

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Literaturstudie zum Vermehrungs- und Toxinbildungs-
vermögen von *Clostridium botulinum*,
zu den Eigenschaften des Botulinumtoxins sowie zum
Vorkommen und zur Tenazität der *Clostridium botulinum*-Sporen**

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

eingereicht von
Claudia Preising, geb. Tamm
aus Leipzig

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Gutachter: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber, Institut für Lebensmittelhygiene,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Prof. Dr. Roger Stephan, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene,
Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 24.10.2006

Meinen Eltern in Dankbarkeit,
meinem Mann in Liebe gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Pathogenese und Klinik des Botulismus	3
2.1	<i>C. botulinum</i>	3
2.1.1	Spore	4
2.1.1.1	Bildung	5
2.1.1.2	Auskeimung	6
2.1.2	Virulenzfaktoren	7
2.1.2.1	Botulinumneurotoxin	7
2.1.2.1.1	Aufbau	8
2.1.2.1.2	Synthese	9
2.1.2.1.3	Aktivierung	10
2.1.2.1.4	Pharmakologie und Wirkung	11
2.1.2.1.5	Bakteriophagen und Plasmide	12
2.1.2.2	Weitere Toxine	13
2.1.2.2.1	C ₂ -Toxin	13
2.1.2.2.2	C ₃ -Exoenzym	13
2.1.2.3	Bakteriozinbildung	13
2.2	Formen des Botulismus	14
2.2.1	Lebensmittelbedingter Botulismus	14
2.2.2	Wundbotulismus	14
2.2.3	Sonderformen	15
2.2.3.1	Säuglingsbotulismus	15
2.2.3.2	Infektiöser Erwachsenenbotulismus	17
2.2.3.3	Iatrogener Botulismus	17
2.3	Klinischer Verlauf	18
3	Vorkommen von <i>C. botulinum</i> und des Botulismus	20
3.1	Geographische Verteilung	21
3.1.1	Amerika	21
3.1.2	Europa	22
3.1.3	Afrika	23
3.1.4	Asien	24
3.2	Epidemiologische Aspekte	25
3.2.1	<i>C. botulinum</i> -Typ C – Geflügel	27
3.2.2	<i>C. botulinum</i> -Typ E – Fisch	28
3.2.3	Bedeutung silierter Futtermittel	29

3.2.4	In Verbindung mit Botulismus diskutierte Erkrankungen	30
3.2.4.1	Key-Gaskell-Syndrom	30
3.2.4.2	Viszeraler Botulismus	30
3.2.4.3	Shaker Foal Syndrome und Equine Grass Sickness	31
3.3	Ursächliche Lebensmittel	31
3.4	Quantitative Angaben	34
3.5	Auftreten von Botulismus beim Menschen	37
4	Beeinflussung von Spore, vegetativer Zelle und BoNT	39
4.1	Physikalische Faktoren	40
4.1.1	Temperatur	40
4.1.1.1	Wärme	42
4.1.1.1.1	Einfluss auf die Spore	42
4.1.1.1.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	49
4.1.1.1.3	Einfluss auf das Botulinumtoxin	50
4.1.1.2	Kälte	51
4.1.1.2.1	Einfluss auf die Spore	51
4.1.1.2.2	Einfluss auf die vegetativen Zellen der Gruppe I (Typ A sowie proteolytische Stämme der Typen B und F)	53
4.1.1.2.3	Einfluss auf die vegetativen Zellen der Gruppe II (Typ E sowie saccharolytische Stämme der Typen B und F)	54
4.1.1.2.4	Einfluss auf die vegetativen Zellen des Typ C	55
4.1.1.2.5	Einfluss auf das Botulinumtoxin	56
4.1.1.2.6	RePFED-Produkte	56
4.1.2	Bestrahlung	57
4.1.2.1	Einfluss auf die Spore	57
4.1.2.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	59
4.1.2.3	Einfluss auf das Botulinumtoxin	60
4.1.2.4	Interaktion mit anderen Einflussfaktoren	60
4.1.2.5	Gesetzliche Regelungen	60
4.2	Chemische Faktoren	61
4.2.1	Wasseraktivität	61
4.2.1.1	Einfluss auf die Spore	61
4.2.1.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	61
4.2.1.3	Interaktion mit anderen Einflussfaktoren	62
4.2.1.4	a_w -Werte ausgewählter Lebensmittel	63
4.2.2	pH-Wert	63
4.2.2.1	Einfluss auf die Spore	63
4.2.2.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	65
4.2.2.2.1	In synthetischen Medien	66
4.2.2.2.2	In Futter- oder Lebensmitteln	67

4.2.2.3	Einfluss auf das Botulinumtoxin	68
4.2.2.4	Interaktion mit anderen Einflussfaktoren	68
4.2.2.5	pH-Werte in Lebensmitteln	69
4.2.3	Reduktions-Oxidations-Potential	69
4.2.3.1	Einfluss auf die Spore	69
4.2.3.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	70
4.2.3.3	E _h -Werte verschiedener Lebensmittel	70
4.2.4	Veränderte Gasatmosphären	71
4.2.4.1	Einfluss auf die Spore	71
4.2.4.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	72
4.2.4.3	Interaktion mit anderen Einflussfaktoren	74
4.2.5	Einsatz von Pökelsalzen	75
4.2.5.1	Zugabe von Nitrat	75
4.2.5.2	Zugabe von Nitrit	76
4.2.5.2.1	Einfluss auf die Spore	76
4.2.5.2.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	77
4.2.5.2.3	Interaktion mit anderen Einflussfaktoren	78
4.2.5.3	Zugabe von Natriumchlorid	78
4.2.5.3.1	Einfluss auf die Spore	78
4.2.5.3.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	79
4.2.5.3.3	Interaktion mit anderen Einflussfaktoren	81
4.2.6	Räuchern	81
4.2.7	Verschiedene Zusätze	81
4.2.7.1	Einfluss auf die Spore	81
4.2.7.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	82
4.2.7.3	Einfluss auf das Botulinumtoxin	84
4.3	Biologische Faktoren	85
4.3.1	Inokulum	85
4.3.2	Interaktion mit anderen Mikroorganismen	86
4.3.2.1	Wirkungsmechanismen	86
4.3.2.1.1	Verderbnis	86
4.3.2.1.2	Beeinflussung des pH-Wertes	86
4.3.2.1.3	Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes	87
4.3.2.1.4	Bakteriozine	87
4.3.2.2	Einfluss auf die Spore	89
4.3.2.3	Einfluss auf die vegetative Zelle	90
4.3.3	Lysozym	90
4.3.3.1	Einfluss auf die Spore	91
4.3.3.2	Einfluss auf die vegetative Zelle	91

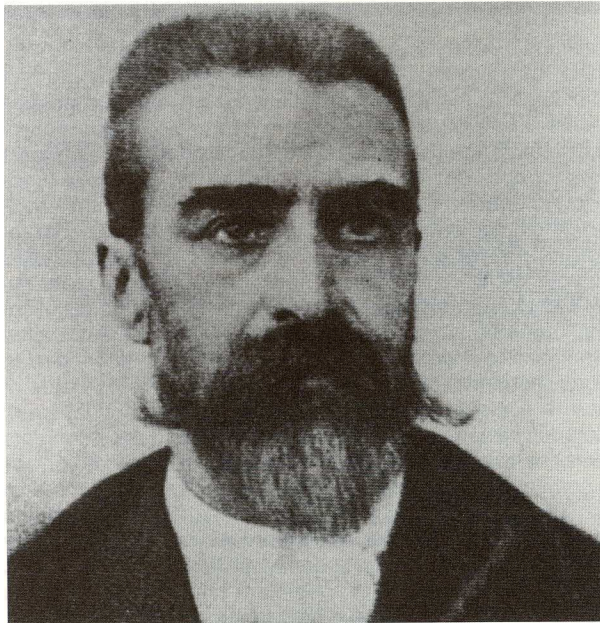
5	Diagnostik, Therapie und Prophylaxe	92
5.1	Verdachtsdiagnose	92
5.2	Erregernachweis	94
5.3	Toxinnachweis	95
5.3.1	Gesetzlich vorgeschriebener Tierversuch	95
5.3.2	Alternativen	96
5.3.2.1	In-Vivo	96
5.3.2.2	In-Vitro	96
5.4	Therapie und Prophylaxe	97
6	Diskussion	99
7	Zusammenfassung	105
8	Summary	107
9	Literaturverzeichnis	109
10	Anhangsverzeichnis	I
11	Anhang	VII
12	Literaturverzeichnis des Anhangs	XL

Abkürzungsverzeichnis

BoNT	BotulinumNeuroToxin
BSE	Bovine Spongiforme Encephalopathie
CA	Controlled Atmosphere
C.	<i>Clostridium</i>
CMM	Cooked Meat Medium
d	dies
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
etc.	et cetera
exkl.	exklusive
ges.	gesamt
ggf.	gegebenenfalls
GIT	GastroIntestinalTrakt
k.A.	keine Angaben
KBE	KolonieBildende Einheiten
lat.	lateinisch
LD ₅₀	mittlere Letaldosis
max.	maximal
MHD	Maximales HaltbarkeitsDatum
MLD	Minimale Letale Dosis
NaCl	Natriumchlorid
NYG (-Medium)	Neopeptone - Yeast extract - Glucose
PCR	Polymerase Chain Reaction
physiol.	physiologisch
pos.	positiv
RePFED	Refrigerated Processed Food of Extended Durability
sacch.	saccharolytisch
SID	Sudden Infant Death
sog.	so genannte
spp.	Spezies
Syn.	Synonym
TS	TrockenSubstanz

1 EINLEITUNG

Bei *C. botulinum* handelt es sich um eine heterogene Gruppe anaerober Bakterien, die die Fähigkeit zur BoNT-Synthese und Sporenbildung eint. Die durch *C. botulinum* auf verschiedene Weise hervorgerufene Erkrankung des Botulismus kommt weltweit vor, wenn auch mit verschiedener Inzidenz.



Das Krankheitsbild des Botulismus wurde erstmals durch Justinus Kerner im Jahre 1820 beschrieben. Er benannte es nach dem verursachenden Nahrungsmittel (botulus, lat. Wurst). Nachdem der auslösende Erreger zunächst durch VAN ERMENGEN (1897) (Abbildung 1) in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs nachgewiesen wurde, belegte LANDMANN (1904) erstmals das Vorkommen des Erregers in Gemüse.

Abbildung 1: Emile van Ermengen (CHERINGTON 1998)

Die weitere Erforschung des Erregers führte zur Entdeckung verschiedener Toxintypen (Tabelle A1), wonach die Benennung der verschiedenen Stämme erfolgte. Dies erwies sich als problematisch, da einerseits auch andere Clostridienspezies zur BoNT-Synthese befähigt sind (HALL et al. 1985; MCCROSKEY et al. 1986) und andererseits eine „Übertragung“ des Toxinbildungsvermögens nachgewiesen wurde (EKLUND et al. 1974).

Die aktuelle Einteilung erfolgt unter zwei Aspekten:

- (1) aufgrund der biochemischen (Tabelle A2) und morphologischen (Tabelle A3) Eigenschaften in vier metabole Gruppen (Tabelle A4), denen jedoch auch andere Clostridienspezies zugerechnet werden
- (2) aufgrund des gebildeten Toxins in die Typen A, B, C₁, C₂, D, E, F und G

Weiterhin haben SUEN et al. (1988a) durch ihre genetischen Untersuchungen nachgewiesen, dass der Typ G eine eigene Spezies darstellt. Dieser und einige nicht-toxische Stämme von *C. subterminale* und *C. hastiforme* sind daraufhin zur Spezies *C. argentinense* zusammengefasst worden. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff *C. botulinum*-Typ G verwendet - zum einen der Verständlichkeit wegen und zum anderen, da bisher für die betreffenden Stämme von *C. subterminale* und *C. hastiforme* keine Befähigung zur BoNT-Synthese nachgewiesen wurde.

Wichtig bei der epidemiologischen Bewertung eines Botulismusgeschehens ist die Kenntnis über die verschiedenen Pathomechanismen und Formen des Botulismus. Während es sich bei der lebensmittelbedingten Variante um eine Intoxikation handelt, kann auch eine Infektion mit Sporen, aus denen sich im weiteren Verlauf vegetative Zellen entwickeln, zu Botulismus führen.

Die Bedeutung von *C. botulinum* wird weitgehend unterschätzt, da in Deutschland nur 10 bis 20 Erkrankungsfälle des Menschen pro Jahr auf diesen Erreger zurückzuführen sind. Gefährlich ist dies, da es sich um einen ubiquitär vorkommenden Erreger handelt, der somit auch in Lebensmitteln vorkommen kann. Dass die Schwere des Krankheitsbildes nicht unterschätzt werden darf, wird anhand einer weltweit geschätzten Mortalitätsrate von 20% (HATHEWAY 1995a) deutlich. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren neue Krankheitsbilder beobachtet, die eine zügige Diagnostik erschweren und die Gefahr einer deutlich höheren Dunkelziffer mit sich bringen.

Seit der Entdeckung von *C. botulinum* besteht großes Interesse an Erkenntnissen über die Hemmung des vegetativen Wachstums, der Toxinbildung und der Sporenaktivierung. Folglich gibt es in der nationalen und internationalen Fachliteratur eine Vielzahl an veröffentlichten Untersuchungsergebnissen, die sich einerseits auf das Vorkommen und andererseits auf die unterschiedlichen Umweltbedingungen und deren Einfluss auf die vegetative Zelle bzw. Spore beziehen.

In den letzten Jahren hat der gesundheitliche Verbraucherschutz in der Öffentlichkeit einen bisher nicht gekannten Stellenwert erreicht. Die Politik der Europäischen Union in Fragen der Lebensmittelsicherheit basiert auf einer wissenschaftlichen Risikobewertung in der gesamten Nahrungskette. Gleichzeitig gelangen in der Lebensmittelwirtschaft immer mehr neue, die Lebensmittelbeschaffenheit möglichst wenig beeinträchtigende Technologien zur Anwendung, da der Verbraucher „natürliche“ Produkte, die dennoch haltbar sind, bevorzugt.

Aus all diesen Beweggründen heraus ist diese Arbeit entstanden mit dem Ziel, eine aktuelle Übersicht über Vorkommen und quantitative Nachweisraten von *C. botulinum* sowie über die Vermehrungs- und Toxinbildungsbedingungen zu schaffen.

Anhand einer Vielzahl variierender Untersuchungsergebnisse wird gezeigt, durch welche Behandlungsmethoden botuline Sporen bzw. deren vegetative Zellen und das BoNT gehemmt bzw. zerstört werden können und inwieweit dieses Wissen im Bereich der Lebensmittelproduktion anwendbar ist. Es ist beabsichtigt, mit der vorliegenden Arbeit einen Beitrag für eine sichere Risikobewertung in Bezug auf die Prävention von *C. botulinum*-Erkrankungen zu leisten.

2 PATHOGENESE UND KLINIK DES BOTULISMUS

Botulismus wird beim Menschen hauptsächlich durch die Typen A, B und E, bei den Tieren durch die Typen C und D verursacht (DAVIES et al. 1974; SCHIEFELBEIN 1986; TEUSCHER u. LINDEQUIST 1994; VAN DER LUGT et al. 1995; MONACO et al. 1998).

Deutlich seltener werden andere *C. botulinum*-Typen als ursächlich nachgewiesen. Beispielsweise konnten beim Menschen vereinzelt Botulismuskfälle auf die Typen C (PREVOT et al. 1955; OGUMA et al. 1990) und D (DEMARCHI et al. 1958) zurückgeführt werden. SONNABEND et al. (1981) wiesen *C. botulinum*-Typ G und sein Toxin bei 5 plötzlich Verstorbenen nach. Allerdings bleibt unklar, inwieweit diese Intoxikation (oder Infektion?) todesursächlich war.

Vereinzelte Berichte liegen über Botulismus bei Affen vor – verursacht durch *C. botulinum*-Typ C (SMART et al. 1980; LEWIS et al. 1990).

Bei Pferden traten Botulismuskfälle verursacht durch die Typen C (MACKAY u. BERKHOFF 1982; KINDE et al. 1991) und A (KÖHLER 1987) auf. KELLY et al. (1984) berichten von Botulismus bei australischen Pferden; das im Serum nachweisbare Toxin konnte durch das bivalente Antitoxin C und D neutralisiert werden. Eine weitere Spezifizierung wurde nicht vorgenommen.

BÖHNEL (1999) wies in seinen Untersuchungen bei Rindern die Typen A, B, C, D und E nach. BRUCKSTEIN und TROMP (2001) berichten von Typ B-Botulismus bei Rindern in Israel.

KÖHLER (1987) berichtet über Erkrankungen bei Hühnern, die auf *C. botulinum*-Typ A zurückgeführt wurden.

Zu bedenken ist, dass durch die orale Aufnahme toxinhaltiger Kadaver(-teile) eine Erkrankung von in der Nahrungskette höher stehenden Tieren möglich ist. So wiesen GRUBB (1964) und NOL et al. (2004) bei Fischen, die im Rahmen einer Botulismusepidemie von Wassergeflügel verstarben, *C. botulinum*-Typ C als ursächlich nach. In diesem Zusammenhang wird auch von Typ C-Botulismus bei Katzen (ELAD et al. 2004), Hunden (FARROW et al. 1983) und Löwen (GREENWOOD 1985) berichtet.

2.1 *C. botulinum*

Die Prinzipien der Einteilung dieser heterogenen Bakteriengruppe sind im Kapitel 1 kurz dargestellt.

Ausführlicher soll an dieser Stelle auf Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen *C. botulinum*-Typen eingegangen werden. Diese kommen z.B. zwischen den Typen E und F sowie C und D vor (GRITZAI PARKINSON u. ITO 2002).

Im Rahmen mehrerer Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Antitoxin eines Toxintyps mehrere BoNT-Typen neutralisiert (PFENNINGER 1924; PREVOT u. BRYGOO 1953; DOLMAN u. MURAKAMI 1961; EKLUND u. POYSKY 1965; EKLUND et al. 1967b; JANSEN 1971).

Die Ergebnisse von SUGIYAMA et al. (1972) widerlegen die Vermutung, dass ein Toxintyp antigenetische Eigenschaften mehrerer Toxintypen hat und belegen somit, dass ein einzelner *C. botulinum*-Typ in der Lage ist, mehr als einen Toxintyp zu synthetisieren. Beispielhaft produzieren die Typ C-Stämme vorwiegend BoNT-Typ C und weniger anteilig BoNT-Typ D (OGUMA et al. 1980). Eine ausführliche Übersicht hierzu gibt Tabelle A5.

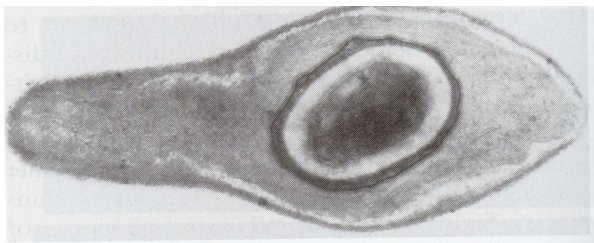
Damit sind die Beobachtungen von GIMENEZ und CICCARELLI (1970) erklärbar, dass erst eine Kombination mehrerer Antitoxintypen die Toxizität vollständig neutralisiert.

SIMPSON (1981) weist darauf hin, dass in Folge dieser Untersuchungsergebnisse die Grenzen der taxonomischen Unterteilung der Spezies *C. botulinum* verschwimmen, die auf dem gebildeten Toxintyp beruht.

2.1.1 Spore

C. botulinum gehört zu der Familie *Bacillaceae*, deren vegetative Formen unter für sie ungünstigen Umweltbedingungen Sporen bilden. Diese Dauerformen sind sehr widerstandsfähig, da in ihnen kaum eine Stoffwechselaktivität stattfindet (GOULD 2000). Dieser Zustand wird als Kryptobiose bezeichnet (SOJKA 1996) und zählt zu den resistentesten Formen des Lebens. Die Untersuchungen von HOFER und DAVIS (1972) belegen, dass *C. botulinum*-Sporen in flüssigen Medien, die bei Raumtemperatur gelagert werden, mehr als 30 Jahre überleben können.

Clostridiale Sporen werden in der vegetativen Zelle gebildet und aufgrund dessen als Endosporen bezeichnet (griech. Endo: innen).



Diese liegen meist subterminal und sind etwas breiter als die Mutterzelle, so dass von einer Tennisschläger- oder Löffelform gesprochen wird (Abbildung 2).

Abb. 2: Spindelförmige *C. botulinum*-Zelle mit Endospore (JOHNSON 2000)

Die Größe gibt SEIDEL (1992) mit $1,0 \times 1,6 \mu\text{m}$ an. Obwohl vorherige Untersuchungen (TAKAGI et al. 1960; STEWART 1963) keine Oberflächenstrukturen nachweisen konnten, fanden HODGKISS und ORDAL (1966) nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen stecknadelförmige Anhängsel, deren Längen minimal variierten (Abbildung 3).

Weitere elektronenmikroskopische Aufnahmen sind bei HODGKISS et al. (1967) abgebildet; im Durchschnitt fanden die Autoren 160 – 240 dieser Anhängsel pro Spore.

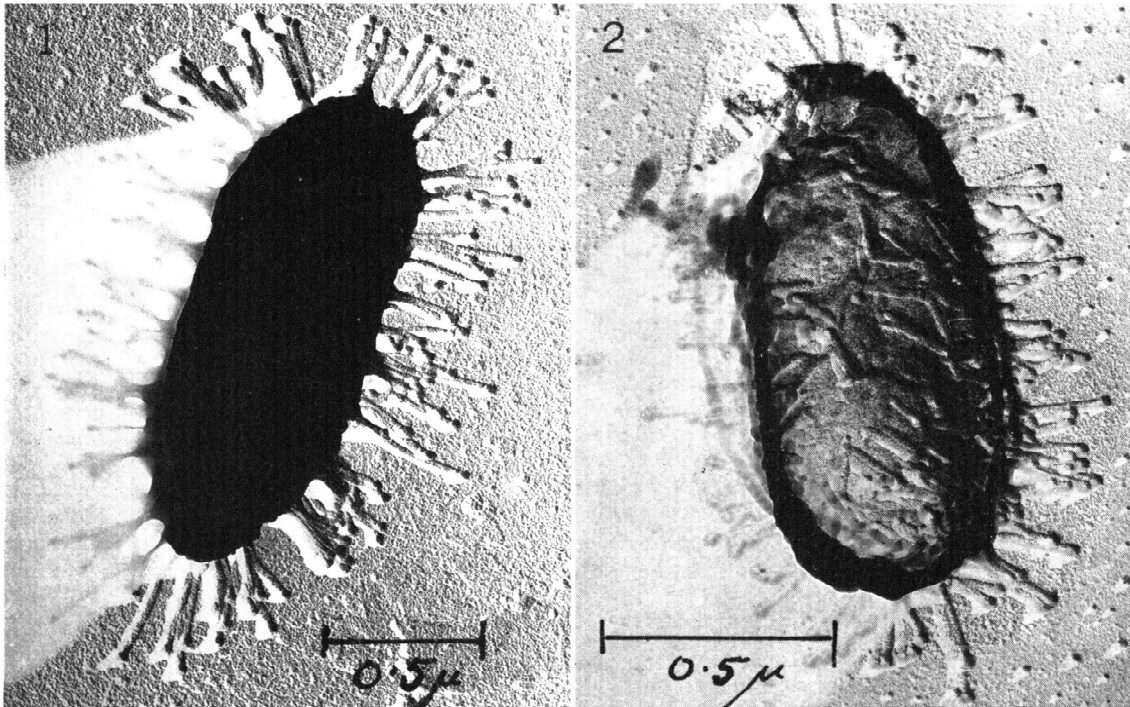


Abbildung 3: Stiefelförmige Anhängsel an einer *C. botulinum*-Typ E-Spore (HODGKISS u. ORDAL 1966)

2.1.1.1 Bildung

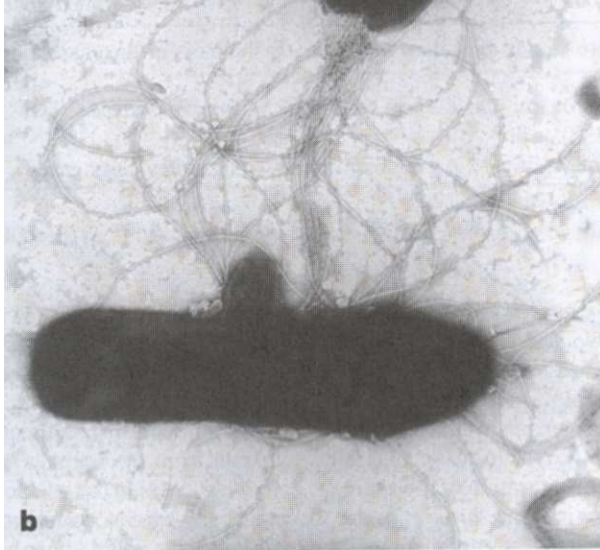
Die Sporenbildung ist genetisch festgelegt, stellt jedoch keine regelmäßig wiederkehrende Phase im Lebenszyklus dar. Vielmehr wird sie durch ungünstige Umweltbedingungen ausgelöst.

In mehreren Studien wurde der Einfluss der Zusammensetzung des Mediums auf die Sporulation untersucht (TSUJI u. PERKINS 1962; ROBERTS 1965; ANELLIS et al. 1972), woraus ersichtlich wird, dass eine Vielzahl an Einflussfaktoren wirken.

Die Hauptbestandteile der Sporulationsmedien sind Tryptikase und Glucose (SONNENSCHNEIN 1980) sowie Pepton (PERKINS 1965). Weiterhin fördern Hefeextrakt (SEGNER et al. 1971a), Arginin (PERKINS u. TSUJI 1962), Fleischpartikel (OHYE u. SCOTT 1957) und NH_4SO_4 (ANELLIS et al. 1972) die Sporenbildung.

Den Untersuchungsergebnissen von TSUJI und PERKINS (1962) ist weiterhin zu entnehmen, dass die Zusammensetzung des Sporulationsmediums die Hitzeresistenz der Sporen beeinflusst. So führt die Zugabe von 5% Polypepton zur Bildung hitzeresistenterer Sporen, in denen ein erhöhter Glucosamingehalt nachweisbar ist.

OHYE und SCOTT (1957) wiesen zwischen 25°C und 30°C eine stärkere Sporenbildung nach als bei anderen Temperaturbereichen. Dies stimmt mit den Angaben von PECK et al. (1995) (Tabelle A6) überein. Weiterhin fördert ein spezifisches Erwärmen der Kultur die Sporenbildung. Für die Vertreter der Gruppe I liegt die optimale Zeit-Temperatur-Kombination bei 80°C für 10 Minuten, die Stämme der Gruppen II und III sollten nur auf 70°C für 10 Minuten erhitzt werden (SMITH u. SUGIYAMA 1988).



Ein kleinerer Teil des Protoblasten, in dem sich der Zellkern befindet, verselbstständigt sich durch Einschnürung der Zytoplasmamembran. Im Unterschied zur Zellteilung umgibt die Zytoplasmamembran der Mutterzelle beide Protoblasten auch, nachdem die Sporulationssepte geschlossen ist (Abbildung 4).

Abbildung 4: Sporenbildende *C. botulinum*-Zelle (FRANCIOSA et al. 2003)

Infolgedessen ist der Sporenprotoblast von einer inneren und einer äußeren Zytoplasmamembran umgeben. Während sich aus ersterer die Zellwand entwickelt, wird die zweite zur äußeren Sporenhülle umgebaut. Zwischen diesen beiden Bestandteilen befindet sich die Sporenrinde (Syn. Cortex), die aus Mucoproteinen, muranischer Säure und einer Diaminopicolinsäure zusammengesetzt ist. Nach Beendigung der Sporenbildung wird diese durch Lyse der Mutterzelle freigesetzt.

Während der Endsporenbildung kommt es zur Ansammlung von Calciumionen und löslichen Sporenproteinen sowie zur Synthese von Dipicolinsäure. Dies führt zu einer Wasserreduktion im Inneren und folglich zu einer Volumenabnahme. Da Sporen die gesamte Trockensubstanz der vegetativen Zelle in rund einem Zehntel des ursprünglichen Volumens beinhalten, weisen sie einen hohen Brechungsindex auf (SOJKA 1996). Der Gehalt an Calcium und säurelöslichen Sporenproteinen sowie der daraus resultierende reduzierte Wassergehalt bestimmen die Hitzeresistenz (SEIDEL 1992; MADIGAN et al. 2001).

2.1.1.2 Auskeimung

Das Auskeimen bakterieller Sporen erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst findet eine **Aktivierung** der ruhenden Spore statt (STRASDINE 1967) – dies kann durch hohe, jedoch subletale Temperaturen, Bestrahlung oder Behandlung mit extremen pH-Werten (BLOCHER u. BUSTA 1983b) ausgelöst werden. Kommen diese aktivierten Stadien mit spezifischen Nährstoffen wie L-Alanin oder Adenosin (HASHIMOTO et al. 1969) in Kontakt, vollzieht sich innerhalb weniger Minuten die **Keimung** der Sporen. Es kommt zum Verlust der Dipicolinsäure und anderer Core-Bestandteile sowie zum Abbau der Sporenproteine. Folglich verliert die Spore ihre lichtbrechenden Eigenschaften und ihre Hitzeresistenz, letzteres wird als erstes Anzeichen der Auskeimung angesehen (FOSTER u. JOHNSTONE 1990). Zu den funktionellen Veränderungen zählen die Aktivierung cortexlytischer Enzyme und des Zellstoffwechsels. In der Phase des **Auswachsens** nimmt das Zellvolumen infolge Wasseraufnahme und Neusynthese von RNA und Proteinen zu. Der Keimschlauch, noch von einer dünnen, unvollständigen Zellwand umgeben, tritt am Pol der Sporenhülle heraus und beginnt, sich vegetativ zu teilen.

Das Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen konnte in verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen werden, so unter anderem in nur kurz erhitzten Gemüsesäften (STRINGER et al. 1999), Räucherfischen (CHRISTIANSEN et al. 1968), verschiedenen Gewürzölen (ISMAIEL u. PIERSON 1990a) sowie in Rinderhackfleisch, welches innerhalb von 21 Stunden auf 7,2°C gekühlt wurde (JUNEJA et al. 1997).

Untersuchungsergebnisse darüber, wie sich verschiedene Einflussfaktoren auf das Auskeimen der Sporen wirken, sind im Kapitel 4 dargestellt.

2.1.2 Virulenzfaktoren

2.1.2.1 Botulinumneurotoxin (BoNT)

WAGNER SOMMER et al. (1926) gelang es erstmals, das Toxin in trockener Form darzustellen. Nach einer Vorbehandlung mit Aluminiumhydroxid und Ammoniumphosphat erhielten die Autoren nach einer Trocknung bei 40°C ein bräunliches Pulver.

Chemisch reines, kristallines BoNT vom Typ A wurde durch zwei Forschungsgruppen fast zeitgleich gewonnen (ABRAMS et al. 1946; LAMANNA et al. 1946).

Bevor näher auf das BoNT eingegangen wird, sollen zwei Aspekte vorangestellt werden:

Zum einen das mögliche Vorhandensein von Toxin in oder an Sporen, wenn es im Zuge der Sporenbildung „hängen bleibt“. Auch wenn es sich um kleinste Mengen handelt, GRECZ et al. (1967) sprechen von ca. einem Prozent, ist die Kenntnis dieser möglichen Toxinquelle wichtig, da hohe Sporenkonzentrationen aufgrund des enthaltenen BoNT tödlich sein können. Tabelle 1 fasst diesbezüglich Versuchsergebnisse zusammen:

Tabelle 1: Für Mäuse nachgewiesene tödliche Sporenmengen

<i>C. botulinum</i> -Stamm	tödliche Sporenzahl	Literaturquelle
72A	$8,8 \times 10^6$	GRECZ et al. (1967)
37A	$5,3 \times 10^7$	
9B	$>1,9 \times 10^7$	
33A	4×10^6	FERNANDEZ et al. (1969)

Wie bei einigen anderen Faktoren gibt es Varianzen auch bezüglich der Hitzeresistenz von BoNT. Die Untersuchungsergebnisse von GRECZ et al. (1967) belegen, dass freigesetztes Botulinumtoxin durch eine Erhitzung auf 80°C über 10 Minuten denaturiert ist, wogegen noch in der Spore verbliebenes Toxin dadurch nicht beeinflusst wurde.

Der zweite, an dieser Stelle zu nennende Aspekt ist die BoNT-Synthese durch andere Clostridienspezies. So belegen HALL et al. (1985) sowie MCCROSKEY et al. (1991) eine BoNT-Typ F-Synthese durch *C. baratii*. AURELI et al. (1986), MCCROSKEY et al. (1986) und MENG et al. (1997) gelang der Nachweis der BoNT-Typ E-Synthese durch *C. butyricum*. Aufgrund dessen bezeichnen FRANCIOSA et al. (2003) diese beiden Clostridienspezies als metabolische Gruppe V und VI der Clostridienarten, dem in den Tabellen A2 und A3 Rechnung getragen wird.

2.1.2.1.1 Aufbau

Der Komplex aus toxischer und nicht-toxischer Komponente wird als „Progenitortoxin“ bezeichnet, die davon abgespaltenen toxischen Moleküle werden „Derivatvtoxine“ genannt.

Die E β -Untereinheit, Syn. „nontoxic component“ (SAKAGUCHI 1983) bzw. "nontoxic botulinum protein" (SUGIYAMA 1980), besitzt selbst keine toxischen Eigenschaften. Sie wirkt auf die E α -Untereinheit stabilisierend und ist damit für die Toxizität bedeutend, wenn das Toxin nach oraler Aufnahme mit Verdauungsenzymen in Kontakt kommt (SAKAGUCHI 1983). Damit werden Ergebnisse von OHISHI et al. (1977) bestätigt, die dem Progenitortoxin eine höhere Toxizität zusprechen als dem Derivatvtoxin.

Die toxischen Strukturen sind auf der E α -Untereinheit, Syn. „toxic component“ (SAKAGUCHI 1983) bzw. "neurotoxin" (SUGIYAMA 1980) lokalisiert. Es handelt sich um ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa, zumeist werden Molekulargewichte zwischen 140 und 167 kDa angegeben (KRIEGLSTEIN 1990).

Die Angaben in Tabelle 2 verdeutlichen, dass die in der Literatur angegebenen Molekulargewichte starken Schwankungen unterliegen.

Tabelle 2: Einige nachgewiesene Molekulargewichte für BoNT

C. botulinum- Typ	Molekulargewicht (Dalton)	Literaturquelle
A	900,000	ABRAMS et al. (1946); PUTNAM et al. (1946)
	150,000	DASGUPTA und BOROFF (1968); DASGUPTA et al. (1970)
	145,000	DASGUPTA und SUGIYAMA (1972)
	140,000	BHATTACHARYYA et al. (1988)
	12,200	GERWING et al. (1965b)
B	167,000	BEERS und REICH (1969)
	165,000	DASGUPTA et al. (1968)
	60,000	LAMANNA und GLASSMAN (1947)
	9,000 - 10,000	GERWING et al. (1966)
C	141,000	SYUTO und KUBO (1978)
D	170,000	MIYAZAKI et al. (1977)
E	200,000	SAKAGUCHI et al. (1964)
	150,000	KITAMURA et al. (1969)
	147,000	DASGUPTA und SUGIYAMA (1972)
	18,600	GERWING et al. (1964)
F	155,000	YANG und SUGIYAMA (1975)

Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, dass in den Untersuchungen sowohl die Reinigung des Toxins als auch der Zeitpunkt, zu dem das Toxin gewonnen wurde, variieren (GERWING et al. 1968). Folglich ist es denkbar, dass sowohl Molekülansammlungen als auch – z.B. durch Vorbehandlung entstandene – kleinere Grundstrukturen nachgewiesen werden. Anhand der Ergebnisse von YANG und SUGIYAMA (1975) wird deutlich, dass bei Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden variierende Molekülgrößen für einen Stamm festzustellen sind.

Weiterhin beeinflusst das Medium, in dem BoNT gebildet wird, die Molekülgröße des synthetisierten Toxins. Beispielsweise werden in verschiedenen Gemüsesorten größere Toxinmoleküle produziert als in Fleisch (SUGI et al. 1978). Dennoch wird davon ausgegangen, dass Molekülgrößen, die deutlich unter 150 kDa liegen, Artefakte darstellen (SUGIYAMA 1980).

Im Zuge der Aktivierung wird das Toxin durch Proteasen in eine leichte (50 kDa) und eine schwere (100 kDa) Kette gespalten (DASGUPTA u. SUGIYAMA 1972). In der Literatur sind dafür auch die Begriffe H- (high) und L-Kette (light) zu finden. Verbunden sind die Ketten über Disulfidbrücken (DEKLEVA u. DASGUPTA 1989) oder Eisen-II-Ionen (BHATTACHARYYA et al. 1988). Auf der E_α-Untereinheit befinden sich drei funktionelle Areale, die für je einen Schritt der Intoxikation verantwortlich sind (Abbildungen A1 und A2). Dabei befinden sich auf der H-Kette der Rezeptor zur Bindung an den präsynaptischen Spalt und die transmembrane Domäne. Das katalytische Areal lagert auf der leichten Kette (HALPERN u. NEALE 1995). Bei BÖHNEL (1995) sind eine Vielzahl an Literaturhinweisen bezüglich der Aminosäureanalysen zu finden.

HAUSCHILD (1990) teilt die Toxine je nach ihrer Molekülgröße in vier Gruppen (small bis extra large) ein. Gleichzeitig weist er darauf hin, dass bisher nur Vertreter der Gruppen M und L in toxischen Lebensmitteln nachgewiesen wurden.

2.1.2.1.2 Synthese

Prinzipiell bildet jeder *C. botulinum*-Stamm ein Neurotoxin, jedoch ist eine weitere Einteilung in Subtypen nötig, da einige Stämme in der Lage sind, mehrere Neurotoxinformen zu synthetisieren (Tabelle A5).

Synthetisiert werden die Botulinumtoxine intrazellulär, als Aggregate mit anderen Proteinen (HOBBS 1976). Diese Vorstufen werden als „Protoxine“ beschrieben (SAKAGUCHI u. TOHYAMA 1955b; BONVENTRE u. KEMPE 1960b) und sind an Zellwandpeptidoglykane gebunden (HYUN u. SAKAGUCHI 1989). Innerhalb dieses Komplexes ist der Toxinvorläufer mit mehreren RNA-Molekülen verbunden. Zum Zeitpunkt der Toxinfreisetzung werden die RNA-Moleküle abgetrennt und das Protoxin durch proteolytische Enzyme aktiviert (BONVENTRE u. KEMPE 1959a). Dies kann durch mikrobiell gebildete oder andere proteolytische Enzyme sowie im Rahmen der enzymatischen Verdauung im Gastrointestinaltrakt geschehen (OHISHI u. SAKAGUCHI 1979; SONNABEND et al. 1987).

In der Literatur sind gegensätzliche Standpunkte zum Zeitpunkt der Toxinfreisetzung zu finden.

DACK und WOOD (1928) sehen das BoNT als bakterielles Stoffwechselprodukt, welches sich in der Kultur anreichert, während das Bakterium noch vital ist. SIEGEL und METZGER (1979) stellten nach 24 Stunden den maximalen Toxintiter fest, der Zelluntergang war davon unabhängig.

Entgegen dieser These vertritt die Mehrheit der Autoren die Auffassung, dass das Toxin erst mit dem Tod und der Autolyse des Bakteriums freigesetzt wird (BOROFF 1955; KINDLER u. MAGER 1955; DUDA u. SLACK 1969). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Substanz, die in der vitalen Zelle vorliegt, nur eine Vorstufe ist und noch einige strukturelle Veränderungen zur Schaffung der Toxizität vorgenommen werden (BOROFF et al. 1952;

BOROFF u. CABEEN 1954). Weitere Untersuchungsergebnisse an den Typen A (KRYNSKI u. SUGIYAMA 1981), C (BOROFF u. CABEEN 1954), D (BOROFF et al. 1952) und E (SAKAGUCHI u. TOHYAMA 1955b) bekräftigen diese Theorie.

Das Toxin wird erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase aktiviert und ist dann im Medium nachweisbar (BONVENTRE u. KEMPE 1959a,1960a). Mehrere jüngere Veröffentlichungen stimmen damit überein (GERWING et al. 1968; HOBBS 1977; CALL et al. 1995; ROSSETTO et al. 2001). Wird von einer postvitalen Toxinfreisetzung ausgegangen, ist der Begriff des Exotoxins nicht anwendbar (BOROFF et al. 1952).

