15
	30	n	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	n	z	n	n	n	<b>p</b>	n	n	6	15
	60	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	z		13	15
	120	z	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	<b>p</b>	n	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	10	15
	180	z	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	n	z	<b>p</b>	<b>p</b>	8	15
	240	n	z	n	<b>p</b>	<b>p</b>	z	x	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	n	z	<b>p</b>	<b>p</b>	6	14
	300	n	n	z	z	<b>p</b>	z	x	<b>p</b>	<b>p</b>	n	n	n	<b>p</b>	z	<b>p</b>	5	14
	360	n	z	<b>p</b>	z	z	z	x	n	<b>p</b>	z	n	n	<b>p</b>	z	z	3	14

f)	T3 D	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	pos	ges
	0	n	<b>p</b>	n	n	z	<b>p</b>	z	n	n	n	n	n	<b>p</b>	<b>p</b>	z	4	15
	30	z	<b>p</b>	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	z	n	n	<b>p</b>	<b>p</b>	z	6	15
	60	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>		14	15
	120	<b>p</b>	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	z	z	n	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	9	15
	180	<b>p</b>	<b>p</b>	z	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	z	z	z	z	n	<b>p</b>	z	<b>p</b>	8	15
	240	<b>p</b>	<b>p</b>	n	z	<b>p</b>	<b>p</b>	x	z	<b>p</b>	z	z	n	<b>p</b>	<b>p</b>	z	7	14
	300	z	<b>p</b>	z	z	<b>p</b>	<b>p</b>	x	n	z	z	n	n	<b>p</b>	z	z	4	14
	360	z	<b>p</b>	n	n	<b>p</b>	<b>p</b>	x	n	n	z	n	n	z	z	z	3	14

3.4.2.2. Antikörperkontrolle mittels Immunoblot

In Tab. 28 sind die Gesamtproteingehalte der im Immunoblot eingesetzten Antigene aufgeführt.

Tab. 28. Gesamtproteingehalte der im Immunoblot eingesetzten Antigene

Antigen	C-Toxin	C-Dialysat	D-Toxin	D-Dialysat
µg/mL	301	921	23	882

In Abb. 21 a-c sind die Ergebnisse des Immunoblots dargestellt.

Bei dem Immunoblot gegen das C-Toxin (Abb. 21a) ist bei den positiven Kontrollen und bei allen geimpften Tieren eine deutliche Bande im Bereich der 100kDa und der 50kDa zu erkennen. Beim Pferdeserum und bei den geimpften Tieren sind über das gesamte kDa- Spektrum einzelne Banden erkennbar. Starke Banden befinden sich an den Stellen, an denen die das Toxin begleitenden Hämagglutinine (bei 33kDa, 22kDa und 17kDa) und die nichttoxische nichthämagglutinierende Komponente (bei 130kDa) liegen. Die Streifen der ungeimpften Tiere bleiben praktisch leer, obwohl sehr schwache Banden sowohl im Bereich der 100kDa als auch der 50kDa zu erkennen sind.

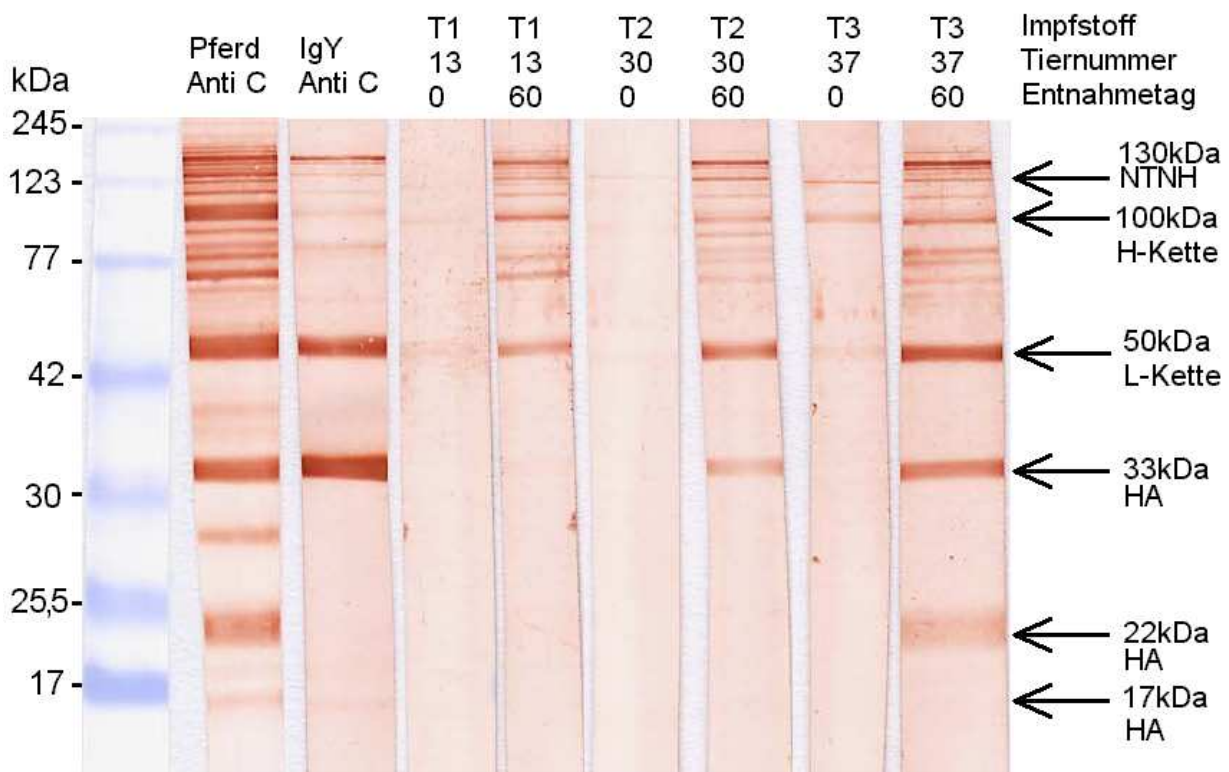


Abb. 21a: Immunoblot der Seren 13/0, 13/60, 30/0, 30/60, 37/0 und 37/60;  
Antigen: C-Toxin