Im Rahmen der Untersuchungen von BAIRD-PARKER und FREAME (1971) konnte BoNT bei allen Temperaturen, bei denen Wachstum stattfand, nachgewiesen werden. Je näher die Inkubationstemperatur am Optimalwert lag, desto eher wurden die maximalen Toxintiter nachgewiesen. Jedoch fällt der Toxintiter bei Inkubationstemperaturen $>37^{\circ}\text{C}$ aufgrund der Hitzelabilität des BoNT rasch wieder ab (PEDERSEN 1955; ABRAHAMSSON et al. 1966).

2.1.2.1.3 Aktivierung

Die in der Bakterienzelle gebildete Vorstufe hat nur einen Teil ihrer vollen Toxizität (KRYNSKI u. SUGIYAMA 1981). Die Aktivierung ist Folge einer Änderung der Molekülstruktur. Aus dem einkettigen Polypeptid entsteht ein Molekül aus zwei, miteinander zumeist durch Disulfidbrücken verbundenen Ketten (SAKAGUCHI 1983; DEKLEVA u. DASGUPTA 1989), deren Molekulargewichte ein Verhältnis von 2:1 haben (SIMPSON 1979). Dies führt nicht zu einer Änderung der Molekülgröße (SAKAGUCHI u. SAKAGUCHI 1959,1973; KITAMURA et al. 1967,1969; SUGIYAMA et al. 1967) oder des Molekulargewichtes (DASGUPTA u. SUGIYAMA 1972), jedoch konnte der Verlust von Aminosäuren nachgewiesen werden (GERWING et al. 1965a).

Bezüglich des Zeitpunktes und der Art der Aktivierung muss zwischen den verschiedenen *C. botulinum*-Stämmen unterschieden werden.

Das Toxin der proteolytischen *C. botulinum*-Typen wird durch endogene Enzyme aktiviert und liegt folglich zum Zeitpunkt der Ausschleusung bereits in aktivierter Form vor (HOBBS 1976; DEKLEVA u. DASGUPTA 1989). Die Toxizität kann durch extrazelluläre Proteasen zusätzlich gesteigert werden (BONVENTRE u. KEMPE 1959a; EKLUND et al. 1967b; DASGUPTA u. SUGIYAMA 1977, zitiert bei SUGIYAMA 1980). Im Rahmen dessen wiesen KRYNSKI und SUGIYAMA (1981) eine 30-fache Steigerung für den Typ A nach.

Im Gegensatz dazu setzen nicht-proteolytische Stämme das Toxin in Form einer inaktiven Vorstufe frei, die durch externe Enzyme in die aktive Form umgewandelt wird (BONVENTRE u. KEMPE 1960b; HOBBS 1977). Im Zuge dessen wiesen DUFF et al. (1956) eine 12- bis 47-fache Steigerung der Toxizität nach. Dabei wird der Grad der Potenzierung stark von den vorherrschenden Bedingungen beeinflusst (SAKAGUCHI u. TOHYAMA 1955b; KITAMURA 1970).

Eine Steigerung der Toxizität infolge Trypsinzugabe konnte für die BoNT-Typen A (KRYNSKI u. SUGIYAMA 1981), B (HALLIS et al. 1996), C_β (JANSEN u. KNOETZE 1971; OHISHI 1983b), D (MIYAZAKI et al. 1977), E (DUFF et al. 1956), F (HOLDEMAN u. SMITH 1965) und G (GIMENEZ u. CICCARELLI 1970) mehr oder weniger stark nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gelang dies nicht für BoNT-Typ C_α (SEGNER et al. 1971b; EKLUND u. POYSKY 1972). BAUMGART (1970b) stellte keine Steigerung der Toxizität bei mit Trypsin behandelten Proben fest und begründet dies mit einer geringen Toxinmenge.

Wie die Ergebnisse von SAKAGUCHI und TOHYAMA (1955a) zeigen, können auch durch andere Mikroorganismen gebildete proteolytische Enzyme die Toxizität von BoNT erhöhen, jedoch ist die Wirkung deutlich schwächer (SAKAGUCHI u. SAKAGUCHI 1959).

Die Auftrennung der E_α -Untereinheit in zwei Fragmente wird als „nicking“ bezeichnet. Die Bedeutung dieses Vorganges für die Aktivierung der botulinen Neurotoxine bzw. die Potenzierung ihrer Toxinwirkung ist jedoch fraglich, seit eine Steigerung der Toxizität und der strukturelle Umbau unabhängig voneinander nachgewiesen wurden (OHISHI u. SAKAGUCHI 1977, 1979; KRYSINSKI u. SUGIYAMA 1981; DEKLEVA u. DASGUPTA 1989). Hervorgehoben soll an dieser Stelle noch einmal die Bedeutung von Trypsin für den Nachweis von geringen Mengen an BoNT in Lebensmitteln, die ohne eine Steigerung der Toxizität nicht immer nachweisbar wären (TJABERG 1974; SMELT u. HAAS 1978).

2.1.2.1.4 Pharmakologie und Wirkung

Die orale Aufnahme des Toxins hat aus pathogenetischer Sicht die größte Bedeutung, weshalb auf andere Wege der Intoxikation und Infektion an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

Es ist anzunehmen, dass das Toxin im Darm durch das Trypsin der Duodenalflüssigkeit aktiviert und somit seine Toxizität um ein Mehrfaches angehoben wird (ONO et al. 1970; IIDA et al. 1970). Der größte Anteil wird im kranialen Dünndarm resorbiert, jedoch berichtet SAKAGUCHI (1983), dass auch eine Aufnahme im Kolon nachgewiesen ist.

Der neurotoxische Mechanismus wird über mehrere Schritte in Gang gesetzt (SIMPSON 1981; BLACK u. DOLLY 1986) und ist in Abbildung A4 nachzuvollziehen. Der erste Schritt ist die Rezeptorbindung, wobei die H-Kette an Rezeptoren der präsynaptischen Membran bindet (SUGIYAMA 1980) und so das Eindringen der L-Kette ins Zytosol ermöglicht (SCHIAVO et al. 1992; MONTECUCCO u. SCHIAVO 1995, zitiert bei LUVISETTO et al. 2003). Dabei belegen die Untersuchungen von KOZAKI (1979), dass die Bindungsstellen nicht für alle Typen einheitlich sind. Im Rahmen des zweiten sogenannten Zwischenschrittes gelangt die leichte Kette der E_α -Untereinheit durch die Membran in den Intrazellulärraum. Dieser Vorgang ist energie- und temperaturabhängig (SUGIYAMA 1980; BLACK u. DOLLY 1986). Ab diesem Zeitpunkt ist eine Neutralisation des BoNT nicht mehr möglich (SIMPSON 1981). Während der dritten, auch als lytischen Schritt bezeichneten Phase kommt es zur Blockade der Neurotransmitterfreisetzung. Die L-Kette spaltet intrazellulär die synaptischen SNARE-Proteine (SCHIAVO et al. 1992), die die Fusion des Acetylcholinvesikels am synaptischen Spalt ermöglichen (SÖLLNER et al. 1993; JAHN u. SÜDHOF 1999; LIN u. SCHELLER 2000; SCHIAVO et al. 2000; SCHNIDER 2001). Dabei bindet jeder Toxintyp an einer anderen Stelle der drei SNARE-Proteine (SCHIAVO et al. 2000; DRESSLER 2000). Dieser letzte Schritt ist sowohl von der Temperatur als auch von der Nervenaktivität abhängig (SIMPSON 1979). Prinzipiell wird neben der Ausschüttung von Acetylcholin auch die von Noradrenalin gehemmt, jedoch sind dafür höhere Konzentrationen nötig (RAND u. WHALER 1965; VINCENZI 1967; HOLMAN u. SPITZER 1973). Generell wird die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung von der Aktivität der Nervenzellen beeinflusst; je größer diese ist, desto stärker ist die inhibierende Wirkung (HUGHES u. WHALER 1962).

Infolge der Hemmung der Acetylcholinausschüttung kommt es zu einer fortschreitenden Paralyse. Der Tod tritt durch Atemstillstand infolge der Lähmung des N. phrenicus ein.

Aufgrund der Molekülgröße kann davon ausgegangen werden, dass BoNT nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (SAKAGUCHI 1983).

Das BoNT gilt als die giftigste biologische Substanz (LAMANNA 1959; BARTLETT 1986; BÖHNEL u. LUBE 2000), dennoch ist die Wirkungsstärke unterschiedlich. So hat das Toxin A „...die stärkste Giftwirkung...“ (SELBITZ 2002). Die in der Literatur angegebenen letalen Dosen für einen erwachsenen Menschen variieren (Tabelle A7), bei den Tierarten gibt es Varianzen zum einen zwischen den Spezies (GILL 1982) und zum anderen je nach Art der Intoxikation bzw. Infektion (Tabelle A8).

Untersuchungsergebnisse zur Stabilität des Botulinumtoxins gegenüber externen Einflüssen werden im Kapitel 4 besprochen. Weitere Angaben sind bei SHERMAN et al. (1926), SOMMER und SOMMER (1928), BELLINGER et al. (1951) sowie SCHWARZ (1979) zu finden.

2.1.2.1.5 Bakteriophagen und Plasmide

Nachweise von Phagen und Plasmiden gelangen in einzelnen Stämmen aller *C. botulinum*-Typen, ein Zusammenhang mit der Toxinbildung besteht jedoch nur in den Gruppen III und IV (FRANCIOSA et al. 2003). In Tabelle A9 sind die Lokalisationen der genetischen Informationen zur Toxinsynthese bei den BoNT-produzierenden Spezies zusammengefasst.

Mehrere Veröffentlichungen beschreiben Phagen, ihre Isolierungsmethoden und ihren Aufbau sowie die Bedeutung bezüglich der Toxizität (EKLUND et al. 1971; DOLMAN u. CHANG 1972; SUGIYAMA u. KING 1972; RIEMANN 1973).

Der erfolgreiche Versuch der Phagenübertragung von einem Typ auf einen anderen wird in mehreren Veröffentlichungen beschrieben. Den Forschungsgruppen gelang auf diesem Wege die Umwandlung von *C. botulinum*-Typ C in -Typ D (INOUE u. IIDA 1970,1971; EKLUND u. POYSKY 1974; OGUMA et al. 1976). Sogar die Phagenübertragung von *C. botulinum*-Typ C auf *C. novyi*-Typ A war erfolgreich und somit die Synthese eines anderen clostridialen Toxins (EKLUND et al. 1974). Dabei ist zu bedenken, dass durch die Übertragung von Phagen die Grenzen der Einteilung in verschiedene *C. botulinum*-Typen verschwimmen (BÖHNEL 1995).

Die Umwandlung eines nicht-toxinbildenden in einen BoNT-synthetisierenden Stamm und umgekehrt gelang nur teilweise (INOUE u. IIDA 1970; IIDA, 1981, zitiert bei BÖHNEL 1995; ZHOU et al. 1993), eine mögliche Fehlerquelle kann dabei die fehlerbehaftete Kombination von Stämmen und Phagen sein (OGUMA et al. 1979). Folge dieser Nachweise ist, dass eine Trennung von apathogenen und toxischen Stämmen nicht ohne weiteres möglich ist, da der Verlust oder Gewinn eines Phagen diese Grenze aufhebt (SEIFERT 2004).

OGUMA et al. (1981) gelang es, Phagen in Verbindung mit dem C₂-Toxin nachzuweisen.

In mehreren Versuchen konnten phagenähnliche Partikel in den *C. botulinum*-Typen A, B, C, D, E und F induziert werden (IIDA u. INOUE 1968; INOUE u. IIDA 1968; EKLUND et al. 1969; SUGIYAMA u. KING 1972).

SCOTT und DUNCAN (1978) wiesen erstmals extrachromosomale DNA im *C. botulinum*-Typ E-Stamm „Minnesota“ und weiteren nicht-toxischen Stämmen nach.

HAUSER et al. (1992) wiesen in toxischen *C. butyricum*-Stämmen ein BoNT-Typ E-Gen nach, dass dem von *C. botulinum*-Typ E ähnelt und auf Plasmiden lokalisiert ist. Da dies bei apathogenen Stämmen nicht gefunden wurde, sehen es die Autoren als erwiesen an, dass über Plasmide die Fähigkeit zur BoNT-Typ E-Bildung auf ursprünglich atoxische *C. butyricum*-Stämme übertragen werden kann.

Dies stimmt nicht mit den Untersuchungsergebnissen von STROM et al. (1984) sowie WEICKERT et al. (1986) überein. Diese belegen, dass es keinen regelmäßigen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Plasmiden und einer möglichen Toxinbildung durch *C. botulinum* gibt. Auch bei GRITZAI PARKINSON und ITO (2002) ist zu lesen, dass - obwohl in verschiedenen Typen Plasmide gefunden wurden - bisher nur für den Typ G eine Beeinflussung der Toxinproduktion nachweisbar ist.

2.1.2.2 Weitere Toxine

Neben den Botulinumneurotoxinen, welche durch die Typen A bis G gebildet werden, produzieren die Vertreter der Gruppe III weitere Substanzen, die der Vollständigkeit halber kurz erwähnt werden sollen.

2.1.2.2.1 C₂-Toxin

Das C₂-Toxin hat keine neurotoxischen Wirkungen, demnach wird es auch nicht den Neurotoxinen zugeordnet. Infolge ihrer Untersuchungsergebnisse sprechen OHISHI et al. (1984) von einem zytotoxischen Enterotoxin.

Es zerstört die Aktinfilamente der Zellen (REUNER et al. 1987), was zu einer Steigerung der vaskulären Permeabilität (OHISHI 1983a) und folglich zu Vakuolbildungen in den Epithelien führt. Im Zuge dessen kommt es zu interzellulären Ödemen, Nekrosen der Mucosa, Hämorrhagien der Lunge und Flüssigkeitsansammlungen im Darm (JENSEN u. DUNCAN 1980; SIMPSON 1982; OHISHI u. ODAGIRI 1984; SUGIMOTO et al. 1995).

Mit ihren Untersuchungen belegen NAKAMURA et al. (1978), dass die Synthese des C₂-Toxins nur während der Sporulation und nicht während des vegetativen Wachstums stattfindet.

2.1.2.2.2 C₃-Exoenzym

Dieses vom Typ C synthetisierte Toxin wurde erstmals durch AKTORIES et al. (1987) beschrieben. Die zytotoxische Aktivität ist gering und seine Bedeutung als Virulenzfaktor im Rahmen der natürlichen Erkrankung unbekannt (POPOFF 1995).

2.1.2.3 Bakteriozinbildung

An dieser Stelle wird nur auf die Bakteriozine eingegangen, die durch *C. botulinum*-Stämme gebildet werden. Auf von anderen Spezies gebildete und auf *C. botulinum* wirkende Bakteriozine wird im Kapitel 4.3.2.1.4 eingegangen.

Mehrere Untersuchungen konnten nachweisen, dass *C. botulinum*-Stämme Bakteriozine bilden, die das Wachstum und die Toxinbildung anderer Stämme derselben Spezies hemmen. Als ursächlich stellten ELLISON et al. (1971) strukturelle Veränderungen, z.B. an der DNA, fest. Eine Synthese dieser Substanzen erfolgt entweder nach Induktion (REEVES 1965) oder auch unabhängig von auslösenden Mechanismen (ELLISON u. KAUTTER 1970).

KAUTTER et al. (1966) berichten, dass nicht-toxische *C. botulinum*-Typ E-Stämme eine Substanz namens „Boticin E“ bilden, die die Toxinbildung von Stämmen hemmt, welche ähnliche biochemische und morphologische Eigenschaften haben (Tabelle A10). Auffällig ist, dass *C. botulinum*-Typ E sensitiv reagierte, nicht aber die Typen A, B oder F. Anders die Untersuchungsergebnisse von ANASTASIO et al. (1971): sie stellten eine Empfindlichkeit der Typen B, E und F, nicht jedoch der untersuchten proteolytischen Stämme fest. Letzteres kann z.B. auf das Vorhandensein proteolytischer Enzyme zurückgeführt werden, da die Ergebnisse von KAUTTER et al. (1966) eine Inaktivierung des Bakteriozins durch Trypsin belegen. Weiterhin belegen die Ergebnisse von ELLISON und KAUTTER (1970), dass die untersuchten Botizine relativ unempfindlich gegenüber pH-Wert-Veränderungen und Temperaturerhöhungen sind.

Bakteriozine wurden auch in *C. botulinum*-Typ G-Stämmen nachgewiesen (EKLUND et al. 1988b). Interessanterweise verloren die zunächst toxischen Stämme nach Entfernung des Plasmids sowohl ihre Fähigkeit zur Toxinbildung als auch die der Bakteriozinbildung.

2.2 Formen des Botulismus

Je nach dem pathogenetischen Mechanismus werden verschiedene Botulismusformen unterschieden (Tabelle A11), von denen die Intoxikation über Lebens- bzw. Futtermittel die wohl bekannteste ist.

2.2.1 Lebensmittelbedingter Botulismus

Bei dieser – auch als klassische Variante bezeichneten - Form des Botulismus handelt es sich um eine Intoxikation mit im Lebensmittel präformiertem BoNT.

Zumeist erkranken Erwachsene, jedoch existieren auch einzelne Fallbeschreibungen bei Kleinkindern (ARMADA et al. 2003; FISCHER et al. 2004).

Da das aufgenommene Toxin von den Enzymen des Magensaftes nicht zerstört wird, kommt es im Dünndarm zur Resorption mit nachfolgender hämatogener Verbreitung. KOBAYASHI et al. (2003) berichten, dass im Rahmen einer Intoxikation mit BoNT-Typ A vegetative Zellen anwachsen konnten und so weiteres BoNT produzierten.

2.2.2 Wundbotulismus

Ursächlich ist die Kontamination eines Hautdefektes mit *C. botulinum*-Sporen, hauptsächlich vom Typ A (SHUKLA u. SHARMA 2005). Gibt es in den entstehenden Wundtaschen ein anaerobes Milieu, kann es zum Auskeimen der Sporen mit nachfolgender BoNT-Synthese kommen. Die anschließende pathogenetische Entwicklung entspricht der der Intoxikation – es kommt zur Toxinresorption mit anschließender hämatogener Verbreitung.

Diese Erkrankungsform tritt bei Haut- und Schleimhautdefekten auf (MERSON u. DOWELL 1973; BERNARD et al. 1987), z.B. bei traumatischen oder operativen Wunden, als Folge von Zahnabszessen oder im Rahmen einer Sinusitis.

Im Laufe der letzten Jahre hat vor allem in Kalifornien, USA, zum einen die Anzahl der Fälle zugenommen, zum anderen änderte sich der Pathomechanismus (Abbildung 5).



Abbildung 5: Auftreten von Wundbotulismus (bedingt durch Drogenkonsum) in den USA, 1951 – 1998 (WERNER et al. 2000)

Auslöser sind weniger primäre oder sekundäre Wunden, als vielmehr parenteraler Drogenkonsum (CRAWFORD MECHEM u. WALTER 1997; WERNERT et al. 2000; GRITZAI PARKINSON u. ITO 2002). Vermutlich kommt es während der Streckung oder Verteilung der Drogen zu einer Kontamination (PASSARO et al. 1998). Fallberichte liegen auch aus Norwegen (JENSENIUS et al. 2000), Irland (FITZGERALD et al. 2003) und Deutschland (ARNHOLDT u. MÜHLER 2004) vor.

2.2.3 Sonderformen

2.2.3.1 Säuglingsbotulismus

Diese Erkrankungsform wurde 1976 erstmals beschrieben (PICKETT et al. 1976). Obwohl der Säuglingsbotulismus in Deutschland sehr selten auftritt, ca. ein Fall pro Jahr (BÖHNEL et al. 2001a), nimmt die Bedeutung global gesehen zu. Laut den Veröffentlichungen von BARTLETT (1986), NEVAS et al. (2002) und ANONYM (2002) stellt er in den USA die häufigste Botulismusform dar. Beispielsweise waren von den 40 Botulismusfällen, die 1979 in den USA registriert wurden, 24 Fälle Toxiko-Infektionen von Säuglingen (MORRIS u. HATHEWAY 1980). Anhand der Angaben in Tabelle A12 ist nachzuvollziehen, dass dieses Verhältnis auch in den folgenden Jahren zu beobachten war. Von 1982 bis 1997 traten in Argentinien 146 derartige Fälle auf (FERNANDEZ et al. 1999). Zumeist werden Keime der Typen A und B als ursächlich nachgewiesen (FERNANDEZ et al. 1999). Es gibt aber auch vereinzelte Berichte über Typ C-, E- oder F-Botulismus bei Säuglingen (MORRIS u. HATHEWAY 1980; HOFFMAN et al. 1982; HALL et al. 1985; AURELI et al. 1986; MCCROSKEY et al. 1986; SUEN et al. 1988b; OGUMA et al. 1990).

Diese Form wird überwiegend bei Kleinkindern (jünger als sechs Monate) beobachtet (SUGIYAMA 1982). Das auslösende BoNT ist nicht präformiert, es wird erst infolge einer Besiedlung des Darmes mit *C. botulinum* gebildet. Ermöglicht wird dies, da im Darm von Säuglingen andere Milieubedingungen vorliegen als bei Erwachsenen. OTTE und EMMRICH (1982) sehen die „...besondere Immunitätslage und die andersartige Mikroökologie der Darmflora ...“ als ursächlich. Da Bakterien, die ein Auskeimen der Botulinum-Sporen verhindern, noch fehlen, ist ein opportunistisches Wachstum von *C. botulinum* im Darm möglich.

Dass diese Erkrankung bei Kleinkindern vermehrt zu beobachten ist, wird unter anderem auf die zunehmende Verwendung von Ersatzmilch anstelle von Muttermilch zurückgeführt. ARNON (1986) konnte nachweisen, dass (1) der Faeces-pH-Wert von Kindern, die Muttermilch bekommen, deutlich unter dem von Kindern liegt, die anderweitig ernährt werden und (2) gleichzeitig verschiedene Bakterienpopulationen dominieren (Tabelle A13). Daraus schlussfolgert er, dass den Säuglingen mit der Muttermilch neben immunologischen Komponenten auch ein entsprechendes Darmmilieu zum Schutz gegen das Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen zukommt.

Diese Untersuchungsergebnisse werden von SONNENBORN und GREINWALD (1991) bestätigt: „Bei Flaschenkindern etabliert sich ... eine relativ komplex zusammengesetzte Mikroflora, wobei die *Enterobacteriaceae* hohe Keimzahlen erreichen und *Bacteroides*-Arten unter den Anaerobiern dominieren. Im Gegensatz dazu treten bei gestillten Kindern strikt anaerobe Bifidobakterien in den Vordergrund ...“. Die Diskrepanz der festgestellten pH-Werte erklären die Autoren mit der vergleichsweise niedrigen Pufferkapazität der Muttermilch. Dies erleichtert die Entstehung eines sauren Milieus infolge mikrobieller Säureproduktion. SULLIVAN et al. (1988) wiesen nach, dass Bifidobakterien die Vermehrung von *C. botulinum* hemmen.

Als Sporenquelle wird regelmäßig Honig genannt. Die dazu durchgeführten Untersuchungen (FLEMMING et al. 1980; HARTGEN 1980; GUILFOYLE u. YAGER 1983; HAUSCHILD et al. 1988; FENICIA et al. 1993; MCMASTER et al. 2000; MÜLLER-BUNKE et al. 2000; SCHIMMEL 2002) variieren stark in den Ergebnissen, dennoch empfiehlt das BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2001), ehemals Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Nahrungsmittel von Säuglingen nicht mit Honig zu süßen.

MIYAZAKI und SAKAGUCHI (1978) konnten nachweisen, dass die Toxinsynthese beim Huhn im Blinddarm stattfindet, da nach oraler Gabe von Botulinus-Sporen vegetative Zellen zwar im gesamten GIT, BoNT dagegen nur im Blinddarm nachweisbar waren. Da Tiere mit abgebundenem Caecum nicht erkrankten, vermuten die Autoren, dass über die Blinddarmwand auch die Toxinresorption stattfindet. Unklar ist allerdings, inwieweit diese Ergebnisse auf Säuglinge übertragen werden können.

Dagegen halten SUGIYAMA und MILLS (1978) den Dünndarm für den Ort der Toxinaufnahme. Ihre Untersuchungsergebnisse geben eine mögliche Erklärung auf die Fragen, die die Ergebnisse von PETERSON et al. (1979) aufwerfen. Sie wiesen in

Stuhlproben erkrankter Kinder letale Toxinmengen nach, und dennoch kam es im Nachhinein zu einer Genesung. Die Autoren vermuten, dass durch eine zeitweise undichte Ileocaecalklappe das im Caecum gebildete BoNT refluxartig in den Dünndarm gelangt und dort resorbiert wird.

Anhand der Verschiedenheit der Ergebnisse wird ersichtlich, dass weiterer Forschungsbedarf besteht, um die Pathogenese des Säuglingsbotulismus zu verstehen und wirksame prophylaktische Maßnahmen zu ermöglichen.

2.2.3.2 Infektiöser Erwachsenenbotulismus

In der Literatur zu findende Synonyme für diese Krankheitsform sind „intestinaler Botulismus“ oder „infant-like botulism“. Verschiedene Untersuchungsergebnisse belegen, dass sich *C. botulinum* im adulten GIT vermehren kann, die Pathogenese entspricht der des Säuglingsbotulismus. Als ursächlich werden anatomische Veränderungen oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen genannt, die eine Dysbiose zur Folge haben (STOCKER 1980; CHIA et al. 1986; MCCROSKEY u. HATHEWAY 1988; CHERINGTON 1998; SCHWAGERICK u. BÖHNEL 2001).

Aufgrund ihrer Untersuchungen an Rindern sehen NOTERMANS et al. (1978) die Vermehrung von *C. botulinum* im Magen-Darm-Kanal bei Rindern als erwiesen an. Eine Dysbiose kann z.B. durch eine erhöhte Mycotoxinkonzentration im Futter verstärkt werden (TONTIS u. STUTE 2003; SCHWAGERICK 2004a). Beim Rind wird diese Form als Viszeraler Botulismus bezeichnet (Kapitel 3.2.4.2).

2.2.3.3 Iatrogen Botulismus

Die Indikationen zum Einsatz von BoNT in der Medizin sind immer vielfältiger geworden (DRESSLER 2000). Einige davon sind Strabismen, hemifaciale Spasmen, Tremor und andere pathologische Muskelkontraktionen (OATES u. WOOD 1991; CARDOSO u. JANKOWIC 1995; BERWECK u. HEINEN 2004). BRASHEAR et al. (2002) beobachteten bei 40 von 64 untersuchten Schlaganfallpatienten eine deutliche Minderung der spastischen Handlähmung nach lokaler intramuskulärer Applikation. Bei Parkinsonpatienten wird das Neurotoxin intrakutan injiziert, um das Schwitzen im Bereich der Handflächen und Achseln zu reduzieren (SAADIA et al. 2001; SCHNIDER et al. 2001). Andere Veröffentlichungen beschreiben weitere erfolgreiche Anwendungen (SOJER et al. 2001; STROBL 2001; MÜLLER u. WISSEL 2001).

Zum Einsatz kommen sowohl BoNT-Präparate vom Typ A als auch vom Typ B (SADICK 2003), letztere vor allem bei Resistenzen gegenüber Typ A infolge Antikörperbildung (STRAUB 2004).

Der Vollständigkeit halber soll auch der Einsatz von BoNT-haltigen Präparaten im Bereich der plastischen Chirurgie genannt werden. Besonders das Präparat Botox® ist dem Verbraucher ein Begriff.

Obwohl der therapeutische Einsatz heute keine Besonderheit mehr darstellt, ist er mit Risiken verbunden, die jedoch unterschiedlich bewertet werden. CHERINGTON (1998) mutmaßt, dass es zu einer Ausbreitung des Neurotoxins kommen kann, was Botulismusefälle nach therapeutischem Einsatz von BoNT erklärt (GIRLANDA et al. 1992, zitiert bei CHERINGTON 1998; BAKHEIT et al. 1997, zitiert bei LUVISETTO et al. 2003).

DRESSLER (2000) dagegen sieht keine reelle Gefahr, da die verwendeten Dosen gering sind und nicht gebundenes BoNT im Muskel innerhalb weniger Stunden angebaut wird. Jedoch empfiehlt der Autor, das Verhältnis von BoNT-Dosis und Muskelgröße zu beachten und ggf. mehrere Einzelinjektionen vorzunehmen.

Kurz genannt werden sollte auch der Begriff des Botulismus-Inhalationssyndroms. Da BoNT in Aerosolform auch über die Lunge aufgenommen werden kann (MCNALLY et al. 1994, zitiert bei SHAPIRO et al. 1998), besteht die Gefahr von Laborunfällen (HOLZER 1962) oder des Einsatzes von Toxinaerosol als biologische Waffe (FELDMEIER 2002; BOSSI u. BRICAIRE 2003).

2.3 Klinischer Verlauf

Die Ausprägung der klinischen Symptome ist von mehreren Faktoren abhängig. So beeinflusst **die aufgenommene oder im Körper gebildete Toxinmenge** den Krankheitsverlauf (SEGNER et al. 1971b; VAN DER LUGT et al. 1995; DRESSLER 2005) entscheidend. Die Aufnahme subletaler Toxinmengen führt demnach zu weniger akuten Verläufen (WERNER 1992; VENNER 1999), jedoch ist eine Kumulation mit Todesfolge beschrieben (BALJER et al. 1974; KRONTHALER 1983; SHAPIRO et al. 1998; BÖHNEL 2004). Für den Verlauf ist entscheidend, wie viele Synapsen mit BoNT besetzt sind. Es müssen drei Viertel aller Rezeptoren besetzt sein, um eine sichtbare Symptomatik hervorzurufen (PATON u. WAUD 1967; GREVE et al. 1993).

Weiterhin variiert die Symptomatik in Abhängigkeit vom **C. botulinum-Stamm**, der die Erkrankung auslöst (KIETZMANN 1957).

Mehrere Veröffentlichungen (CICCARELLI et al. 1977; SWERCZEK 1980b; KÖHLER 1987; VAN DER LUGT et al. 1995; WILKINSON 1999; ADAM-CASTRILLO et al. 2004) belegen, dass die verschiedenen **Tierarten** unterschiedlich sensibel auf das BoNT reagieren. Am empfindlichsten sind Einhufer, danach folgen in abnehmender Reihenfolge Geflügel, Wiederkäuer, Schwein und Fleischfresser (excl. Nerz). Zusätzlich ist jede Spezies gegenüber den verschiedenen Toxovaren unterschiedlich empfindlich, was sich wiederum darin äußert, dass die verschiedenen Toxovare unterschiedliche Wirtstiere „bevorzugen“ (Tabelle A14).

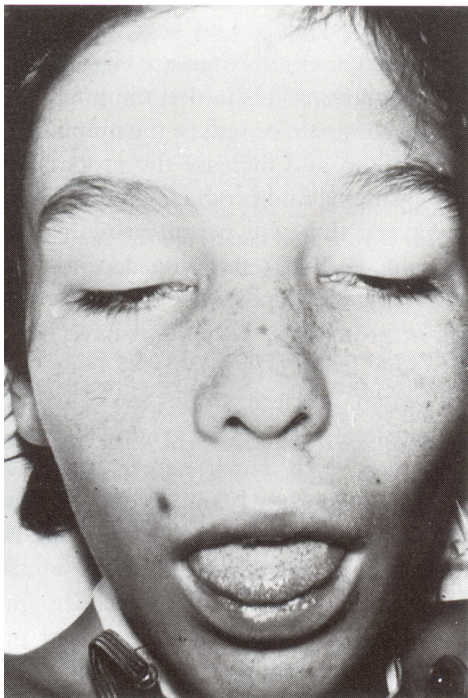
Die Toxinwirkung wird weiterhin von der **Widerstandskraft des befallenen Organismus** beeinflusst. LINDNER und BECHTEL (1969) belegen, dass ein Vitamindefizit die Widerstandskraft herabsetzt.

Proteinreiche **Futtermittel** und ein alkalischer pH-Wert im Darm schaffen ein Milieu, in dem kleine BoNT-Mengen die Darmmotilität herabsetzen und so eine starke Vermehrung vegetativer Zellen mit Toxinbildung ermöglichen (SCHETTLER 1979).

Zuletzt soll noch auf die Bedeutung **proteolytischer Enzyme** hingewiesen werden, die die Toxinwirkung um ein Mehrfaches steigern können (DUFF et al. 1956; NICOLET 1985). Dies erklärt, warum KOLB (2000a) von einer Potenzierung der spezifischen Letalität durch Verdauungsenzyme, z.B. Trypsin, spricht.

Die angegebenen Inkubationszeiten beim Menschen variieren zum Teil recht stark: 12 bis 36 Stunden (RODLOFF 2001) oder acht Stunden bis acht Tage (BAUERNFEIND u. SHAH 1995). MACDONALD et al. (1985) beobachteten, dass Patienten mit einem schwereren Krankheitsverlauf deutlich kürzere Inkubationszeiten aufweisen als solche mit milderen klinischen Symptomen. Die Autoren führen dies auf unterschiedliche Toxinmengen zurück, die von den Patienten aufgenommen werden. Genaue Angaben zu Mortalitätsraten sind im Kapitel 3.5 nachzulesen.

Zunächst kommt es zu eher unspezifischen Symptomen (Übelkeit, Erbrechen und Durchfall), die auch bei einer Vielzahl anderer Lebensmittelinfektionen beobachtet werden. Die eigentlichen, durch die Intoxikation hervorgerufenen Symptome zeigen sich in Lähmungserscheinungen: so treten zunächst Funktionsstörungen der Augenmuskulatur auf (unter anderem das pathognomonische Doppelsehen, Strabismus und Pupillenstarre) sowie Sprach- und Schluckstörungen (Abbildung 6). Im weiteren Verlauf werden periphere Nerven beeinträchtigt (Lähmung der Blasen- und Darmmuskulatur, Bewegungsstörungen), was letztendlich zum Tod durch Atemstillstand führt (LUVISETTO et al. 2003). Tabelle A15 gibt einen Überblick über häufig festzustellende Symptome.



Nach allgemeiner Auffassung gilt als klassisches Trio eine symmetrische, absteigende und schlaffe Lähmung, ein klares Sensorium und Fieberfreiheit.

Im Gegensatz dazu berichten DOLMAN et al. (1960), dass eine erhöhte Körpertemperatur im Zusammenhang mit entstehenden Atemproblemen und Pneumonien auftreten kann. Dies ist vermutlich auf sekundäre Infektionen zurückzuführen, aber weniger auf Botulismus an sich.

Abbildung 6: Lähmung der Gesichtsmuskulatur bei Patient mit Botulismus (JOHNSON 2000)

Etwas anders beginnt der Krankheitsverlauf des Säuglingsbotulismus, weshalb er an dieser Stelle gesondert erwähnt werden soll. Das erste festzustellende Symptom ist meist eine Obstipation (TURNER et al. 1978). Erst im weiteren Verlauf treten die für Botulismus typischen Symptome auf, die sich in Trinkschwäche, einer allgemeinen Muskelhypotonie und Paresen der Hirnnerven äußern (SCHREINER et al. 1991). Aufgrund der Beobachtung, dass ein an Botulismus erkranktes Kleinkind plötzlich aufhörte zu atmen (MIDURA u. ARNON 1976; MARX 1978), wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Säuglingsbotulismus und dem Plötzlichen Kindstod diskutiert.

Es wurden verschiedene Proben von an SID verstorbenen Kindern auf das Vorhandensein von *C. botulinum* bzw. BoNT untersucht (Tabelle 3).

Tabelle 3: Nachweis von BoNT oder *C. botulinum* (vegetative Zelle oder Spore) in verschiedenen Proben von an Plötzlichem Kindstod verstorbenen Kindern

Probenart	positive Proben / Gesamtprobenzahl	% positive Proben	Literaturquelle
Milz und Darminhalt	9/211	4,3	ARNON et al. (1978)
Kot	1/30	3,3	PETERSON et al. (1979)
Herzblut und Dünndarm	0/41	0	HEINZEL et al. (1985)
Blut und Darm	6/12	50	BEHRENS et al. (1998)
Blut, Leber und Darm	11/57	19,3	BÖHNEL et al. (2001a)

Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der Heterogenität der untersuchten Proben die verschiedenen Untersuchungsergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar sind.

Weiterhin konnten SONNABEND et al. (1981) *C. botulinum*-Typ G und dessen BoNT im Zusammenhang mit fünf plötzlichen Todesfällen nachweisen. Während vier der Verstorbenen Erwachsene sind, handelt es sich bei dem fünften Fall um ein 18 Wochen altes Mädchen. Dabei wird davon ausgegangen, dass im Stuhl gesunder Säuglinge keine *C. botulinum*-Keime nachweisbar sind (STARK u. LEE 1982), obwohl SNYDER (1940) und THOMPSON et al. (1980) von asymptomatischen Trägern berichten.

Obwohl ein Zusammenhang vermutet werden kann, fehlt der entscheidende Nachweis, dass der Säuglingsbotulismus die Ursache für den Plötzlichen Kindstod ist. In Anbetracht der vielfältigen Krankheitsverläufe erscheint es wahrscheinlicher, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt (BARTRAM u. SINGER 2004).

3 VORKOMMEN VON *C. BOTULINUM* UND DES BOTULISMUS

In diesem Kapitel sollen das Vorkommen und die Verbreitung von *C. botulinum* aus mehreren Blickwinkeln beleuchtet werden.

Zum einen werden die Nachweise der verschiedenen *C. botulinum*-Typen unter geographischen und epidemiologischen Aspekten betrachtet. Weiterhin wird aus verbraucherschützerischer Sicht auf ursächliche Lebensmittel und quantitative Nachweise eingegangen.

Aus diesen beiden Ansatzpunkten ergibt sich der letzte Teil: ein zahlenmäßiger Überblick über Erkrankungsfälle in Deutschland und einigen anderen ausgewählten Ländern.

3.1 Geographische Verteilung

Das Vorkommen der verschiedenen Toxovare variiert weltweit (Tabelle A16). Dabei ist zu beachten, dass diese Angaben verallgemeinert sind und sich darauf beziehen, welche Typen vor Ort am häufigsten nachgewiesen wurden. Langfristig betrachtet werden die geographischen Dominanzen der verschiedenen Typen zurückgehen, da nicht nur durch Zugvögel, sondern vermehrt auch durch Tier-, Reise- und Güterverkehr eine weltweite (Um-) Verteilung stattfindet (BÖHNEL 1995).

Auch innerhalb einer Region kann es zu Unterschieden im Nachweis von *C. botulinum* kommen (BOTT et al. 1966,1968). Im Rahmen der ersten Studie wiesen die Autoren in 9% der gastrointestinalen Proben der Fische des Michigansees *C. botulinum*-Typ E nach. Zwei Jahre später untersuchten sie Bodenproben und wiesen dabei in über 90% BoNT-Typ E nach. Ähnliche Ergebnisse legten SMITH und MORYSON (1975,1977) vor. Im Rahmen der ersten Studie untersuchten sie Proben vom Gewässergrund und verglichen diese mit Proben des umliegenden Bodens. Dabei konnten die Autoren in 72,5% der Schlammproben *C. botulinum* nachweisen, in den ebenfalls entnommenen Bodenproben dagegen nur zu 4%. Die Untersuchungen von WARD et al. (1967a) belegen auch jahreszeitliche Varianzen – in Boden- und Sedimentproben der Amerikanischen Golfküste dominiert in warmen Monaten *C. botulinum*-Typ E, während in der kälteren Jahreszeit keiner der gefundenen Typen vergleichsweise häufiger nachzuweisen war.

Während Typ A offenbar die Hauptursache für Botulismus in den USA, Argentinien und China ist, wird der Typ B vor allem in Europa als Botulismuserreger nachgewiesen (HATHEWAY 1995b). Der Typ E kommt zumeist in den kühleren Regionen der Nordhalbkugel vor. Diese Angaben stimmen mit denen von IWAND (1979) überein.

3.1.1 Amerika

Der Typ A dominiert westlich der Rocky Mountains und wurde auch in Südamerika nachgewiesen (CARROLL et al. 1966; KLARMANN 1987; GROÙE-HERRENTHEY 2004). Mit ihrer Studie belegen LÚQUEZ et al. (2005), dass auch in Argentinien der Typ A dominiert. LINDSTRÖM et al. (2001a) gelang der Nachweis mit Hilfe der PCR in Fischköpfen, die aus US-amerikanischen Gewässern stammten.

Am häufigsten wiesen SCHOENHOLZ und MEYER (1922) in Gemüse- und Bodenproben der Hawaii-Inseln *C. botulinum*-Typ B nach. Auch in den östlichen Gebieten der USA herrscht der Typ B vor (MITSCHERLICH u. MARTH 1984; SCHALLEHN 1994). In Kentucky wird sogar von einer Dominanz gesprochen (GERBER 1994b).

Typ C-Botulismus wurde bei Schafen in Kalifornien durch SWIFT et al. (2000) beschrieben. DÖBEREINER et al. (1992) berichten über die weite Verbreitung von Botulismus unter brasilianischen Rindern; im Zuge der Diagnostik wurden sowohl Typ C als auch Typ D nachgewiesen. Auch in den Untersuchungen brasilianischer Bodenproben (GROÙE-HERRENTHEY 2004) wurden fast ausnahmslos die Typen C und D nachgewiesen. Nur in

einem Fall wurde *C. botulinum*-Typ A festgestellt, die Autorin vermutet jedoch eine sekundäre Kontamination der Probe.

Eine geographische Besonderheit stellt das gehäufte Vorkommen von *C. botulinum*-Typ E im Bereich der Großen Seen Nordamerikas dar. BOTT et al. (1966) konnten den Typ E in 16,5% der gastrointestinalen Proben von Fischen nachweisen. FANTASIA und DURAN (1969) gelang dies in 3,6% der in der Nähe der Großen Seen gefangenen Döbel. In ihrer Veröffentlichung verweisen sie auf eine ihrer vorher durchgeführten Studien, in deren Rahmen sie bei 50% der untersuchten frischen Döbel *C. botulinum*-Typ E feststellten.

Der Typ E wurde weiterhin an der Westküste Washingtons, in Alaska und an der amerikanischen Golfküste nachgewiesen (WARD et al. 1967a; SCHALLEHN 1994; JOHNSON 2000). BOYER et al. (2001) sprechen von einem endemischen Vorkommen des Typ E in Kanada und Alaska.

Zunächst gelang der Nachweis des Typ F in Lachsen des Columbia-Rivers (CRAIG u. PILCHER 1966) sowie in lateinamerikanischen Gewässern (WARD et al. 1967b). Später wurde er an verschiedenen Orten des Kontinents gefunden (WENTZ et al. 1967; GIMENEZ u. CICCARELLI 1968; WILLIAMS-WALLS 1968; SMITH 1975a).

GIMENEZ und CICCARELLI (1970) konnten 1969 in argentinischen Bodenproben erstmals *C. botulinum*-Typ G nachweisen.

3.1.2 Europa

Erste Nachweise gelangen LEIGHTON und BUXTON (1928) in schottischen Bodenproben (Typ A und B). Später fand auch HAINES (1942) in Erdproben aus Süd-Ost-England die Typen A und B.

Unregelmäßig konnte der Typ A in England nachgewiesen werden (JOHNSON 2000). Weitere Untersuchungen belegen das Vorkommen auch in Schweden, Frankreich, Polen und der UdSSR (SONNENSCHNEIN 1980).

Der Typ B ist in Europa vorherrschend (SONNENSCHNEIN 1980; KLARMANN 1987). SMITH und MORYSON (1975) fanden in 50 von 69 Sedimentproben aus Londoner Gewässern *C. botulinum* - 31 davon waren mit dem Typ B kontaminiert. Auch SMITH und YOUNG (1980) konnten in 10 von 174 untersuchten Bodenproben den Typ B nachweisen. Ebenso herrscht der Typ B in skandinavischen Erdproben vor (HUSS 1980), wenn auch mit variabler Häufigkeit. Mehrmals wurde *C. botulinum*-Typ B sowohl in Kot- als auch in Bodenproben holländischer Rinderfarmen gefunden (NOTERMANS et al. 1978; NOTERMANS et al. 1985).

SMITH und MORYSON (1975) gelang der *C. botulinum*-Typ C-Nachweis in Schlammproben englischer Seen, an denen in den zurückliegenden Jahren Botulismus bei Wassergeflügel aufgetreten war.

C. botulinum-Typ D kann in der nördlichen Hemisphäre nur selten nachgewiesen werden. So konnten SMITH und MORYSON (1975) in nur einer von 50 *C. botulinum*-haltigen Proben den Typ D nachweisen. In der Schweiz gelang ein Nachweis nicht (SONNABEND et al. 1987).

In den marinen Proben aus Skandinavien, der Nordsee und der Gewässer rund um die Britischen Inseln dominiert *C. botulinum*-Typ E (SKOVGAARD 1979). In der Öresundregion wurde in 59,5% der Proben *C. botulinum*-Typ E festgestellt (JOHANNSEN 1962), wobei ein Nachweis in Proben der Seeböden bis zu 100% möglich war. Auch in Schweden waren die Nachweisraten für *C. botulinum*-Typ E im aquatischen Milieu deutlich höher als im terrestrischen (JOHANNSEN 1963). HUSS (1980) konnte in 90% der Proben der dänischen Küste den Typ E nachweisen. In 71% der Wasser- und Sedimentproben der Ostsee stellten HIELM et al. (1998a) *C. botulinum*-Typ E fest. ALA-HUIKKU et al. (1977) wiesen in ca. 10% der untersuchten Forellen aus finnischen Zuchtfarmen den Typ E nach. HUSS und PEDERSEN (1979) fanden in verschiedenen Meerestieren europäischen Ursprungs *C. botulinum*-Typ E (Tabelle A17). Spätere Untersuchungen bestätigen dies: so stellten HYYTIÄ et al. (1998) in 19% der Fische und 8% der Rogenproben *C. botulinum*-Typ E fest. HIELM (1999) konnte in 95% der untersuchten finnischen Fischfarmen den Typ E nachweisen. Zusammenfassend gehen HIELM et al. (1998a) davon aus, dass in der Ostsee die weltweit höchste Kontamination mit *C. botulinum*-Typ E vorliegt, eine mögliche Erklärung sehen sie in dem vergleichsweise niedrigen Salzgehalt.

Im Rahmen einer Untersuchung der Umgebung fischverarbeitender Betriebe konnte EBERT (1954) *C. botulinum*-Typ E nachweisen.

Vermeehrt wurden Untersuchungen in Deutschland durchgeführt, als im August 1970 drei Personen an Botulismus verstarben, nachdem sie mit Typ E kontaminierte Forellenfilets gegessen hatten (BACH u. MÜLLER-PRASUHN 1971). BAUMGART (1970a) wies bei der Untersuchung von 41 Flundern aus Deutschland in einer Probe *C. botulinum*-Typ E nach. BACH et al. (1971) stellten in 14 von 366 Proben aus einer Teichwirtschaft und verschieden verarbeiteten Forellen *C. botulinum*-Typ E fest. In 7,1% der Proben von Ostseefischen wurde BoNT-Typ E gefunden (BAUMGART 1972).

CANN et al. (1975) gelang es, in britischen Fischzuchten *C. botulinum*-Typ F nachzuweisen.

In der Schweiz wurde *C. botulinum*-Typ G im Rahmen postmortaler Untersuchungen an fünf Menschen (SONNABEND et al. 1981) und in Bodenproben (SONNABEND et al. 1987) nachgewiesen.

3.1.3 Afrika

Erstmals beschreiben FREAN et al. (2004) eine Botulismus-Typ A-Erkrankung in Südafrika, die durch vor Ort hergestellte Fischkonserven verursacht wurde.

YERUHAM et al. (2003) beschreiben einen Botulismus-Typ B-Ausbruch bei Rindern in Israel, als Intoxikationsquelle konnte Maissilage ausgemacht werden. Obwohl im Rahmen dieses Ausbruches >50 Tiere erkrankten, zählt Botulismus in Israel zu den sporadisch auftretenden Erkrankungen (ANONYM 1997).

ELAD et al. (2004) berichten von Typ-C-Botulismus bei Katzen, als Auslöser wurde toxinhaltiges Pelikanfleisch nachgewiesen.

VAN DER LUGT et al. (1995) berichten von Botulismusfällen bei Schafen und Ziegen, die auf die Typen C und D zurückzuführen sind.

BoNT-Typ E-haltige Garnelen, die vor der nigerianischen Küste gefangen und nach der Verarbeitung exportiert wurden, führten in Frankreich zur Erkrankung eines Menschen (BOYER et al. 2001).

Es ist wahrscheinlich, dass die wenigen in der internationalen Literatur zu findenden *C. botulinum*-Nachweise das reale Bild nur verzerrt darstellen. Aufgrund der lokalen Gegebenheiten kann davon ausgegangen werden, dass die Quantität und Qualität möglicher Untersuchungen nicht mit denen in Europa oder Amerika vergleichbar sind. Deshalb kann nicht davon ausgegangen werden, dass die wenigen Nachweise ein repräsentatives Bild über das Vorkommen von *C. botulinum* auf dem afrikanischen Kontinent widerspiegeln.

3.1.4 Asien

KRAWTSCHENKO und SHISKULINA (1966, zitiert bei SEIDEL 1992) untersuchten das Vorkommen von *C. botulinum* auf dem Gebiet der Sowjetunion. Sie konnten in ihren Untersuchungen die Typen E, B, A, C und D in abnehmender Häufigkeit feststellen. BULATOVA et al. (1973) wiesen in verschiedenen Proben den Typ F zu 51% nach, in abnehmender Häufigkeit die Typen E, B, A und C. Auch CHULKOVA et al. (1976) konnten in *C. botulinum*-haltigen Fischen und anderen Meerestieren die Typen E und F zu 82% nachweisen.

Aufgrund der Größe des Landes variieren die lokalen Dominanzen in China. HOU et al. (1977, zitiert bei GAO et al. 1990) belegten eine regionale Dominanz des Typ B im Norden – die Autoren wiesen in allen *C. botulinum*-positiven Proben den Typ B nach, wobei in einem Fall eine Mischinfektion mit *C. botulinum*-Typ A vorlag. Dies stimmt mit den früheren Untersuchungsergebnissen von SCHOENHOLZ und MEYER (1922) überein. Für die Küstenregionen dagegen belegen die Zahlen von GAO et al. (1984, zitiert bei GAO et al. 1990) eine Dominanz der Typen C und D. Tabelle 4 fasst die verschiedenen Untersuchungsergebnisse zusammen.

Tabelle 4: Verteilung der *C. botulinum*-Typen in den verschiedenen Regionen Chinas (modifiziert nach GAO et al. 1990)

Region	Gesamtprobenzahl	% pos. Proben	<i>C. botulinum</i> -Typ					
			A	B	C	D	E	F
Nord-China	3597	14,8	247	287	1	0	35	2
Süd-China	2304	2,5	7	2	19	26	6	0
Gesamt	5901	10,0	254	289	20	26	41	2

HAQ und SUHADI (1981) wiesen in 11,4% der Boden- und Gewässerproben Javas *C. botulinum* nach. Im Rahmen der Typisierung stellten die Autoren am häufigsten die Typen C und D fest. MORTOJUDO et al. (1973) fanden alle Typen von A bis F in verschiedenen Proben aus indonesischen Gewässern. In 11 von 24 *C. botulinum*-positiven Proben wurde Typ C nachgewiesen. In abnehmender Reihenfolge traten die Typen A, B, F, D und E auf. Ähnliche Ergebnisse sind in Tabelle A18 dargestellt. Diese Dominanz in tropischen Regionen spiegelt sich auch in den Ergebnissen anderer Untersuchungen wieder (TANASUGARN 1979; HUSS 1980; LALITHA u. GOPAKUMAR 2000; LALITHA u. SURENDRAN 2002).

Das Vorherrschen der Typen C und D in Äquatornähe ist offensichtlich. Eine mögliche Ursache sind die herrschenden Temperaturen, die optimal für die Typen C und D sind (MIYAZAKI u. SAKAGUCHI 1978). Psychrotrophe *C. botulinum*-Keime werden dagegen selten nachgewiesen (HAQ u. SUHADI 1981; LALITHA u. IYER 1990; LALITHA u. GOPAKUMAR 2000).

Erkrankungen, die auf den Typ E zurückzuführen waren, sind aus Japan bekannt (NAKAMURA et al. 1956; SCHALLEHN 1994), parallel konnten Typ E-Sporen durch verschiedene Untersuchungen in der Umwelt nachgewiesen werden (HAQ u. SAKAGUCHI 1980; YAMAKAWA u. NAKAMURA 1992). Weiterhin wiesen YAMAKAWA und NAKAMURA (1992) in Bodenproben japanischer Flüsse *C. botulinum*-Typ B-Isolate und die BoNT-Typen B, C und E nach.

3.2 Epidemiologische Aspekte

Die Typen A, B, F und G können vor allem dem Erdboden, der Typ E den marinen Proben zugeordnet werden. Dagegen sind die Toxovare C und D zumeist in Kotproben verschiedener Tierarten nachzuweisen. Sowohl die Untersuchungen von EASTON und MEYER (1924) als auch die in Tabelle A19 erfassten Untersuchungsergebnisse belegen, dass *C. botulinum*-Sporen im Darm gesunder Tiere vorkommen und mit dem Kot ausgeschieden werden.

Über die Vielzahl der Faktoren, die die Entstehung und Ausprägung des Krankheitsbildes „Botulismus“ beeinflussen, gibt die Abbildung A3 einen Überblick. Im Folgenden soll auf einzelne Aspekte eingegangen werden.

Die **intensive landwirtschaftliche Nutzung** ermöglicht es, den Kreislauf von *C. botulinum* aufrechtzuerhalten. So werden mit dem Kot ausgeschiedene Keime über Gülle oder Einstreu auf die Felder gebracht, es kommt zur Kontamination pflanzlicher Futtermittel und so wiederum zu Infektionen oder Intoxikationen bei Tieren. Die von KALZENDORF (2004) präsentierten Ergebnisse zeigen, dass der Clostridienbesatz in Grassilagen nach Begüllung höher ist, als nach einer mineralischem Düngung der Felder. Weiterhin können Futtermittel durch **erregerhaltige Kadaver** (GALEY et al. 2000) oder durch Erdkontamination von Grobfuttermitteln (BÖHNEL u. GESSLER 2004) mit entsprechenden Sporen versetzt werden. Eine Kontamination ist auch durch **Abfälle, die in der Tierfütterung eingesetzt werden**, denkbar. So kann es in Küchenabfällen zu einer BoNT-Synthese kommen (FENSKE u. PIOCH 1983). Sowohl in Bioabfällen (BÖHNEL u. LUBE 2000) als auch in

Kompostproben (SCHIMMEL 2002) gelang ein BoNT-Nachweis. Aufgrund der inhomogenen Struktur ist mit dem Vorhandensein von Toxininseln zu rechnen – BÖHNEL und LUBE (2000) konnten eine Toxinstabilität von bis zu vier Wochen bei einer Umgebungstemperatur von 6°C nachweisen. Bei einer Tiefkühlagerung bei -26°C gelang dies auch noch ein Jahr später. Um ein Wachstum pathogener Keime in Bioabfällen zu verhindern, ist dessen Behandlung gesetzlich geregelt (BIOABFALLVERORDNUNG 1998). BREUKINK et al. (1978) sowie HAAGSMA und TER LAAK (1978) berichten von Botulismusfällen bei Rindern, die durch die Verfütterung von BoNT-haltigem Birtreber ausgelöst wurden. Dies führte zu Verlusten auf mehreren Rinderfarmen in den Niederlanden. Vögel können sich weiterhin über die orale **Aufnahme von toxinhaltigen Arthropoden** oder an Kadavern verendeter Artgenossen vergiften (LEE et al. 1962; FISH et al. 1967; BALJER et al. 1974; DUNCAN u. JENSEN 1976; SPIEß 1978). Auf diese Weise entsteht eine Kettenreaktion: gesunde Tiere vergiften sich an toxinhaltigen Kadavern und geben so einerseits dem Bakterium neuen „Nährboden“ und sorgen andererseits bis zu ihrem Verenden für eine weitere geographische Verbreitung. SPIEß (1978) verweist zusätzlich auf die Möglichkeit der Toxiko-Infektion, „... wobei der Erreger sich im Verdauungstrakt der Mastküken vermehrt und dort das Toxin produziert.“ Nachgewiesen wurde dieser Pathomechanismus durch MIYAZAKI und SAKAGUCHI (1978) an zwei Wochen alten Hühnerküken.

Über die Bedeutung von **Überschwemmungen** für die Ausbreitung von Clostridien gibt es verschiedene Ansichten. So geht NASR (1958) davon aus, dass im Rahmen einer Überschwemmung Clostridien auf das Land verbracht werden, wogegen WOBESER et al. (1987) die These vertreten, dass regelmäßige Überschwemmungen zu einem Wegspülen vorhandener Sporen führen und so regelmäßige Botulismusausbrüche verhindern.

Zur Anreicherung von *C. botulinum* in Gewässern kann es vor allem in warmen Sommermonaten kommen. Unter anderem führt der **Anstieg der Wassertemperatur** zur Vermehrung von *C. botulinum* (MILBRADT 1976; HENTSCHE u. RAETHEL 1977; LUTZ 1992).

KLARMANN (1989) untersuchte das Vorkommen von *C. botulinum* in verschiedenen Tierkörperbeseitigungsanstalten. Dabei konnte er sowohl in den Rohmaterialien als auch in den Endprodukten (Tierkörpermehl) den Botulismuserreger nachweisen. Aufgrund der thermischen Bearbeitung ist jedoch eine Rekontamination wahrscheinlicher als eine Persistenz auskeimungsfähiger Sporen.

C. botulinum kommt in gesunden Haustierbeständen vor (NOTERMANS et al. 1985). NOTERMANS et al. (1978) fanden 10^4 *C. botulinum*-Keime/g Rinderkot. Auch in 62% der Kotproben schwedischer Schweine (DAHLENBORG et al. 2001) und in 73% der Kotproben schwedischer Rinder (DAHLENBORG et al. 2003) konnte *C. botulinum* nachgewiesen werden. Dabei stellten die Autoren saisonale Schwankungen fest: während im Sommer durchschnittlich <1,5 Sporen/g nachgewiesen wurden, lag die Anzahl im Winter bei >4 Sporen/g. Ursächlich hierfür kann eine andere Rationsgestaltung (z.B. vermehrte Silagefütterung) im Winter sein.

3.2.1 *C. botulinum*-Typ C – Geflügel

Immer wieder kommt es zu verlustreichen Massenerkrankungen, die nicht lückenlos in der Literatur nachvollziehbar sind (ALBERT 2003), da Fallberichte nicht regelmäßig veröffentlicht werden.

Botulismus wird regelmäßig bei Wassergeflügel (BLANDFORD et al. 1969; HAAGSMA et al. 1972; HENTSCHKE u. RAETHEL 1977; SHAYEGANI et al. 1984; CALSOW et al. 1995), seltener bei Mastgeflügel (ROBERTS et al. 1973; SMART u. ROBERTS 1977; SPIEß 1978; HARRIGAN 1980) beobachtet.

Zumeist wird *C. botulinum*-Typ C als Auslöser nachgewiesen (GRUBB 1964). In seltenen Fällen konnte jedoch auch *C. botulinum*-Typ E als auslösendes Agens diagnostiziert werden – in diesen Fällen handelte es sich jedoch um fischfressende Vögel, z.B. Möwen oder Seetaucher (ADAMS et al. 2003).

Die Entstehung dieses Krankheitskomplexes wird durch mehrere Faktoren begünstigt, auf die wichtigsten soll an dieser Stelle eingegangen werden.

Ein entscheidender Faktor ist ein Anstieg der Gewässertemperatur. Dafür kommen mehrere Ursachen in Betracht. Abbildung 7 stellt den zeitlichen Zusammenhang von Außen- und Wassertemperatur sowie den Botulismuszfällen graphisch dar.

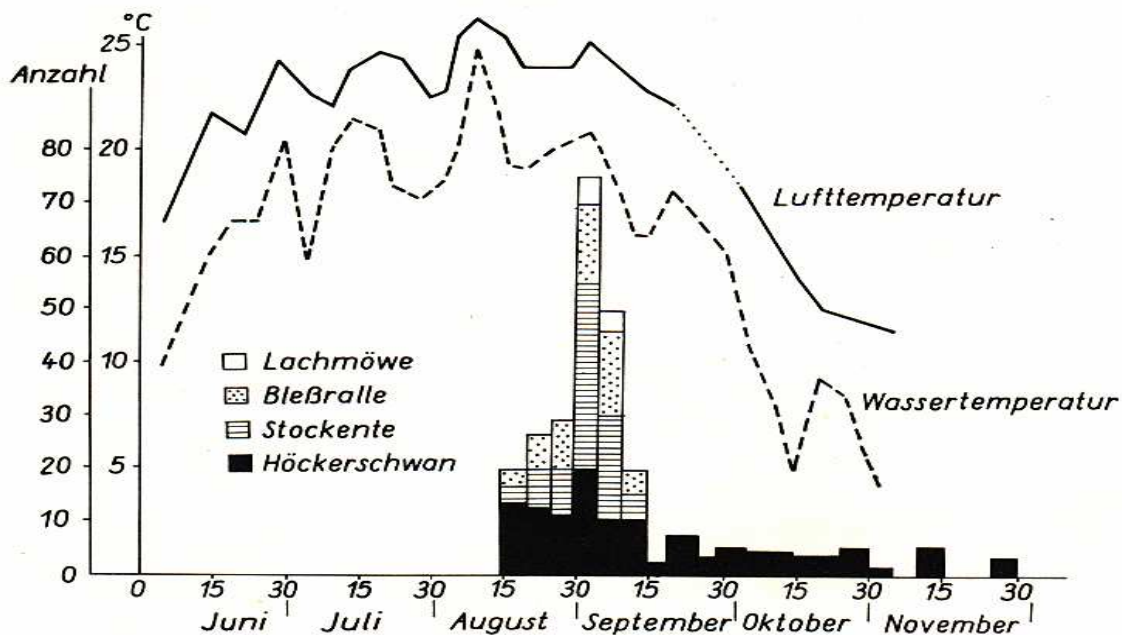


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen Anzahl an Botulismuszfällen bei Wassergeflügel und der Luft- bzw. Wassertemperatur (KÖHLER 1977)

Unabhängig davon können eingeleitete Industrieabwässer (BALJER et al. 1974) oder die Kühlwässer von Atomkraftwerken (BEER 1987) zu einer Anhebung der Gewässertemperatur führen.

MILBRADT (1976) beobachtete, dass besonders die Tiere erkrankten, die sich am Ufer aufhielten. Ursächlich sind höhere Wassertemperaturen in diesen flachen Zonen (CALSOW et al. 1995). Weiterhin beobachtete MILBRADT (1976) eine Beendigung des Krankheits-

geschehens, nachdem im Frühherbst die Lufttemperaturen sanken und Regenfälle für vermehrte Zu- und Abflüsse der Teiche und somit für eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes sorgten. Ähnliche Beobachtungen machten SHAYEGANI et al. (1984). Problematisch ist die vergleichsweise langsamere Temperaturabnahme im Wasser als in der Luft. So treten Botulismuserreger auch im Frühherbst auf, wenn zuvor längere Hitzeperioden bestanden (LUTZ 1992).

Gleichzeitig fördert ein anaerobes, eiweißreiches Milieu die Vermehrung von *C. botulinum*. Dies findet der Botulismuserreger in Kadavern verendeter Tiere (BALJER et al. 1974) oder im Schlamm, z.T. bestehend aus Pflanzenschlick (BLANDFORD et al. 1969). Dabei besteht die Gefahr eines Circulus vitiosus: anfallende Kadaver ermöglichen eine BoNT-Synthese und stellen wiederum eine Intoxikationsquelle für gesunde Vögel dar. Dieser Kreislauf kann sich weiter fortpflanzen, bis meist äußere Bedingungen den Botulismuserreger hemmen. Diese These beruht darauf, dass gesunde Tiere an den Kadavern fressen, was nicht alle Vogelarten tun. Pflanzenfresser, die den Hauptanteil der verendeten Tiere darstellten (KÖHLER et al. 1977), können das Gift, welches in den anaeroben Faulschlammschichten sonnenbeschienener Gewässer gebildet wird (HENTSCHKE u. RAETHEL 1977), während des Gründelns direkt vom Gewässerboden aufnehmen.

Eine weitere Ursache stellen Insekten dar - sie können als Intoxikationsquelle fungieren. So berichten LEE et al. (1962), FISH et al. (1967) sowie FOREYT und ABINANTI (1980) über Botulismus bei Fasanen, ausgelöst durch in den Kadavern parasitierende Schmeißfliegenlarven. Nach durchschnittlich vier Tagen können an Kadavern Larven gefunden werden (CLIPLEF u. WOBESER 1993). Bei Untersuchungen eines Botulismusausbruches konnten DUNCAN und JENSEN (1976) in 43% der Fliegenlarven BoNT nachweisen. Für Insekten oder deren Larvenstadien ist BoNT nicht giftig, daher können sie es ohne Schaden aufnehmen (FOREYT u. ABINANTI 1980). Vögel dagegen vergiften sich bei Aufnahme dieser toxischen Insekten (KRONTHALER 1983; ADAMS et al. 2003). Da dieses BoNT sowohl verschiedene Metarmophosestadien als auch niedrige Temperaturen im Winter unbeschadet übersteht (HUBALEK u. HALOUZKA 1991), ist deren Bedeutung nicht zu unterschätzen.

Bei Erkrankungen von Masttieren werden neben möglichen Insekten auch toxische Kadaver verstorbener Tiere und das Vorkommen des Erregers in der Tiefstreu diskutiert (SMART u. ROBERTS 1977).

3.2.2 *C. botulinum*-Typ E – Fische

Prinzipiell sind zwei Kontaminationswege denkbar – zum einen die Infektion des lebenden Tieres und zum anderen die Kontamination während der Bearbeitung (PEDERSEN 1955).

In der Literatur finden sich viele Hinweise dazu, dass schon der lebende Fisch im Wasser *C. botulinum*-Sporen aufnimmt. So konnten BOTT et al. (1966) im Magen-Darm-Kanal verschiedener Fische aus den Großen Seen *C. botulinum* nachweisen. Dabei gelang es ihnen, eine direkte Beziehung zwischen der im GIT vorhandenen Futtermenge und der darin nachgewiesenen Sporenanzahl nachzuweisen. *C. botulinum* konnte auch im Schlamm aus Fischzuchtgewässern und daraus entnommenen Forellen nachgewiesen werden (BACH

1971; BACH et al. 1971). Allerdings wurde das Vorkommen auch in Fischen, die in frei schwimmenden Netzen – und somit ohne Bodenkontakt – aufwachsen, belegt. Somit müssen auch andere Kontaminationswege beachtet werden. Weiterhin spricht für eine Sporenaufnahme durch lebende Fische, dass in auf dem Gewässerboden lebenden Fischarten ein Nachweis von *C. botulinum* häufiger möglich ist (SAUPE 1989). Die Verbreitung von *C. botulinum* über verschiedene Gewässer erfolgt zum einen durch Wasservögel, die die Botulinus-Sporen mit ihrem Kot verschleppen und zum anderen durch Umsetzen von sporenhaltigen Fischen (BACH 1971).

Obwohl der Kontaminationsweg Schlamm – Futter – Darminhalt (– Schlachttisch) – Filet am wahrscheinlichsten ist, kann die Möglichkeit der direkten Verunreinigung der Filets im Schlachtprozess nicht ausgeschlossen werden. Diese Gefahr ist während der Weiterverarbeitung der Tiere am größten (WENZEL et al. 1971). Durch zügiges und fachgerechtes Eviszerieren mit anschließender Kühlung kann die Keimbelastung gesenkt und eine Toxinbildung verhindert werden (HUSS et al. 1974b; SAUPE 1989). HUSS et al. (1979) weisen darauf hin, dass nicht ausgenommene Fische ein gesondertes Risiko darstellen. Werden sie nicht schnell genug so weiterverarbeitet, dass ein Auskeimen der Sporen unterbunden und vorhandenes Toxin zerstört wird, stellen derartige Lebensmittel ein ernstzunehmendes Verbraucherrisiko dar, wie die Fallbeschreibung von TELZAK et al. (1990) beispielhaft zeigt.

Auch sollte die Zufuhr von *C. botulinum*-Sporen über kontaminierte Zutaten (Gewürze etc.) vermieden werden (DOLMAN et al. 1950).

3.2.3 Bedeutung siliierter Futtermittel

In der modernen Landwirtschaft wird aus finanziellen Beweggründen versucht, möglichst viele Materialien zu recyceln oder auf andere Art und Weise (weiter) zu nutzen. Die damit entstehende Problematik zeigt sich beispielhaft in der Nutzung von Geflügelmist in der Rinderhaltung. Aufgrund der Haltungsbedingungen bei Wirtschaftsgeflügel kommt es immer wieder vor, dass verendete Tiere nicht entfernt werden und somit im Geflügelmist verbleiben und ein optimales Milieu für *C. botulinum* darstellen.

Typ C–Botulismus konnte bei Rindern diagnostiziert werden, die mit siliertem Hühnermist gefüttert wurden (MCLOUGHLIN et al. 1988; JEAN et al. 1995). Da bei einigen Tieren Symptome erst nach mehr als 14 Tagen auffällig wurden, stellen MCLOUGHLIN et al. (1988) die These auf, dass nur geringe Toxinmengen aufgenommen wurden, die zu einer verminderten Darmmotilität führten. Infolgedessen konnten *C. botulinum*-Sporen auskeimen, was eine Toxiko-Infektion zur Folge hatte.

Auch wenn Geflügelmist als Einstreu, und nicht als Futtermittel, zum Einsatz kommt, kann es infolge der Aufnahme BoNT-haltiger Partikel zu Erkrankungen kommen (BONGERS et al. 1988).

Silage an sich kann auf verschiedenen Wegen verunreinigt werden. Eine Kontamination ist zum einen durch Erdverunreinigungen möglich (WEIßBACH 2004). Weiterhin begünstigen die heute eingesetzten Erntemaschinen das Verpressen von Schadnagern und jungen Wildtieren, die nicht schnell genug fliehen.

Vorhandene Sporen gelangen so in die Silage, deren anaerobes Milieu ein Auskeimen begünstigt. Bei einem pH-Wert $> 4,5$ und einer Wasseraktivität $> 0,985$ ($TS < 25\%$) kann sich *C. botulinum* vermehren (ROBERTS 1988, zitiert bei WILKINSON 1999; MEYER u. COENEN 2002). Begünstigt wird dies, wenn nitratarmer Ausgangsmaterialien verwendet werden (POLIP 2001). Ursächlich ist die folglich reduzierte clostridienhemmende Wirkung der nitrosen Gase, die aus dem Nitratabbau hervorgehen.

HAAGSMA und TER LAAK (1978) wiesen Typ B-Botulismus bei Rindern aufgrund toxinhaltiger Grassilage nach. Dabei stellten sie 10^4 Keime/g fest.

Weitere, ähnliche Fallbeschreibungen existieren aus England (HOGG et al. 1990; ANONYM 2003), Frankreich (POPOFF u. LECOANET 1987), den Niederlanden (HAAGSMA u. TER LAAK 1979), Kanada (JEAN et al. 1995), den USA (ABBITT et al. 1984; DIVERS et al. 1986) und Israel (YERUHAM et al. 2003).

Im Zusammenhang mit der zunehmenden Silagefütterung tritt Botulismus bei Pferden vermehrt auf (WOLLANKE 2004), da diese gegenüber BoNT besonders empfindlich reagieren (WILKINSON 1999; MEYER u. COENEN 2002). COENEN (1997) sieht in der Verfütterung von Ballensilage an Pferde ein unnötiges Risiko, da diese zumeist eine hohe Trockenmasse (lange Anwelkphase) und einen pH-Wert $> 5,5$ hat.

1997 konnte in der BRD in 10 Pferdebeständen BoNT nachgewiesen werden. Bei weiterer Zunahme der Silagefütterung in der Pferdehaltung muss mit einem Anstieg der Botulinus-Intoxikationen gerechnet werden (DIETZ 1998).

3.2.4 In Verbindung mit Botulismus diskutierte Erkrankungen

3.2.4.1 Key-Gaskell-Syndrom

NUNN et al. (2004) vermuten einen Zusammenhang zwischen dem Key-Gaskell-Syndrom und einer *C. botulinum*-Infektion, da sie in Futter-, Kot- und Blutproben erkrankter Katzen BoNT-Typ C nachweisen konnten, während dies bei keinem der gesunden Kontrolltiere gelang.

3.2.4.2 Viszeraler Botulismus

Seit 1999 wird ein neues Krankheitsbild vor allem in Baden-Württemberg (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2005a) und Mecklenburg-Vorpommern (SCHWAGERICK 2004b) beobachtet. Diese Toxiko-Infektion der Rinder wird als Viszeraler Botulismus bezeichnet - ursächlich ist eine Ansiedlung von *C. botulinum* im Darm. Infolge der anschließenden Toxinsynthese (und verstärkt durch rohfasernarmes Futter) nimmt die Motorik ab, was zu einer verminderten Nährstoffaufnahme führt (GESSLER u. BÖHNEL 2001b). Die Folge sind Lahmheiten, Verdauungsstörungen, Gewichtsverlust und Rückgang der Milchleistung (BÖHNEL u. GESSLER 2003; HOLZHAUER 2004). SCHWAGERICK und BÖHNEL (2001) konnten sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Tieren Toxin-Antikörper feststellen. Infolge dieser Ergebnisse kommen sie zu dem Fazit, dass ein schwaches Abwehrsystem ein begünstigender Faktor für diese Botulismusform ist. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Krankheitsbild über lange Zeiträume persistiert und zu einer von der Ursache her oft verkannten Mortalitätsrate von 10 bis 20% führt (NEUFELD u. BELIHART-NEUFELD 2004a).

3.2.4.3 Shaker Foal-Syndrome und Equine Grass Sickness

Zum einen gibt es das so genannte Shaker-Foal-Syndrome, als dessen Ursache eine Infektion mit *C. botulinum*-Typ B angesehen wird (BOSTEDT 1999). MACKAY und BERKHOFF (1982) berichten von einem Erkrankungsfall, der durch *C. botulinum*-Typ C verursacht wurde. GESSLER und BÖHNEL (2001a) vermuten, dass sich der Keim in der noch nicht stabilisierten Darmflora der Fohlen relativ einfach ansiedeln und Neurotoxin bilden kann. Als Sporenquelle werden der mütterliche Kot (VENNER 1999) oder sandige Weiden (MACKAY u. BERKHOFF 1982) vermutet.

Zudem gibt es Berichte über das Vorkommen dieser Erkrankung bei adulten Tieren. Dabei sieht BÖHNEL (1995) eine „... Besiedlung von intestinalen oder anderen Wunden ...“ als ursächlich an. Auch SWERCZEK (1980b) vermutet Läsionen im Darm, da er nach oraler Infektion von Fohlen nicht immer ein Krankheitsbild auslösen konnte.

Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen BoNT und der Equinen Grass Sickness diskutiert (GERBER 1994a; COTTRELL et al. 1999; HUNTER et al. 1999; GESSLER u. BÖHNEL 2001a; BÖHNEL et al. 2003). Dabei handelt es sich um eine Erkrankung des GIT unbekannter Ätiologie. HUNTER et al. (1999) gehen davon aus, dass die Toxine nicht oral aufgenommen, sondern erst im Darm synthetisiert werden. Jedoch kann ein Vorhandensein von BoNT allein nicht zum Auslösen der Krankheit führen (POXTON et al. 1999; BÖHNEL et al. 2003). Erst wenn es zu Störungen im mikrobiellen Milieu kommt, zerstören die Toxine die lokalen Nervenzellen, was eine Dysfunktion des Darmes nach sich zieht.

Dass bei der Diagnostik klinischer Verdachtsfälle BoNT nicht immer nachweisbar ist, kann unter anderem daran liegen, dass die für ein Pferd letale Toxinmenge so niedrig ist, dass sie im Serum, welches mit Hilfe des Mäuseletalitätstests untersucht wird, nicht immer nachweisbar ist. Dies liegt zum einen an der hohen Sensibilität des Pferdes gegenüber BoNT-Typ B und zum anderen an der Verdünnung, welche es im Serum erfährt (SWERCZEK 1980a).

3.3 Ursächliche Lebensmittel

Zu den häufigsten Botulismusursachen beim Menschen zählen **Gemüsekonserven**, bei denen eine Kontamination mit im Erdboden enthaltenen Sporen möglich ist. Dass, wenn Sporen vorhanden sind, eine Toxinsynthese in bearbeitetem Gemüse möglich ist, wurde unter anderem für Kartoffeln (SOLOMON et al. 1994), Kopfsalat (PETRAN et al. 1995), Spargel (PATERSON et al. 1992) und Knoblauch (SOLOMON u. KAUTTER 1988) nachgewiesen.

Aber auch in **Fleisch- und Fischprodukten** – konserviert oder nicht – ist eine BoNT-Synthese möglich. Obst ist, aufgrund seines niedrigen pH-Wertes, eher selten Ursache von Botulismus (SINELL 1992). Dabei muss beachtet werden, dass ein durch Pilzbefall verursachter pH-Wert-Anstieg das Auskeimen vorhandener Sporen ermöglichen kann (Tabelle A20, Kapitel 4.2.2). Auch Mischinfektionen können den pH-Wert sekundär verändern (MOESCHLIN 1986).

In den USA wurden 75% der von 1899 bis 1949 registrierten Botulismuskfälle durch kontaminiertes Obst und Gemüse (zum großen Teil im privaten Haushalt be- bzw. verarbeitet) verursacht (DOLMAN et al. 1950). Diese Angaben stimmen mit denen in Tabelle A21 überein. Auch in den folgenden Jahren konnten 42,9% der Botulismusausbrüche in den USA auf Obst und Gemüse zurückgeführt werden (BEAN u. GRIFFIN 1990).

Währenddessen sind in Europa vor allem mangelhaft konserviertes Fleisch und Fleischprodukte von Bedeutung (HOLZER 1962). Dabei stellen großvolumige Schinken (insbesondere Knochenschinken) in Europa eine besondere Gefahrenquelle dar (TOMPKIN 1980, LEISTNER 1981; FEHLHABER 1992; Tabelle A22). LÜCKE (1983) begründet dies damit, dass die Pökellake nicht gespritzt wurde, sondern das Salz von außen eindringen musste. Bei dieser Verfahrensweise ist eine längere Einwirkzeit nötig, um die Toxinbildung im Schinkeninneren zu unterbinden. Im Laufe der Jahre nahm auch in Europa das Spritzen der Lake in das Innere der Produkte zu (FEHLHABER 2004). Jedoch liegen dem Verfasser keine vergleichenden Untersuchungen darüber vor, inwieweit die Art der Pökellung eine mögliche Synthese von Botulinustoxin beeinflusst. LÜCKE et al. (1982) konnten während des Pökelprozesses die Vermehrung und Toxinbildung nicht-proteolytischer Typen nachweisen, wenn im Schinkeninneren Temperaturen von 8 bis 10°C herrschten. Folglich sind die Pökeltemperatur und –dauer von entscheidender Bedeutung für die Unterbindung der BoNT-Synthese.

Botulismuserkrankungen nach **Fisch**genuss sind meist auf den Typ E zurückzuführen (JOHANNSEN 1965; DEHOF et al. 1989). Die im Kapitel 4.1.1.2 genannten Untersuchungsergebnisse bestätigen, dass *C. botulinum*-Typ E psychrotroph und infolge dessen auch bei entsprechender kühler Lagerung nur schwer kontrollierbar ist (DOLMAN u. CHANG 1953). Deshalb stellen Räucherfische und deren Produkte, die mild gesalzen oder ungenügend erhitzt bzw. gesäuert wurden, eine Gefahrenquelle dar (SAUPE 1989), besonders wenn sie vakuumverpackt werden. Folglich ist der Typ E-Botulismus besonders in Regionen verbreitet, in denen marine Produkte roh bzw. aus hygienischer Sicht mangelhaft (z.B. zu geringer Salzgehalt), bearbeitet werden. Obwohl der Typ E-Botulismus in Deutschland keine dominante Rolle spielt, sind nähere Untersuchungen empfehlenswert, da sich asiatische Produkte, z.B. Sushi, zunehmender Beliebtheit erweisen und SAKAGUCHI u. TOHYAMA (1955a) derartige Lebensmittel als auslösende Agenzien nachgewiesen haben.