Bei dem Immunoblot gegen das C Dialysat ist das Bandenmuster deutlich schwächer ausgeprägt als bei dem Blot gegen das C-Toxin. Allerdings ist auch hier nach der Impfung eine Zunahme des Bandenmusters erkennbar (Abb.21b).



Abb. 21b: Immunoblot der Seren 13/0, 13/60, 30/0, 30/60, 37/0 und 37/60;  
Antigen: C-Dialysat

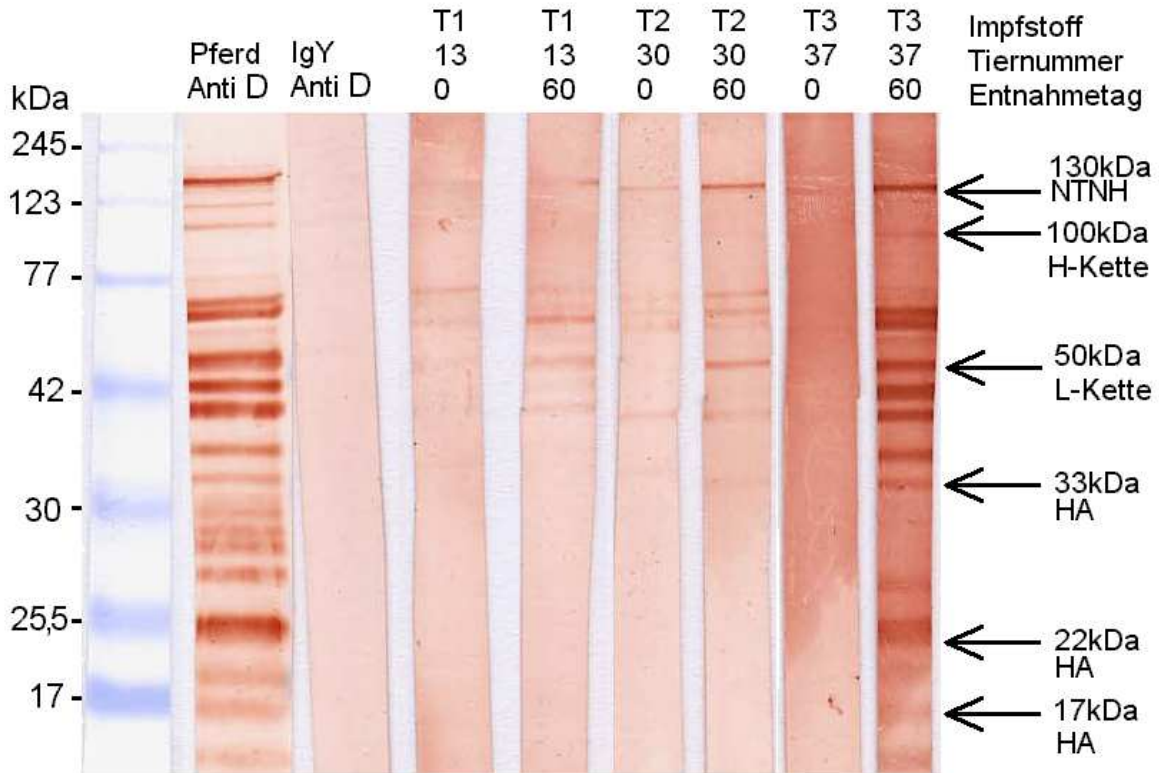


Abb. 21c: Immunoblot der Seren 13/0, 13/60, 30/0, 30/60, 37/0 und 37/60  
Antigen: D- Dialysat

Gegen das eingesetzte D-Dialysat ist im Immunoblot eine Reaktion zu erkennen (Abb. 21c). Bei diesem Toxintyp zeigt das Hyperimmunserum vom Pferd und das mit dem Impfstoff T3 geimpfte Tier ein sehr komplexes Bandenmuster. Bei beiden Seren ist eine schwache Reaktion im Bereich der schweren Kette und eine kräftige Reaktion im Bereich der leichten Kette zu erkennen. Bei den mit den anderen Impfstoffen geimpften Tieren ist eine schwache Reaktion im Bereich der leichten Kette zu finden, während bei dem verwendeten Hühnerantikörper die Banden im Bereich der leichten und der schweren Kette extrem schwach sind. Bei dem Immunoblot gegen das D-Toxin ist bei keinem der eingesetzten Seren eine Reaktion erkennbar.

### 3.4.3. Diskussion

Bei den im Vorversuch gewählten Verdünnungsstufen (1:5, 1:10 und 1:20) für die zu testenden Seren konnten entsprechende Extinktionsunterschiede zwischen den einzelnen getesteten Seren innerhalb der Verdünnungsstufe festgestellt werden. Die Einzelwerte aus den jeweiligen Vierfach-Bestimmungen zeigten bei der 1:10-Verdünnung der einzelnen Seren die geringste Schwankungsbreite. Die Werte der 1:20-Verdünnung ließen nicht so deutliche Unterschiede der Extinktion der Seren aus den einzelnen Entnahmetagen erkennen. Insgesamt wurde bei der 1:10-Verdünnung der Seren der günstigste Extinktionswert in Relation zu den anderen Werten gefunden. Für die Untersuchung der gesamten Seren wurde die Verdünnungsstufe 1:10 gewählt.

Die untersuchten Serumproben wurden in einem Feldversuch in Brasilien zur Überprüfung der Wirksamkeit von drei verschiedenen am Standort erhältlichen Toxoidvakzinen über eine Zeitspanne von einem Jahr nach erfolgter Impfung genommen. Geimpft wurde jeweils eine Gruppe von 15 ca. 6-8 Monate alten Tieren, entsprechend den Herstellerangaben der Impfstoffe. 15 Tiere dienten als ungeimpfte Kontrollgruppe. Alle geimpften Tiere stammten aus der Nachzucht eines Bestandes, wurden in diesem Bestand aufgezogen und gemästet. Sie befanden sich in einer Mastgruppe, die gemeinsam auf einer Weide gehalten wurde. Die erste Impfung erfolgte im März (Mitte bis Ende der Regenzeit), sodass die letzte Blutentnahme ebenfalls im März durchgeführt wurde.

Bei der Gruppe, die mit Impfstoff T2 geimpft wurde, konnte im ELISA gegen das Antigen Typ D bei drei Tieren nach der ersten bzw. zweiten Impfung ein positiver Antikörperspiegel gefunden werden. Zwei dieser Tiere hatten bereits vor der Impfung einen zweifelhaften Antikörperspiegel. Gegen das Antigen C bildete ein Tier (Nr. 17) am 120. Tag nach der ersten bzw. 90 Tage nach der zweiten Impfung einen messbaren Antikörperspiegel aus, sodass ein Zusammenhang mit der Impfung nicht wahrscheinlich ist. Im Mittel konnte im Serum der mit T2 geimpften Tiere kein höherer Antikörpertiter als im Serum der ungeimpften Kontrolltiere gemessen werden.

Impfstoff T1 konnte nach der ersten Impfung bei vier von 15 Tieren gegen das Antigen C und bei sechs von 15 Tieren gegen das Antigen D einen positiven Antikörpertiter erzeugen. Nach der zweiten Impfung hatten zusätzlich zwei Tiere bei Antigen C und 7 Tiere bei Antigen D einen positiven Antikörpertiter. Bis auf zwei Tiere erzielten alle übrigen nach der ersten Impfung einen als zweifelhaft zu beurteilenden Antikörpertiter. Bei einem Tier konnte weder gegen das Antigen C noch das Antigen D ein messbarer Antikörpertiter gefunden werden. Ein weiteres zeigte gegen das Antigen C keine messbare Antikörperbildung, gegen den Typ D konnte jedoch eine Antikörperbildung festgestellt werden.

Die Antikörpertiter der mit T1 geimpften Tiere gegen das Antigen C liegen wesentlich niedriger als die Antikörpertiter der mit T3 geimpften Tiere. Die gegen beide Antigene gemessenen Titer fallen bei den mit T1 geimpften Tieren nach drei Monaten ab und bleiben auf einem etwas höheren Niveau als vor der Impfung gegen Antigen C bis zum Ende der Beobachtungszeit stabil. Gegen Antigen D liegen die Antikörpertiter nach einem starken Abfall im dritten Monat bis zum neunten Monat nach der Impfung auf etwa vergleichbarer Höhe und fallen dann in den letzten beiden Beobachtungsmonaten bis auf das Niveau der ungeimpften Tiere ab.

Bis auf ein Tier aus der mit dem Impfstoff T3 geimpften Gruppe hatten alle nach der zweiten Impfung einen positiven Antikörpertiter. Die Antikörpertiter gegen Antigen C sind bei diesem Impfstoff homogener als gegen das Antigen D.

Die Antikörpertiter der mit T3 geimpften Tiere halten sich, verglichen mit den Antikörpertitern der mit T1 geimpften Tiere, über sechs Monate auf einem hohen Niveau und liegen erst 12 Monate nach der letzten Impfung auf vergleichbarem Niveau wie vor der Impfung.

Da die Tiere alle aus der selben Mastgruppe stammten, können unterschiedliche Ernährungssituationen während der Trockenperiode nicht als Erklärung der in der Trockenzeit unterschiedlich stark abfallenden Antikörpertiter der mit den Impfstoffen T1 und T3 geimpften Tieren dienen.

Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass die Impfung der Tiere eine deutliche Immunreaktion gegen die eingesetzten Antigene hervorruft. Es werden Antikörper gegen eine große Palette der im Antigen vorhandenen Proteine angezeigt. Dies liegt zum einen an der derzeit gängigen Praxis für die Herstellung von Impfstoffen gegen BoNT. Dabei werden Kulturüberstände von *C.-botulinum*-Kulturen einer je nach Hersteller unterschiedlichen Reinigung unterzogen und durch Formalinzusatz toxoidiert.