Neben den Eigenschaften des Lebensmittels spielt auch deren Bearbeitung und Lagerung eine entscheidende Rolle. Inwieweit sich die verschiedenen Einflussfaktoren auf die Vermehrung und Toxinbildung auswirken, ist im Kapitel 4 nachzulesen. An dieser Stelle soll auf eine Lebensmittelgruppe hingewiesen werden, die aufgrund ihrer Herstellungs- und Lagerbedingungen eine besondere Gefahrenquelle darstellt. Zunehmend bevorzugen Konsumenten sogenannte „heat-and-eat“- sowie „Ready-to-eat-Produkte“. Aufgrund ihrer Bearbeitungsmodalitäten werden sie auch als **RePFED-Produkte** bezeichnet. Eine Erhitzung erfolgt bei 65-95°C, so dass *C. botulinum*-Sporen nicht abgetötet werden (PECK 1997). Bei entsprechend kühler Lagerung haben diese Produkte die vom Verbraucher gewünschte verlängerte Haltbarkeit - ohne massive nutritive oder organoleptische Beeinträchtigungen.

Dabei müssen Hersteller und Verbraucher bedenken, dass Sporen in den Ausgangszutaten vorhanden sein können, die durch die Temperaturerhöhung nicht zerstört werden – im Vergleich zu der das Auskeimen eventuell hemmenden Begleitflora. Besonders bei einer inadäquaten Kühlung ist eine BoNT-Synthese durch nicht-proteolytische *C. botulinum*-Stämme möglich, da eine Vermehrung und Toxinbildung schon ab 3,3°C nachgewiesen werden konnte (EKLUND et al. 1967a,b; GRAHAM et al. 1997). Ebenso können organoleptisch unbedenkliche Lebensmittel BoNT enthalten (EKLUND 1982; POST et al. 1985b, SOFOS 1992). Weiterhin können auch eher untypische Lebensmittel unter bestimmten Bedingungen als auslösendes Agens in Frage kommen, beispielsweise Weichkäse aufgrund dessen, dass der aufgesprühte Schimmelpilz stark sauerstoffzehrend wächst und so sekundär anaerobe Verhältnisse schafft (KAUF et al. 1974).

Neben der Beschaffenheit des Lebensmittels und seiner Bearbeitung spielen auch die regionalen Essgewohnheiten eine wichtige Rolle. Während in Frankreich überwiegend Fleischprodukte und in China vor allem Lebensmittel auf pflanzlicher Basis ursächlich sind, spielt in Japan und den skandinavischen Ländern Fisch eine entscheidende Rolle (Tabelle A23).

In den Tabellen 5 und 6 sind beispielhaft einige quantitative BoNT-Nachweise in Futter- bzw. Lebensmitteln aufgeführt .

Tabelle 5: Quantitative BoNT-Nachweise im Rahmen experimenteller Versuche

Futter- bzw. Lebensmittel	<i>C. botulinum</i> -Typ	nachgewiesene BoNT-Menge (Maus LD ₅₀)	Literaturquelle
Medium auf Grassilagebasis	A	1,2x10 ⁶ /ml	NOTERMANS et al. (1979)
	B	max.5,6x10 ⁵ /ml	
Frischer, nicht ausgenommener Hering, nach 4 d	E	max.5x10 ³ /g	HUSS et al. (1979)
Frischer, eviszierter Hering, nach 4 d	E	max.5x10 ² /g	
Medium auf Kartoffelbasis, nach 4 d untersucht	A	max.2,1x10 ⁶ /ml	NOTERMANS et al. (1981)
	B	max.8,8x10 ⁵ /ml	
	C	max.2,0x10 ² /ml	
	E	max.1,2x10 ³ /ml	
Gebäckene, folienverpackte Kartoffeln, nach 3 d untersucht	A	max.5x10 ⁵ /ml	SUGIYAMA et al. (1981)

Tabelle 6: Quantitative BoNT-Nachweise im Rahmen von Botulismuserkrankungen

Futter- bzw. Lebensmittel	<i>C. botulinum</i> -Typ	Nachgewiesene BoNT-Menge (Maus LD ₅₀)	Literaturquelle
Mascarpone	A	1,8x10 ³ /g	AURELI et al. (1996)
		1,2x10 ² /g	
Tiramisu	A	2,4x10 ³ /g	
verschiedene Avertebraten	C	<50 - >4x10 ⁵ /g	DUNCAN und JENSEN (1976)
		10 ¹ – 10 ^{4,9} /0,5ml	LEE et al. (1962)
		<1x10 ⁵ /g	HUBÁLEK und HALOUZKA (1991)
		10 ⁶ /g	SHAYEGANI et al. (1984)
Rohschinken	E	2x10 ³ /g	LÜCKE et al. (1982)
Nicht ausgenommenener, gesalzener Fisch	E	10 ⁴ /ml bzw. 10 ² /ml	TELZAK et al. 1990

Quantitative Toxinnachweise, die nach kultureller Anzüchtung erfolgten, finden in Tabelle 6 keine Beachtung, da in diesen Fällen deutlich höhere Toxinmengen nachweisbar sind (SCHULZE u. FUNKE 1981; SCHULZE 1986). HAUSCHILD (1990) geht davon aus, dass in toxischen Lebensmitteln häufig ein BoNT-Level von 10⁴ Mäusen LD₅₀/g vorkommt.

3.4 Quantitative Angaben

Da es sich bei *C. botulinum* um einen ubiquitär vorkommenden Keim handelt, erlauben qualitative Nachweise nur begrenzte Schlussfolgerungen. Daher sind aus lebensmittelhygienischer Sicht besonders quantitative Nachweise interessant.

Zunächst erfolgen einige Angaben über Sporenkonzentrationen in Umweltproben (Tabelle 7). Die großen Differenzen sind in der unterschiedlichen Probenart und den variierenden Entnahmeorten begründet. Gleichzeitig variieren die quantitativen Angaben je nach vorliegenden Umweltbedingungen. So konnten MARION et al. (1983) nur von April bis Oktober das Bakterium in Bodenproben aus Florida nachweisen. Neben den jahreszeitlichen Einflüssen hat unter anderem auch die Art der Tierhaltung einen entscheidenden Einfluss auf die nachzuweisende Sporenanzahl (DAHLENBORG et al. 2001). So konnten bei Tieren aus Freilandhaltung deutlich weniger Sporen nachgewiesen werden als bei denen aus Stallhaltung (Tabelle A24).

Tabelle 7: Quantitative Nachweise von *C. botulinum*-Sporen in Erd- und Sedimentproben

Sporen/Gramm	Probenart	Literaturquelle
0,001 bis 0,002	Sediment	FACH et al. (2002)
0,02 bis 35	Erde oder Sediment	HUSS (1981) sowie INGRAM und ROBERTS (1971, zitiert bei SELL 1985)
0,1 bis 3 (Typ B)	Erde von Rinderfarmen	NOTERMANS et al. (1985)
0,37	Süßwasser	HIELM (1999)
0,45	Sedimente indischer Fischfarmen	LALITHA und GOPAKUMAR (2000)
0,5 bzw. 1,02 (Typ E)	Strand- bzw. küstennahe Sedimentproben, Ostsee	HIELM et al. (1998a)
2,02 (Typ E)	Sedimente aus finnischen Forellenzuchtanlagen	HIELM et al. (1998b)
50 bis 60 (Typ E)	skandinavische Gewässerproben	BAKER und GENIGEORGIS (1990)
240	Sediment	HUSS (1980)

Im Zusammenhang mit Fällen von Säuglingsbotulismus wurde vermehrt Honig auf das Vorkommen von *C. botulinum* untersucht.

Häufig konnte in Proben aus dem europäischen Raum keine Kontamination festgestellt werden (FLEMMING u. STOJANOWIC 1980; HARTGEN 1980; SCHIMMEL 2002). Im Gegensatz dazu gelang dies NAKANO et al. (1990), SCHOCKEN-ITURRINO et al. (1999), MÄDE et al. (2000) sowie NEVAS et al. (2002).

Regelmäßig wurden quantitative Nachweise in amerikanischen Proben erbracht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Quantitative Nachweise von *C. botulinum*-Sporen in Honig

Sporen/Gramm	Literaturquelle
<0,018-0,06	NEVAS et al. (2002)
0,2 (Typ B)	SUGIYAMA et al. (1978)
0,28 (Typ A)	SUGIYAMA et al. (1978)
1-10	KRÄMER (2002)
4 (Typ A)	NAKANO et al. (1990)
5-25	MIDURA et al. (1979)
36-60 (Typ F)	NAKANO et al. (1990)

SNOWDON und CLIVER (1996) schätzen, dass in ca. 5% der Honigproben *C. botulinum*-Sporen nachgewiesen werden können und die durchschnittliche Kontamination bei unter 1 Spore/g liegt. Andere Veröffentlichungen geben den normalen Sporengehalt in Honigproben mit 0,001 bis 0,01/g an (KRÄMER 2002). Der Eintrag kann unter anderem über sporenhaltiges Bienenfutter oder die Zugabe von Süßungsmitteln erfolgen (NAKANO et al. 1992).

Quantitative Angaben zum Vorkommen von *C. botulinum* in Fischen sind in der Literatur häufig zu finden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Quantitative Nachweise von *C. botulinum*-Sporen in Fischen und Muscheln

Sporen/Gramm	Probenbesonderheiten	Literaturquelle
0,003 - 0,007	Salzwasserfische	FACH et al.(2002)
0,005 und 0,06	Hering, ges. Fisch	CANN et al. (1966b)
0,006 - 0,012	Süßwasserfische	FACH et al. (2002)
0,03 - 2,7	Hering (Ostsee)	HYTTIÄ-TREES (1999)
0,03 bis 0,12	Rogen	
0,04	Venus- und Mies- muscheln	LALITHA und GOPAKUMAR (2000)
0,06	Darminhalt von verschiedenen Zucht- fischen	LALITHA und GOPAKUMAR (2000)
0,09 - 2,4	Steinbeißer	BAKER et al. (1990)
0,15 und 0,23	Lachs, 2 Untersuchungen	BAKER et al. (1990)
0,16	Darminhalt finnischer Forellen	HIELM et al. (1998b)
0,17	Filet vom Schellfisch, auf dem offenen Meer gefangen	EYLES und WARTH (1981, zitiert bei LINDROTH und GENIGEORGIS 1986)
0,17	Gezüchtete Garnelen	LALITHA und GOPAKUMAR (2000)
max. 5,3 (Typ E)	Gezüchtete Forellen	HUSS et al. (1974a)
durchschnittlich < 100	Darminhalt von aus der Ostsee stammenden Heringen	ZALESKI (1981, zitiert bei BAKER und GENIGEORGIS 1990)

Die Untersuchungsergebnisse von HYTTIÄ-TREES et al. (1999) zu Sporennachweisen in verschiedenen Fischarten sind in Tabelle A25 zusammengefasst. Da jedoch verschiedene Probenanzahlen der einzelnen Spezies untersucht wurden, lassen sich nur bedingt Aussagen darüber machen, welche Bedeutung die zu untersuchende Fischart hat.

AURELI et al. (1996) konnten sowohl in Mascarpone als auch in einer Tiramisuprobe, die als botulismusauslösende Lebensmittel festgestellt wurden, bis zu 10^5 Sporen/g nachweisen. Anlässlich eines Botulismusausbruches in Italien untersuchten FRANCIOSA et al. (1999) das Vorkommen von *C. botulinum*-Sporen in Milchprodukten. In 3 % der Mascarpone-Proben konnten sie <10 Sporen/g nachweisen. Nach drei Tagen Inkubation bei 28°C konnte aber nur in einer von fünf Proben Wachstum und BoNT nachgewiesen werden. Auch in 2,5% der anderen Milchprodukte wurden <10 Sporen-Typ A/g gefunden. Das Vorkommen von *C. botulinum*-Sporen führen die Autoren auf konzentrierende Produktionsschritte zurück, z.B. die Zentrifugation. Insgesamt sind Botulismusausbrüche, die auf den Genuss von roher Milch zurückzuführen sind, eher selten. Ursächlich dafür ist das geringe Vorkommen von <1 Spore/ml (GLASS et al. 1999).

In Tabelle 10 sind Ergebnisse weiterer Untersuchungen zusammengefasst.

Tabelle 10: Quantitative Nachweise von *C. botulinum*-Sporen in verschiedenen Lebensmitteln

Lebens-/ Futtermittel	Sporen/Gramm	Literaturquelle
Gemüse	0,0025	DODDS und AUSTIN (1997, zitiert bei GIRARDIN et al. 2002)
Pilze	0,15-0,41	HAUSCHILD et al. (1975)
Gnocchi	<25	DEL TORRE et al. (2004)
Schinken	0,4 - 478	HAUSCHILD und HILSHEIMER (1980)
Biertreber, ursächlich für Typ B-Botulismus	10^5 - 10^7	HAAGSMA und TER LAAK (1978)

3.5 Auftreten von Botulismus beim Menschen

Zu beachten ist, dass die folgenden Angaben lückenhaft sind, da Zahlenmaterial nur von wenigen Ländern veröffentlicht wird.

Unabhängig von den registrierten Fallzahlen ist von einer höheren Dunkelziffer auszugehen (BERNDT 1978). Dies liegt zum einen am fehlenden Verdacht bei atypischen Verläufen (SCHIMMEL 2002) und ist zum anderen durch eine unzureichende Diagnostik (BÖHNEL u. GESSLER 2004) begründet.

Die weltweit geschätzte Mortalitätsrate liegt bei 20% (HATHEWAY 1995a). Dabei geht BERNDT (1978) von einer geringeren Mortalitätsrate für Deutschland aus, da zumeist Typ B-Fälle auftreten und diese einen milderen Verlauf nehmen.

Die ersten dem Verfasser zugänglichen Zahlen stammen aus den dreißiger Jahren (ZAUN 1951). 1935 gab es im Deutschen Reich 32 Botulismusausbrüche, in deren Rahmen 82 Personen erkrankten, wovon 11 verstarben.

Historisch bedingt ist ein weiterer Überblick über Gesamtdeutschland erst ab 1990 möglich, einzelne Veröffentlichungen aus den dazwischen liegenden Jahren werden beispielhaft genannt. MEYER (1950) und FARCHMIN (1950,1954) geben einen Überblick über die Zeit der sowjetischen Besatzungszone und die ersten Jahre der DDR. So wurden 1948 zehn und 1949 elf Ausbrüche gemeldet. In den Jahren 1950 bis 1952 gibt es 20 Botulismusausbrüche, in deren Rahmen es zu 117 Erkrankungen und 10 Todesfällen kam.

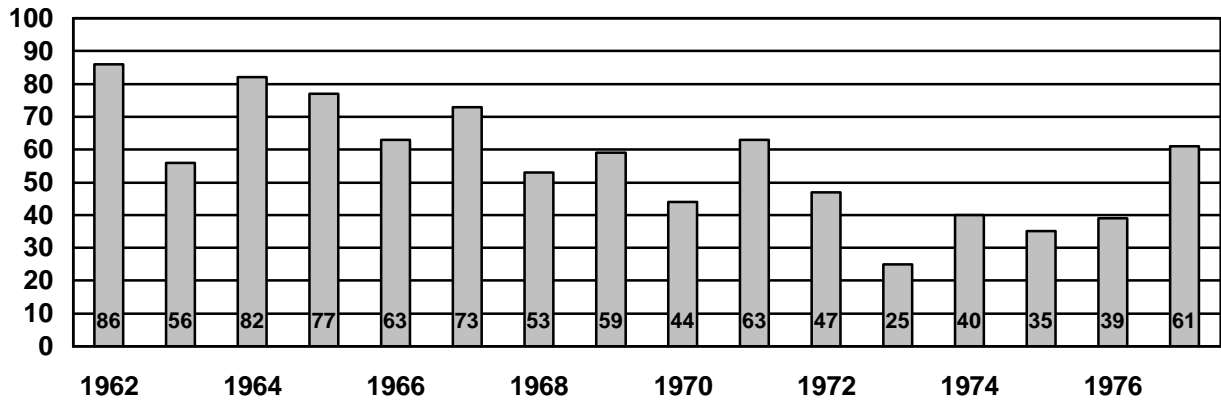


Abbildung 8: Gemeldete Botulismuskfälle in der BRD und West-Berlin, 1962 - 1977 (IWAND 1979)

Die in Abbildung 8 erfassten Zahlen stimmen mit den Angaben von GROßKLAUS (1977) überein. Das Zahlenmaterial von BERNDT (1978) und SZEGEDI (1988) differiert vereinzelt. Für die Jahre 1974, 1975 und 1976 geben sie 76, 72 bzw. 77 und 38 Erkrankungsfälle an. SINELL und KOLB (1981) sprechen von durchschnittlich 43 Botulismuskfällen jährlich für den Zeitraum von 1968 bis 1978. SCHULZE und FUNKE (1981) schätzen die Mortalitätsrate auf ca. 10%.

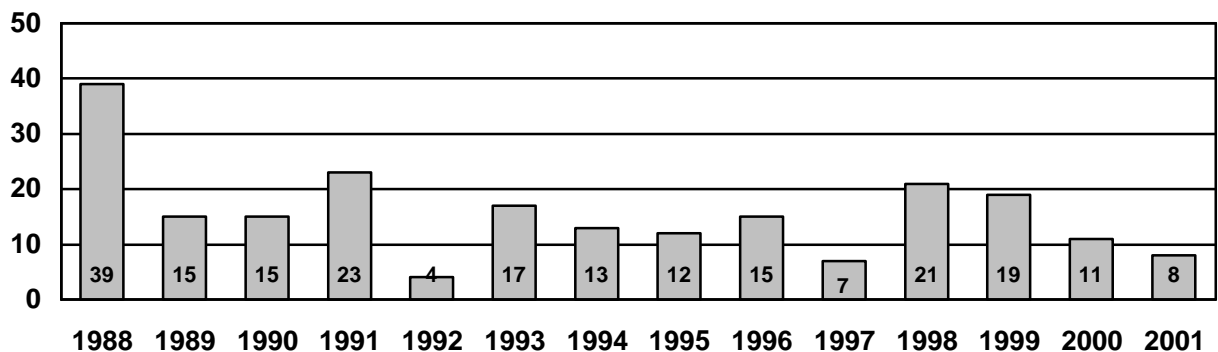


Abbildung 9: Gemeldete Botulismuskfälle in der BRD, 1988 - 2001 (THERRE 1999; BLATZ 1999; ANONYM 2000; NEUFELD u. BELIHART-NEUFELD 2004b; ANONYM 2006a; ANONYM 2006b)

Insgesamt gehen BÖHNEL et al. (2001a) von ca. 10 bis 20 Botulismuskfällen pro Jahr in Deutschland aus, was mit den Zahlenangaben in Abbildung 9 weitestgehend übereinstimmt.. Im Freistaat Sachsen traten 1999 und 2000 je zwei Botulismuserkrankungen auf (GRIZAN 2002).

In den USA werden durch die Centers for Disease Control regelmäßig Statistiken über durch Lebensmittel entstandene gesundheitliche Schäden geführt.

Die durchschnittliche Anzahl an Botulismusausbrüchen pro Jahr wird mit 15 bis 16 angegeben (RAY 2001). MCCLURE et al. (1994) geben für den Zeitraum von 1971 bis 1989 durchschnittlich 14 Ausbrüche mit 31 Erkrankungsfällen an. In den Jahren von 1973 bis 1987 gab es insgesamt 231 Ausbrüche mit 494 Einzelerkrankungen (BEAN u. GRIFFIN 1990). Genaue Fallzahlen für die einzelnen Bundesstaaten von 1978 bis 1984 sind in Tabelle A12 nachzulesen.

Damit ist *C. botulinum* für 8% aller lebensmittelbedingten Erkrankungen verantwortlich. Auch wenn diese Erkrankung eher selten auftritt, so ist Botulismus doch für einen hohen Anteil der Todesfälle, die durch Lebensmittelvergiftungen hervorgerufen werden, verantwortlich. So kommen auf 1000 Erkrankungsfälle 192 Todesfälle (BEAN u. GRIFFIN 1990). Nur *Listeria monocytogenes*-Infektionen haben ein höheres Verhältnis von Erkrankungs- zu Todesfällen (BEAN u. GRIFFIN 1990).

BEAN et al. (1997) veröffentlichten Zahlen für die Jahre 1988 bis 1992, worauf die Angaben in Tabelle A27 zurückzuführen sind. Es ist auffällig, dass der Prozentsatz der durch *C. botulinum* verursachten Erkrankungen gering ist im Vergleich zu den durch diesen Erreger verursachten Todesfällen. Mögliche Ursache ist eine zunächst falsche Diagnose, was rechtzeitige therapeutische Maßnahmen verhindert (BEAN u. GRIFFIN 1990).

Von 1971 bis 1989 traten in Kanada pro Jahr durchschnittlich vier Ausbrüche mit 11 Erkrankungen auf (MCCLURE et al. 1994), was durch die Angaben von TODD (1992) (Tabelle A26) bestätigt wird. Für den Zeitraum von 1975 bis 1984 benennt er 56 Todesfälle, wodurch acht (=14,2%) durch *C. botulinum* verursacht wurden.

In Schweden traten von 1992 bis 1997 drei Botulismusfälle mit fünf Einzelerkrankungen auf, wovon ein Patient verstarb (LINDQVIST et al. 2000). Dieser war der einzige lebensmittelbedingte Todesfall während der gesamten Studie.

Auffällig ist dabei, dass die Todesrate in Deutschland mit 10% (SCHULZE u. FUNKE 1981) deutlich niedriger ist als auf dem amerikanischen Kontinent, wo 15% bis 20% angegeben werden (BEAN u. GRIFFIN 1990; TODD 1992). Als ursächlich kann die lokale Dominanz der Typen A (Amerika) bzw. B (Europa) vermutet werden (Kapitel 3.1). Die von LINDQVIST et al. (2000) festgestellte Mortalitätsrate von 20% in Schweden spricht zwar gegen diese These, jedoch müssen diese Angaben aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes nicht repräsentativ sein. An dieser Stelle wird ersichtlich, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Epidemiologie und die daraus resultierenden Folgen realistisch einschätzen zu können.

4 BEEINFLUSSUNG VON SPORE, VEGETATIVER ZELLE UND BoNT

Es wäre falsch, einheitliche Angaben über die Vermehrungs- und Toxinbildungsbedingungen von *C. botulinum* zu machen, da die Wachstumsbedingungen je nach Typ variieren (NICOLET 1985; JENSEN et al. 1987), Tabelle A28 verdeutlicht dies beispielhaft. Aber auch verschiedene Stämme, die das Toxin des gleichen Typs bilden, können sich bei konstanten Umweltbedingungen verschieden stark vermehren und BoNT bilden (PATEL et al. 1978).

Die Fähigkeit zur Vermehrung und Toxinbildung unter bestimmten Bedingungen ist zeitabhängig. Je ungünstiger die Einflüsse für *C. botulinum* sind, desto länger dauert es, bis Wachstum oder BoNT nachgewiesen werden können (Tabelle A29). Für den Verbraucher bedeutet dies, dass bei fehlerhafter Behandlung der Lebensmittel das Intoxikationsrisiko mit zunehmender Lagerungsdauer zunimmt.

Dabei kann ein einzelner Faktor nicht losgelöst von anderen Bedingungen betrachtet werden, da es zu Interaktionen zwischen den verschiedenen Umweltbedingungen kommt (Tabellen A30, A31, A32, A33, A34).

Im Folgenden wird der Übersichtlichkeit wegen die Wirkung jedes Faktors auf Spore, vegetative Zelle und BoNT getrennt dargestellt. In der Praxis ist diese Aufteilung jedoch nicht immer exakt möglich, da im Rahmen von Versuchen zumeist Sporen inokuliert werden und die Wirkung des Faktors anhand der eintretenden Toxinsynthese bewertet wird. Aufgrund dessen wird bei dieser Vorgehensweise nicht nur die Fähigkeit des Wachstums vegetativer Zellen und der Toxinsynthese, sondern auch ein vorheriges Auskeimen der Sporen untersucht.

4.1 Physikalische Faktoren

4.1.1 Temperatur

Um das Wachstum und somit die Gefahr einer Toxinbildung in Lebensmitteln zu unterbinden, werden sowohl niedrige als auch hohe Temperaturen eingesetzt.

Im Rahmen der industriellen Lebensmittelbearbeitung werden die Sporen und das Toxin primär durch hohe Temperaturen abgetötet bzw. zerstört und das Wachstum sowie die Toxinbildung vegetativer Zellen zumeist durch niedrige Temperaturen gehemmt.

Dem zufolge konzentriert sich ein Großteil der in der Literatur zu findenden Untersuchungen auf die Hitzeempfindlichkeit der Sporen (Kapitel 4.1.1.1.1) und des BoNT (Kapitel 4.1.1.1.3) sowie die Fähigkeit vegetativer Zellen, sich bei niedrigen Temperaturen zu vermehren und Toxin zu bilden (Kapitel 4.1.1.2.2 bis 4.1.1.2.4).

Die Temperaturanforderungen für die Keimung von *C. botulinum*-Sporen sind weniger restriktiv als die für das Wachstum und die Toxinbildung vegetativer Zellen. So wiesen GRECZ und ARVAY (1982) in einem Temperaturbereich von 2°C bis 50°C das Auskeimen von *C. botulinum*-Typ E-Sporen nach, wogegen eine Vermehrung vegetativer Zellen nur bei 6°C bis 41°C stattfand.

Bei der Festlegung des optimalen Temperaturbereiches variieren die Angaben. GRECZ und ARVAY (1982) fanden optimale Bedingungen für das Auskeimen der Sporen bei 9°C, während andere Studien diese im Bereich von 30°C bis 37°C sehen (STRASDINE 1967; VARY u. HALVORSON 1968; ROWLEY u. FEEHERRY 1970). Eine möglich Ursache für diese Differenzen könnte die bei GRECZ und ARVAY (1982) nicht vorgenommene Hitzeaktivierung der Sporen sein.

Die Temperatur ist die Variable mit der stärksten Wirkung auf das Wachstum von vegetativen Mikroorganismen im Allgemeinen und *C. botulinum* im Speziellen (JENSEN et al. 1987; BAKER u. GENIGEORGIS 1990). Tabelle A35 veranschaulicht, wie stark die Inkubationstemperatur die Teilungsrate beeinflusst.

Über den Bereich des optimalen Wachstums variieren die Angaben (Tabelle 11).

Tabelle 11: Literaturangaben über den optimalen Temperaturbereich für das Wachstum von *C. botulinum*

<i>C. botulinum</i>	Optimaler Temperaturbereich (°C)	Literaturquelle
Gruppe I	35 – 40	ROBERTS et al. (1996) und FRANCIOSA et al. (2003)
	35 - 37	SOFOS (1992)
	35	RAY (2001)
	30 - 40	GRITZAI PARKINSON und ITO (2002)
Typ A	40	GRECZ und ARVAY (1982)
Gruppe II	30 - 35	KRÄMER (2002)
	30 - 35	SOFOS (1992)
	30	RAY (2001)
	28 - 30	ROBERTS et al. (1996)
	27 - 37	GRITZAI PARKINSON und ITO (2002)
	25 - 28	GRAHAM et al. (1996b)
	18 - 25	FRANCIOSA et al. (2003)
Typ B	37	JENSEN et al. (1987)
Typ E	35	OHYE und SCOTT (1957)
	32,5	GRECZ und ARVAY (1982)
	30	AJMAL (1968a) und DEHOF et al. (1989)
	25 - 37	CATO et al. (1986, zitiert bei HYYTIÄ-TREES (1999))
	23 - 25	WENZEL et al. (1971)
Gruppe III	40 - 42	SOFOS (1992)
	40	FRANCIOSA et al. (2003)
	30 - 37	GRITZAI PARKINSON und ITO (2002)
Gruppe IV	37	FRANCIOSA et al. (2003)
	30 - 37	GRITZAI PARKINSON und ITO (2002)

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich besonders auf Untersuchungen zu den Vertretern der Gruppen I und II, was auch die Schwerpunkte der in der Literatur nachzuvollziehenden Forschungsergebnisse widerspiegelt. Als ursächlich für diese Wichtung wird die Humanpathogenität dieser *C. botulinum*-Typen vermutet.

4.1.1.1 Wärme

Ziel einer Erhitzung von Lebensmitteln ist prinzipiell die Zerstörung pathogener (Verderbnis-) Keime bzw. im Speziellen die Zerstörung von *C. botulinum*-Sporen.

4.1.1.1.1 Einfluss auf die Spore

Vorangestellt werden soll die Beobachtung von DICKSON (1928), dass eine Erwärmung der Sporen auf subletale Temperaturen dazu führt, dass erst nach besonders langen Inkubationszeiten ein Auskeimen beobachtet werden kann - in den genannten Untersuchungen war dies erst nach 71 Monaten der Fall. Die Bedeutung dieser Beobachtung liegt in der Möglichkeit falsch-negativer Ergebnisse bei Untersuchungen auf das Vorhandensein auskeimungsfähiger Sporen.

Prinzipiell muss zwischen zwei Untersuchungszielen unterschieden werden:

- 1) Temperaturen, die von *C. botulinum*-Sporen überdauert werden
- 2) Temperaturen, für die eine Zerstörung der Sporen belegt ist

Für *C. botulinum*-Sporen subletale Temperaturen

Mehrere Untersuchungen belegen, dass die proteolytischen Typen A, B und F deutlich hitzetoleranter sind als die saccharolytischen Typen B, E und F (LYNT et al. 1977,1979,1982; SOLOMON et al. 1977). Dies stimmt mit den Angaben in den Tabellen 12 und A36 überein.

Unabhängig von dieser Einteilung belegen verschiedene Untersuchungen Differenzen sowohl zwischen verschiedenen Typen einer Gruppe (SCOTT u. BERNARD 1982; EKLUND et al. 1988a; PECK et al. 1993) als auch zwischen verschiedenen Stämmen eines Typs (OHYE u. SCOTT 1957). So sind saccharolytische Typ B-Sporen 30 mal hitzeresistenter als Typ E-Sporen, obwohl beide der Gruppe II angehören (SOFOS 1992).

Weiterhin beeinflusst die chemische Beschaffenheit der Spore deren Hitzeresistenz. Die Untersuchungen von ALDERTON et al. (1980) belegen, dass die D-Werte von Sporen, die verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen wurden, variieren.

In Tabelle 12 sind Zeit-Temperatur-Kombinationen zusammengefasst, für die nachgewiesen wurde, dass die getesteten *C. botulinum*-Sporen nicht inaktiviert wurden. Im Gegensatz dazu sind in der Tabelle 13 Untersuchungen zusammengefasst, die eine Inaktivierung der *C. botulinum*-Sporen belegen.

Tabelle 12: Nachgewiesene Hitzeresistenzen von *C. botulinum*-Sporen

<i>C. botulinum</i> -Typ	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Medium	Inokulum	Literaturquelle
B (sacch.)	80	30	2-Phasenmedium ¹	k.A.	SCOTT und BERNARD (1982)
	82,2	30	Maräne	k.A.	PACE et al. (1967)
	88,9	55	Krabbenfleisch	10 ⁶ / 30g Krabbenfleisch	PETERSON et al. (1997)
	90,6	55			
	92,2	35			
	94,4	15			
	90	30	PHGS	1,4x10 ⁸ /10ml	STRINGER und PECK (1997)
	73,9	155	Maräne	10 ⁶ /g	CRISLEY et al. (1968)
	85,0	8			
	80	10	Leberbouillon	k.A.	NAKAMURA et al. (1956)
	90	3			
	80	110	Hering	10 ⁵ /g	ABRAHAMSSON et al. (1966)
	90	10			
	82,2	30	Döbel, geräuchert	10 ⁶ /Fisch	CHRISTIANSEN et al. (1968)
	85	120	TPG	10 ⁷ /ml	GRAIKOSKI und KEMPE (1964)
	90	60			
	95	40	Kartoffeln, vakuumverpackt	10 ⁶ /kg	NOTERMANS et al. (1981)
F(sacch.)	70	180	physiol. Kochsalzlösung	10 ⁵ /ml	EKLUND et al. (1967b)
	80	30			
	90	2			

¹ Rinderherzbouillon

Bei dem Vergleich der Ergebnisse ist zu beachten, dass der Nachweis von vegetativen Zellen oder BoNT unter anderem von Inkubationstemperatur und –zeit beeinflusst wird, wie die Ergebnisse von ABRAHAMSSON et al. (1966) belegen.

Die Hitzetoleranz wird zum einen durch die Sporenkonzentration (DOZIER 1924a; PACE et al. 1972; AZIZI 2000) und zum anderen durch die Zusammensetzung des Mediums (UPADHYAY u. ANNASE 1969; MARGOSCH et al. 2004) stark beeinflusst, in dem die Sporen einer Wärmezufuhr ausgesetzt werden.

Dies wurde für den pH-Wert (ITO et al. 1970, zitiert bei SELL 1985), den a_w -Wert (MURRELL u. SCOTT 1966; ALDERTON et al. 1980), mehrere Desinfektionsmittel (BÄUMER 1956) und verschiedene andere Zusätze (SUGIYAMA 1951; MOLIN u. SNYGG 1967; BOWLES u. MILLER 1993a,b) belegt.

Auf die Beeinflussung der Hitzeresistenz durch die Zugabe von Lysozym wird im Kapitel 4.3.4 eingegangen. Die Untersuchungen von GOULD (2000) zeigen weiterhin, dass die Hitzeresistenz einer Spore größer ist, wenn der Versporungsprozess bei höheren Temperaturen stattfindet.

Folglich sind die Untersuchungsergebnisse auch nur bedingt miteinander vergleichbar.

Prinzipiell gilt, je höher die relative Luftfeuchtigkeit ist, desto mehr Sporen werden pro Zeiteinheit bei einer festgesetzten Temperatur abgetötet (PACE et al. 1967, zitiert bei SELL 1985). Praktische Anwendung findet dies bei der Herstellung von Räucherfischen. So konnte bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% und einer Erhitzung des Fisches auf 82,2°C für fünf Minuten eine Reduktion der keimfähigen *C. botulinum*-Typ E-Sporen um den Faktor 10^5 nachgewiesen werden (PACE et al. 1972).

In diesem Zusammenhang ist die Lokalisation der Sporen entscheidend. ALDERMAN et al. (1972) wiesen nach, dass Fische, die intramuskulär kontaminiert werden, nach dem Räucherprozess mehr lebensfähige Sporen beherbergen als oberflächlich inokulierte.

Da der zur Sporenreduktion benötigte Erhitzungsprozess auch von der Inokulumgröße abhängt, sollte sich der Räucherprozess unter anderem nach der Kontaminationsrate richten (PACE et al. 1972). Beim Vergleich mehrerer Fischräuchereien, die bei gleicher Temperatur mit feuchter Hitze arbeiteten, konnte eine deutlich geringere Kontaminationsrate in den bearbeiteten Fischen nachgewiesen werden (PACE u. KRUMBIEGEL 1973).

Die genannten Untersuchungen belegen das Risiko des Auskeimens von Sporen in zuvor erhitzten Lebensmitteln. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die für die Inaktivierung von *C. botulinum*-Sporen benötigte Temperatur industriell kaum eingesetzt wird, da sie zu organoleptischen Veränderungen und einer Reduktion des Nährstoffgehaltes führt (PETERSON et al. 2002). Die Gefahr dieser unzureichenden Erhitzung besteht in einer Zerstörung der Verderbnisflora (LERKE und FARBER 1971), folglich fehlen die Konkurrenzkeime für *C. botulinum* und mögliche organoleptische Veränderungen treten erst deutlich später, nach einer möglichen BoNT-Synthese, auf.

Andererseits kann bei wärmebehandelten Lebensmitteln zumindest von einer Schädigung der Sporen ausgegangen werden, was eine erhöhte Sensitivität z.B. gegenüber NaCl oder Nitrit zur Folge hat (ROBERTS u. HITCHINS 1969, zitiert bei PETERSON et al. 2002). Dies bedeutet, dass die Fähigkeit, unter grenzwertigen Bedingungen zu überleben und auszukeimen, reduziert ist. So beobachteten ABRAHAMSSON et al. (1966) ein zeitlich verzögertes Anwachsen nach einer Erhitzung auf 80°C für 110 Minuten.

Schon WILLIAMS (1936) gelang es, die Anpassungsfähigkeit von *Bacillus*- und *Clostridium*-Sporen aufzuzeigen. Nachdem ein Stamm mehrmals hintereinander erhitzt wurde, konnte eine höhere Hitzeresistenz infolge Adaption nachgewiesen werden.

Eine weitere, aus lebensmittelhygienischer Sicht nachteilige Folge deckten die Untersuchungen von GRAIKOSKI und KEMPE (1964) auf. Bei einer Erwärmung auf 70°C bzw. 75°C wurde zwar ein Großteil der Sporen inaktiviert, jedoch wurden nach 40 bis 60 Minuten zuvor ruhende Sporen aktiviert und keimten aus. Auch SEGNER et al. (1971a) beschreiben das Phänomen des „pre-heating“.

C. botulinum-Sporen zerstörende Temperaturen

Um die Hitzeresistenzen verschiedener Mikroorganismen vergleichbar zu machen, wurde der D-Wert eingeführt. Er ist ein Maß dafür, wie viel Zeit bei einer bestimmten Temperatur benötigt wird, um 90% der Population abzutöten. Die für die Reduktion des D-Wertes auf 1/10 benötigte Temperatursteigerung wird als z-Wert bezeichnet.

Die Tabelle 13 gibt einen Überblick über in der Literatur zu findende D- und z-Werte für *C. botulinum*-Sporen in verschiedenen Medien.

Tabelle 13: D- und z-Werte von *C. botulinum*-Sporen

<i>C. botulinum</i> -Typ	Temperatur (°C)	D-Wert (Min) /z-Wert (°C)	Medium	Inokulumgröße	Literaturquelle
A	95	12 - 38	Phosphatpuffer 0,05M	10 ⁶ /20ml	NOTERMANS et al. (1981)
	115,5	0,30 – 0,77	Phosphatpuffer 0,03M	10 ⁸ /2ml	TSUJI und PERKINS (1962)
B (prot.)	82,2	483-868	2-Phasenmedium ¹	k.A.	SCOTT und BERNARD (1982)
	95	23	Phosphatpuffer 0,05M	10 ⁶ /20ml	NOTERMANS et al. (1981)
	100	26,3	Leberwurst	k.A.	LÜCKE (1983)
		7,7	Brühwurst		
120	7,2	Gestampfte Möhren	10 ⁶ -10 ⁸ /ml	MARGOSCH et al. (2004)	
B (sacch.)	75	42,1 / 8,47-10,08	Putenfleisch, püriert	10 ⁷ /ml	JUNEJA und EBLEN (1995)
	80	17,1			
	85	7,8			
	90	1,1			
	75	19,39 / 9,76	Möhrenbrei	k.A.	GAZE und BROWN (1990, zitiert bei BETTS und GAZE 1995)
	80	4,24			
	85	1,57			
	90	0,43			
	82,2	1,49 – 32,3	2-Phasenmedium ¹	k.A.	SCOTT und BERNARD (1982)
	88,9	12,9	Krabbenfleisch	10 ⁶ /30g	PETERSON et al. (1997)
	94,4	2,9			
	85	100	Phosphatpuffer 0,067M ²	k.A.	PECK et al. (1993)
	90	18,7			
	95	4,4			

Fortsetzung der Tabelle 13

C	93	2,32; 3,02	Phosphatpuffer 0,067M	10 ⁶ /Gefäß	SEGNER und SCHMIDT (1971)
	96	0,91 – 2,62			
	101	0,07 – 2,44			
	104	0,02 – 0,90			
	107	0,12; 0,28			
	110	0,12			
C & D	104	0,02 – 0,9 / 9,5 – 11,5	k.A.	k.A.	GRITZAI PARKINSON und ITO (2002)
E	50	7943	Austernhomogenat	1,5x10 ⁵ /ml	BUCKNAVAGE et al. (1990)
	55	1259			
	60	776			
	70	72			
	80	0,78			
	70	29,3 – 37,5	k.A.	k.A.	ITO et al. (1970, zitiert bei SELL (1985))
	75	5,1 – 8,2	k.A.	k.A.	
	80	1,4 – 1,8	k.A.	k.A.	
	73,9	2,0-8,96	Austernhomogenat	10 ⁵ – 10 ⁷ /ml	CHAI und LIANG (1992)
	75,0	1,28-5,28			
	76,7	0,73-2,69			
	79,4	0,25-1,03			
	82,2	0,07-0,43			

Fortsetzung der Tabelle 13

E	75	255 / 10,4	Forelle	$10^6/5\text{ml}$	LINDSTRÖM et al. (2003)
	85	98			
	93	4,2			
	73,9	8,66	Menhaden Surimi	$10^7/\text{ml}$	RHODEHAMEL et al. (1991)
	76,7	3,49			
	79,4	2,15			
	82,2	1,22			
	76,7	5 / 11	Krabbenfleisch	$10^5-10^6/\text{g}$	LYNT et al. (1977)
	80	0,3 – 3,0	k.A.	k.A.	BAUMGART (1975, zitiert bei DEHOF (1994))
	81	55 / 10,1	Maräne	$10^6/5\text{ml}$	LINDSTRÖM et al. (2003)
	90	7,1			
	82,0	0,1 – 3,0 / 5,0 - 8,9	k.A.	k.A.	EISNER (1979)
		0,33	2-Phasenmedium ¹	k.A.	SCOTT und BERNARD (1982)
		0,2	Venusmuschel	k.A.	LICCIARDELLO (1983)
	F	76,7	4,29	Phosphatpuffer (0,067M)	$10^5 - 10^6/\text{ml}$
79,4		0,93			
82,2		0,33			
110		1,45 – 1,82 / 11,1 – 11,9	Phosphatpuffer (0,067M)	k.A.	LYNT et al. (1982)
G	110	0,5 / 20	k.A.	k.A.	GRITZAI PARKINSON und ITO (2002)

¹ Rinderherzbouillon

² Zugabe von Lysozym (10µg/ml)

In den Experimenten von TANNER und MCCREA (1923) wurden die Typ A- und Typ B-Sporen nach 300 Minuten bei 100°C, nach 120 Minuten bei 105°C, nach 90 Minuten bei 110°C, nach 40 Minuten bei 115°C und nach 10 Minuten bei 120°C zerstört.