Der Einsatz von dialysiertem Toxin belegt eine Antikörperproduktion gegen viele in der Kultur vorhandenen Proteine. Diese müssen von *C. botulinum* in der Kultur gebildet worden sein, da die Tiere vor der Impfung nur eine sehr geringe Antikörperreaktion zeigen. Diese Reaktion könnte zum einen auf eine natürliche Exposition mit den Antigenen hindeuten, wahrscheinlicher ist aber, dass diese Reaktion auf eine Impfung der Tiere gegen andere Clostridiosen und Kreuzreaktionen auf diese Impfung zurückzuführen ist. Auf diesem Betrieb werden alle Tiere mit ca. 4 Wochen und beim Absetzen (4-6 Monate) gegen „Clostridiosen“ geimpft. Als „Clostridiosen“ beim Rind werden in Brasilien alle durch Clostridien mit Ausnahme von *C. botulinum* und *C. tetani* verursachten Krankheitsbilder zusammengefasst. Bei allen eingesetzten Antigenen außer dem hauseigenen D-Toxin können im Bereich der schweren und der leichten Kette (100 bzw. 50kDa) der BoNT Antikörperreaktionen

festgestellt werden. Bei dem D-Toxin war vermutlich die Gesamtproteinmenge von 23 µg/mL zu gering um auf dem Immunoblottstreifen eine Reaktion hervorzurufen. Diese Reaktion ist besonders deutlich bei dem eingesetzten C-Toxin zu erkennen. Aus den im Immunoblot gewonnenen Erkenntnissen kann gefolgert werden, dass die im ELISA gemessenen Extinktionen sowohl gegen BoNT als auch gegen sonstige von *C. botulinum* in der Kultur gebildeten Proteine wie Hämagglutinine und die nichttoxische nichthämagglutinierende Komponenten gerichtet waren.

Aus den vorgestellten Ergebnissen ist deshalb nur bedingt eine Aussage über die tatsächliche Effektivität der getesteten Impfstoffe möglich. Zur Bestimmung des Antikörpertiters wurde dem ELISA gegenüber dem Mäuseschutzversuch aus mehreren Gründen der Vorzug gegeben. Zwar haben Untersuchungen keine direkte Korrelation zwischen dem im ELISA ermittelten Antikörpertiter und der Schutzwirkung im Mäuseversuch ergeben (ADAMI, 1984), jedoch ist die bei der natürlichen Intoxikation durch Rinder tatsächlich aufgenommene Menge Toxin gänzlich unbekannt. Allein die Toxinmenge, die sich in einem Gramm Kadaversubstanz befindet, kann ausreichen, um ein Rind zu töten (THEILER und ROBINSON, 1927). Damit bleibt der für eine effektive Schutzwirkung erforderliche Antikörpertiter beim Rind ebenfalls unbekannt. Zudem ist ungewiss, welche Rolle gegen Hämagglutinine und nichttoxische nichthämagglutinierende Proteine gerichtete Antikörper bei einer natürlichen oralen Intoxikation spielen. Nach OHISHI et al. (1977) übernehmen die Hämagglutinine und die nichttoxischen nichthämagglutinierenden Proteine eine wichtige Schutzfunktion für das Neurotoxin bei der oralen Intoxikation. Die orale Toxizität der Neurotoxinkomponente ohne die umgebenden Proteine ist praktisch gleich Null. Bei jeder Vakzination ist deshalb das Erzielen eines höchst möglichen Antikörpertiters wichtig (JANSEN et al., 1976). Bei einigen zur Impfung vorgesehenen Tieren und auch bei einigen Tieren aus der ungeimpften Kontrollgruppe konnte ein bestehender Basisantikörpertiter gegen BoNT Typ C und D gefunden werden. Da die Tiere laut den Aussagen des Tierhalters noch nicht gegen Botulismus geimpft waren und noch keine Botulismuserkrankung auf dem Betrieb festgestellt worden war, könnte dieser AK-Titer durch eine natürliche Exposition hervorgerufen worden sein. JUBB et al. (1993) beschrieben das Vorliegen von gegen BoNT gerichteten Antikörpern bei an Botulismus erkrankten und gesunden Tieren. Sie vermuteten, dass die positiven Reagenten aus der gesunden Tiergruppe eine subklinische Intoxikation durchgemacht hätten.

Dies könnte im vorliegenden Fall auch der Grund für die hohen Basisantikörpertiter gewesen sein. Diese Reaktion könnte allerdings auch an Kreuzreaktionen zu der etwa zwei Monate zuvor erfolgten Impfung gegen „Clostridiosen“ gelegen haben.

Nach DÖBEREINER et al. (1992) tritt Botulismus in Brasilien während der Regenzeit gehäuft auf. Zu dieser Zeit ist die Masse an Grünfutter am größten, jedoch die durch die Weide bereitgestellte Menge Phosphor am geringsten. Osteophagie und die damit verbundene Aufnahme von BoNT sind in dieser Zeit gehäuft festzustellen. Eine prophylaktische Vakzination des Bestandes zur Botulismusprävention in Brasilien erscheint daher im September mit einer Boosterung im Oktober und einer jährlichen Wiederholungsimpfung im Oktober am zweckmäßigsten.

## 4. Zusammenführende Diskussion

### 4.1. Schlussbetrachtung

Als Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit wird festgestellt, dass die auf fast allen in Brasilien untersuchten Betrieben getroffenen Managementmaßnahmen für eine effektive Verhinderung eines Botulismusausbruchs nicht ausreichen. Ein Betrieb hatte ungenügend dekontaminierte Geflügeleinstreu gefüttert, bei zwei weiteren war vermutlich verunreinigte Silage der Intoxikationsgrund. Die Kadaverbeseitigung erfolgte nur auf einem Betrieb durch Verbrennen und anschließendes Vergraben. Es war auch der einzige Betrieb, der extensive Weidehaltung ohne *Brachiaria* sp., ohne Zufütterung von Silage oder anderem potenziell kontaminiertem Material betrieb und wo bisher kein Botulismus ausgebrochen war. Deshalb wurde der Standort für die Kontrollversuche zur Vakzinequalität ausgewählt. Trotzdem zeigte sich bei der Bestimmung der gegen BoNT gerichteten Antikörper bei einigen Tieren ein bereits vor der Impfung bestehender Titer. Daraus lässt sich schließen, dass entweder die Angaben des Tierhalters, noch keinen Botulismus gehabt zu haben, nicht zutreffen oder es bisher nur zu subklinischen Erkrankungen bzw. möglicherweise zu wenigen nicht als Botulismus diagnostizierten Todesfällen gekommen war.

Bei den Untersuchungen zur Impfstoffkontrolle stellte sich heraus, dass von drei getesteten Impfstoffen einer einen hohen Antikörperspiegel in der Impfpopulation hervorrufen konnte, der auch über einige Monate anhielt. Ein Impfstoff konnte keinen im ELISA messbaren Antikörpertiter erzeugen, während der Antikörpertiter des dritten getesteten Impfstoffes nach erfolgter Impfung schnell wieder abfiel. Alle diese Impfstoffe hatten den in Brasilien erforderlichen Wirksamkeitstest nach der Richtlinie Nr. 49 bestanden (BRASIL, 1992). Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse werfen zumindest in Bezug auf die Wirksamkeit des Impfstoffs T2 Fragen auf. Ein Vergleich des Antikörpertiters bei Meerschweinchen und bei Rindern, die mit diesem Impfstoff geimpft wurden, zeigte, dass die Antikörpertiter der Meerschweinchen den für die nationale Zulassung erforderlichen Antikörpertiter von 2 UI/mL überschritten. Die getesteten Rinder jedoch erreichten diesen Antikörpertiter nicht (FONSECA, 2001). Dies zeigte sich besonders bei BoNT Typ C, während der Antikörpertiter für Typ D zwar niedriger war als bei den anderen beiden Impfstoffen, die geforderten 2 UI/ mL aber erreichte. Die im untersuchten Probenmaterial vorherrschenden *C.-botulinum*-Typen waren die Typen C und D. Eine sinnvolle Impfung kann also auf diese Typen beschränkt bleiben. Der Typ A wurde in einer Probe gefunden. Es konnte aber kein zweifelsfreier Zusammenhang zu einer Botulismusintoxikation hergestellt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Erregeridentifizierung erwiesen sich als gut geeignet. Die zur Erregerisolation eingesetzten Medien und Methoden waren dagegen ungeeignet. Es konnte keine Reinkultur eines toxischen Stammes der für den Botulismus in Brasilien verantwortlichen Stämme C und D isoliert werden. Das Medium EA scheint sogar die Toxinbildung in Subkulturen zu unterdrücken, bzw. zerstört die Toxinbildungsfähigkeit der auf ihm wachsenden Kulturen von *C. botulinum* Typ C.

Mit Hilfe der Gaschromatographie konnten Stämme von *C. botulinum* identifiziert werden, eine einwandfreie Differenzierung war nicht möglich. Die Identifikation gelang mit der PCR nur bei

Typ A, da diese das Toxingen nachweist, welches bei den anderen untersuchten Stämmen offenbar nicht mehr vorhanden war.

#### 4.2. Schlussfolgerung

Auf Grund der hier vorgelegten Ergebnisse lässt sich postulieren, dass in unterschiedlichen Haltungssystemen (extensive oder intensive Fleischerzeugung, Milcherzeugung) weitgehend gleiche Management-Massnahmen anwendbar sind um eine effektive Botulismusbekämpfung mit daraus resultierenden geringen Tierverlusten bei adulten Tieren zu gewährleisten.

Im Wesentlichen besteht eine effektive Botulismuskontrolle aus ineinander greifenden, sich gegenseitig bedingenden Massnahmen:

- gutes Weidemanagement
- Mineralstoffsupplementierung
- Kadaverbeseitigung
- Vakzinierung.

Unterschiede ergeben sich aus den jeweiligen Haltungssystemen, die noch einmal gesondert beschrieben werden sollen:

Extensive Weidehaltung für die Fleischproduktion und Nachzucht:

Die zentrale Massnahme bei der extensiven Weidehaltung ist die adäquate Supplementierung der Tiere mit Mineralstoffen, insbesondere Phosphor. Dabei ist darauf zu achten, dass eine Mineralstoffaufnahme *ad libitum* möglich und das Platzangebot an den jeweiligen Leckstellen ausreichend ist, um auch den rangniederen Tieren eine ausreichende Mineralstoffaufnahme zu ermöglichen. Als praktikabel erwies sich mindestens eine Leckstelle pro Weide mit einem Platzangebot von mindestens 10 cm pro auf dieser Weide gehaltenem Tier. Bei sehr großen Arealen müssen eventuell mehrere Leckstellen pro Weide eingeplant werden, damit die zur Leckstelle zurückzulegende Strecke nicht zu groß wird und die Tiere somit nicht auf näher gelegene Mineralstoffressourcen (Kadaver) zurückgreifen. Die Leckstellen müssen mit einem Dach versehen sein, damit die insbesondere in der Regenzeit notwendige Mineralstoff-supplementierung nicht mit dem Regen weggeschwemmt wird.