Bei einer Konzentration von 5×10^6 Typ E-Sporen/ml war eine Erhitzung von sechs Minuten auf 80°C bzw. zwei Minuten auf 100°C für das Abtöten der Sporen nötig (GUNNISON et al. 1937). Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 5×10^7 /ml war dafür eine Dauer von 40 bzw. fünf Minuten nötig.

Bei einer Temperatur von 85°C für 60 Minuten wiesen PECK et al. (1995) eine Reduktion der lebensfähigen nicht-proteolytischen Sporen um $10^{1,9}$ bis 10^5 nach.

Beim Vergleich der Ergebnisse fällt auf, dass die nachgewiesenen Temperaturangaben stark variieren. Dies kann auf die unterschiedlichen Versuchsaufbauten (Sporentyp, Medium, Beobachtungsdauer nach Hitzeeinwirkung etc.) zurückgeführt werden.

Weitere Angaben können bei WALLHÄUßER und SCHMIDT (1967), BELL und KYRIAKIDES (2000) sowie JOHNSON (2000) nachgelesen werden.

Nitrit beeinflusst die Hitzeresistenz der Sporen nur in sehr hohen Konzentrationen. Während bei industriell verwendeten Dosierungen (150-300 ppm) keine Veränderungen beobachtet werden konnten, wurden mehr Sporen hitzeinaktiviert, wenn eine zwei- bis achtmal so hohe Konzentration verwendet wurde (PIVNICK et al. 1970).

Um die Sterilität von Vollkonserven, deren pH-Werte über 4,5 liegen, zu gewährleisten, wurde das 12-D-Konzept, Syn. „botulinum cook“, formuliert. Dabei wird davon ausgegangen, dass *C. botulinum*-Sporen eine der hitzeresistentesten pathogenen Keime sind und deren entsprechende quantitative Minimierung einen ausreichenden lebensmittelhygienischen Schutz gewährleistet. Das Ziel ist eine Reduktion der auskeimungsfähigen Sporen um den Faktor 10^{12} . Bei 121°C beträgt der D-Wert 0,2 Minuten. Demnach ergibt sich aus dem 12-D-Konzept ($12 \times 0,2$) die Mindesthaltezeit von 2,4 Minuten bei 121°C. Nachteilig ist jedoch die Reduktion der Schmackhaftigkeit und des Nährwertes einer Vielzahl der behandelten Lebensmittel.

4.1.1.1.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

BELL und KYRIAKIDES (2000) geben die maximalen Temperaturen, bei denen Wachstum möglich ist, mit 48°C bzw. 45°C für die Typen der Gruppe I bzw. II an.

Während PIERSON et al. (1974) bei 40°C noch Wachstum nachweisen konnten, stellten sie bei 40,5°C einen Rückgang der Zellzahl nach drei Stunden fest. Bei einer Temperatur von 42°C sank die Zellzahl innerhalb von sieben Stunden von 10^6 auf 10^3 pro ml.

OHYE und SCOTT (1953) konnten Wachstum von *C. botulinum*-Typ A und B bei 45°C nachweisen (wenn auch mit verlängerter Latenzphase), wenn das Wachstum bei niedrigeren Temperaturen initiiert wurde.

GRAHAM und LUND (1993) beobachteten bei 45°C kein Wachstum von nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Typ B-Zellen.

BONVENTRE und KEMPE (1959b) konnten sogar bei 48°C Wachstum von *C. botulinum*-Typ A nachweisen.

Ob Wachstum nachgewiesen werden kann, hängt auch davon ab, welche Art von Ausgangsmaterial verwendet wird. So konnten OHYE und SCOTT (1957) bei der Verwendung von Sporeninokula nur vereinzelt Wachstum bei 40°C nachweisen.

Wurden dagegen vegetative Zellen inokuliert, konnte regelmäßig Wachstum nachgewiesen werden. Auch bei 42,5°C wurde Wachstum vegetativer Zellen vereinzelt festgestellt. Bei 45°C wurde deutlich, dass weiterhin das verwendete Medium entscheidend ist. Während im NYG-Medium kein Wachstum festgestellt werden konnte, war dies im CMM-Medium möglich.

4.1.1.1.3 Einfluss auf das Botulinumtoxin

Die Thermolabilität des BoNT wurde schon durch VAN ERMINGEN (1897) nachgewiesen. Die zumeist biphasige Zerstörung führen CARTWRIGHT und LAUFFER (1958), LAMANNA (1959) sowie LICCIARDELLO et al. (1967) auf die variierende Thermostabilität vorhandener Toxinorstufen und Unterschiede in der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen (um so mehr Bindungen vorhanden sind, desto mehr Wärmezufuhr ist für eine Toxininaktivierung notwendig) zurück.

In Tabelle 14 sind einige Untersuchungsergebnisse zur thermischen Inaktivierung von BoNT zusammengefasst.

Tabelle 14: Empfohlene Zeit-Temperatur-Kombinationen zur Inaktivierung von BoNT

Temperatur (°C)	Wirkungszeit (min)	Weitere Angaben	Literaturquelle
58	5	Typ E in Phosphatpuffer	ABRAHAMSSON et al. (1966)
62	10	Typ E in Phosphatpufferlösung mit 0,2% Gelatine	
60	5	Typ E, bei pH 3,5 und 7,5	OHYE und SCOTT (1957)
70 - 80	bis zu 20	10 ⁴ - 10 ⁵ LD ₅₀ /g Lebensmittel vollständig zerstört	LUND (1990)
85	5		
80	10	k.A.	PIERSON und REDDY (1988)
80	6	k.A.	LEVETZOW (1979)
80	30	Typ B	KLEY (1962)
80	< 5	Typ C zu 99% inaktiviert	HUBÁLEK und HALOUZKA (1988)
79	20	10 ⁵ LD ₅₀ /g Lebensmittel vollständig zerstört, Typ A, B, E und F	WOODBURN et al. (1979)
85	5		

Die Temperaturempfindlichkeit variiert je nach den vorliegenden Umweltbedingungen (SCHOENHOLZ u. MEYER 1924; ABRAHAMSSON et al. 1966; HYYTIÄ-TREES 1999). So geben mehrere Autoren die maximale Thermoresistenz für BoNT in einem pH-Wert-Bereich von 4-5 (OHYE u. SCOTT 1957; WOODBURN et al. 1979) an; LICCIARDELLO et al. (1967) weisen den pH-Wert der größten Thermoresistenz mit 4,5 aus.

An dieser Stelle soll auf eine mögliche Fehlerquelle hingewiesen werden, die auf die Thermolabilität des Toxins zurückzuführen ist. Die Untersuchungen von PEDERSEN (1955) belegen, dass der maximale Toxintiter um so schneller wieder abfällt, je höher die Inkubationstemperatur ist. Dies liegt daran, dass das synthetisierte BoNT aufgrund der Wärmeinwirkung wieder zerstört wird, was im Extremfall zu falsch-negativen Ergebnissen

führen kann (BAIRD-PARKER 1971). Dies ist auch möglich, wenn nicht das Toxin selbst, sondern nur dessen Aktivator denaturiert wird (SAKAGUCHI u. TOHYAMA 1955b). Derartige Proben können durch Kontakt mit aktivierenden Substanzen ihre Toxizität entfalten.

Von dem BoNT der vegetativen Zelle muss bezüglich der Thermoempfindlichkeit das BoNT, welches sich an Sporen befindet, abgegrenzt werden. Die Untersuchungen von GRECZ et al. (1967) belegen, dass das in der Spore befindliche Toxin eine Erhitzung auf 80°C für 10 Minuten unbeschadet übersteht, während ins Medium freigesetztes BoNT bei dieser Behandlung inaktiviert wird. Das hitzeresistente Toxin wurde immer dann zerstört, wenn sporentötende Temperaturen erreicht wurden.

4.1.1.2 Kälte

Das Ziel einer Temperaturabsenkung ist die Hemmung der Vermehrung vegetativer Zellen und die Unterbindung der BoNT-Synthese. Da zumeist die Typen A, B, E und F bzw. die durch sie gebildeten Toxine für Erkrankungen bei Menschen verantwortlich sind, wird im Folgenden primär auf die Vertreter der Gruppen I und II eingegangen.

Wie Tabelle A37 veranschaulicht, liegen die minimalen Wachstums- und Toxinbildungstemperaturen in Lebensmitteln höher als in flüssigen Nährmedien (KRÄMER 2002). Ursächlich hierfür ist, dass das Wachstum und die Toxinbildung in grenzwertigen Bereichen nur dann möglich sind, wenn sich alle anderen Umweltfaktoren im optimalen Bereich befinden (HOBBS 1977; SIMUNOVIC et al. 1985).

Allgemein gilt, dass mit steigender Inkubationstemperatur die Zeitspanne, nach der Toxin festgestellt werden kann, kürzer wird (READ et al. 1970; Tabelle A38).

4.1.1.2.1 Einfluss auf die Spore

Wie zuvor schon erwähnt, liegt die niedrigste Temperatur bei 2,0°C, bei der GRECZ und ARVAY (1982) ein Auskeimen (durch Veränderung der Helligkeit im Phasenkontrastmikroskop) nachweisen konnten. OHYE und SCOTT (1957) gelang kein Wachstumsnachweis vegetativer Zellen aus einem Sporeninokulum bei 2,5°C.

Dies belegt, dass ein Auskeimen von Sporen bei niedrigen Temperaturen möglich ist, auch wenn ein anschließendes vegetatives Wachstum gehemmt wird. Auch SMELT und HAAS (1978) registrierten in ihren Versuchen zwar eine Reduzierung der proteolytischen Sporen, jedoch gelang weder ein Wachstums- noch ein Toxinnachweis.

In einem mit proteolytischen Sporen versetzten, vakuumverpackten Nudelgericht konnten SIMPSON et al. (1995) nach 14-tägiger Lagerung bei 15°C BoNT nachweisen. Durch die Verwendung größerer Inokulumengen und höherer Temperaturen als unter Kühlbedingungen, zeichneten die Autoren nach eigenen Angaben ein „worst case scenario“, welches unter handelsüblichen Bedingungen nicht zu erwarten ist.

Wenn 2×10^6 Sporen pro Röhrchen inokuliert wurden, gelang es auch EKLUND et al. (1967a) Toxin nachzuweisen. Bei gleicher Sporenanzahl und einer Inkubation bei 4,4°C war Toxin nach 27 Tagen und bei 5,6°C nach 18 Tagen nachweisbar. Mit zunehmender Inkubationszeit wurden höhere Toxintiter gemessen.

SOLOMON et al. (1977) verimpften wärmebehandelte Typ E-Sporen. Im Labormedium konnte sowohl bei 4°C als auch bei 8°C nach 30 Tagen BoNT nachgewiesen werden.

In verschiedenen Lebensmitteln, die mit nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Sporen inokuliert und bei niedrigen Temperaturen gelagert wurden, konnte BoNT nachgewiesen werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: BoNT-Nachweise in Lebensmitteln, die bei Kühltemperaturen gelagert wurden

BoNT-Typ	Lebensmittel	Lagerungs-temperatur	Tage bis zum Toxinnachweis	Literaturquelle
E	vakuumverpackter Schellfisch	3,3°C	k.A.	HOBBS (1977)
E	luftdichtverpacktes Krabbenfleisch	4,4°C	40	LERKE und FARBER (1971)
E	geräucherte Forellen	5°C	21	BACH et al. (1971)
E	vakuumverpackte Forellen	5°C	49	HUSSAIN et al. (1977)
E	gekochtes Geflügelfleisch	8°C	14	GENIGEORGIS et al. (1991)
E	geräucherte Fische	10°C	5	KAUTTER (1964)
E	vakuumverpackte Forellen	10°C	6	GARREN et al. (1995)
E	gekochte Kartoffeln, vakuumverpackt	10°C	9	NOTERMANS et al. (1981)
E	Krabbenfleisch	12°C	14	SOLOMON et al. (1977)
B & E	Nüsse	5°C	21	AUSTIN et al. (1998)
B, E & F	geräucherte Fischproben (zerkleinert)	10°C	10	CANN und TAYLOR (1979)

Weitere tabellarische Zusammenfassungen geben SIMUNOVIC et al. (1985), BETTS und GAZE (1995) sowie PECK (1997).

Die Fähigkeit der Sporen, bei niedrigen Temperaturen auszukeimen, wird unter anderem von der Art des Inokulums beeinflusst. ABRAHAMSSON et al. (1966) gelang es, bei einer Inkubationstemperatur von 3°C innerhalb von drei Monaten Toxin nachzuweisen, wenn die Probe mit einem Gemisch aus Sporen und vegetativen Zellen versetzt wurde. Bei alleiniger Verwendung von Sporen konnte dieses Ergebnis nicht nachvollzogen werden.

4.1.1.2 Einfluss auf die vegetativen Zellen der Gruppe I (Typ A sowie proteolytische Stämme der Typen B und F)

Die Mindesttemperatur für das Wachstum wird mit 10°C angegeben (SCHMIDT 1964, zitiert bei SMELT u. HAAS 1978; LUND 1990; DAY 2000).

Während bei Temperaturen von 4 – 10°C kein Wachstum durch *C. botulinum*-Typ A festgestellt werden konnte, war dies bei Temperaturen >10°C möglich (BONVENTRE u. KEMPE 1959b).

Auch TANNER und OGLESBY (1941) konnten Wachstum für *C. botulinum*-Typ A bei 10°C nach 99 Tagen, nicht jedoch bei 5°C nachweisen. Analog waren die Ergebnisse für verschiedene Stämme des Typ B.

OHYE und SCOTT (1953) konnten für die Typen A und B Wachstum bei 12,5°C nur dann nachweisen, wenn die Sporen vorher bei 20°C auskeimten. Bei einer Inkubationstemperatur von 15°C konnte sowohl das Auskeimen der Sporen als auch das Wachstum vegetativer Zellen beobachtet werden.

Wachstum der Typen B und F konnten SOLOMON et al. (1977) nach 60 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 12°C im Labormedium nachweisen. Im Krebsfleisch dagegen gelang dies nur bei einer Inkubationstemperatur von 26°C.

SMELT und HAAS (1978) konnten bei 10°C kein Wachstum nachweisen. Dagegen konnte bei 12°C nach einer drei- bis neunwöchigen Latenzphase für einige der untersuchten Stämme Wachstum nachgewiesen werden. Die Latenzphase endete mit einem raschen Anstieg der Zellzahlen, parallel nahm die Anzahl der Sporen ab. Die proteolytische Aktivität der Kulturen schätzten die Autoren als gering ein. Mit ansteigender Temperatur verkürzte sich die Latenzphase.

Die benötigte Zeitspanne, um Wachstum bei einer von hundert Zellen zu initiieren, betrug bei 20°C zwei bis acht Tage und bei 16°C vier bis acht Tage. Lag die Inkubationstemperatur bei 12°C, konnte die Vermehrung einer einzelnen Zelle nicht beobachtet werden (JENSEN et al. 1987).

Neben dem direkten Wachstumsnachweis wird auch ein Toxinnachweis in mit Sporen inokulierten Proben als Maß für eine Stoffwechselaktivität vegetativer Zellen genutzt.

In Spinat- und Rindfleischproben, die mit Typ A-Sporen versetzt und bei 10°C gelagert wurden, konnten TANNER et al. (1940) nach vier Tagen BoNT feststellen. Dieser Nachweis gelang nicht in Lebensmitteln mit niedrigerem pH-Wert oder wenn die Proben bei 5°C inkubiert wurden.

Im Gegensatz dazu gelang es LERKE und FARBER (1971) weder in Krabben- noch in Garnelenfleisch, welches bei 10°C gelagert wurde, innerhalb von 75 Tagen eine Toxinsynthese nachzuweisen.

SMELT und HAAS (1978) konnten in Fleischbouillon, inkubiert bei 12°C, die Toxinbildung nachweisen. Sie erfolgte mehr oder weniger stark zeitlich versetzt zum Wachstum.

MALIZIO und JOHNSON (1991) untersuchten die Toxinbildung durch proteolytische Stämme in Pilzen. Im Rahmen dessen gelang ihnen ein Toxinnachweis nach dreiwöchiger Inkubation bei 6°C nicht. Erst ab einer Inkubationstemperatur von 14°C konnte nach einer 14-tägigen Lagerung BoNT festgestellt werden.

PETTRAN et al. (1995) gingen der Frage nach, unter welchen Bedingungen *C. botulinum* in verschiedenen Gemüsesorten BoNT bildet. Obwohl sie vermehrungsfähige Sporen bei 4,4°C und 12,7°C nachweisen konnten, verhinderten diese Temperaturen eine Toxinbildung. Bei einer Lagerungstemperatur von 21°C konnte nach 10 bzw. 17 Tagen BoNT nachgewiesen werden.

DEL TORRE et al. (1998) verbrachten proteolytische Stämme in verschiedene Pastasorten. Während es ihnen in einem künstlichen Medium, inkubiert bei 12°C, gelang, eine BoNT-Bildung nachzuweisen, war dies in den untersuchten Lebensmitteln nicht der Fall. Erst bei einer Inkubationstemperatur von 20°C gelang der Nachweis nach 30 Tagen. Ursache für diese Differenz sind vermutlich die niedrigeren pH- und a_w -Werte der verschiedenen Pastasorten im Vergleich zum künstlichen Medium. Belegt wird diese Vermutung dadurch, dass in der mit Artischocken gefüllten Pasta auch nach 50 Tagen kein Toxin nachgewiesen wurde – im Vergleich zu den anderen Sorten wurde hier ein deutlich niedrigerer pH-Wert gemessen.

4.1.1.2.3 Einfluss auf die vegetativen Zellen der Gruppe II (Typ E sowie saccharolytische Stämme der Typen B und F)

Als minimale Wachstumstemperatur wird ein Wert von 3,3°C angegeben (SCHMIDT et al. 1961; EKLUND et al. 1967a,b; SIMUNOVIC et al. 1985; O'CONNOR-SHAW u. REYES 2000).

SCHMIDT et al. (1962a) wiesen Wachstum in Form von Gasbildung durch *C. botulinum*-Typ E bei 6,1°C nach 16 Tagen und bei 9,4°C nach 5 Tagen nach. Dagegen wird das Wachstum von *C. botulinum*-Typ E bei einer Inkubationstemperatur von 10°C durch einen a_w -Wert von 0,990 gehemmt (HOBBS 1976).

Die Zeit, innerhalb welcher sich die Anzahl nicht-proteolytischer *C. botulinum*-Typ B-Zellen verdoppelt, beträgt bei 4, 5, 6, 8 bzw. 10°C 42, 29, 23, 9 bzw. 5,7 Stunden (GRAHAM u. LUND 1993).

Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C für 28 Tage konnte Wachstum nachgewiesen werden, wenn 1×10^3 bis $1,7 \times 10^5$ Sporen oder 1,7 bis $8,3 \times 10^4$ Zellen/ml Hirn-Herz-Bouillon verimpft wurden (JENSEN et al. 1987).

Anhand Tabelle A35 ist nachvollziehbar, dass sich die Latenzphase mit ansteigenden Temperaturwerten verkürzt, pro Zeiteinheit finden mehr Zellteilungen statt. Die Ergebnisse von EKLUND et al. (1967a), PATEL et al. (1978) sowie LINDROTH und GENIGEORGIS (1986) bestätigen diesen Zusammenhang.

In der Mehrzahl der Untersuchungen konnte kein Wachstum bei 3°C und weniger nachgewiesen werden (CASTELL 1947; SCHMIDT et al. 1961; EKLUND et al. 1967a,b; PATEL et al. 1978).

Dagegen gelang dies GRAHAM et al. (1997) bei 3,2°C nach fünf Wochen, bei 3,1°C nach sechs Wochen bzw. bei 2,9°C nach sieben Wochen. Eine mögliche Erklärung für die differierenden Ergebnisse ist, dass GRAHAM et al. (1997) Wachstum direkt nachwies, zuvor genannte Autoren dagegen die BoNT-Synthese als Indikator nutzten.

Dass es Unterschiede auch innerhalb dieser Gruppe gibt, belegen die Ergebnisse von GRAHAM et al. (1997). Sie beobachteten, dass die Stämme des Typ F häufiger als die der Typen E und B wuchsen. Damit bestätigen sie die Ergebnisse von JENSEN et al. (1987), dass die Wachstumswahrscheinlichkeit bei niedrigen Temperaturen aus Typ F-Sporen höher ist als aus Typ E- oder B-Sporen.

Im Anschluss folgen Untersuchungsergebnisse, die eine BoNT-Synthese belegen. Prinzipiell kann von einer Verzögerung der Toxinbildung infolge einer Temperaturabsenkung ausgegangen werden (GENIGEORGIS et al. 1991).

Alle Proben, die EKLUND et al. (1967a) bei 2,2°C inkubierten, waren nach 120 Tagen nicht toxisch.

ABRAHAMSSON et al. (1966) gelang es, bei einer Inkubationstemperatur von 3°C innerhalb von drei Monaten Toxin nachzuweisen, wenn die Probe mit einem Gemisch aus Sporen und vegetativen Zellen versetzt wurde. Bei alleiniger Verwendung von Sporen konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden.

GRAHAM et al. (1997) konnten eine Toxinsynthese bei 3°C feststellen, wobei BoNT-Typ F deutlich häufiger nachweisbar war. Selten konnte Toxin nachgewiesen werden ohne Anzeichen von Wachstum (z.B. in Form von Trübung).

SCHMIDT et al. (1961) konnten in allen Proben, die bei 3,3°C wachsende Zellen beinhalteten, BoNT nachweisen. In Proben, die bei niedrigeren Temperaturen inkubiert wurden, gelang dies nicht.

Abschließend soll die Bedeutung der adäquaten Kühlung von Lebensmitteln in Bezug auf die Unterbindung von Botulismus noch einmal hervorgehoben werden. Ziel ist es, ein Auskeimen der Sporen und anschließendes vegetatives Wachstum zu verhindern (PETERSON et al. 2002). Voraussetzung dafür ist eine Lagerungstemperatur < 3°C (NOTERMANS et al. 1990; BETTS u. GAZE 1995).

Dies gilt insbesondere für Produkte, die unter Reduktion des Luftsauerstoffgehaltes verpackt werden (AUSTIN et al. 1998). Da unter Praxisbedingungen eine entsprechende Kühlung nicht immer gewährleistet ist, schlagen BRYAN (1988) sowie BETTS (1996, zitiert bei BELL und KYRIAKIDES 2000) eine Unterteilung in zwei Gruppen vor: zum einen die Produktgruppe, die bei <3°C gelagert werden sollte und andererseits die Lebensmittel, die bei >3°C und <8°C angeboten werden können. Für letztere wird eine Haltbarkeit von mehr als 10 Tagen nur dann empfohlen, wenn zusätzliche Faktoren (a_w - oder pH-Wert) das Auskeimen, vegetatives Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* unterbinden.

4.1.1.2.4 Einfluss auf die vegetativen Zellen des Typ C

Je nach Stamm liegt die Mindesttemperatur für Wachstum von *C. botulinum*-Typ C bei 12,8°C bzw. 15,6°C (SEGNER et al. 1971b). Lagen die Temperaturen bei 10,0°C bzw. 12,8°C konnten für die Dauer des Versuches (250 Tage) keine Anzeichen auf Vermehrung der vegetativen Zellen gefunden werden, unabhängig davon, in welchem Medium die Sporen inokuliert wurden.

4.1.1.2.5 Einfluss auf das Botulinumtoxin

Da die praktische Bedeutung der Toxininaktivierung durch niedrige Temperaturen äußerst gering ist, finden sich in der internationalen Literatur nur wenige Angaben.

Die Beobachtungen von HUBÁLEK und HALOUZKA (1991) weisen daraufhin, dass das BoNT nicht besonders kälteempfindlich ist, da die Autoren ein „Überwintern“ in Larven nachweisen konnten. Damit bestätigen sie zuvor im Labor gemachte Untersuchungsergebnisse (HUBÁLEK u. HALOUZKA 1988; Tabelle A39).

BÖHNEL und LUBE (2000) stimmen damit überein – ihre Ergebnisse belegen, dass präformiertes Toxin über einen Zeitraum von vier Wochen bei einer Lagerungstemperatur von 6°C stabil bleibt. Wurde die toxinhaltige Probe bei -26°C gelagert, gelang der BoNT-Nachweis auch noch nach einem Jahr.

4.1.1.2.6 RePFED-Produkte

Vermeehrt werden frische, konservierungsmittelfreie Lebensmittel mit verlängerter Haltbarkeit von den Verbrauchern gewünscht. Im Zuge dessen nimmt die Bedeutung der RePFED-Produkte zu. Hierbei handelt es sich um wärmebehandelte Lebensmittel, die bei entsprechender Kühlung eine Haltbarkeit von vier bis sechs Wochen aufweisen (NOTERMANS et al. 1990).

Die Erwärmung erfolgt bei niedrigeren Temperaturen (65 – 95°C) für eine längere Zeit (PECK 1997). So bleiben die organoleptischen und sensorischen Eigenschaften des Lebensmittels gewahrt. Im Anschluss erfolgt eine schnelle Abkühlung, die Lagerungstemperaturen liegen bei 1-8°C.

Aufgrund der milden Temperaturerhöhung sind diese Lebensmittel nicht steril, die Mikroflora ist zum einen von der Stärke und Dauer der Erwärmung und zum anderen von der Lagerungstemperatur abhängig. Um das Wachstum aerober Keime zu unterdrücken, werden diese Produkte häufig unter Vakuum oder anaeroben Bedingungen verpackt – dies kann allerdings gleichzeitig das Wachstum anaerober Keime fördern (GRAHAM et al. 1996a).

Über die Ausgangsprodukte können Botulinus-Sporen in die Lebensmittel gelangen. So stellt Gemüse ein erhöhtes Risiko dar (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, UK 1992, zitiert bei CARLIN u. PECK 1996).

Zum Beispiel konnten NOTERMANS et al. (1990) die Toxinbildung bei einer Inkubationstemperatur von 8°C nach 12 Tagen nachweisen. Dies gelang allerdings nur bei der Verimpfung solch großer Sporenmengen, wie sie in Lebensmitteln nicht zu erwarten sind. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit eine Präinkubation bei 3°C die Toxinbildung beeinflusst. Während dies bei *C. botulinum*-Typ E keine Wirkung zeigte, konnte BoNT-Typ B mit zunehmender Dauer der Präinkubation eher festgestellt werden.

Wachstum bei 8°C konnten FERNANDEZ und PECK (1997) nach 50 Tagen nachweisen, wenn die Probe für 42 Stunden bei 70°C inkubiert wurde. Erfolgte eine Erwärmung auf 70°C nur für 105 Minuten, waren toxische Proben bei einer Inkubationstemperatur von 5°C nach 14 Tagen und bei 8°C nach neun Tagen nachweisbar.

Die Haltbarkeit wird von der Kühlung bestimmt. Lebensmittel, die bei 3 – 5°C gelagert werden, sollten maximal 10 Tage und bei <10°C höchstens vier bis fünf Tage gelagert werden. Beträgt die Haltbarkeit mehr als 10 Tage, sollten die Lebensmittel durch einen weiteren Faktor so beeinflusst werden, dass eine Toxinbildung durch *C. botulinum* unterbunden wird (HYTTIÄ-TREES 1999).

Die Untersuchungsergebnisse belegen, dass die BoNT-Produktion zum einen von der Erwärmungstemperatur und –dauer und zum anderen von der anschließenden Kühlung abhängig ist.

4.1.2 Bestrahlung

Obwohl mittlerweile mehrere Studien zeigen, dass bestrahlte Lebensmittel weder toxische Effekte erzielen noch genetische Defekte verursachen (THAYER et al. 1987; ELIAS 1992), sind viele Konsumenten zurückhaltend beim Kauf derart bearbeiteter Lebensmittel.

Die letalen Effekte einer Bestrahlung sind auf zwei verschiedene Pathomechanismen zurückzuführen (SMITH u. SUGIYAMA 1988). Zum einen die Veränderungen am Genom (z.B. irreparable Brüche) und andererseits indirekte Effekte durch entstehende Sauerstoffradikale (infolge Radiolyse des Wassers). Prinzipiell handelt es sich nicht um einen Alles-oder-Nichts-Effekt. Bei subletalen Bestrahlungsdosen werden die Sporen zunächst empfindlicher gegenüber anderen hemmenden Einflüssen. Beispielsweise reagieren bestrahlte Typ E-Sporen im Vergleich zu unbehandelten empfindlicher auf Polymyxin und Neomycin (ROWLEY et al. (1983b).

Vorangestellt werden sollen Ergebnisse von GRECZ et al. (1967), die belegen, dass eine Bestrahlung mit nachfolgender Erhitzung zwar dazu führt, dass Sporen nicht mehr auskeimen können, das in ihnen enthaltene BoNT jedoch nicht automatisch inaktiviert ist.

4.1.2.1 Einfluss auf die Spore

Je nach Stärke der Bestrahlung werden verschiedene Effekte in der Lebensmittelherstellung ausgenutzt (Tabelle A40). Während nach einer Bestrahlung mit 2,5 bis 5,0 kGy die Lebensmittel gekühlt werden sollten, um ein Auskeimen vorhandener Clostridium-Sporen zu unterbinden, ist dies bei Werten um 30 kGy nicht mehr nötig, da in diesem Bereich vorhandene *C. botulinum*-Sporen zerstört werden (RAY 2001). Auch VARNAM und EVANS (1991) bestätigen, dass eine Bestrahlung mit 3 bis 5 kGy vegetative Zellen abtötet, für die Zerstörung von Sporen dagegen solch hohe Dosen angewendet werden müssten, die mit organoleptischen Veränderungen einhergehen.

Aufgrund der hohen Strahlenresistenz von *C. botulinum*-Sporen ist deren Abtötung in Lebensmitteln schwierig, ohne die nutritiven und organoleptischen Eigenschaften zu beeinträchtigen. Zudem bringt das Pasteurisieren mittels Bestrahlung keine weiteren Vorteile gegenüber anderen Verfahren, da die Sicherheit der Lebensmittel nur durch zusätzliche Maßnahmen gewährleistet werden kann.

Prinzipiell weisen proteolytische Stämme höhere D-Werte als saccharolytische Vertreter (HOBBS 1977) auf. Letztendlich haben Typ E-Sporen nur etwa 50% der Strahlenresistenz wie Typ A-Sporen (SCHMIDT et al. 1962b). Differenzen wurden auch zwischen den Typen A und B nachgewiesen (KEMPE et al. 1954; WHEATON et al. 1961).

Infolge Bestrahlung von Typ E-Sporen in Natriumphosphatlösung wurde ein leichter Abfall der vitalen Dauerformen nach einer Bestrahlung mit 3 kGy beobachtet. Bei einer Strahlendosis >5 kGy kam es zu einer schnellen Sporeninaktivierung (LIM et al. 2003). Die für die Abtötung von clostridialen Sporen um den Faktor 10^6 benötigte Strahlendosis beträgt 10 bis 30 kGy (KRÄMER 2002).

In Tabelle 16 sind einige in der internationalen Literatur angegebene D-Werte zusammengefasst.

Tabelle 16: Nachgewiesene D-Werte für *C. botulinum*-Sporen

<i>C. botulinum</i> -Typ	D-Wert (kGy)	Medium	Literaturquelle
A	<1,61 – 12,77	Wasser bzw. Honig	HUHTANEN 1991b
A	1,00 – 1,30	Hirn-Leber-Herz-Bouillon	ANELLIS et al. (1972)
B	1,00 – 1,20		
B	3,4	Rinderhackfleisch	KEMPE und GRAIKOSKI (1962)
A	1,0 - 1,4	Wässrige Lösung	ROBERTS und INGRAM (1965b)
B	1,0 – 1,1		
C	1,40		
D	2,20		
E	0,8 – 1,6		
F	2,50		
E	1,20 – 2,20	Wässrige Lösung	ROBERTS und INGRAM 1965a
E	1,25 – 1,38	Rindfleischsuspension	SCHMIDT et al. 1962a

Weitere zusammengefasste D-Werte können bei SCHMIDT und NANK (1960), SCHMIDT (1963) sowie in Tabelle A41 nachgelesen werden. Der D-Wert wird unter anderem von der Bestrahlungstemperatur (GRECZ et al. 1965, 1971; Tabelle A42) und dem Lebensmittel bzw. Medium (SCHMIDT u. NANK 1960; WHEATON et al. 1961) beeinflusst.

4.1.2.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

Der Einfluss der Bestrahlung auf die Toxinproduktion von *C. botulinum* in verschiedenen Lebensmitteln wurde in mehreren Studien untersucht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Abhängigkeit der BoNT-Bildung von einer Bestrahlung der Lebensmittel

Lebensmittel	Lagerungs- temperatur	Bestrahlungs- dosis (kGy)	Tage bis BoNT pos.	Literaturquelle
Schellfisch- filet	5,6 °C	0	>55	EKLUND (1982)
		100	>55	
		200	>60	
	7,8 °C	0	22	
		100	23	
		200	<12	
Schweine- fleisch	15 °C	0	19	LAMBERT et al. (1991b)
		1	28	
Rindfleisch	28 °C	2,5	24	SUAREZ REBOLLO et al. (1997)
		5,0	17	
		7,5	24	
		10,0	38	

Ebenso bestätigen CANN et al. (1966a), FIRSTENBERG-EDEN et al. (1982) und LAMBERT et al. (1991c) einen signifikanten Unterschied bezüglich der Toxinproduktion in bestrahlten und nicht bestrahlten Proben.

Anhand der Ergebnisse von EKLUND (1982) und SUAREZ REBOLLO et al. (1997) ist erkennbar, dass die Verzögerung der Toxinbildung mit zunehmender Strahlendosis nicht immer linear verläuft. Es ist anzunehmen, dass weitere, für die Autoren nicht erkennbare Faktoren oder eine Kombination dieser zusätzlich Einfluss nehmen.

Zu gegenteiligen Ergebnissen kamen CANN et al. (1965). Im Rahmen ihrer Untersuchungen konnte BoNT in mit 3,0 kGy bestrahlten Fischproben eher nachgewiesen werden als in nicht bestrahlten. Als ursächlich sehen die Autoren die Reduktion der Verderbnisflora, was die Bedingungen für das Wachstum von und die Toxinbildung durch *C. botulinum* verbessert.

Auch AJMAL (1968b), VARNAM und EVANS (1991) sowie BÖGL et al. (1993) weisen auf die Gefahr hin, dass bei geringen Bestrahlungsstärken (<10 kGy) die konkurrierende mikrobielle Flora gehemmt und somit einem Wachstum von *C. botulinum* Vorschub geleistet wird, insbesondere unter anaeroben Bedingungen. Folglich können organoleptisch unveränderte Lebensmittel BoNT-haltig sein und somit eine Gefahrenquelle darstellen (LARSON u. JOHNSON 1999). Daher ist eine zusätzliche kühle Lagerung empfehlenswert, um das Auskeimen vorhandener Sporen mit anschließender Toxinbildung zu unterbinden.

4.1.2.3 Einfluss auf das Botulinumtoxin

Die Zerstörung von BoNT infolge einer Bestrahlung ist primär dosisabhängig, gleichzeitig beeinflusst das umgebende Medium sekundär die Bestrahlungsresistenz (TRANTER et al. 1987). So konnte eine Bestrahlung von BoNT-Typ E mit weniger als 60 kGy den Toxintiter nicht vollständig eliminieren (SKULBERG 1965). Vielmehr ist eine Dosis von >80 kGy für die Zerstörung von präformiertem Botulinustoxin erforderlich (KRÄMER 2002).

Serumalbumin, Kasein, DNA und RNA sowie einige Aminosäuren und Purine wirken schützend auf das Neurotoxin, während für Kohlenhydrate keine protektive Wirkung festgestellt wurde (MIURA et al. 1970, zitiert bei SELL 1985). Dies erklärt die Beobachtungen von ROSE et al. (1988), dass das Botulinumtoxin in Fleischboullion strahlenresistenter ist als in einer Gelatinephosphatlösung.

Weiterhin wurden nach Ultraschall- (SCHEIBNER 1955) und Mikrowellenbehandlungen (NOTERMANS et al. 1990; SIMPSON et al. 1995) verringerte Toxinmengen nachgewiesen, wobei die Stärke der Reduktion in den verschiedenen Untersuchungen variierte. Eine mögliche Erklärung dafür können jedoch auch die verschiedenen Inokulumgrößen sein.

4.1.2.4 Interaktion mit anderen Einflussfaktoren

Inwieweit die Bestrahlung von Lebensmitteln einen signifikanten Einfluss auf die Toxinbildung von *C. botulinum* hat, hängt unter anderem von der Gaszusammensetzung innerhalb der Verpackung ab. So konnten LAMBERT et al. (1991b) nur in Proben, die unter Sauerstoff verpackt wurden, eine signifikante Verlangsamung der Toxinbildung nachweisen. Weiterhin erhöhen für *C. botulinum* optimale Temperaturen, eine hohe Kontaminationsrate und der fehlende Zusatz verschiedener Konservierungsstoffe die Bestrahlungsresistenz vegetativer Zellen (KEMPE u. GRAIKOSKI 1962; AJMAL 1968b; DIEHL 1972; HUSSAIN et al. 1977; FIRSTENBERG-EDEN et al. 1982; LAMBERT et al. 1991a; MONK et al. 1995).

4.1.2.5 Gesetzliche Regelungen

Im nationalen Recht ist die Bestrahlung von Lebensmitteln durch die LEBENSMITTELBESTRAHLUNGSVERORDNUNG (2000) geregelt. Darin sind unter anderem Zulassungen, die Einfuhr bestrahlter Lebensmittel aus Drittländern sowie Aufzeichnungspflichten und Analysemethoden genauso vorgeschrieben wie die Kennzeichnung entsprechender Lebensmittel.

Innerhalb der Europäischen Gemeinschaft wird die Bestrahlung durch eine Rahmenrichtlinie (1999/2/EG) und eine Durchführungsrichtlinie (1999/3/EG) geregelt. Eine Übersicht über Zulassungen der γ -Bestrahlung in verschiedenen europäischen Ländern gibt Tabelle A43.

Die WHO empfiehlt eine Anwendung besonders in Ländern der Dritten Welt (PFEILSTICKER 1993).

4.2 Chemische Faktoren

4.2.1 Wasseraktivität

4.2.1.1 Einfluss auf die Spore

Bezüglich des benötigten freien Wasseranteiles belegt die Studie von BAIRD-PARKER und FREAME (1967), dass der Mindest- a_w -Wert für das Auskeimen der Sporen variiert, je nachdem, welche wasserbindende Substanz verwendet wird. Demzufolge ist auch die Salzkonzentration eines Mediums unterschiedlich, die die Keimung (10,3%) und das Wachstum (5,0%) hemmt (BAIRD-PARKER u. FREAME 1967).