Eine weitere wichtige Massnahme bei der extensiven Weidehaltung ist die effektive Beseitigung anfallender Kadaver. Dabei spielen mehrere Überlegungen eine wichtige Rolle. Werden Kadaver vergraben, besteht die Gefahr, dass Aasfresser (Gürteltiere) die Kadaver wieder ausgraben und damit für Wiederkäuer zugänglich machen. Beim unsachgemäßen Vergraben und durch den Zerfall der Kadaver können sich mit der Zeit kleine Bodensenken bilden, in denen sich in der Regenzeit Wasser ansammeln kann. Neue Intoxikationen können dann auftreten, wenn BoNT in das Wasser gelangt und von Rindern beim Trinken mit aufgenommen wird. Beim Verbrennen besteht immer die Gefahr der großflächigen Verbreitung sporen-haltigen Materials durch in die Luft wirbelnde Aschepartikel, aber auch der Konservierung der Sporen in unverbrannten Resten, wie z. B. im Mark der schwer zu verbrennenden Knochen. Gleiches gilt, wenn die Kadaver Aasgeiern zur schnellen Verwertung zugänglich gemacht würden (z.B. durch Abhäuten der Kadaver). Jedoch ist davon auszugehen, dass man bei einer schnellen Verbrennung der ungeöffneten Kadaver innerhalb weniger Stunden nach dem Verenden mit



einer geringen Menge im Tierkörper gebildeter Sporen rechnen kann. Die meist sehr großen Areale in der extensiven Rinderproduktion Brasiliens machen ein rasches Auffinden verendeter Tiere jedoch sehr schwer. Die angesprochenen Punkte zeigen, dass die Kadaverbeseitigung ein nur schwer lösbares Problem darstellt und es somit keine allgemeingültige Vorgehensweise geben kann. Die Lösung dieses Problems muss also ganz auf die Kadaververmeidung bzw. Tiergesundheit ausgerichtet sein. Tiere, die das Fressen von Kadavern erlernt haben, und deren Nachzucht sollten möglichst gemerzt werden, damit diese Unart nicht an andere Tiere weitergegeben werden kann.

Die Vermeidung von Überstockung als Weidemanagementmassnahme sollte nicht nur aus allgemein tierhygienischer Sicht selbstverständlich sein, sondern auch, damit eine Zufütterung minderwertiger Futtermittel als Intoxikationsquelle unterbleiben kann. Als weitere Maßnahme sollte ein Wechsel der weithin angebauten *Brachiaria spp.* hin zu Futtergräsern mit einem höheren Phosphorgehalt erfolgen. Eine intensive Düngung der Weideflächen mit phosphathaltigen Düngern und damit die Erhöhung des Phosphorgehaltes der Futterpflanzen kann auf kleineren Flächen in Erwägung gezogen werden. Für große Flächen ist diese Massnahme eher unpraktikabel und auch sehr teuer, zumal der aufgebrachte Phosphor in tropischen Böden mit den darin enthaltenen Aluminiumverbindungen schnell wieder in eine für die Pflanze unverwertbare Form umgewandelt wird.

SOUZA (2001) beschreibt eine weitere in Brasilien problematische Intoxikationsquelle: künstlich angelegte Wasserlöcher, die zisternenartig das Wasser in der Regenzeit sammeln und für die Trockenzeit bereitstellen. Bei zunehmender Trockenheit können die Tiere oft nur noch verschmutztes schlammiges Wasser aufnehmen, in dem nahezu ideale Bedingungen für eine Toxinbildung von *C. botulinum* bestehen. Mit Windkraft betriebene Grundwasser fördernde Viehtränken bzw. Umzäunung der Wasserreservoirs und Einleitung in hygienisch angelegte Tränken, womit dieses Problem eliminiert würde, werden in Brasilien kaum genutzt.

Eine weitere wichtige Massnahme ist eine zum idealen Zeitpunkt erfolgende Impfung mit einem effektiven Impfstoff. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in dieser Hinsicht große Unterschiede bei den getesteten zugelassenen Impfstoffen bestehen. Der Zeitpunkt für eine jährliche Impfung des Bestandes sollte möglichst zum Beginn der Regenzeit gewählt werden, da dann die Gefahr der Botulismuserkrankungen am höchsten ist. Noch nicht grundimmunisierte Tiere sollten etwa vier bis sechs Wochen vor diesem Zeitpunkt die Erstimpfung erhalten.

Eventuell könnte die alljährliche Botulismusimpfung gemeinsam mit der im November gesetzlich vorgeschriebenen Impfung gegen die Maul- und Klauenseuche gegeben werden. So könnte ein für die Tiere stressintensiver und für die Viehhirten arbeitsintensiver weiterer Auftrieb vermieden werden. Mittlerweile steht ein Kombinationsimpfstoff gegen clostridiale Erkrankungen mit neun unterschiedlichen Antigenen (mit Formalin inaktivierte Kulturen von *C. chauvoei* und toxoidierte Toxine von *C. botulinum* Typ C und D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* Typ B, C, und D und *C. sordellii*) zur Verfügung (POLISTAR, VALLÉE), der Jungtieren beim Absetzen gegeben werden könnte. Feldversuche zur Wirksamkeit dieses Impfstoffes bei Rindern sollten dann für jedes enthaltene Antigen gesondert durchgeführt werden, da für die nationale Zulassung nur die Wirksamkeitsüberprüfung gegen *C. chauvoei* erfolgt.

Sollten bei einem nach diesen Richtlinien geführten Betrieb keine Botulismusfälle auftreten, kann, solange es die Infektionslage zulässt, eventuell auf eine Impfung des gesamten Bestandes verzichtet werden, wenn die besonders gefährdeten Kühe zum Beginn der Regenzeit

einen ausreichenden Impfschutz erhalten. Dies ist aber bei Betrieben nicht möglich, die schon Botulismusausbrüche hatten. Dort wird es nach Aussetzen der Impfung immer wieder zu einzelnen Fällen bis zu einem größeren Ausbruch kommen, weshalb hier die Impfung aller Tiere ab sechs Monaten, möglichst zum Beginn der Regenzeit, als weitere wichtige Stützmassnahme zur effektiven Botulismuskontrolle erforderlich ist.

Intensive Fleisch- und Milcherzeugung:

Bei intensiven Mastbetrieben und auch bei milcherzeugenden Betrieben steht eine wiederkäuergerechte Fütterung mit der begleitenden Impfung aller Tiere im Mittelpunkt der Vermeidung größerer Totalverluste. Den hier eingesetzten Futtermitteln ist häufig „von Außen“ nicht anzusehen, ob es darin zur Entwicklung des BoNT gekommen ist oder nicht.

Ein besonderes Augenmerk ist deshalb auf eine gute allgemeine Fütterungspraxis zu legen.

Dabei ist insbesondere darauf zu achten, dass

- die Versorgung mit Nähr- und Mineralstoffen den einzelnen Leistungsstadien wie Trächtigkeit, Laktation oder Mast angepasst wird
- der Futtermittelverzehr in den Phasen mit hohem Nährstoffbedarf durch eine gute Futterqualität auf die Bedürfnisse des Tieres abgestimmt ist
- Futtermittel entsprechend ihren Eigenschaften und Nährstoffgehalten eingesetzt werden.

Ein jahreszeitlich gebundenes Auftreten des Botulismus ist aufgrund einer ganzjährig gleichbleibenden Fütterung eher nicht zu erwarten, weshalb die Impfung der im feed-lot gehaltenen Tiere zweckmäßigerweise bei der Aufstallung erfolgen wird. Hierbei sollte insbesondere darauf geachtet werden, dass ausschließlich Tiere aufgestellt werden, die während der Aufzucht die notwendigen Impfungen, wie z.B. gegen Rauschbrand, erhalten haben, sodass bei der Aufstallung nur noch die Impfung gegen Botulismus gegeben werden muss. Idealerweise stammen solche Tiere aus der eigenen Nachzucht. Sollte ein Zukauf notwendig werden, empfiehlt sich eine Wiederholung der Impfung gegen Rauschbrand. Die Anforderungen an einen effektiven Impfstoff sind teilweise bereits bei JANSEN (1976) beschrieben, sollen der Vollständigkeit halber aber noch einmal angesprochen werden. Der einzusetzende Impfstoff muss über die notwendige Spezifität verfügen, d. h. er muss Antikörper gegen die in Brasilien vorkommenden BoNT der dort verbreiteten Stämme erzeugen. Mit den für die Impfstoffproduktion verwendeten Typen C und D wird ein großer Teil der Intoxikationen erfasst. Einige Autoren konnten jedoch in Brasilien auch andere BoNT für Intoxikationen verantwortlich machen (LOBATO et al., 1988 und SCHOCKEN-ITURRINO, 1990), die bei ausschließlicher Verwendung von bivalentem Impfstoff weiterhin auftreten können. Der im Rahmen dieser Arbeit gefundene BoNT-Typ A unterstreicht dies.

Da die aufgenommene Menge von BoNT während eines Intoxikationsgeschehens weiterhin unbekannt bleibt, kann ein Impfstoff nur auf die höchst möglich zu erzielende Antikörpermenge ausgerichtet sein, die über einen relativ langen Zeitraum auf einem hohen Niveau verbleibt.

Dieses Kriterium wurde in dieser Arbeit nur bei einem der getesteten Impfstoffe erreicht (T3).

Alle drei der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Impfstoffe hatten die nationale Zulassung der zuständigen Behörde erhalten. Die Zulassungskriterien sind in der Richtlinie Nr. 49 festgehalten (BRASIL, 1992). Nach dieser Richtlinie werden Meerschweinchen mit der für Rinder empfohlenen Menge Impfstoff (bei den hier eingesetzten Impfstoffen also 5 mL) geimpft und im

Mäusebelastungstest der Antikörpertiter ermittelt. Die für eine erfolgreiche Zulassung erforderlichen Antikörpertiter liegen bei 5 IU/mL (Typ C-AK) und 2 IU/mL (Typ D-AK). Da ein ELISA in der Regel nicht mit dem Mäuseschutzversuch korreliert, kann bei den durchgeführten Versuchen keine Aussage über den Antikörpertiter, wie er im Mäuseschutzversuch ermittelt würde, getroffen werden. Jedoch besteht kein Zweifel darüber, dass ein effektiver Impfstoff auch im ELISA zwangsläufig einen höheren Antikörpertiter erzeugen müsste im Vergleich zu vollkommen ungeimpften Kontrolltieren. Dies war bei Impfstoff T2 nicht gegeben. Der Antikörpertiter der mit diesem Impfstoff geimpften Tiere lag im Durchschnitt sogar noch unter dem der nicht geimpften Tiere.

Allerdings muss aus den Ergebnissen des ELISA und des Immunoblot ebenfalls in Frage gestellt werden, ob die Qualität bzw. der Herstellungsprozess der untersuchten Impfstoffe den heutigen Anforderungen an eine Vakzine gerecht wird. Die Ergebnisse belegen, dass nur ein kleiner Teil der insgesamt gebildeten Antikörper überhaupt gegen das Toxin selbst gerichtet ist. In diesem Zusammenhang bleiben offene Fragen, die nicht zur Fragestellung dieser Arbeit gehören, die aber dennoch einen weiteren Forschungsbedarf erfordern:

- Könnte eine Vakzine, die ausschließlich gegen das Toxin gerichtet ist, einen ausreichenden Immunschutz für eine natürliche orale Intoxikation gewährleisten?
- Welche Rolle spielen die neben dem Toxin gebildeten Proteine von *C. botulinum* und gegen sie gerichtete Antikörper, die bei der Verimpfung der Gesamtkultur mit entstehen würden, bei einer natürlichen oralen Intoxikation und könnten diese Antikörper schon im Gastrointestinaltrakt die Aufnahme des Toxins verhindern?
- Ist der Mäuseschutzversuch, bei dem mit intraperitoneal oder intravenös injiziertem Toxin belastet wird, überhaupt eine effektive Methode um einen schützenden Antikörpertiter gegen ein immunologisch so komplexes Geschehen zu bestimmen?