Unabhängig davon weisen ELLIOTT und SCHAFFNER (2001) Varianzen zwischen den *C. botulinum*-Typen nach. Während 1,75% NaCl die Auskeimungsrate von Typ E nur reduziert, werden Sporen des saccharolytischen Typs B vollständig gehemmt.

Tabelle A44 belegt beispielhaft, wie der a_w -Wert des Mediums die Hitzeresistenz von *C. botulinum*-Typ A beeinflusst.

4.2.1.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

MOTARJEMI et al. (2000) benennen einen a_w -Wert von maximal 0,93 als wachstumshemmend für alle *C. botulinum*-Typen. Aus den Angaben in Tabelle 18 ist ersichtlich, dass die Autoren dabei von dem niedrigsten in der Literatur veröffentlichten Mindest- a_w -Wert ausgehen und zusätzlich eine Sicherheitsspanne eingebracht haben.

Tabelle 18: Minimaler a_w -Wert für das Wachstum von *C. botulinum* in NaCl-haltigen Substraten (SPERBER 1982)

<i>C. botulinum</i> -Typ	Mindest a_w -Wert	Literaturquelle
A und B	0,96	BAIRD-PARKER und FREAME (1967)
	0,955	DENNY et al. (1969)
	0,95	SCOTT (1957)
	0,94	OHYE und CHRISTIAN (1967)
	0,94	MARSHALL et al. (1971)
E	0,972	EMODI und LECHOWICH (1969a)
	0,97	BAIRD-PARKER und FREAME (1967)
	0,97	OHYE und CHRISTIAN (1967)

Die gefundenen Grenzwerte differieren zum einen zwischen den verschiedenen *C. botulinum*-Typen und zum anderen ist der Grenzwert eines Typs je nach verwendetem Zusatz unterschiedlich (Tabelle A45). Unter Verwendung von Glycerol toleriert *C. botulinum* niedrigere a_w -Werte, da es in die Zelle gelangen kann und so kein osmotischer Stress wie bei dem nicht permeablen Natriumchlorid entsteht (RAY 2001).

Anhand der Untersuchungsergebnisse von BARBUT et al. (1986) ist der Einfluss des verwendeten Salzes gut nachvollziehbar. Sie konnten BoNT zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachweisen, je nachdem, welches Salz den a_w -Wert regulierte (Tabelle A46).

Infolge ihrer Untersuchungen legten BRIOZZO et al. (1986) den Mindest- a_w -Wert für Wachstum und Toxinbildung von *C. botulinum*-Typ G bei 0,965 fest.

In Kaviar fand bei einem a_w -Wert von 0,968 keine Toxin-Synthese statt. Dies konnte erst ab einem a_w -Wert von 0,974 nach vier Wochen für die Typen A und B belegt werden (HAUSCHILD u. HILSHEIMER 1979).

GLASS und DOYLE (1991) versetzten verschiedene Pastaproducte mit proteolytischen *C. botulinum*-Sporen. Nach Inkubation bei 30°C konnte in keiner der Proben eine Toxinbildung nachgewiesen werden, wenn der a_w -Wert $\leq 0,94$ war. Dagegen konnte BoNT in einer der Proben mit einem a_w -Wert von 0,96 nach zwei Wochen festgestellt werden.

In Fleischproben, deren a_w -Werte deutlich niedriger lagen ($<0,82$), konnten weder Wachstum noch Toxinbildung durch proteolytische Typ B-Sporen festgestellt werden (LARA et al. 2003).

4.2.1.3 Interaktion mit anderen Einflussfaktoren

Die Sensibilität von *C. botulinum* bezüglich eines reduzierten a_w -Wertes variiert in Abhängigkeit von pH-Wert und Inkubationstemperatur (BAIRD-PARKER u. FREAME 1967; Tabelle A31).

Bei den Untersuchungen von EMODI und LECHOWICH (1969a,b) lagen die minimalen a_w -Werte bei 0,978 und 0,975, wenn die Inkubationstemperatur zwischen 10°C und 30°C lag. Erst bei Temperaturen unter 10°C kam es zu einem überdurchschnittlichen Anstieg des Mindest- a_w -Wertes.

BAIRD-PARKER und FREAME (1967) untersuchten die Mindest- a_w -Werte für vegetatives Wachstum der Typen A und B bei einer Inkubationstemperatur von 20°C. Unter Verwendung von NaCl betrug dieser 0,97 und unter Verwendung von Glycerol 0,93.

Während in bei 30°C inkubierten Nudelprodukten mit einem a_w -Wert von 0,96 nach zwei Wochen Toxin nachweisbar war, gelang dies bei einer Inkubationstemperatur von 4°C auch bei einem a_w -Wert von 0,99 nicht (GLASS u. DOYLE 1991).

Wachstum für *C. botulinum*-Typ E konnte bei einem a_w -Wert von 0,975 nach sechs Tagen bei 30°, nach 19 Tagen bei 15°C und nach 42 Tagen bei 7,2°C nachgewiesen werden (RAY 2001).

Bei optimalen Temperaturbedingungen hat *C. botulinum* im pH-Wert-Bereich von 7 – 8 die größte Toleranz gegenüber einem niedrigen a_w -Wert. Je mehr der pH-Wert in den sauren Bereich absinkt, desto höher war der für das Wachstum benötigte a_w -Wert (Tabelle A32). Bestätigt werden diese Zusammenhänge durch die Untersuchungen von DODDS (1989), die in Tabelle A33 zusammengefasst sind.

Der minimale a_w -Wert ist unabhängig davon, ob Elektrolyte oder Nichteurolyte (z.B. Zucker) zu seiner Einstellung verwendet werden (EMODI u. LECHOWICH 1969b).

4.2.1.4 a_w -Werte ausgewählter Lebensmittel

Tabelle A47 gibt einen Überblick über die a_w -Werte in verschiedenen Produkten.

Die a_w -Werte der von DEHOF (1994) untersuchten geräucherten Forellenfilets lagen oberhalb der angegebenen Werte – sie rangierten zwischen 0,983 und 0,987.

Aufgrund der vorher genannten Untersuchungen müssen bei Lebensmitteln, die einen a_w -Wert über 0,93 aufweisen, zusätzliche Einflussfaktoren wirken, so dass ein Wachstum von *C. botulinum* mit Toxinsynthese unterbunden wird.

Kurz genannt werden soll an dieser Stelle die Gruppe der Lebensmittel, die eine relativ hohe Konzentration an wasserbindenden Lösungen oder hydrophilen Kolloiden enthalten. Hierzu zählen unter anderem Salami, Trockenobst und Honig. Ihnen ist gemeinsam, dass sie a_w -Werte zwischen 0,70 und 0,90 haben und damit auch ohne Kühlung relativ lange haltbar sind. Aufgrund des niedrigen a_w -Wertes wird ein Auskeimen evtl. vorhandener Sporen und vegetatives Wachstum unterbunden (RAY 2001).

4.2.2 pH-Wert

Bevor auf den Effekt einer pH-Wert-Verschiebung auf Spore, vegetative Zelle und Toxin im Einzelnen eingegangen wird, sollen einige übergreifende Untersuchungsergebnisse dargestellt werden.

Bei Verimpfung vegetativer Zellen liegt der optimale pH-Wert bei 7,0 (DOZIER 1924a), werden Sporeninokula verwendet, wurde ein geringgradig niedrigeres Optimum festgestellt. Ursächlich sind vermutlich differierende Bedingungen für das Auskeimen der Sporen.

BONVENTRE und KEMPE (1959b) konnten starkes Wachstum von *C. botulinum*-Typ A bei pH-Werten zwischen 5,5 und 7,0 feststellen. Maximale Toxintiter dagegen wurden in Bereichen von 5,5 bis 8,0 nachgewiesen. Innerhalb dieses Bereiches konnten die Autoren keine gravierenden Differenzen feststellen.

Aufgrund mikrobieller Aktivitäten kommt es während der Lagerung vieler Lebensmittel zu einem pH-Wert-Abfall (AUSTIN et al. 1998; GLASS et al. 1999). Deshalb können auch, aufgrund ihres hohen pH-Wertes, als sicher geltende Lebensmittel ein Botulismusrisiko darstellen.

4.2.2.1 Einfluss auf die Spore

In den Untersuchungen von ROWLEY und FEEHERRY (1970) lag der für die Auskeimung günstigste pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5. Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von ANDO und IIDA (1970) überein.

Je weiter der pH-Wert sinkt, desto geringer ist die Auskeimungsrate bzw. verlängert sich die für die vollständige Keimung benötigte Zeit (BAIRD-PARKER u. FREAME 1967). Beispielsweise führt bei 15°C und einem Salzgehalt von 2% eine Reduktion des pH-Wertes von 6,5 auf 5,5 zu einem 10-fachen Anstieg der mittleren Auskeimungsdauer (CHEA et al. 2000).

Bezüglich der Untergrenze, bei der ein Auskeimen der Sporen festgestellt wurde, sind in der Literatur variierende Angaben zu finden.

Die Varianzen sind unter anderem vom *C. botulinum*-Typ abhängig - so belegen die Ergebnisse von BLOCHER und BUSTA (1985) eine vollständige Hemmung der Sporenauskeimung für *C. botulinum*-Typ A, während das Auskeimen von Typ B-Sporen nicht beeinflusst wurde.

Während ROWLEY und FEEHERRY (1970) bei pH-Werten unter 4,8 ein Nachweis der Sporenauskeimung nicht gelang, war dies SMELT et al. (1982) bei einem pH-Wert von 4,3 und YOUNG-PERKINS und MERSON (1987) bei einem pH-Wert von 4,07 möglich. Auch RAATJES und SMELT (1979) berichten, dass ein Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen bei einem pH-Wert von 4,2 unter anaeroben Bedingungen und einer Sojaproteinkonzentration von 5.5% nachweisbar war. Anhand der variierenden Ergebnisse wird deutlich, dass die Zusammensetzung des Mediums das Auskeimen von Sporen unter suboptimalen Bedingungen beeinflusst. SMELT et al. (1982) gehen davon aus, dass vorhandene *Bacillus* spp. das Redoxpotenzial senken sowie das Enzym Katalase produzieren und so ein Auskeimen der Sporen im primär sauren Medium ermöglichen.

In Tomaten, die mit proteolytischen und nicht-proteolytischen Typ B-Sporen inokuliert und bei 23°C unter reduziertem Sauerstoffgehalt inkubiert wurden, konnten HOTCHKISS et al. (1992) BoNT nachweisen. Dabei lagen die pH-Werte einiger als positiv ermittelten Proben bei < 4,6.

Birnen, die zu den sauren Lebensmitteln gehören (Tabelle A54), konnten als Ursache für zwei Todesfälle infolge Botulismus nachgewiesen werden (MEYER u. GUNNISON 1929). Gleichzeitig wurden in den Verdachtsproben Hefen und Laktobazillen festgestellt. In eigenen Untersuchungen keimten unter Zugabe von Hefen Sporen aus und ermöglichten das Wachstum vegetativer Zellen - vermutlich durch eine lokale Anhebung des pH-Wertes.

Auch über das Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen im alkalischen Milieu gibt es Untersuchungen. VARY und HALVORSON (1968) konnten ein Auskeimen bei pH-Wert 8,5 nachweisen, wobei oberhalb von pH-Wert 7,5 mit einer Abnahme der Auskeimungsrate zu rechnen ist (ROWLEY und FEEHERRY 1970).

YOUNG-PERKINS und MERSON (1987) untersuchten, ob sich *C. botulinum*-Typ A bei einem pH-Wert von 4,07 vermehrt. Nach Inkubation bei 30°C beobachteten sie stark bewegliche Zellen. Da die Medien nur mit Sporen inokuliert wurden, zogen sie daraus Rückschlüsse auf stattgefundene Auskeimung. Allerdings wurden nur 5% vegetative Zellen gefunden, der deutlich größere Anteil waren unveränderte Sporen. Dieser Nachweis könnte eine Erklärung für negative Ergebnisse früherer Untersuchungen sein.

4.2.2.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

SAKAGUCHI et al. (1960) konnten in Herz-Hirn-Infusionen, die bei 30°C inkubiert wurden, einen für das Wachstum von *C. botulinum* optimalen pH-Wert von 6,9 feststellen. Auch HOBBS (1976,1977) sowie DEHOF et al. (1989) gehen von einem Optimum im neutralen Bereich (pH-Wert 6,8 – 7,0) aus.

Der obere Grenzbereich wird mit ca. 8,5 angegeben (SAKAGUCHI et al. 1960; ROMPF u. JAHN 2000). HOBBS (1977) unterscheidet zwischen den proteolytischen und den nicht-proteolytischen Stämmen - für erstere gibt er die Obergrenze mit 9,0 und für letztere mit 8,5 an.

Die Fähigkeit von *C. botulinum*, in saurem Milieu zu wachsen, hängt zum einen vom pH-Wert an sich und zum anderen von dem verwendeten Säuerungsmittel ab. Weiterhin ist das Redoxpotenzial des Lebensmittels entscheidend, da bei dessen Reduktion Bedingungen geschaffen werden, die das Wachstum von *C. botulinum* fördern (SMOOT u. PIERSON 1979).

Der das Wachstum von *C. botulinum* hemmende pH-Wert variiert von Typ zu Typ. Als Hemmfaktor für die Gruppe I gilt allgemein ein pH-Wert von 4,6, für die Gruppe II einer von 5,0 (INGRAM u. ROBINSON 1951; ODLAUG u. PFLUG 1978; MOTARJEMI et al. 2000).

Grundlage dieser Grenzwerte sind die Untersuchungen von TOWNSEND et al. (1954). Danach liegt der Mindest-pH-Wert für das vegetative Wachstum bei 4,8. Dazu wird eine Sicherheitsspanne von 0,2 Einheiten abgezogen, somit ist der Grenzwert bei 4,6 festgelegt.

Je weiter sich der pH-Wert eines Mediums vom Optimum entfernt, desto mehr verlängert sich die Zeitspanne, bis BoNT nachgewiesen werden kann (DODDS 1989; Tabelle A48).

Die Ergebnisse von BLOCHER und BUSTA (1983a) belegen, dass eine Reduktion des pH-Wertes in Bereichen <5,5 nur einen minimalen Effekt auf das Wachstum vegetativer Zellen hat. Eine andere Untersuchung konnte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wachstumswahrscheinlichkeit bei pH-Wert 5,5 und 5,1 finden (LUND et al. 1987), wogegen bei pH-Wert 4,9 die Wahrscheinlichkeit 30-mal niedriger lag.

In späteren Untersuchungen konnten Wachstum und Toxinsynthese auch bei deutlich niedrigeren pH-Werten beobachtet werden. Als ursächlich werden Inseln mit höheren pH-Werten vermutet. Solche umschriebenen Areale wurden unter Myzelien in verschimmeltem Tomatensaft (HUHTANEN et al. 1976; ODLAUG u. PFLUG 1979) und in ausgefallenen Eiweißen (TANAKA 1982) nachgewiesen.

Ergebnisse, die mit Hilfe künstlicher Medien gewonnen werden, können nicht bedingungslos auf Lebensmittel übertragen werden. So konnte die BoNT-Synthese in Medien, deren pH-Werte mit Zitronensäure gesenkt wurden, bis zu einem pH-Wert von 4,2 nachgewiesen werden (TSANG et al. 1985), während dies in Lebensmitteln, deren pH-Werte bei 4,6 lagen, nicht gelang (POST et al. 1985a). Aus diesem Grunde werden im Folgenden Ergebnisse, die auf der Basis der Verwendung synthetischer Medien und solche, die an Lebensmitteln durchgeführt wurden, getrennt dargestellt.

4.2.2.2.1 In synthetischen Medien

Ein pH-Wert von 5,5 – 6,5 kann das Wachstum nicht vollständig hemmen, es ist aber deutlich verlangsamt (BLOCHER et al. 1982). Dies bestätigt die Ergebnisse von BAIRD-PARKER und FREAME (1967) - sie konnten bei einem pH-Wert von 5,3 Wachstum der Typen A, B und E feststellen. Bei einem pH-Wert von 5,0 war dies nur für die Typen A und B bei einer Inkubationstemperatur von 30°C möglich. Bei niedrigeren Temperaturen konnte der Wachstumsnachweis nicht erbracht werden.

RAATJES und SMELT (1979) gelang in mit Sojaprotein angereicherten Medien der Wachstumsnachweis von *C. botulinum*-Typ A und B nach sechswöchiger Inkubation bei 30°C. Bei einem pH-Wert von 4,0 war ein Proteingehalt von 5,5% nötig und bei einem pH-Wert von 4,4 eine Eiweißkonzentration von 3,0%. Die Autoren verweisen darauf, dass mit den *C. botulinum*-Sporen auch *Bacillus*-Sporen inokuliert wurden – diese senken das Redoxpotenzial und schaffen somit bessere Bedingungen für *C. botulinum*.

In mit Sojaprotein angereicherten Medien konnten auch SMELT et al. (1982) Wachstum von proteolytischen *C. botulinum*-Stämmen bei pH-Werten <4,6 nachweisen (Tabelle A49). Dies gelang ebenfalls in mit 5,5% Milchprotein versetzten Medien bei pH-Werten von 4,4 – 4,5. Dagegen konnten diese Ergebnisse in Medien, die nur einen Proteingehalt von 0,6% aufwiesen, nicht nachvollzogen werden.

In Medien, deren pH-Werte mit Zitronensäure eingestellt wurden, stellten TSANG et al. (1985) Wachstum und Toxinbildung bei einem pH-Wert von 4,2 fest. In vergleichbaren Medien, denen Essigsäure zugesetzt wurde, war dies erst ab einem pH-Wert von 5,0 und nach einer deutlich längeren Inkubationszeit möglich.

Auch in einem Medium auf Rindfleischbasis, dessen pH-Wert bei 3,73 lag, konnte nach 35 Wochen Wachstum und Toxinbildung nachgewiesen werden (WONG et al. 1988). Der Proteingehalt des Mediums betrug 3%. Wurde dieser auf 2% gesenkt, lag der Mindest-pH-Wert bei 4,29.

Die Mindest-pH-Werte für verschiedene Stämme von *C. botulinum*-Typ C liegen zwischen 5,62 und 5,1 (SEGNER et al. 1971b).

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse wird die Bedeutung vorhandener Eiweiße in Lebensmitteln mit einem niedrigen pH-Wert deutlich. Proteine fungieren einerseits als Nährstoffquelle und andererseits als Puffer, der die pH-Wert-Reduktion im Zellinneren verlangsamt (YOUNG-PERKINS u. MERSON 1987; WONG et al. 1988). Innerhalb der Matrix ausgefällter Eiweiße liegen aufgrund der proteolytischen Aktivitäten von *C. botulinum* lokal höhere pH-Werte vor. Somit ist lokal begrenztes Wachstum in Lösungen möglich, deren pH-Wert <4,6 liegt (RAATJES u. SMELT 1979; TANAKA 1982).

Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass der pH-Wert allein kein zuverlässiger Indikator für das Wachstum von *C. botulinum* ist. Vielmehr sollte er immer in Zusammenhang mit dem Proteingehalt der Lösung und der Art der verwendeten Säuren gesehen werden.

4.2.2.2 In Futter- oder Lebensmitteln

BOW et al. (1974) berichten von einem Botulismusfall in Idaho, Utah. Das auslösende Agens war **Tomatensaft**, dessen pH-Wert bei 4,2 lag. Neben *C. botulinum*-Typ A und seinem Toxin wurde, wie auch bei MEYER und GUNNISON (1929), ein nicht näher identifizierter hefen-ähnlicher Mikroorganismus gefunden. Vermutlich ermöglichte dieser – wie auch in anderen Berichten beschrieben (HUHTANEN et al. 1976; ODLAUG u. PFLUG 1979) – einen lokalen pH-Wert-Anstieg und somit eine Vermehrung von *C. botulinum*.

In **Feigen** konnten ITO et al. (1978) Wachstum und Toxinsynthese bei einem pH-Wert von 5,45 feststellen. Bei einem niedrigeren pH-Wert gelang dieser Nachweis nicht.

LERKE (1973) wies in **Krabbenfleisch**, dessen pH-Wert bei 4,96 lag, nach sechs Tagen BoNT nach, wenn die Proben bei 30°C inkubiert wurde n. Bei einer Lagerungstemperatur von 10°C konnte der Nachweis erst nach >127 Tagen erbracht werden.

HAUSCHILD und HILSHEIMER (1979) wiesen in **Kaviar**, dessen a_w -Wert 0,978 betrug, nach zwei Wochen bei einem pH-Wert von 5,2 BoNT nach. Wurde der a_w -Wert auf 0,974 gesenkt, war eine Toxinproduktion auch nach vier Wochen bei einem pH-Wert von 5,4 nicht feststellbar.

In **Pilzsauce**, die einen pH-Wert von 4,35 hatte, konnten NIKOLAEVA und MAZOKHINA (1972, zitiert bei SMELT et al. 1982) Wachstum und Toxinbildung von *C. botulinum*-Typ B nachweisen. Diese Ergebnisse sollten aber unter Vorbehalt bewertet werden, da eine relativ große Inokulummenge verwendet wurde (3×10^7 KBE/g). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass das nachgewiesene Toxin mit den inokulierten Sporen eingebracht wurde (SMELT et al. 1982).

In **marinierten Lebensmitteln** gelang der BoNT-Nachweis bei pH-Wert 4,77, nicht jedoch bei pH-Wert 4,62 (HAUSCHILD et al. 1975).

NOTERMANS et al. (1979) wiesen eine Toxinbildung in **Grassilage** nach. Bei einem pH-Wert von 6,5 lag der minimale a_w -Wert bei 0,943; wurde der pH-Wert auf 5,3 reduziert, musste der a_w -Wert auf mindestens 0,985 angehoben werden (Tabelle A34).

In **unbehandelten Truthahnprodukten** stellten MILLER et al. (1993) eine Toxinproduktion durch proteolytische *C. botulinum*-Stämme fest. Wurden die Proben bei 28°C inkubiert, konnte bei den pH-Werten von 6,5; 6,0 und 5,5 nach fünf, sechs und sieben Tagen BoNT nachgewiesen werden.

In Essiglake eingelegte und bei Zimmertemperatur aufbewahrte **Heringe** (pH-Wert = 4,5) lösten 1986 bei zwei Frauen Botulismus aus (SCHULZE 1986).

Bei einer Inkubationstemperatur von 20°C gelang ein Toxinnachweis in allen **frischen Pastaprobten**, nur in den mit Artischocken gefüllten Tortellini gelang dies nicht (DEL TORRE et al. 1998). Ursache hierfür ist vermutlich der deutlich niedrigere pH-Wert (Tabelle A50). Weiterhin besteht ein Risikofaktor in dem für einige Proben nachgewiesenen Anstieg des pH-Wertes während der Inkubation.

THOMPSON und TANNER (1925) konnten in verschiedenen sauren Lebensmitteln eine Toxinproduktion nachweisen, wenn die Proben bei Raumtemperatur gelagert wurden (Tabelle A51). In Obst- und Gemüsesorten, die einen niedrigeren pH-Wert aufwiesen (z.B. Sauerkraut), gelang dies nicht.

Auch primär saure Lebensmittel (pH-Wert < 4,6) konnten als auslösende Agenzien im Rahmen von Botulismusfällen ausgemacht werden (Tabelle A20).

Obwohl eine Toxinsynthese durch *C. botulinum* in Lebensmitteln, deren pH-Werte unterhalb von 4,6 liegen, unwahrscheinlich ist, ist die generelle Aussage falsch, Wachstum sei bei pH-Werten <4,6 nicht möglich (RAATJES u. SMELT 1979).

4.2.2.3 Einfluss auf das Botulinumtoxin

Das Protoxin weist eine starke Stabilität bezüglich pH-Wert-Veränderungen auf. Die Untersuchungen von KITAMURA et al. (1969) zeigen, dass es erst bei pH-Werten < 3 und > 9 zu einer Inaktivierung kommt. Dabei liegt der Bereich der höchsten Stabilität zwischen pH-Wert 4 und 6, wie auch die späteren Ergebnisse von SCHWARZ (1979) zeigen. Bestätigt werden ebenso die Versuchsergebnisse von MAIER (1954), im Rahmen derer der Toxintiter im Mainwasser (pH-Wert =6,5) eher sank als der in physiologischer Kochsalzlösung (pH=5,9) (Tabelle A52). Zu analogen Ergebnissen kam der Autor bei Untersuchungen mit verschiedenen Bodenarten. In Humuserde, deren pH-Wert mit 5,7 am niedrigsten lag, war BoNT am längsten nachweisbar.

Beim schematischen Übertragen dieser Ergebnisse auf die Verdauungsvorgänge müsste von einer Inaktivierung des BoNT ausgegangen werden, da der Magensaft einen pH-Wert von 1,6 aufweist. Mit Hilfe zweier Mechanismen gelingt dem Toxin dennoch eine unbeschadete gastrale Passage: Zum einen steigt der pH-Wert des Magensaftes während einer Mahlzeit und zum anderen wirken Nahrungspartikel protektiv (NOTERMANS et al. 1980).

Parallel dazu darf in sauren Lebensmitteln das Vorhandensein von BoNT nicht ausgeschlossen werden. So wurde in bei Zimmertemperatur gelagertem sauren Fischprodukten (marinierter Hering) nach mehr als vier Monaten BoNT-Typ E nachgewiesen (SEIDEL 1992). Die Ergebnisse von BRIOZZO et al. (1986) zeigen, inwieweit der pH-Wert die Aktivierung des BoNT durch Trypsin beeinflusst (Tabelle A53). Für durch Trypsin aktiviertes BoNT konnte bei einem pH-Wert von 2,2 ein stabiler Toxintiter für drei Wochen nachgewiesen werden. Im Anschluss daran verfünffachte sich dieser und fiel nach weiteren drei Wochen in den Ausgangsbereich zurück (HUSS u. PETERSEN 1980).

4.2.2.4 Interaktion mit anderen Einflussfaktoren

Neben der Art des Lebensmittels bzw. des Mediums beeinflussen auch der Anfangs-pH-Wert, die Inokulumgröße, die Inkubationstemperatur und –zeit sowie der verwendete Stamm den Mindest-pH-Wert (ODLAUG u. PFLUG 1978).

Mehrere Untersuchungen zeigen, dass Wachstum bei suboptimalen Bedingungen einen höheren pH-Wert erfordert als unter optimalen Bedingungen. Die von BAIRD-PARKER und FREAME (1967) untersuchten Stämme konnten bei niedrigeren pH-Werten wachsen, wenn sie bei 30°C und nicht nur bei 20°C inkubiert wurde. Für den Typ E konnten SEGNER et al. (1966), EMODI und LECHOWICH (1969a) sowie LERKE (1973) entsprechende Ergebnisse vorweisen.

Die pH-Wert-Untergrenze für die Toxinbildung proteolytischer *C. botulinum*-Typ B-Stämme hängt parallel von dem vorliegenden a_w -Wert (NOTERMANS et al. 1979) bzw. der Menge an zugegebenem Salz (MONTVILLE 1983) ab.

Neben den vorherrschenden Umweltbedingungen hat auch das verwendete Inokulum einen entscheidenden Einfluss auf den minimalen pH-Wert. So konnten ITO et al. (1976) bei einem pH-Wert von 5,0 Wachstum und Toxinbildung nachweisen, wenn 10^6 Sporen verimpft worden waren. Dieser Nachweis gelang nicht bei einer Inokulumgröße von 10^2 Sporen, was eher einer natürlichen Kontamination entspricht. Damit werden die Ergebnisse von SEGNER et al. (1966) sowie HAUSCHILD et al. (1975) bestätigt. Neben der Anzahl der verwendeten Sporen ist auch die Anzahl der verwendeten Stämme entscheidend. Da die Sensibilität bezüglich eines reduzierten pH-Wertes zwischen den Stämmen variiert (EMODI u. LECHOWICH 1969a; BREAD et al. 1970), kann bei Verwendung von nur einem Stamm keine die gesamte Spezies umfassende Aussage gemacht werden. Je größer die Vielfalt der untersuchten Stämme ist, desto eher können allgemeingültige Aussagen gemacht werden.

4.2.2.5 pH-Werte in Lebensmitteln

Lebensmittel werden aufgrund ihres pH-Wertes in verschiedene Gruppen eingeteilt (Tabelle A54) und dementsprechend ist das Risiko der BoNT-Synthese einzuschätzen.

In verschiedenen Käsesorten, deren a_w -Werte oberhalb von 0,96 lagen, war bei einem pH-Wert von 5,6 kein Wachstum von *C. botulinum* innerhalb von drei Monaten nachweisbar (TER STEEG et al. 1995).

Ausgehend von Botulismusfällen in Italien durch toxinhaltigen Käse (AURELI et al. 1996), untersuchten FRANCIOSA et al. (1999) verschiedene Milchprodukte. Dabei konnten sie in der betroffenen Marke pH-Werte von 5,98 bis 6,25 feststellen. Da in diesem Bereich ein Wachstum von *C. botulinum* möglich ist, müssen zusätzliche Barrieren ein Auskeimen der durch die Autoren nachgewiesenen Sporen verhindern.

DEL TORRE et al. (1998) fanden in frischen Pastaprodukten pH-Werte, die ein Wachstum von *C. botulinum* mit Toxinsynthese ermöglichen (Tabelle A50).

4.2.3 Reduktions-Oxidations-Potenzial

Die Hemmung anaerober Mikroorganismen in Medien mit hohen Redoxpotenzialen beruht stärker auf dem Vorhandensein von gelöstem Sauerstoff als auf dem E_h -Wert selbst (LUND u. WYATT 1984). Nach Beginn des mikrobiellen Wachstums kommt es zu einem Abfall des E_h -Wertes, bedingt durch die H^+ -Produktion der vegetativen Zellen (SMOOT u. PIERSON 1979).

4.2.3.1 Einfluss auf die Spore

Die Untersuchungen von ANDO und IIDA (1970) zeigen, dass bei einem Redoxpotenzial von +231 mV bis +293 mV ein Auskeimen von *C. botulinum*-Typ E-Sporen nachweisbar war, wenn auch kein Wachstum der gebildeten vegetativen Zellen. Damit muss davon ausgegangen werden, dass ein Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen unter Luftsauerstoff möglich ist.

4.2.3.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

Wachstum von *C. botulinum* wurde von -6mV bis -436mV nachgewiesen (MORRIS u. O'BRIEN 1971, zitiert bei ODLAUG u. PFLUG 1978). SMOOT und PIERSON (1979) bestätigen dies. Je niedriger das Redoxpotenzial ist, desto eher und stärker können Wachstum und Toxinbildung nachgewiesen werden (ANDO u. INOUE 1957; LUND u. WYATT 1984; WONG et al. 1988). Aus lebensmittelhygienischer Sicht ist jedoch weniger die Untergrenze als vielmehr die Obergrenze des durch *C. botulinum* tolerierten Redoxpotenzials relevant, weshalb im Folgenden nur darauf eingegangen wird.

Der Höchstwert, bei dem Wachstum von *C. botulinum* nachgewiesen werden kann, unterliegt dem Einfluss der anderen vorliegenden Parameter. Nach ROBERTS (1982, zitiert bei VARNAM und EVANS 1991) sowie ROWLEY und ANELLIS (1976, zitiert bei SMOOT und PIERSON 1979) ist ein Wachstum von *C. botulinum* oberhalb eines Redoxpotenzials von $+150\text{mV}$ nicht möglich, auch wenn alle anderen Parameter im Optimalbereich liegen.

Dagegen konnte MORRIS (1976, zitiert bei LUND und WYATT 1984) Wachstum noch bei $+250\text{mV}$ feststellen.

Der Wachstumsnachweis bei einem festgelegten Redoxpotenzial wird unter anderem von der verwendeten Inokulumgröße beeinflusst (Tabelle A55).

Zugabe reduzierender Agenzien

Der E_h -Wert eines Mediums kann durch verschiedene Zusätze sowohl gesteigert (z.B. Ascorbinsäure) als auch gesenkt (z.B. Cysteinhydrochlorid) werden (SMITH u. PIERSON 1979). Bei vergleichbarer Molarkonzentration variierte die reduzierende Stärke in abnehmender Reihenfolge: Natriumaldehydsulfoxylat, 2-Mercaptoethanol, Zysteinhydrochlorid, Natriumthioglucolat und Ascorbinsäure.

Dabei hängt die Beeinflussung des Wachstums zum einen vom Zusatz an sich und zum anderen von dessen Konzentration ab (Tabelle A56). Die Zugabe von $0,05 - 0,1\%$ Thioglucolsäure oder $0,1 - 0,2\%$ Zystein zum Medium ermöglicht ein Wachstum von *C. botulinum* auch unter aeroben Bedingungen (SAKAGUCHI 1983). Bei Erhöhung der Thioglucolatzugabe auf $0,2\%$ wurde das Anwachsen von *C. botulinum*-Typ E verzögert (SEGNER et al. 1966).

LUND et al. (1987) stellten fest, dass die Zugabe von Kaliumsorbit ($<2\text{ mg/l}$) und Zysteinhydrochlorid (200 mg/l) keinen Einfluss auf das Redoxpotenzial hat.

4.2.3.3 E_h -Werte verschiedener Lebensmittel

Tabelle A57 gibt einen Überblick über E_h -Werte ausgewählter Lebensmittelgruppen. Ein hohes Redoxpotenzial in Lebensmitteln ist zumeist auf die Anwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen (HUNGATE 1969, zitiert bei LUND u. WYATT 1984).

In Lebensmitteln mit Luftkontakt kann sich sekundär ein Redoxpotenzial entwickeln, das das Wachstum von *C. botulinum* ermöglicht (MOSSEL u. INGRAM 1955, zitiert bei BAKER u. GENIGEORGIS 1990). Die Ergebnisse von ANDO und INOUE (1957) zeigen, dass das Redoxpotenzial in Fischfleisch infolge Verderbnis und Autolyse abfällt und so anaerobe Bedingungen entstehen, die ein Wachstum mit Toxinbildung ermöglichen.

Auch andere Untersuchungen belegen, dass die E_h -Werte vieler Lebensmittel, deren Umgebung 1 bis 5% Sauerstoff enthält, noch niedrig genug sind, um eine BoNT-Synthese zu gewährleisten (HOTCHKISS et al. 1992). So konnte in Mascarpone-Proben, deren E_h -Werte zwischen +78mV und +285 mV lagen, Wachstum und Toxinbildung nachgewiesen werden (FRANCIOSA et al. 1999).

Besonders für die Beurteilung von Pökellaken ist der E_h -Wert von entscheidender Bedeutung. So konnten LEISTNER und MIRNA (1959) einen engen Zusammenhang zwischen der Qualität einer Pökellake (Geruch, Geschmack, Farbe, Trübung, Ausflockung, pH-Wert, Pökelsalzkonzentration, Keimzahl und -art) und deren Redoxpotenzial belegen (Tabelle A58).

SMOOT und PIERSON (1979) wiesen die Einflüsse des E_h -wertes auf die das Wachstum von *C. botulinum* hemmenden Faktoren nach. So wird beispielsweise in einem Medium mit geringerem E_h -Wert eine höhere NaCl-Konzentration benötigt, um eine vollständige Hemmung von *C. botulinum* abzusichern.

4.2.4 Veränderte Gasatmosphären

Die Nützlichkeit einer veränderten Gasatmosphäre zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln wurde durch verschiedene Autoren nachgewiesen (CHRISTOPHER et al. 1979a; BANKS et al. 1980; WILHELM 1982; MOLIN et al. 1983; FARBER 1991; HOTCHKISS u. BANCO 1992). Die antimikrobielle Wirkung beruht auf der Beeinflussung des E_h -wertes. Dieser wird durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes gesenkt, folglich kommt es zu einer Hemmung des Wachstums der aeroben Verderbnisflora. So können qualitativ hochwertige Lebensmittel mit verlängerter Haltbarkeit hergestellt werden. Nachteilig ist dabei das Schaffen von anaeroben und damit optimalen Bedingungen für das Wachstum von *C. botulinum*, was nur durch Kühltemperaturen $<3^{\circ}\text{C}$ unterbunden werden kann (AUSTIN et al. 1998; GIBSON et al. 2000). Zu hohe CO_2 -Konzentrationen können sogar das Auskeimen von Sporen stimulieren (ANDO u. IIDA 1970; FOEGEDING u. BUSTA 1983).

In der Lebensmittelindustrie kommen zwei Methoden zur Anwendung: zum einen die Aufbewahrung von Lebensmitteln unter Vakuumbedingungen und zum anderen die CA-Lagerung, wobei zumeist eine Mischung aus CO_2 und N_2 verwendet wird. Während Kohlendioxid das Wachstum vieler Pilze, Hefen und bestimmter Bakterien hemmt, verzögert Stickstoff das Ranzigwerden von Lebensmitteln. Bei rotem Fleisch werden geringe Mengen Sauerstoff zugesetzt, um sicherzustellen, dass Myoglobin in seiner oxidierten Form, dem Oxymyoglobin, vorliegt, da dieses für die rote Farbe des Fleisches verantwortlich ist.

4.2.4.1 Einfluss auf die Spore

Hier sollen die „sous-vide“-Produkte Erwähnung finden. Dabei handelt es sich ursprünglich um vakuumverpackte Lebensmittel ohne Wärmebehandlung. Heute werden jedoch auch pasteurisierte Produkte, die im Anschluss vakuumverpackt werden, so bezeichnet (LUND u. PECK 1994). Vorteilhaft ist die hohe ernährungsphysiologische und sensorische Qualität. Nachteilig ist das erhöhte Botulismusrisiko aufgrund der milden Bearbeitung der Ausgangsprodukte, einer nur moderaten Wärmebehandlung ($65^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$) und des geringen Einsatzes von Konservierungsmitteln (LINDSTRÖM et al. 2001b). Zwar werden vegetative

Zellen zerstört, eventuell vorhandene Sporen jedoch nicht negativ beeinflusst (SIMPSON et al. 1995). Um die Gefahr des Auskeimens und anschließender Toxinbildung (besonders durch nicht-proteolytische Stämme) zu reduzieren, sollten diese Lebensmittel bei Kühltemperaturen gelagert werden (BACH 1971; BETTS u. GAZE 1995). Bei Unterbrechungen der Kühlkette besteht die Gefahr einer Botulismuserkrankung (Tabelle A59). Die Wahrscheinlichkeit des Toxinnachweises nimmt mit zunehmender Lagerungsdauer und ansteigender Lagerungstemperatur zu, parallel sinkt das Risiko mit abnehmendem a_w - oder pH-Wert (SIMPSON et al. 1995). Weiterhin konnten HYYTIÄ-TREES et al. (2000) mit zunehmender Kontaminationsrate mehr toxinhaltige Proben pro Versuchsreihe nachweisen. Einen weitaus stärkeren, hemmenden Einfluss hat Äthanol auf das Wachstum von *C. botulinum* (DAIFAS u. SMITH 2003), was die Autoren auf eine Hemmung der Sporenauskeimung zurückführen. Weiterhin wurde unter Äthanoleinfluss eine verlängerte Latenzphase und weniger exponentielles Wachstum festgestellt.

4.2.4.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

C. botulinum kann, obwohl ein Anaerobier, auch in Atmosphären mit einem geringen Sauerstoffgehalt wachsen (SPERBER 1982) - Voraussetzung dafür ist ein entsprechend niedriges Oxidations-Reduktions-Potenzial (RIEMANN 1973). Bei einer Sauerstoffkonzentration von 1 bis 5% liegt ein solch niedriger E_h -Wert vor, dass eine Toxinbildung möglich ist. Damit ist auch erklärbar, dass HOTCHKISS et al. (1992) in Tomaten, die unter Sauerstoffkonzentrationen von 1 bis 2% gelagert wurden, nach 26 Tagen BoNT nachwiesen. Wurde die Sauerstoffkonzentration auf 6,9% erhöht, war dies nicht möglich. Demnach ist eine ein- bis zweiprozentige Sauerstoffkonzentration nicht ausreichend, um die Toxinbildung zu unterbinden. Damit sind frühere Untersuchungsergebnisse bestätigt, die ein Wachstum bei geringen Sauerstoffkonzentrationen belegten (DACK et al. 1927; MEYER 1929; DACK u. WILLISTON 1929). Ein Nachweis der Toxinsynthese konnte auch noch bei einer Sauerstoffkonzentration von bis zu 15% erbracht werden, wenn der pH-Wert zwischen 6 und 7 lag (WHITING u. NAFTULIN 1992). Weiterhin stellten AJMAL (1968b), DEZFULIAN (1999) sowie DAIFAS et al. (1999a) Wachstum und Toxinbildung unter aeroben Bedingungen fest. LAMBERT et al. (1991a) kommen zu anderen Ergebnissen: während bei einer Inkubationstemperatur von 15°C eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration die Toxinbildung hemmt, konnte dies bei 25°C und 5°C nicht nachvollzogen werden (Tabelle A60). Auch LAMBERT et al. (1991b) konnten eine Toxinbildung eher in Proben nachweisen, die unter 20% Sauerstoff gelagert wurden als in denen, die unter 100% Stickstoff gehalten wurden (Tabelle A61). Gleichzeitig ist aus dieser Tabelle ersichtlich, dass eine Steigerung der CO₂-Konzentration die Toxinbildung um zwei Tage hinauszögert. In sauerstofffreier Atmosphäre verstärkte sich der hemmende Effekt des Kohlendioxid - ein Nachweis gelang erst nach 35 Tagen. Während Kohlendioxid die Sporenauskeimung fördert (ANDO u. IIDA 1970; HOLLAND et al. 1970; ENFORS u. MOLIN 1978; FOEGEDING u. BUSTA 1983), wirkt er auf vegetative *C. botulinum*-Zellen eher hemmend (CHRISTOPHER et al. 1979b; EKLUND 1982; DOYLE 1983; AMIGO et al. 1995; GIBSON et al. 2000). Ursächlich dafür ist, dass unter anaeroben Bedingungen Milchsäurebakterien dominieren, welche *C. botulinum* hemmen (LAMBERT et al. 1991b). Zu analogen Ergebnissen kamen LAWLOR et al. (2000).