## 5. Zusammenfassung

Untersuchungen zu den Einflussfaktoren einer effizienten Bekämpfungsstrategie für Rinderbotulismus in Brasilien.

Große-Herrenthey, Anke

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig und Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Universität Göttingen  
Eingereicht im März 2004

Schlüsselworte: Botulismus, Impfstoffe, Rinder, Brasilien

116 S.; 25 Abb.; 30 Tab.; 263 Lit.; Anhang

In der tropischen Rinderproduktion ist Botulismus eine zu hohen Verlusten führende Seuche. In Brasilien gehört Botulismus neben Tollwut und Pflanzenvergiftungen zu den drei verlustreichsten Erkrankungen adulter Rinder. Während in Ländern wie Australien oder Südafrika Botulismus gut kontrollierbar geworden ist, werden in Brasilien die Verluste auf etwa 1% des gesamten brasilianischen Rinderbestandes pro Jahr geschätzt. Da Impfstoffe selbst in entlegenen Regionen erhältlich sind, sollen mit der vorliegenden Arbeit Gründe für die anhaltend hohen Verluste untersucht werden.

Die Arbeit untersucht dazu drei unterschiedliche Bereiche:

- Die Tierhalterbefragung, bei der geklärt werden sollte, welche Maßnahmen zum Schutz vor Botulismus ergriffen werden.
- Die bakteriologische Untersuchung, mit der die in Brasilien vorherrschenden *C.-botulinum*-Typen bestimmt werden sollten.
- Die Impfstoffkontrolle, mit der kommerziell erhältliche Impfstoffe auf ihre Wirksamkeit untersucht werden sollten.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Tierhalterbefragung zeigte, dass die Prävention durch geeignete Managementmaßnahmen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Tierbesitzer beschränken sich weitgehend auf die Bekämpfung der bereits ausgebrochenen Erkrankung. Plötzliche Ausbrüche mit hohen Tierverlusten werden dabei in Kauf genommen.
- Die bakteriologische Untersuchung ergab, dass C und D die überwiegend vorherrschenden Typen von *C. botulinum* sind. Bivalente Impfstoffe dagegen wären also potentiell wirksam. Andere endemische Typen, wie der nachgewiesene Typ A, würden dabei allerdings nicht mit abgedeckt.
- Die Untersuchung der Impfstoffe zeigte erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Vakzinen in der Höhe der gebildeten Antikörper und in der Persistenz eines hohen Antikörperspiegels. Das gewählte Testsystem ELISA erwies sich dabei als nur bedingt geeignet. Der Immunoblot konnte die im ELISA gefundenen Ergebnisse bestätigen, zeigte aber auch die Schwächen des ELISA auf.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Verluste durch Botulismus weitgehend auf Mängel im Management zurückzuführen sind. Diese sind insbesondere das Fehlen einer Botulismusimpfung im Standardprogramm des Betriebsmanagements. Dazu kommen die Verfütterung kontaminierter Futtermittel und die unzureichende Beseitigung von verendeten Rindern.

## 6. Summary

Investigations on influencing factors of an efficient prevention strategy against cattle botulism in Brazil (States of Sao Paulo, Goias, Mato Grosso do Sul).

Grosse- Herrenthey, Anke

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Institute of Agronomy and Animal Production in the Tropics, University of Göttingen

Submitted in March 2004

Keywords: Botulism, Vaccine, Cattle, Brazil

116 pages; 25 pictures; 30 tables; 263 citations; appendix

Botulism is a disease, which still causes high losses in tropical cattle production systems. In Brazil botulism shows next to rabies and plant poisonings the highest mortalities in adult cattle, whereas in countries like Australia or South Africa botulism has to some extent come under control. Estimated losses in Brazil are in the range of 1 % p.a. of the total cattle population. Since even in remote areas vaccines are available the goal of this investigation was to identify causes for continual high losses.

The study is based on three different areas of investigation:

- A field survey in order to identify effective management measures to protect cattle against botulism.
- A bacteriological analysis to identify the main endemic types of *C. botulinum*.
- A study of the efficacy of commercially available vaccines.

Results were as follows:

- The field survey showed that preventive herd management is practically only of secondary importance. Cattle owners restrict their activities mainly on the treatment of clinical cases, while outbreaks with high losses of animals are widely tolerated.
- The bacteriological analysis showed that the predominant types of *C. botulinum* are C and D. Therefore bivalent vaccines against these types could be effective. Other existing types, e. g. type A, which was found in one case, would not be covered.
- The efficacy of vaccines showed considerable differences regarding production of antibodies and persistence of a high level of protection between the different tested vaccines. As a tool for testing the ELISA proved to be only partly suitable. An additional immunoblot confirmed the ELISAs result, but showed also its shortcomings.

Finally it is discussed that losses due to botulism result extensively from deficiencies in herd management. These are especially the absence of a systematic vaccination program against botulism integrated into the regular herd management, furthermore, the use of contaminated feeds like poultry droppings, and an ineffective removal of carcasses and carrion.