Auf den ersten Blick widersprechen dem die Beobachtungen von LAMBERT et al. (1991c), dass bei CO₂-Konzentrationen von 60% und 75% eine Toxinbildung eher nachweisbar ist als bei 45%. Vermutlich verbindet sich der durch den Absorber gebildete Wasserstoff mit vorhandenem Sauerstoff, was zu einer Reduktion des Redoxpotenzials führt. Folglich sind Wachstum und Toxinbildung trotz hoher CO₂-Konzentrationen möglich. Diese Erklärung deckt sich mit den Ergebnissen von FOEGEDING und BUSTA (1983) – sie konnten in Medien, die unter 10% Wasserstoff gehalten wurden, eine Reduzierung des Redoxpotenzials feststellen. In verschiedenen Lebensmitteln wurde der Einfluss variierender Gasatmosphären auf die Toxinbildung untersucht (Tabelle 19).

Tabelle 19: Toxinbildung durch *C. botulinum* unter verschiedenen Gasatmosphären

Lebensmittel	Lagerungs-temperatur	Gas-atmosphäre	Tage bis BoNT pos.	Literaturquelle
Backwaren	25°C	Luft	6	DAIFAS et al. (1999a)
		CO ₂ :N ₂ (60:40)	4	
		100% CO ₂	5,5	DAIFAS et al. (1999b)
		Luft + <2,6% Ethanol	10	DAIFAS und SMITH (2003)
		100% CO ₂	5	
Schweinefleisch	15°C	20% O ₂	14	LAMBERT et al. (1991a)
		100% N ₂	28	LAMBERT et al. (1991b)
Buntbarschfilet	8°C	Luft	20	REDDY et al. (1996)
		CO ₂ :N ₂ (75:25)	40	
		Vakuum	17	
Welsfilet	8°C	Luft	9	REDDY et al. (1997b)
		CO ₂ :N ₂ (75:25)	18	
		Vakuum	6	
Lachsfilet	8°C	Luft	17	REDDY et al. (1997a)
		CO ₂ :N ₂ (75:25)	24	
		Vakuum	10	
Dorschfilet	8°C	Luft	>10	POST et al. (1985b)
		Vakuum	20	
		N ₂	17	
		CO ₂	19	
		CO ₂ :N ₂ :O ₂ (90:8:1)	8	
		CO ₂ :N ₂ :O ₂ (65:31:4)	9	
Lachsfilet	8°C	CO ₂ :Luft (70:30)	12	GARCIA et al. (1987)
		CO ₂ (100%)	9	
		Vakuum	6	

Für einen Vergleich der Untersuchungsergebnisse ist zu beachten, dass weitere Einflussfaktoren variierten, denen jedoch aus Übersichtsgründen in dieser Tabelle nicht Rechnung getragen werden konnte.

Lebensmittel, die unter erhöhten CO₂-Konzentrationen verpackt werden, stellen kein erhöhtes Botulismusrisiko dar. Dies wurde unter anderem für Milch (GLASS et al. 1999) und Fische (GARCIA et al. 1987; REDDY et al. 1997a) belegt.

KAFFEZAKIS et al. (1969) wiesen die Toxizität von Carbonmonoxid, Ethylendioxid und Sulfurdioxid in aufsteigender Reihenfolge auf *C. botulinum* nach.

4.2.4.3 Interaktion mit anderen Einflussfaktoren

Die Angaben in Tabelle 20 verdeutlichen, wie die Temperatur, bei der vakuumverpackte Lebensmittel gelagert werden, das Risiko der Botulismus-Intoxikation beeinflusst.

Tabelle 20: BoNT-Nachweise in gekühlten Proben unter variierenden Gasatmosphären

Temperatur	Verpackungsart	Inokulum	BoNT*	Literaturquelle
10°C	Vakuum	3 bis 4 log ₁₀	6	GARREN et al. (1995)
8°C	100% Luft	100/g	17	REDDY et al. (1997a)
	75%CO ₂ + 25%N ₂		24	
	Vakuum		10	
5 – 8°C	Vakuum	10 ³ /Forelle	35	DEHOF et al. (1989)
4°C	Vakuum	4,5x10 ³	30	LYON und REDDMANN (2000)
4°C	Vakuum	10 ⁴	15	GARCIA und GENIGEORGIS (1987)
4°C	100% N ₂	43/g	14	LAWLOR et al. (2000)
	30%CO ₂ :70%N ₂	43/g	42	
3,3°C	Vakuum	10 ⁶ /100g	21	CANN et al. (1967, zitiert bei BAKER und GENIGEORGIS (1990))

*Tag des ersten Toxinnachweises

Der Einfluss der Temperatur auf die Toxinbildung ist deutlich stärker als der der veränderten Gasatmosphäre (STIER et al. 1981; LAMBERT et al. 1991a; GARREN et al. 1995; CAI et al. 1997). Weiterhin unterstützen die Angaben in Tabelle 20 die Ergebnisse von KAUTTER et al. (1981), dass eine Kühlung <3°C oder weitere Hemmfaktoren nötig sind, um eine Toxinbildung zu unterbinden.

Je höher der CO₂-Gehalt der Atmosphäre ist, desto größer muss die inokulierte Sporenmenge sein, um eine BoNT-Synthese nachweisen zu können (Tabelle A62). Weiterhin stellten GARCIA et al. (1987) fest, dass die Inokulumgröße in CO₂-angereicherten Medien größer sein muss als in solchen, die unter Vakuum gehalten werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von LAWLOR et al. (2000) überein – die Autoren zeigten weiterhin auf, dass der Einfluss der Inokulumgröße um so entscheidender ist, je niedriger die Inkubationstemperatur ist.

Die Experimente von GARCIA und GENIGEORGIS (1987) belegen, dass bei für *C. botulinum* optimalen Temperaturbedingungen eine Spore ausreicht, um BoNT nach einem Tag nachzuweisen - sowohl unter Vakuumbedingungen als auch bei erhöhtem CO₂-Gehalt.

Ob es bei veränderten Gasatmosphären zu einer Toxinbildung durch *C. botulinum* kommt, hängt unter anderem vom pH-Wert und dem Salzgehalt ab (Tabelle A63).

Während der pH-Wert bei 60% CO₂ innerhalb der Verpackung keinen Einfluss auf die Toxinbildung hatte, war dies bei 100% CO₂ nachweisbar (DAIFAS et al. 1999b). Unter reinem Kohlendioxid konnte bei einem pH-Wert von 6,5 BoNT nach fünf Tagen, bei einem pH-Wert von 8,3 dagegen erst nach sieben Tagen nachgewiesen werden.

Weiterhin beeinflussen der verwendete *C. botulinum*-Typ (SOLOMON et al. 1998), die Anwesenheit anderer Mikroorganismen (DAIFAS u. SMITH 2003), die verwendeten Verpackungsmaterialien (HARRISON et al. 1996; HAO et al. 1999; GONZALEZ-FANDOS et al. 2000) sowie das Lebensmittel selbst (KAUTTER et al. 1981) das Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* in modifizierten Gasatmosphären.

Zusammenfassend gilt, dass die Zusammensetzung der Gasatmosphäre im Vergleich zur Lagerungstemperatur (LAMBERT et al. 1991a; LAWLOR et al. 2000) und dem Redoxpotenzial (HOTCHKISS et al. 1992) eine eher untergeordnete Rolle bezüglich der Hemmung von *C. botulinum* spielt. Weitere Untersuchungen (LINDROTH u. GENIGEORGIS 1986; GARCIA et al. 1987; GARCIA u. GENIGEORGIS 1987) bestätigen, dass eine Veränderung der Gasatmosphäre an sich keinen signifikanten Effekt auf die Wahrscheinlichkeit der Toxinbildung hat.

4.2.5 Einsatz von Pökelsalzen

Schon 1899 wurde erkannt, dass nicht Nitrat selbst, sondern das daraus mikrobiell gebildete Nitrit für die Konservierung von Lebensmitteln verantwortlich ist (MÜLLER 1989b). Infolgedessen wurde Nitrat weitgehend durch Nitrit ersetzt.

Mehrfach wurde die konservierende Wirkung der Pökelsalze nachgewiesen (BULMAN u. AYRES 1952; ROBERTS et al. 1981b; ROWLEY et al. 1983a).

Da Nitrat, Nitrit und Kochsalz synergistisch wirken (CUPPETT et al. 1987; SCOTT 1989; HYYTIÄ et al. 1997), sind bei paralleler Anwendung niedrigere Einzelkonzentrationen notwendig (Tabelle A30).

4.2.5.1 Zugabe von Nitrat

Für die Anwendung von Nitrat spricht die Ausbildung einer stabileren Pökelfarbe sowie eines volleren Aromas der Produkte im Vergleich zur Nitritanwendung. Ökonomisch ist von Nachteil, dass längere Reifungszeiten notwendig sind, weiterhin besteht das Risiko einer Wachstumsförderung von *Enterobacteriaceae* (KRÄMER 2002).

HUSTAD et al. (1973) schätzen den Einfluss von Nitrat auf die Botulinumtoxin-Produktion als eher gering ein. Auch LÜCKE et al. (1982) vertreten die Meinung, dass die BoNT-Synthese stattfindet, bevor das Pökelsalz zu den beimpften Stellen vorgedrungen ist.

ROBERTS et al. (1981a,b) kamen zu dem Ergebnis, dass Nitrat zwar die Toxinproduktion signifikant verringert, aber keine effektive konservierende Wirkung besitzt.

Im Rahmen der Untersuchungen von TANNER und EVANS (1933b) konnten in Lösungen mit einer Mindestnitratkonzentration von 4,427% weder Wachstum noch Toxinbildung von *C. botulinum* nachgewiesen werden.

Die Zugabe von 686mg/kg Kaliumnitrat zu geräucherten Regenbogenforellen konnte die Anzahl toxischer Proben insgesamt zwar reduzieren, dennoch wurde sechs Wochen nach Verimpfung von $2,02 \times 10^4$ KBE/kg in den bei 8°C gelagerten Proben BoNT nachgewiesen (HYTTIÄ et al. 1997). Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C gelang dies nicht. Dies bestätigt die Ergebnisse von LÜCKE et al. (1982), dass eine Temperatur von 8°C während der Pökellung keinen ausreichenden Schutz vor der BoNT-Synthese gewährleistet.

4.2.5.2 Zugabe von Nitrit

Nitrit wird in Form von Nitritpökelsalz angewendet, wobei es sich um ein Gemisch aus Speisesalz und Natriumnitrit handelt. Die antimikrobielle Wirkung beruht zum einen auf der Freisetzung von Stickoxiden und zum anderen auf der Bildung von Nitrolsäure (MÜLLER 1989b).

4.2.5.2.1 Einfluss auf die Spore

Die Ergebnisse von DUNCAN und FOSTER (1968) belegen, dass trotz 0,06% Nitrit bei einem pH-Wert von 6,0 sowie 0,8 bis 1,0% bei pH-Wert 7,0 das Auskeimen von Sporen bei Anaerobiern beobachtet werden kann, nicht aber eine Zweiteilung. Auch bei höheren Nitritkonzentrationen konnte die Bildung vegetativer Zellen aus den Sporen in diesen pH-Wert-Bereichen nicht beobachtet werden.

ROBERTS und SMART (1974) stellten fest, dass die anticlostridiale Wirkung durch ein vorheriges Erhitzen des Nitrits deutlich verstärkt werden kann (Tabelle 21).

Tabelle 21: Hemmung der Sporenauskeimung durch Natriumnitrit (modifiziert nach ROBERTS und SMART 1974)

Inokulum	hemmende Natriumnitritkonzentration (mg/l) bei pH-Wert 6,0					
	<i>C. botulinum</i> -Typ A		<i>C. botulinum</i> -Typ E		<i>C. sporogenes</i>	
	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.
10^6 Sporen/ml	20	240	15	160	10	200
10^3 Sporen/ml	15	240	7,5	240	10	200

e. Nitrit erhitzt (115°C, 15 min)

n.e. Nitrit nicht erhitzt

4.2.5.2.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

In verschiedenen Lebensmitteln wurde die hemmende Wirkung von Nitrit auf die Toxinbildung durch *C. botulinum* belegt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Auswirkung verschiedener Nitritkonzentrationen auf Wachstum und Toxinbildung von *C. botulinum* in verschiedenen Lebensmitteln

Lebensmittel	weitere Faktoren	Nitrit (ppm)	Nachweis von BoNT/Wachstum	Literaturquelle
Schweinefleisch, vakuumverpackt	27°C 300 Sporen/g	0	nach 5,3 d	ISMAIEL und PIERSON (1990b)
		50	nach 6,2 d	
		100	nach 24,1 d	
		150	nach 23,4 d	
Schinken, vakuumverpackt	27°C, 8 Wochen, 10 ³ Sporen/g	0	in 50/52 Proben	TANAKA et al. (1980)
		40	in 47/50 Proben	
		120	in 17/28 Proben	
Geflügelfleisch	27°C 10 ³ Sporen/g	0	nach 4 d	SOFOS et al. (1980a)
		40	nach 4 d	
		156	nach 8 d	
Speck	27°C, 40 Tage, 10 ³ Sporen/g	0	in 10/50 Proben	SOFOS et al. (1980b)
		120	in 0/50 Proben	
Speck, aufgeschnitten & vakuumverpackt	30°C 10 ⁴ Sporen/g	0	nach 4 d	COLLINS-THOMPSON et al. (1974)
		50	nach 8 d	
		100	nach 8 d	
		150	nach 16 d	
Dosenschinken	10 ² Sporen/g	0	nach 7 d	GREENBERG (1972)
		100	nach 28 d	
		200	nach >180 d	
	10 ⁴ Sporen/g	0	nach 7 d	
		100	nach 13 d	
		200	nach 70 d	
		500	nach >180 d	

Gleichzeitig belegen die Ergebnisse von ISMAIEL und PIERSON (1990b), dass die hemmende Aktivität von Nitrit in Lebensmitteln geringer ausgeprägt ist als in künstlichen Medien.

Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von LÜCKE et al. (1982) überein. Sie zeigen, dass eine Toxinbildung stattfinden kann, bevor das Pökelsalz zu den beimpften Stellen vordringt. Auch eine spätere Veröffentlichung (LÜCKE 1983) weist auf das Botulismusrisiko bei großen Rohschinken hin.

4.2.5.2.3 Interaktion mit anderen Einflussfaktoren

Die Effektivität der Nitritwirkung wird von den umgebenden Bedingungen beeinflusst (Tabelle A64), wobei die Bedeutung der Inkubationstemperatur durch die Ergebnisse von EMODI und LECHOWICH (1969a), SOFOS et al. (1980b) und HYYTIÄ et al. (1997) hervorgehoben wird. Weitere Ergebnisse fassen HOBBS (1976), HAUSCHILD (1982) sowie SCHÜPPEL (1985) zusammen. Die antibiotuline Wirkung des Nitrit wird weiterhin durch eine geringe Kontaminationsrate (GREENBERG 1972; CHRISTIANSEN et al. 1973; INGRAM 1977; SOFOS et al. 1979b), einen niedrigen pH-Wert (HYYTIÄ-TREES 1999) sowie eine erhöhte NaCl-Konzentration (CHRISTIANSEN 1980) verbessert.

TANNER und EVANS (1934) belegen, dass die hemmende Nitritkonzentration auch durch die im Medium enthaltenen Zusätze beeinflusst wird. 5,88ppm in einem mit Glucose versetzten Medium hemmten alle verimpften Stämme, während im Basismedium einige und im mit Schweinefleisch versetzten Medium alle verimpften Stämme wuchsen.

Eine Stärkung des antibiotulinen Effektes durch eine Steigerung der Nitritkonzentration ist relativ gering, wenn gleichzeitig 4,5% NaCl oder niedrige Lagerungstemperaturen (15°C) vorliegen (ROBERTS et al. 1981a).

Einige Zusätze reduzieren die Nitritmindestkonzentration, die für die Unterdrückung der BoNT-Synthese notwendig ist. Dies konnte für Speisesalz (PELROY et al. 1982), Majoranöl (ISMAIEL u. PIERSON 1990b) und Sorbinsäure (SOFOS et al. 1979a) nachgewiesen werden. Gleichzeitig beeinflusst Nitrit die Wirkung anderer Zusätze – so stellten SOFOS et al. (1980a) eine Steigerung der Sorbinsäurewirkung nach Zugabe von Nitrit fest.

4.2.5.3 Zugabe von Natriumchlorid

Die Wirkungsweise von NaCl beruht auf der Reduktion des freien Wasseranteils in einem Medium (HAUSCHILD u. HILSHEIMER 1979; BREWER 2000). Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit der Toxinbildung mit zunehmendem Salzgehalt schnell ab - diesen nicht-linearen Effekt konnten ROBINSON et al. (1982) nachweisen.

Da BAIRD-PARKER und FREAME (1967) bei Salzgehalten von 10,3% zwar ein Auskeimen der Sporen, nicht jedoch vegetatives Wachstum nachweisen konnten, gehen sie davon aus, dass die Hemmung nach Beendigung der Sporenauskeimung und vor Entstehung vermehrungsfähiger Zellen wirkt.

4.2.5.3.1 Einfluss auf die Spore

CANN und TAYLOR (1979) wiesen in Forellen, die mit 10^2 Typ B- und E-Sporen/g beimpft und für 30 Tage bei 10°C gelagert wurden, in 90% der Proben mit einem Salzgehalt von 2,5% BoNT nach. Dagegen war keine der Proben, denen 3,0% NaCl zugesetzt wurde, toxisch.

Die Untersuchungen von SEGNER et al. (1971b) belegen, dass bei einem Salzgehalt von 3,0% ein Auskeimen der Sporen stattfindet, wenn auch kein vegetatives Wachstum.

Die in Tabelle 23 zusammengefassten Untersuchungen haben Sporeninokula verwendet, so dass bei einem Wachstums- bzw. Toxinnachweis auch von einem Nachweis der Sporenauskeimung ausgegangen werden kann.

4.2.5.3.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

Es wird davon ausgegangen, dass ab einer Salzkonzentration von 10% in der wässrigen Phase (a_w -Wert = 0,9353) kein Wachstum von *C. botulinum* mehr möglich ist (KETZ 1956; HOBBS 1976). Bei Vertretern der Gruppe II liegt der Grenzwert bei 5%, a_w -Wert = 0,9707 (OHYE u. CHRISTIAN (1967, zitiert bei SELL 1985; HOBBS et al. 1982, zitiert bei VARNAM u. EVANS 1991; ROBERTS et al. 1996). DOZIER (1924b) legte aufgrund seiner Untersuchungen die tolerierbare Salzkonzentration bei etwa 6% fest, obwohl vereinzelt Wachstum bei 7% festgestellt wurde. TANNER und EVANS (1933a) konnten nachweisen, dass Wachstum und Toxinbildung bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gehemmt werden und diese auch in Abhängigkeit vom Medium variieren (Tabelle A65).

Die Wachstumsraten von *C. botulinum*-Typ A wurden bis zu einem Salzgehalt von 3% im Medium nicht beeinflusst (MONTVILLE 1983). Erst ab einer Konzentration von 4% verlangsamte sich die Wachstumsrate, was durch einen niedrigen pH-Wert verstärkt wurde.

Alle von SEGNER et al. (1971b) untersuchten *C. botulinum*-Typ C-Stämme wurden durch einen Salzgehalt von 3,0% in ihrem Wachstum gehemmt. Bei niedrigeren NaCl-Konzentrationen wurden Varianzen zwischen den einzelnen Stämmen ersichtlich. Während Wachstum aller Stämme bei 2,0% Salzgehalt nachweisbar war, hemmten 2,5% NaCl einzelne Stämme.

SEGNER et al. (1966) konnten bei 16, 21 und 30°C erst ab 5,0% NaCl eine vollständige Hemmung des Wachstums von *C. botulinum*-Typ E für die Dauer eines Jahres nachweisen.

In Robertsons Fleischbouillon wurde innerhalb von drei Monaten kein BoNT-Typ E nachgewiesen, wenn mindestens 4,5% NaCl zugesetzt wurden (ABRAHAMSSON et al. 1966). Bei niedrigeren Salzgehalten war eine Toxinsynthese nachweisbar - besonders bei optimalen Temperaturen. Um über die Dauer von sechs Monaten eine Toxinbildung bei Temperaturen von 3,4 bis 30,0°C zu unterdrücken, benötigten EMODI und LECHOWICH (1969a) eine Salzkonzentration von 4,87%.

Lebensmittel mit variierenden Salzgehalten wurden mehrfach auf eine mögliche Toxinbildung untersucht (Tabelle 23).

Tabelle 23: Einfluss der NaCl-Konzentration auf das Wachstum von bzw. die Toxinbildung durch *C. botulinum* in verschiedenen Lebensmitteln

Lebensmittel	Weitere Faktoren	NaCl (%)	Nachweis von BoNT/Wachstum	Literaturquelle
Frankfurter Würstchen	10 ³ Sporen/g; 150ppm Nitrit; 27°C	2,5	nach 6 d	BARBUT et al. (1986)
		3,25	nach 12 d	
		4,0	nach 30 d	
japanische Nudelsuppe	2-3x10 ³ Sporen; 30°C; pH ca. 6,5	3,9	nach 7 d	IMAI et al. (1990)
		4,0	nach 14 d	
geräucherte Maräne	3x10 ³ Sporen/g; 27°C, 83 Tage	2,3	nach 7 d	CUPPETT et al. (1987)
		4,4	nach 42	
		6,2	negativ	

Fortsetzung der Tabelle 23

Spagetti mit Fleischsoße	10 ³ Sporen/g; 15°C, 42 Tage, pH 5,5	0	nach 21 d	SIMPSON et al. (1995)
		1	nach 28 d	
		2	negativ	
Krebsersatzfleisch	10 ⁴ Sporen/g; pasteurisiert bei 80°C; Lagerung bei 25°C	2,1	nach 7 d	PETERSON et al. (2002)
		2,4	nach 7 d	
		2,7	negativ	
geräucherter Döbel	10 ⁶ Sporen/ Fisch; Lagerung bei 20 bis 25°C, 7 Tage	<1,0	in 85% der Proben	CHRISTIANSEN et al. (1968)
		1,0–1,49	in 67% der Proben	
		1,5–1,99	in 58% der Proben	
		2,0-2,49	in 31% der Proben	
		2,5-2,74	in 12% der Proben	
		>2,75	negativ	
wärme-behandelte Lachssteaks	10 ² Sporen/g; Lagerung bei 25°C, 7 Tage	2,0-4,0	in allen Proben	PELROY et al. (1982)
		4,0-4,5	in 87,5% der Proben	
		4,5-5,0	in 70% der Proben	
		5,0-5,5	in 37,5% der Proben	
		5,5-6,0	in 50% der Proben	
		6,0-6,5	in 16,6% der Proben	
		>6,5	negativ	
Kaviar	10 ⁶ Sporen/150g; Inkubation bei 30°C, 14 Tage; pH 5,6	2,27	in 100% der Proben	HAUSCHILD und HILSHEIMER (1979)
		3,95	in 33,3% der Proben	
		4,67	negativ	
Kochschinken	10 ⁵ Sporen/g, vakuumverpackt, Inkubation bei 25°C	2,1	nach 2 d 3/3	PIVNICK und BARNETT (1965)
		2,7	nach 5 d 3/3	
		3,4	nach 5 d 1/3	

In rohen Heringen, die in einer Lake mit 6,7% NaCl eingelegt wurden, konnten HYYTIÄ et al. (1999) innerhalb einer sechswöchigen Lagerung bei 6°C weder Wachstum noch Toxinbildung nachweisen.

4.2.5.3 Interaktion mit anderen Einflussfaktoren

Je höher der Salzgehalt ist, desto eher müssen andere Parameter in für *C. botulinum* optimalen Bereichen liegen, um eine Toxinbildung zu gewährleisten. Dies ist unter anderem für die Temperatur (ABRAHAMSSON et al. 1966), den pH-Wert (IMAI et al. 1990) sowie den Salzgehalt (PIVNICK et al. 1969, zitiert bei LECHOWICH et al. 1978) belegt.

Weiterhin beeinflussen die Kontaminationsrate (PETERSON et al. 2002), der *C. botulinum*-Typ (CANN u. TAYLOR 1979), die Art der verwendeten Stämme (BAIRD-PARKER u. FREAME 1967) sowie das Nährmedium (TANNER u. EVANS 1933a) die für die Unterbindung der Toxinbildung benötigte Mindestkonzentration.

4.2.6 Räuchern

Diese Form der chemischen Konservierung von Lebensmitteln spielt besonders im Bereich der Fisch- und Fleischbearbeitung eine Rolle.

Die antimikrobielle Wirkung beruht zum einen auf der Reduktion der a_w -Wertes und zum anderen auf den im Rauch vorhandenen antimikrobiellen Substanzen. Zu diesen zählen Essigsäure, Propionsäure, Ketone, Kresole sowie Phenole (SPANYAR et al. 1966). Bei der Heißräucherung wird durch die einwirkende Hitze eine zusätzliche antimikrobielle Wirkung genutzt.

Da oft nur eine oberflächliche Wirkung erzielt und somit das Überleben und Auskeimen eventuell vorhandener, bakterieller Sporen im Inneren nicht beeinflusst wird (KETZ 1956), sollte das Räuchern mit anderen konservierenden Behandlungsverfahren kombiniert werden. Untersuchungen belegen, dass sich eine Kombination von Räuchern und Pökeln positiv auf die mikrobielle Stabilität und die Unterdrückung der Toxinbildung durch *C. botulinum* auswirkt (CHRISTIANSEN et al. 1968; EKLUND et al. 1982). Es ist empfehlenswert, weitere *C. botulinum* hemmende Faktoren zu nutzen, da eine kontinuierliche und genaue Kontrolle des Salzgehaltes in Räucherprodukten schwierig ist (CANN u. TAYLOR 1979).

4.2.7 Verschiedene Zusätze

4.2.7.1 Einfluss auf die Spore

Ein Auskeimen von *C. botulinum*-Sporen konnte in verschiedenen Nährmedien nachgewiesen werden, wobei sich **Hefeextrakt** (TREADWELL et al. 1958), **L-Alanin** und **L-Lactat** (PLOWMAN u. PECK 2002) sowie **Glukose** (ANDO u. IIDA 1970) als essenziell erwiesen.

Weiterhin kann das Auskeimen von Sporen durch verschiedene Zusätze beschleunigt werden. Dies wurde z.B. für **Natriumbikarbonat** (BROUSSOLLE et al. 2002) und **L-Cystein** (ROWLEY u. FEEHERRY 1970) belegt.

Die Untersuchungen von PLOWMAN und PECK (2002) belegen, dass eine Kombination verschiedener, das Auskeimen fördernder Faktoren die Bildung vegetativer Zellen beschleunigt, wobei Varianzen innerhalb der Spezies *C. botulinum* auftreten (ALBERTO et al. 2003).

Verschiedene Kohlenhydrate konnten als effektive Auskeimungsförderer nachgewiesen werden, woraus ANDO (1971) schließt, dass Glukose während des Auskeimens verstoffwechselt wird.

ELLER et al. (1968) wiesen eine sporizidale Wirkung der **Ascorbinsäure** für *C. botulinum*- und andere Clostridien-Sporen nach. Eine reversible Hemmung der Sporenauskeimung konnte für **Kaliumsorbat** nachgewiesen werden (SMOOT u. PIERSON 1981), die Stärke ist dabei pH-Wert-abhängig (SEWARD et al. 1982). Die das Auskeimen von *C. botulinum*-Typ A-Sporen hemmende Wirkung für **Sorbinsäure** wurde durch BLOCHER und BUSTA (1985) belegt.

4.2.7.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

Für **Glukose** konnten EMODI und LECHOWICH (1969b) nachweisen, dass ein entsprechend hoher Gehalt zu einer Reduktion des a_w -Wertes führt und so das Wachstum und die Toxinbildung inhibiert. Im gesamten Temperaturbereich (7,2 – 30°C) konnte bei einem Zusatz von 22,5% Glucose kein Wachstum für die untersuchten Stämme von *C. botulinum*-Typ E nachgewiesen werden. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde Wachstum in den oberen Temperaturbereichen festgestellt.

HALL und MAURER (1986) wiesen für **Propylenglykol** eine Unterbindung der Toxinsynthese ab einer Konzentration von 14,3% nach. Wurde gleichzeitig Nitrit zugegeben, konnte die benötigte Propylenglykolkonzentration auf 6,2% (31,2 ppm Nitrit) bzw. 9,1% (24,4 ppm Nitrit) gesenkt werden.

Für verschiedene **Aldehyde** und **Ketone** konnten inhibitorische Aktivitäten gegenüber *C. botulinum* nachgewiesen werden (BOWLES u. MILLER 1993a,b), wobei eine pH-Wert-Abhängigkeit festgestellt wurde.

Die primäre antimikrobielle Wirkung organischer Säuren bzw. ihrer Salze beruht auf einer Reduktion des pH-Wertes (STRATFORD 2000). Eine vergleichende Übersicht bezüglich der hemmenden Wirkung auf die Toxinsynthese gibt Tabelle A66. SUAREZ REBOLLO et al. (1997) konnten in keiner der mit 2,0 und 3,3% **Propionsäure** versetzten Proben BoNT nachweisen, unabhängig von der variierenden Anzahl inokulierter Sporen. Bei niedrigeren Propionsäurekonzentrationen sind zusätzliche hemmende Faktoren notwendig, um eine Toxinbildung zu unterbinden.

Die Ergebnisse von MEYER et al. (2003) belegen, dass durch die Zugabe von 2,5% **Milchsäure** clostridial bedingte Verderbniserscheinungen verzögert auftreten. Auch bezüglich der Hemmung der BoNT-Synthese wurden entsprechende Nachweise erbracht (Tabelle 24).

Tabelle 24: Verzögerung der BoNT-Synthese durch Natriumlaktat

Medium	Rahmenbedingungen	Natriumlaktat (%)	Erster BoNT-nachweis (d)	Literaturquelle
Pepton-Hefeextrakt,	10 ⁴ Sporen/ml; pH 6,1; 15°C	0	14	HOUTSMA et al. (1994)
		1,0	14	
		2,0	21	
	10 ⁴ Sporen/ml; pH 6,1; 20°C	0	5	
		1,5	11	
		2,5	15	
10 ⁴ Sporen/ml; pH 6,1; 30°C	4,0	11		
Geflügelfertigprodukt	2,2 Sporen/g; 27°C	0	3	MAAS et al. (1989)
		2,0	5	
		2,5	6	
		3,0	7	
		3,5	8	

NOTERMANS et al. (1985) wiesen eine Verzögerung der BoNT-Synthese durch **Zitronensäure** nach. Je höher die Konzentration ist, desto größer muss die vorhandene Zell- oder Sporenanzahl sein, um Wachstum nachweisen zu können (GRAHAM u. LUND 1986). Beeinflusst wird die antibotuline Wirksamkeit durch das Vorhandensein von Chelatkomplexbildenden zweiwertigen Metallionen. Gleichzeitig wiesen die Autoren nach, dass mehr Zeit vergeht, bis nach einer Sporenverimpfung Wachstum nachweisbar ist als in einem vergleichbaren Inokulum vegetativer Zellen.

In mit 0,89% Zitronensäure versetzten Medien wurde Wachstum bei pH-Wert 4,1 nach 8,5 Wochen festgestellt (YOUNG-PERKINS u. MERSON 1987), wenn dem Medium 6% Sojaprotein zugesetzt wurden.

Im Rahmen mehrerer Untersuchungen konnte die antibotuline Wirkung der **Sorbinsäure** nachgewiesen werden (YORK u. VAUGHN 1954; SOFOS et al. 1980a; PIERSON u. SMOOT 1982; ROBERTS et al. 1982; BLOCHER u. BUSTA 1983a). Die für die Hemmung von Clostridien benötigte Konzentration der undissoziierten Säure wird mit 1,0% angegeben (RAY 2001). Beachtenswert dabei ist, dass die Konzentration der undissoziierten Säure pH-Wert-abhängig ist (SOFOS u. BUSTA 1981). Eine Konzentration von 1000 mg/l reduziert die Wachstumswahrscheinlichkeit bei 30°C für 14 Tage um den Faktor 10⁸. Liegt der pH-Wert <5, steigt der Faktor deutlich an (LUND et al. 1987).

Die Wachstumsraten, und damit die Sensibilität gegenüber der Säure, variieren von Stamm zu Stamm (BLOCHER et al. 1982).

Mehrere Untersuchungen belegen die Verzögerung der Toxinbildung in Lebensmitteln (Tabelle 25).

Tabelle 25: Verzögerung der BoNT-Synthese durch Sorbat

Lebensmittel	Rahmenbedingungen	Sorbat (%)	BoNT-Nachweis	Literaturquelle
vakuumverpackter Schinkenspeck	10 ³ Sporen/g; 27°C	0	19 d	IVEY et al. (1978)
		0,13	>110 d	
		0,26	>110 d	
Schinkenspeck	10 ³ Sporen/g; 27°C, 15d	0	in 7/50 Proben	SOFOS et al. (1980b)
		0,26	in 3/50 Proben	
gekochte, vakuumverpackte Kartoffeln	7,0 log ₁₀ pro 0,7 bis 0,8 kg; 20°C	0	nach 14 d	NOTERMANS et al. (1985)
		5*	nach 28 d	

* Kartoffeln wurden für 2 Minuten in eine Lösung getaucht, die 2% Ascorbinsäure und 5% Sorbinsäure enthält

Die Effektivität der Sorbinsäurewirkung wird von anderen Faktoren beeinflusst. Die Ergebnisse von ROBERTS et al. (1982) zeigen, dass die antibotuline Wirkung bei 3,5% NaCl stärker ist als bei 2,5% NaCl und niedrige Lagerungstemperaturen den Effekt weiter verstärken.

MILLER et al. (1993) belegen, dass die antibotulinen Wirkungen organischer Säuren stark variieren (Tabelle A66). Damit werden die Untersuchungsergebnisse von SMELT et al. (1982) bestätigt. Sie besagen, dass Essig- und Milchsäure stärker das Wachstum von *C. botulinum* (bei pH-Wert 4,4) hemmen als Zitronen- oder Salzsäure.

Auch Säuren mit zwei Carboxylgruppen haben unterschiedliche Potenziale, die BoNT-Synthese zu unterdrücken (DYMICKY et al. 1987; Tabelle A67).

Weiterhin wurden antibotuline Wirkungen für verschiedene **Gewürze** (HALL u. MAURER 1986; ISMAIEL u. PIERSON 1990a; NYCHAS u. TASSOU 2000; NEVAS et al. 2004), **Schwefeldioxid** (TOMPKIN et al. 1980), **Glyzeride** (CHAIBI et al. 1996a,b), **Fettsäuren** (FOSTER u. WYNNE 1948; GRECZ et al. 1959), **Harzverbindungen** (DAIFAS et al. 2004) sowie **Phosphatemulgierer** (ECKNER et al. 1994) nachgewiesen.

4.2.7.3 Einfluss auf das Botulinumtoxin

BHATTACHARYYA und SUGIYAMA (1989) untersuchten die Wirkung verschiedener Chelatbildner, wobei sie Differenzen in Abhängigkeit von der Art des Chelatbildners (Tabelle A68) und des BoNT-Typs (Tabelle A69) feststellten.

4.3 Biologische Faktoren

4.3.1 Inokulum

Mit steigender Inokulumgröße steigt die Wahrscheinlichkeit der Vermehrung (ZHAO et al. 2002; Tabelle A70). BAKER und GENIGEORGIS (1990) führen 7,4% der experimentellen Unterschiede auf Variationen des Sporeninokulums zurück. Damit hat nur die Temperatur einen stärkeren Einfluss.

Die Anzahl der verwendeten Sporen beeinflusst auch, ob nur ein Auskeimen der Sporen oder zusätzlich von vegetativen Zellen gebildetes BoNT nachgewiesen werden kann. Im Rahmen der Untersuchungen von RIEMANN (1967, zitiert bei SELL 1985) war die für einen Toxinnachweis benötigte Sporenanzahl 10^2 bis 10^{10} mal höher als die zum Auskeimen benötigte Menge.

Prinzipiell konnte auch ein positiver Zusammenhang zwischen Anzahl der inokulierten Sporen und erstem Toxinnachweis (Tabelle A71) festgestellt werden (SOLOMON u. KAUTTER 1988). Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse von TER STEEG und CUPPERS (1995) sowie WHITING und ORIENTE (1997). Ab einer gewissen Inokulumkonzentration im Medium kann die BoNT-Synthese jedoch nicht weiter verstärkt werden (SOLOMON et al. 1990) - möglicherweise weil die maximale Synthesekapazität erreicht ist.

Die Anzahl der verimpften Sporen hat einen um so größeren Einfluss auf die Toxinsynthese, je ungünstiger die anderen Einflussfaktoren für *C. botulinum* sind (BAKER u. GENIGEORGIS 1990; FRANCIOSA et al. 1999). Mit zunehmender Inokulumgröße konnte eine Toxinbildung bei niedrigeren Temperaturen und höheren Salzgehalten nachgewiesen werden (JENSEN et al. 1987; MENG u. GENIGEORGIS 1993). Es gibt verschiedene Theorien, die dieses Phänomen zu erklären versuchen (ZHAO et al. 2000). Eine jüngere Untersuchung vermutet, dass die Sporen untereinander kommunizieren (ZHAO et al. 2003), diese Fähigkeit wird auch als „Quorum sensing“ bezeichnet. Grundlage ist die Sekretion von Signalmolekülen, deren Konzentration der Zelldichte einer Population entspricht.

Neben der Anzahl der verimpften Sporen beeinflussen noch andere mit dem Inokulum in Zusammenhang stehende Bedingungen die Vermehrungs- und Toxinbildungsfähigkeit. So konnten SOLOMON et al. (1990) bei Verwendung von heterogenen Inokula (Sporen verschiedener *C. botulinum*-Typen) schneller BoNT nachweisen als in Proben mit homogenen Inokula. Des Weiteren ist entscheidend, auf welche Art und Weise die Sporen auf der Probe verimpft werden – bei Stichbeimpfungen kann BoNT eher nachgewiesen werden als bei oberflächlichen Beimpfungen (SUGIYAMA et al. 1981). Auch die Effektivität des Räucherns von Fisch in Bezug auf das Abtöten von Sporen ist davon abhängig, ob diese Sporen oberflächlich aufgetragen oder intramuskulär verimpft werden (EKLUND et al. 1982). Ergebnisse experimenteller Untersuchungen hängen weiterhin davon ab, ob als Inokulum Sporen oder vegetative Zellen verwendet werden. So konnten ABRAHAMSSON et al. (1966) bei 3°C Wachstum nachweisen, wenn sie ein Gemisch aus Sporen und vegetativen Zellen verimpften. Bei der alleinigen Verwendung von Sporen konnte auch nach einem längeren Zeitraum keine Vermehrung nachgewiesen werden. Bestätigt wird dies durch AJMAL (1968a) sowie JENSEN et al. (1987).

4.3.2 Interaktion mit anderen Mikroorganismen

Schon MEYER (1928) wies durch verschiedene Untersuchungen Wechselwirkungen zwischen *C. botulinum* und anderen Mikroorganismen nach. Die Einflussnahme geschieht über eine direkte Veränderung von Umweltbedingungen, die Abgabe von Stoffwechselprodukten oder infolge Konkurrenz um vorhandene Nährstoffquellen (BÖHNEL 1987; LYON u. REDDMANN 2000). Aus Übersichtsgründen wird auf die von Typ zu Typ variierenden Empfindlichkeiten gegenüber dem Vorhandensein anderer Keime nicht näher eingegangen.

Die Beeinflussung von *C. botulinum* durch andere Mikroorganismen ist unter zwei Aspekten zu betrachten. Zum einen ist eine Einflussnahme im Lebensmittel zu bedenken. Da nur wenige Lebensmittel steril sind, müssen auch die Auswirkungen des Vorhandenseins anderer Mikroorganismen auf das Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* beachtet werden, um mögliche Risiken einschätzen zu können. Andererseits muss auch die Beeinflussung durch Bakterien des GIT bedacht werden, da die Untersuchungen von SUGIYAMA (1979) belegen, dass eine Kolonisation des Darmes mit *C. botulinum* bei einer gestörten Magen-Darm-Flora leichter möglich ist. An dieser Stelle soll noch einmal auf das Krankheitsbild des Säuglingsbotulismus und das des Viszeralen Botulismus beim Rind hingewiesen werden (Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2).

Im Folgenden soll sowohl auf symbiotische als auch auf antagonistische Beziehungen von *C. botulinum* zu verschiedenen anderen Mikroorganismen eingegangen werden.

4.3.2.1 Wirkungsmechanismen

4.3.2.1.1 Verderbnis

Bezüglich des Botulismusrisikos besteht die Funktion der Verderbnisflora darin, das Lebensmittel ungenießbar zu machen, bevor BoNT gebildet ist (LARSON u. JOHNSON 1999). Kommt es durch Bearbeitungsprozesse (z.B. Bestrahlung mit niedrigen Dosen) zu einer Reduktion dieser Keime und gleichzeitig nicht zu einer Beeinträchtigung von *C. botulinum*, fehlen konkurrierende Mikroorganismen, was die Vermehrungs- und Toxinbildungsbedingungen für *C. botulinum* deutlich verbessert (BÖGL et al. 1993).

4.3.2.1.2 Beeinflussung des pH-Wertes

Je nach Medium kann sowohl eine mikrobiell bedingte Steigerung als auch eine Reduktion der Wasserstoffionenkonzentration zu einer Verbesserung der Wachstumsbedingungen für *C. botulinum* führen.

Da mikrobielle Enzymaktivitäten die pH-Wert-Veränderungen verursachen, sind diese temperaturabhängig (PATEL et al. 1978).

Einen pH-Wert-Anstieg aufgrund des Vorhandenseins von Hefen (***Mycoderma-Spezies***) und Schimmelpilzen (***Penicillium-Spezies***) belegen die Untersuchungen von TANNER et al. (1940). Infolgedessen gelang ein Toxinnachweis in primär sauren (pH-Wert <4,5) Lebensmitteln (Kapitel 4.4.2.2).

Auch in *Aspergillus gracilis*-Mycelien konnte ein Anstieg des pH-Wertes nachgewiesen werden (ODLAUG u. PFLUG 1979), was Wachstum von *C. botulinum* in Tomatensaft mit einem ursprünglichen pH-Wert von 4,2 ermöglichte.

Die Untersuchungsergebnisse von QUORTRUP und SUDHEIMER (1943) belegen, dass *Pseudomonas aeruginosa* den pH-Wert einer Nährlösung erhöht. Während der Ausgangswert bei 6,8 lag, konnte nach 24 bzw. 192 Stunden ein Wert von 7,3 bzw. 8,0 ermittelt werden.

Milchsäurebakterien reduzieren durch Abbau vorhandener Kohlenhydrate den pH-Wert eines Lebensmittels (JOHNSON 2000). So konnte von CRANDALL et al. (1994) in Rindfleischproben, die neben *C. botulinum* auch verschiedene *Pediococcus pentosaceus*-Stämme enthielten, ein niedrigerer pH-Wert nachgewiesen werden als in solchen, in denen dieser Mikroorganismus fehlte. Infolgedessen wird ein Wachstum von *C. botulinum* gehemmt (RODGERS et al. 2003a,b).

Vor allem Glucogenreserven dienen den pH-Wert senkenden bakteriellen Enzymen als Nährstoffquelle im Fleisch (PATEL et al. 1978).

4.3.2.1.3 Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes

Inwieweit der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre reduziert sein muss, um Wachstum von *C. botulinum* zu ermöglichen, wurde in Kapitel 4.6.1 erörtert. Daher soll an dieser Stelle nur darauf hingewiesen werden, dass anaerobe Verhältnisse auch sekundär durch sauerstoffzehrende Aerobier geschaffen werden können (MÜLLER 1989a).

QUORTRUP und SUDHEIMER (1943) konnten dies für *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen. Innerhalb von fünf Stunden war kein Sauerstoff mehr in der Gasatmosphäre vorhanden.

SMELT et al. (1982) konnten in sauren Lösungen (pH<4,6) ein Wachstum von *C. botulinum* nachweisen und führten dies unter anderem darauf zurück, dass der parallel verimpfte *Bacillus subtilis* den E_h-Wert senkt und so günstigere Bedingungen schafft. Weiterhin sehen die Autoren diesen Pathomechanismus als ursächlich für entsprechende Ergebnisse von ODLAUG und PFLUG (1979) an.

4.3.2.1.4 Bakteriozine

Die Bakteriozinbildung durch *C. botulinum* selbst wurde im Kapitel 2.1.2.3 besprochen, an dieser Stelle soll ausschließlich die Wirkung von Bakteriozinen anderer Spezies auf *C. botulinum* besprochen werden.

Bei Bakteriozinen handelt es sich um biologisch aktive, mikrobiell produzierte Proteine, die das Wachstum anderer Keime hemmen (TAGG et al. 1976). Einen allgemeinen Überblick über die verschiedenen Bakteriozine und deren Anwendungsmöglichkeiten geben O'KEEFFE und HILL (2000) sowie KEMPERMAN et al. (2003) - aufgrund ihres Einsatzes in der Lebensmittelindustrie werden die bakteriozinbildenden Bakterien auch als Starterkulturen bezeichnet.

Für die Beeinflussung von *C. botulinum* sind die Bakteriozine Nisin und Pediocin von Bedeutung, welche von einigen **Lactococcus- bzw. Pediococcus-Spezies** gebildet werden. Nisin kommt in Milch und Milcherzeugnissen vor und ist gegen gram-positive Keime aktiv (BAYOUMI 1991; BECKER 2000).

1969 wurde Nisin durch die WHO als Zusatzstoff akzeptiert (LINDSTRÖM et al. 2001b). In den USA ist ein Zusatz von maximal 10^4 IU/ml in bestimmten Lebensmitteln erlaubt (FEDERAL REGISTER 1988, zitiert bei MAZZOTTA et al. 1997). Eine entsprechende Zulassung als Lebensmittelzusatzstoff existiert in Deutschland nicht.

Eine anticlostridiale Wirkung wurde durch mehrere Untersuchungen belegt (HIRSCH et al. 1951; SCOTT u. TAYLOR 1981; OKEREKE u. MONTVILLE 1991a,b; THOMAS et al. 2002). Wenn man die Empfindlichkeit von *C. botulinum* gegenüber Bakteriozinen mit der anderer Spezies vergleicht, kann von einem vergleichsweise resistenten Verhalten gesprochen werden. Die zu einer bestimmten Keimreduktion benötigte Konzentration liegt deutlich höher als die anderer Mikroorganismen (MAZZOTTA et al. 1997).

Folglich liegt die verderbnisverhindernde Nisinkonzentration deutlich unter der, die die Toxinbildung durch *C. botulinum* unterdrückt (DAVIES u. DELVES-BROUGHTON 2000). Aus Übersichtsgründen soll die Existenz nisin-resistenter Stämme nur erwähnt werden – nähere Untersuchungsergebnisse können bei MAZZOTTA et al. (1997), MAZZOTTA und MONTVILLE (1999) sowie MAZZOTTA et al. (2000) nachgelesen werden.

Die Sensitivität von *C. botulinum* gegenüber Nisin bzw. Pediocin variiert je nachdem, welcher bakteriozin-produzierende Mikroorganismus koinokuliert wird (CRANDALL u. MONTVILLE 1993).

Des Weiteren variiert die Empfindlichkeit von Stamm zu Stamm (Tabelle A72). SCOTT und TAYLOR (1981) untersuchten die Empfindlichkeit von sechs verschiedenen *C. botulinum*-Stämmen und stellten fest, dass Typ A resistenter als Typ B und dieser wiederum unempfindlicher als Typ E ist. Bestätigt werden diese prinzipiellen Ergebnisse durch MAZZOTTA et al. (1997) und RODGERS et al. (2003a), wobei MAZZOTTA et al. (1997) diese Differenzen nur bei Verwendung eines Sporeninokulums nachvollziehen konnten. Wurden vegetative Zellen verimpft, konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen von SOMERS und TAYLOR (1981) zeigen, dass die Effektivität von Nisin bezüglich einer Unterdrückung der BoNT-Synthese unter anderem vom pH-Wert des Mediums und von den verimpften *C. botulinum*-Stämmen beeinflusst wird.

In verschiedenen Lebensmitteln wurde untersucht, ob und inwieweit die Zugabe von Bakteriozinen bzw. bakteriozin-produzierenden Mikroorganismen das Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* hemmt (Tabelle 26).

Tabelle 26: Beeinflussung der BoNT-Synthese durch Bakteriozine oder bakteriozinproduzierende Mikroorganismen

Lebensmittel	Weitere Faktoren	Bakteriozin bzw. -prod. Stamm	BoNT-Nachweis	Literaturquelle
Rinderhackfleisch	8°C, 28 Tage	kein Zusatz	pos.(3/3)	LINDSTRÖM et al. (2001b)
		250 IU/g Nisin	pos.(3/3)	
		500 IU/g Nisin	pos.(3/3)	
	4°C, 28 Tage	kein Zusatz	neg.(0/3)	
		250 IU/g Nisin	neg.(0/3)	
		500 IU/g Nisin	neg.(0/3)	
Rindfleisch, vakuumverpackt	10°C	kein Zusatz	nach 6 d	CRANDALL et al. (1994)
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	nach 10 d	
	4°C	kein Zusatz	nach 31 d	
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	nach 17 d	
Geräucherte Makrele, unter 100% CO ₂ gelagert	26°C	409 IU/g	nach 2,5 d	TAYLOR et al. (1990)
		600 IU/g	nach 4 d	
	10°C	173 IU/g	nach 13 d	
		409 IU/g	nach 14 d	

Zu beachten ist, dass in Fleischproben die Wirksamkeit von Nisin herabgesetzt ist, da das Protein an Fleischpartikel gebunden wird (SOMERS u. TAYLOR 1981).

Prinzipiell haben andere Faktoren einen stärkeren Einfluss auf die Toxinbildung. Dies konnte für die Temperatur (CRANDALL u. MONTVILLE 1993; RODGERS et al. 2003a), die Inokulumgröße (SCOTT u. TAYLOR 1981) und –art (MAZZOTTA et al. 1997) sowie den pH-Wert und den NaCl-Gehalt (MAZZOTTA et al. 1997) nachgewiesen werden.

Trotzdem wird davon ausgegangen, dass Nisin synergistisch mit anderen das Wachstum und die Toxinbildung hemmenden Faktoren wirkt (HOLLEY 1981).

4.3.2.2 Einfluss auf die Spore

KAUTTER et al. (1966) konnten für eine bakteriozin-ähnliche Substanz, welche durch **nicht-toxische C. botulinum-Typ E-Stämme** produziert wird, eine bakteriostatische Wirkung gegenüber toxischen C. botulinum-Typ E-Stämmen nachweisen. Dieser Nachweis gelang nicht für die Typen A, B und F.

Die Untersuchungen von LAU et al. (1974) belegen, dass das Auskeimen von Typ B-Sporen (anders als das vegetative Wachstum) durch Boticin P, welches durch einen nicht-toxischen C. botulinum-Typ E-Stamm produziert wird, nicht beeinflusst wird.

Auch durch den vom **Moraxella-Stamm A-43** produzierten Hemmstoff konnte ein Auskeimen von C. botulinum-Typ E-Sporen nicht unterbunden werden (KWAN u. LEE 1974).

4.3.2.3 Einfluss auf die vegetative Zelle

Für *C. sporogenes* konnten JORDAN und DACK (1924), STARK et al. (1928) sowie HUHTANEN (1991) eine von der Keimzahl abhängige Hemmung der BoNT-Synthese durch *C. botulinum* nachweisen. Auch für **andere Clostridien-Spezies** wurde eine hemmende Wirkung belegt (KAUTTER et al. 1966; SMITH 1975b; SULLIVAN et al. 1988).

Bacillus licheniformis wirkt inhibierend auf *C. botulinum*-Typ F (Tabelle A73). Auch für *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis* wurden antimikrobielle Aktivitäten gegenüber *C. botulinum* nachgewiesen (Graham 1978; GIRARDIN et al. 2002). Anders interpretieren RAATJES und SMELT (1979) ihre Ergebnisse: sie konnten in botulinussporenhaltigen Proben auch bei niedrigen pH-Werten eine BoNT-Synthese nachweisen, wenn *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* koinokuliert wurden. Die Autoren führen dies auf die Reduktion des Redoxpotenzials durch die Bazillen zurück. TANAKA (1982) konnte ebenfalls weder für *Bacillus subtilis* noch für *Bacillus licheniformis* eine hemmende Wirkung auf die Toxinbildung durch *C. botulinum* nachweisen. Deshalb muss vermutet werden, dass weitere, bisher unbekannte Faktoren die Wechselwirkungen unter den Mikroorganismen beeinflussen. SMELT et al. (1982) sprechen *Bacillus subtilis* eher noch eine das Wachstum von *C. botulinum* fördernde Wirkung zu.

Aufgrund der Synthese von Milchsäure und der damit verbundenen pH-Wert-Senkung wurde für verschiedene **Laktobazillen** eine hemmende Wirkung sowohl auf *C. botulinum* (SCHOOP u. HARMS 1935; DÜLLICK 1957; TANAKA et al. 1980; SULLIVAN et al. 1988; SKINNER et al. 1999; RODGERS et al. 2003a,b) als auch auf andere, aus lebensmittelhygienischer Sicht wichtige Keime (GILLILAND u. SPECK 1977) nachgewiesen. Die Wirkung der Laktobazillen kann durch verschiedene externe Faktoren beeinflusst werden. Eine Verstärkung ist durch die Zugabe fermentierbarer Kohlenhydrate möglich (Tabelle A74). Auf diese Art und Weise kann die zur Haltbarmachung von Schinken benötigte Natriumnitritkonzentration reduziert werden. Andererseits wird das Wachstum vorhandener Laktobazillen in einigen Lebensmitteln gehemmt (KARAIANOGLU et al. 1977), was sich auch auf das Verhalten von *C. botulinum* auswirken kann.

Eine Beeinflussung des Wachstums und der Toxinbildung von *C. botulinum* wurde weiterhin für **Penicillium- und Mycoderma-Spezies** (TANNER et al. 1940), **Saccharomyces cerevisiae** (DAIFAS u. SMITH 2003) und **Pseudomonas aeruginosa** (QUORTRUP u. SUDHEIMER 1943) nachgewiesen.

4.3.3 Lysozym

Hierbei handelt es sich um ein bakteriolytisch wirkendes Enzym, welches Bestandteile bakterieller Zellmembranen zerlegt (KOLB 2000b), weshalb es als Konservierungsmittel vielseitig eingesetzt wird (CUNNINGHAM et al. 1991). Es kommt natürlicherweise in einer Vielzahl von Lebensmitteln vor, so z.B. in Obst und Gemüse (CHANDAN u. EREIFEJ 1981), Fischen (LIE et al. 1989) sowie Eiern (PROCTOR u. CUNNINGHAM 1988).

Aufgrund der Hitzeempfindlichkeit des Lysozym kommen PECK und FERNANDEZ (1995) zu unterschiedlichen Auskeimungs- und Wachstumsraten - je nachdem, ob der Lysozymzusatz vor oder nach der Probenerhitzung erfolgte.

4.3.3.1 Einfluss auf die Spore

Mehrere Studien belegen, dass der Zusatz von Lysozym die Hitzeresistenz von *C. botulinum*-Sporen verstärkt (PECK et al. 1992a,1993; GRAHAM et al. 1996a; PECK 1997; FERNANDEZ u. PECK 1999). Der Zusatz von 5 µg/ml Lysozym steigerte die Überlebensfähigkeit von Typ A-Sporen um das 3-fache und die von Typ E-Sporen um das 1800-fache (ALDERTON et al. 1974). In den Untersuchungen von LINDSTRÖM et al. (2003) waren die D-Werte der in den Forellen vorkommenden Sporen höher als die, die in den Maränen gefunden wurden. Eine mögliche Ursache dafür sehen die Autoren in den verschiedenen Lysozymkonzentrationen der Fischmuskulatur.

Begründet ist dies in der Fähigkeit, die Sporenhülle zu durchdringen und das durch die Wärme beeinträchtigte System zur Sporenauskeimung zu reaktivieren (GOULD 1984, zitiert bei LUND u. PECK 1994; PECK et al. 1992b). Dagegen konnte eine regenerative Wirkung nicht bei strahlengeschädigten Sporen nachgewiesen werden (ROWLEY et al. 1983b).

PECK et al. (1993) zeigen auf, dass eine Sporenbehandlung mit Thioglykolat die Permeabilität für Lysozym steigert.

Aufgrund des Wirkungsmechanismus ist verständlich, dass Lysozym keinen Einfluss auf das Auskeimen von Sporen hat, die nicht wärmebehandelt wurden. Die Ergebnisse von GRAHAM et al. (1996) bestätigen dies.

Aus lebensmittelhygienischer Sicht ist dabei bedenklich, dass die in Lebensmitteln vorkommenden Konzentrationen oft höher sind als die, die das Auskeimen hitzegeschädigter Sporen initiieren (LUND u. PECK 1994).

4.3.3.2 Einfluss auf die vegetative Zelle

In Tabelle 27 sind Untersuchungsergebnisse dargestellt, nach denen Lysozym keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum vegetativer Zellen hat, wenn die Sporen zuvor nicht erhitzt wurden.

Tabelle 27: Einfluss der Lysozymkonzentration auf das Wachstum nicht-erhitzter, saccharolytischer *C. botulinum*-Sporen (modifiziert nach GRAHAM et al. 1996a)

Lysozym-konzentration	Inkubationstage, bis Wachstumsnachweis möglich			
	16°C	12°C	8°C	5°C
0 µg/ml	2	2	5 - 6	12
25 µg/ml	2	2	5 - 6	12

HUGHEY und JOHNSON (1987) dagegen stellten eine schwache Hemmung des vegetativen Wachstum infolge Lysozymzugabe fest. Weiterhin wiesen die Autoren eine Zellysis in Lysozym-haltigen Medien fest (Tabelle 28). Die Stärke des lytischen Effektes variierte dabei von Stamm zu Stamm. Während für die in Tabelle 28 aufgezählten Vertreter eine Nachweis der Sensitivität gelang, waren andere wiederholt resistent (*C. botulinum* Alaska E, Iwanai E, Minnesota E and 113B).

Tabelle 28: Lysis von *C. botulinum*-Zellen in Phosphatpuffer* (modifiziert nach HUGHEY und JOHNSON 1987)

<i>C. botulinum</i> -Stamm	Max. Lysis	Minuten bis zur max. Lysis	Minuten bis zu 50% Lysis
Hall A	70	150	30
17 B	54	140	40
Okra B	65	150	35

* Lysozymkonzentration 100mg/l

5 DIAGNOSTIK, THERAPIE UND PROPHYLAXE

Eine sichere Diagnostik ist aus verschiedenen Gründen unumgänglich. Zum einen ist nur nach Kenntnis der Spezies und des Toxovars eine kausale Therapie möglich. Dieses Wissen um den Toxintyp ist weiterhin Voraussetzung für die Erkennung möglicher Gefahrenquellen (Futter- und Lebensmittel) mit dem Ziel, weitere Erkrankungen zu verhindern. Auch im Bereich der Produkthaftung ist die Botulismusdiagnostik entscheidend (BÖHNEL u. GESSLER 2003) – obwohl noch keine Schadensersatzfälle bekannt sind. Diese können jedoch erwartet werden, wenn Verbraucher durch Lebensmittel landwirtschaftlicher Herkunft geschädigt werden.

5.1 Verdachtsdiagnose

Anhand des klinischen Bildes und der epizootiologischen Gegebenheiten kann der praktizierende Arzt/Tierarzt eine Verdachtsdiagnose stellen. Geschieht dies nicht, bleibt die genaue Krankheits-/Todesursache meist unklar. Diese Gefahr nimmt zu, wenn atypische Krankheitsformen auftreten (GREVE et al. 1993) oder Zusammenhänge zu anderen Krankheitsbildern unbekannt sind (z.B. Säuglingsbotulismus - SID).

Die Tabelle 29 liefert einen kurzen Überblick über die wichtigsten Differenzialdiagnosen, die sowohl im human- als auch im veterinärmedizinischen Bereich auszuschließen sind.

Tabelle 29: Bei Botulismusverdacht abzuklärende Differenzialdiagnosen

Erkrankung	Vorkommen	Ursache/Erreger	Botulismus-ähnliche Symptome
Atropinvergiftung	Pferd, Fleischfresser, Geflügel	Aufnahme von atropinhaltigen Nachtschattengewächsen	Obstipation, Ataxie, Atemdepression
Bleivergiftung	Vögel	Orale Aufnahme von Blei (z.B. Sinkblei)	Muskelschwäche, später Muskellähmung
BSE	Rind	Prion	Bewegungsunlust, Ataxie

Fortsetzung der Tabelle 29

Guillain-Barré-Syndrom	Mensch	Immunreaktion gegen das periphere Nervensystem	Paralyse der Gliedmaßen, des Gesichtes und der Atemmuskulatur
Hypocalcämische Gebärparese	Rind, Zootiere, seltener Hund, Schwein, Schaf, Ziege, Pferd	Peripartale Hypocalcämie/ Hypophosphatämie	Schwankender Gang bis Festliegen, eingeschränktes Sensorium
Monensinvergiftung	Pferd	Aufnahme monensinhaltiger Rinder- oder Geflügelfuttermittel	Bewegungsstörungen, Darmatonie
Muskeldystrophie	Säugetiere, Vögel	z.B. Vitamin E-/ Selenmangel	Eingeschränkte Bewegungsfähigkeit, Zungenparalyse
Myasthenia gravis	Mensch, Hund, Katze	Angeborene oder erworbene Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren	Schwankender Gang, schnelle Ermüdung, Dyspnoe
Tollwut	Warmblütige Säugetiere, selten Vögel	Lyssavirus (Rhabdoviridae)	Zungenlähmung mit Speichelfluss
Weidetetanie	Rind, seltener Schaf & Ziege	Hypomagnesämie, oft auch Hypocalcämie	Festliegen

Für die Abgrenzung des Botulismus von den im Bereich der Humanmedizin nennenswerten Differenzialdiagnosen geben SHAPIRO et al. (1998), CHERINGTON (1998), WERNER et al. (2000) sowie KOBAYASHI et al. (2003) nähere Hinweise.

Im Bereich der Veterinärmedizin sind vor allem mögliche Tollwut- und BSE-Fälle zu differenzieren, da für diese Erkrankungen eine Anzeigepflicht besteht.

Bei einem akuten oder gar perakuten Krankheitsverlauf ist die Diagnosestellung post mortem zusätzlich erschwert, da typische pathologisch-anatomische Veränderungen fehlen (SPIEß 1978; KIUPEL et al. 1979; WAGNER u. MANN 1979; SMART et al. 1980; SWIFT et al. 2000; WOLLANKE 2004). Folglich kommt dem Probenmaterial (u.a. vermutete Intoxikationsquelle, Serum, Magen-Darminhalt) eine besondere Bedeutung zu.

Besteht Verdacht auf Säuglingsbotulismus, ist der Nachweis von *C. botulinum* oder BoNT in der Stuhlprobe am wahrscheinlichsten. So konnten FENICIA et al. (1993) im Kot erkrankter Kleinkinder initial 200,000 Sporen/g, sieben Tage später noch 7,000 Sporen/g nachweisen. Nur selten kann das Toxin im Serum nachgewiesen werden (SAKAGUCHI et al. 1988).

Bei Verdacht auf Botulismus bei Rindern sollten zusätzlich folgende Proben entnommen werden (BÖHNEL u. GESSLER 2003):

- je 10ml Serum und Milch bei laktierenden Kühen sowie 50-100g Magen-/ Panseninhalt und Kot; zusätzlich post mortem Proben der einzelnen Darmabschnitte sowie von Leber, Milz und Tonsillen
- verdächtige Futter-, Wasser- oder Bodenproben

5.2 Erregernachweis

C. botulinum allein anhand seiner morphologischen Eigenschaften zu differenzieren, ist schwer möglich, da der Keim verwandten Bakterienstämmen sehr ähnelt (Tabelle A3).

Eine weitere Möglichkeit, einzelne Bakterienstämme zu identifizieren, ist die Beurteilung ihrer biochemischen Eigenschaften (Tabelle A2). Aufgrund dieser und kulturmorphologischer Eigenschaften werden die Stämme in vier metabole Gruppen eingeteilt, denen aber auch andere Clostridienarten zugeteilt werden (Tabelle A4). Die Untersuchungen von OGUMA et al. (1986) belegen, dass die Zuordnung der Typen in die Gruppen aufgrund ihrer biochemischen Leistungen mit den Zuweisungen aufgrund der Toxinsynthese oder dem Vorhandensein von Phagen übereinstimmt.

MAYHEW und GORBACH (1975) versuchten, über die gaschromatographische Untersuchung der gebildeten Fettsäuren eine Lebensmittelkontamination mit *C. botulinum* nachzuweisen. Dabei gelang es ihnen nicht, *C. botulinum*-Keime von *C. sporogenes* zu differenzieren. Auch in späteren Untersuchungen war dies nicht möglich. So führten BRETT (1998) sowie LINDSTRÖM et al. (1999) Schnelltests auf der Basis von Enzymnachweisen durch und kamen zu dem Ergebnis, dass diese auf Genus-Ebene sichere Aussagen liefern, die Spezies aber nicht immer korrekt diagnostizieren.

Sowohl FRANCIOSA et al. (1994) als auch FACH et al. (1995) entwickelten PCRs, mit denen mehrere *C. botulinum*-Typen nachgewiesen werden konnten und die gleichzeitig eine hohe Übereinstimmung mit dem Mäuseletalitätstest aufweisen.

MÄDE et al. (2000) gelang mit der PCR nach FACH et al. (1995) der Nachweis von *C. botulinum* in 1/52 Honigproben. Dieses Ergebnis wurde sowohl durch die PCR nach FRANCIOSA et al. (1994) als auch durch den Tierversuch bestätigt. Während der PCR nach FACH et al. (1995) eine höhere Sensitivität gegenüber dem Typ A zugesprochen wird, reagiert die PCR nach FRANCIOSA et al. (1994) empfindlicher auf den Typ B (MÄDE et al. 2000).

FACH et al. (2002) entwickelten einen PCR-ELISA, der 80% der 25g-Proben aufdeckte, die weniger als 10 Sporen enthielten. Wie schon in früheren Untersuchungen (FRANCIOSA et al. 1994) wiesen FACH et al. (2002) zusätzliche Typ-Gene nach, auf deren BoNT der Mäuseletalitätstest nicht reagierte. Analoge Diskrepanzen stellten schon SZABO et al. (1994) fest. Möglich ist dies durch den Nachweis ruhender BoNT-Gene oder inhibierten BoNTs bzw. *C. botulinum*-Keime.

Eine Typisierung vegetativer *C. botulinum*-Zellen ist außer durch die BoNT-Bestimmung auch durch Pyrolyse möglich. CONE und LECHOWICH (1970) erstellten charakteristische Pyrogramme von vegetativen Zellen und Sporen der Typen A, B und E. Während diese Untersuchungsergebnisse aufgrund visueller Beobachtungen erfolgten, werteten GUTTERIDGE et al. (1980) ihre Ergebnisse mit Hilfe von Computern aus. Dabei konnten sie die Typen A bis F den bekannten Kulturgruppen zuordnen.

Der Versuch des Erregernachweises ist von Bedeutung, da es möglich ist, dass „ ... die Lebensmittel zum Zeitpunkt der Untersuchung infolge Wachstums anderer Mikroorganismen, pH-Wert-Verschiebungen oder auch Temperatureinflüssen gar nicht mehr toxisch sind und nur die direkte Keimisolierung Aufklärung verschaffen kann.“ (LEVETZOW 1979).

Andererseits ist zu bedenken, dass *C. botulinum* ein ubiquitär vorkommender Keim ist. Aufgrund dessen kann die Diagnose nicht nur durch den Erregernachweis gestellt werden - erst, wenn parallel der Toxinnachweis gelingt, gilt die Diagnose als gesichert.

5.3 Toxinnachweis

Das Botulinumtoxin kann in Blut, Organen (Leber, Milz, Tonsillen) oder im Magen-/ Darminhalt nachgewiesen werden (WOLLANKE 2004). Besteht Verdacht auf eine Lebensmittelvergiftung mit mehreren Betroffenen, können auch verdächtige Lebens- bzw. Futtermittelproben untersucht werden.

Der Beweis kann direkt über eine Toxinextraktion oder indirekt über Anzüchtung BoNT-synthetisierender Clostridien erfolgen. Bei letztgenannter Methode ist zu bedenken, dass ein positiver Nachweis lediglich das Vorhandensein von toxin-synthetisierenden Bakterien belegt, nicht jedoch eine zuvor stattgefundene BoNT-Bildung.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die gleichzeitige Verimpfung von proteolytischen und saccharolytischen *C. botulinum*-Typen zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Die Untersuchungen von EKLUND et al. (2004) belegen, dass bei gleichzeitiger Verimpfung eine Hemmung der Toxinsynthese stattfindet.

5.3.1 Gesetzlich vorgeschriebener Tierversuch

Der Toxinnachweis über die Maus ist Standard und gesetzlich in der Amtlichen Sammlung der Untersuchungsverfahren laut §64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (2005) sowie in der DIN 10102 geregelt. Dieses Verfahren ist das zur Zeit sensitivste Verfahren zum Nachweis von BoNT (BEHRENS 1999) und gilt daher als Referenzverfahren (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2005a). Ein typisches Symptom der erkrankten Maus ist die sog. Wespentaille (Abbildung 10).



Abbildung 10: Wespentaille bei einer an Botulismus erkrankten Maus (GESSLER u. BÖHNEL 2004)

Der Nachweisbereich wird von HALLIS et al. (1996) mit 10-20pg/ml angegeben. DOELLGAST et al. (1993, zitiert bei BEHRENS 1999) geben einen noch niedrigeren Bereich (5-10pg/ml) an.

Zu beachten ist, dass die Ergebnisse Schwankungen unterliegen, bedingt z.B. durch verschiedene Mäusestämme oder Haltungsbedingungen (BEHRENS 1999), letztendlich stellte SMITH (1986) auch individuell verschiedene Reaktionen auf verabreichtes BoNT fest.

5.3.2 Alternativen

5.3.2.1 In-vivo

Es gibt verschiedene Untersuchungen, die die Empfindlichkeit der Maus mit der anderer Tiere vergleichen. So wiesen BOROFF und REILLY (1959) nach, dass Fasane und Enten 500- bzw. 50-mal empfindlicher auf BoNT reagieren als Mäuse (Tabelle A75).

SCHETTLER (1979) verwendete für den Nachweis von BoNT-Typ C sechs Wochen alte japanische Wachteln. Inwieweit sich diese als Versuchstiere eignen, untersuchte MEHLER (1981) anhand der Toxintypen A und C. Für BoNT-Typ A konnte bei intraperitonealer Applikation eine 21,4-mal geringere Empfindlichkeit der Wachtel im Vergleich zur Maus nachgewiesen werden. Allerdings ist dies aufgrund der unterschiedlichen Körpergewichte von Wachtel und Maus zu relativieren. Danach ergibt sich nur noch eine dreimal geringere Empfindlichkeit der Wachtel. Anders waren die Untersuchungsergebnisse bei intraperitonealer Applikation von Typ C-Toxin – hier reagierte die Wachtel empfindlicher als die Maus – die für die Wachtel benötigte LD₅₀ war 108-mal kleiner als die der Maus.

5.3.2.2 In-vitro

Da die genannten Tierversuche neben ethischen Bedenken (hohe Anzahl an Versuchstieren und deren tödlich endendes Leiden) auch andere Nachteile (relativ lange Zeitdauer, hohe Kosten) haben, gibt es intensive Bestrebungen nach Alternativen zum Tierversuch, nicht zuletzt auch deshalb, da BoNT als bioterroristisches Agens einzustufen ist (GESSLER u. BÖHNEL 2004). Im Folgenden soll aus Übersichtsgründen nur auf einzelne Untersuchungen bezüglich ELISA und PCR eingegangen werden.

Mit Hilfe des ELISA können entweder Antikörper (JUBB et al. 1993) oder BoNT direkt (THOMAS 1991) nachgewiesen werden.

GIBSON et al. (1987) verglichen den ELISA mit dem Tierversuch bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber BoNT-Typ A (Tabelle A76). Dabei wurden mittels des ELISA keine falsch positiven, jedoch eine falsch negative Probe festgestellt. In den Versuchen von THOMAS (1991) erwies sich der verwendete ELISA gegen BoNT-Typ C und D als weniger sensitiv als der Mäuseletalitätstest. Nachteilig ist weiterhin, dass im Voraus nur selten bekannt ist, um welchen Toxintyp es sich handelt und so ein typspezifischer ELISA nur bedingt einsetzbar ist.

Daher versuchten POTTER et al. (1993), einen ELISA zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Toxintypen A, B und E gleichzeitig nachgewiesen werden können. Zur Kontrolle wurden 490 Proben sowohl mit dem Mäuseletalitätstest als auch mit dem entwickelten ELISA untersucht. Dabei wurden mittels ELISA keine falsch negativen Proben gefunden. Die 91 falsch positiven Proben führen die Autoren auf die höhere Sensitivität des ELISA zurück, da diese Proben für

Mäuse nicht letale Toxinmengen enthielten, die demnach im Tierversuch nicht nachgewiesen werden können. Zu analogen Ergebnissen kamen ROMAN et al. (1994), DOELLGAST et al. (1994) sowie GREGORY et al. (1996). Dagegen führen DEL TORRE et al. (1998) ihre falsch positiven Ergebnisse auf die mittels ELISA nachzuweisenden Stoffwechselendprodukte anderer Clostridien-Spezies zurück und vertreten in diesem Zusammenhang die Auffassung, dass ein spezifischer Nachweis für *C. botulinum*-Neurotoxin auf diesem Wege nicht uneingeschränkt möglich ist.

Im Bereich der molekulargenetischen Nachweisverfahren soll auf die Multiplex-PCR hingewiesen werden, die LINDSTRÖM et al. (2001a) entwickelten. Mit ihr ist der Nachweis des genetischen Toxinbildungspotentials für die Typen A, B, E und F möglich. In deutschen Instituten wird diese Methode angewandt und hat sich mittlerweile etabliert (GESSLER u. BÖHNEL 2004). Allerdings besteht die Gefahr der „Überschätzung des Giftpotenzials“ (ZECHMEISTER et al. 2002), wenn Toxin-Genfragmente nachgewiesen werden, die in einer nachfolgenden Kultivierung jedoch nicht zur BoNT-Synthese führen.

5.4 Therapie und Prophylaxe

In der Humanmedizin sind sowohl Vorsorge als auch Therapie von Bedeutung, während in der Veterinärmedizin aus finanziellen Erwägungen heraus der Schwerpunkt im prophylaktischen Bereich liegt.

Der kausale Therapieansatz besteht in der Gabe multivalenter Antitoxine, die eine weitere Bindung des BoNT an die motorischen Endplatten unterbinden. Die Auswertung von Botulismusfällen belegt, dass Patienten, die multivalente Antitoxine erhalten, höhere Überlebensraten und eine kürzere Krankheitsdauer haben (TACKET et al. 1984). Problematisch dabei ist, dass Toxine zahlreicher Feldstämme nicht mit den Antitoxinen neutralisierbar sind (WOLLANKE 2004). Unabhängig davon variiert die Wirkung der Antitoxine je nach Toxintyp. Da BoNT-Typ A vergleichsweise schneller an die Endplatten bindet, ist die Antitoxinwirkung eher begrenzt, während eine gute Neutralisierung bei Typen B und E beobachtet werden kann (MOESCHLIN 1986). Wegen der Gefahr schwerer anaphylaktischer Reaktionen wird bei Fällen von Säuglingsbotulismus von einer Antitoxingabe abgeraten (MCMASTER et al. 2000).

Eine klinische Genesung ist nur durch die Bildung neuer Axone und neuer motorischer Endplatten möglich (MÜLLER-BUNKE et al. 2000). Aus diesem Grunde braucht ein Abklingen aller Symptome mehrere Wochen oder Monate, in denen die Patienten je nach Bedarf intensivmedizinisch betreut werden müssen. Ziel einer symptomatischen Therapie ist es, die weitere Toxinaufnahme zu unterbinden und gleichzeitig die lebenswichtigen Körperfunktionen aufrechtzuerhalten (DIETZ 1998). In Deutschland werden therapeutische Antiseren nicht angeboten (GESSLER u. BÖHNEL 2001a), sie sind bei Bedarf aus dem Ausland zu importieren.

Die Gabe von Antibiotika ist nicht indiziert, da es sich um eine Intoxikation handelt und bereits freigesetztes Toxin nicht beeinflussbar ist. Weiterhin besteht die Gefahr, dass es durch den Bakterienzerfall zu einer vermehrten Toxinfreisetzung kommt (MÜLLER-BUNKE

et al. 2000). Außerdem konnten ARNON et al. (1977) trotz parenteraler Penicillinbehandlung sowohl *C. botulinum* als auch BoNT noch nach Wochen im Stuhl nachweisen.

Zu den wichtigsten prophylaktischen Maßnahmen gehört die Gabe toxinspezifischer Antikörper. Diese können passiv von immunisierten Spendern erhalten oder aktiv durch eine Immunisierung mit Toxoiden gebildet werden.

Vor allem in Gebieten, in denen Botulismus ein endemisches Problem darstellt, werden landwirtschaftliche Nutztiere geimpft. So werden sowohl mono- als auch bivalente Impfstoffe der Typen C und D vor allem in Südafrika und Australien eingesetzt (JANSEN et al. 1976, zitiert bei BÖHNEL 1995). Auch in den USA (MARTIN 2003), Brasilien (GROßE-HERRENTHEY 2004), Israel (ANONYM 1997) und Deutschland (ANONYM 1999; NEUFELD u. BELIHART-NEUFELD 2004a) werden solche Vakzinen genutzt. In Kentucky tritt Botulismus beim Pferd regelmäßig auf – weshalb vor allem tragende Stuten mit Typ-C-Toxoid-Vakzinen geschützt werden (GERBER 1994b). In Mitteleuropa werden außerdem Tiere auf Nerzfarmen aktiv immunisiert (SELBITZ 1992).

Die Übertragung von Antitoxinen über das Kolostrum konnte ADAMI (1984) bei Ziegen nachweisen. Während im Serum der Jungtiere vor Kolostrumaufnahme keine Antitoxine nachweisbar waren, gelang dies nach dem ersten Tränken.

Dies stimmt mit den Aussagen von LEWIS et al. (1982, zitiert bei BÖHNEL 1995) bezüglich ihrer Untersuchungen an Fohlen überein. Zu anderen Ergebnissen kommen WILKINS und PALMER (2003), ihrer Meinung nach ist die passive Immunität der Fohlen kein ausreichender Schutz.

Weitere wichtige prophylaktische Maßnahmen betreffen den Managementbereich. Zum einen sollte eine regelmäßige Qualitätskontrolle des Futters und der Weiden stattfinden, um die Verunreinigung mit Kadavern zu minimieren. Weiterhin ist die unschädliche Beseitigung der tierischen Exkremente von Bedeutung. KEHLER und SCHOLZ (1996) empfehlen in Verdachtsfällen einen vollständigen Weide-/Futterwechsel.

Klassische Fehler im Rahmen der Silageherstellung und -fütterung sollten vermieden werden. So stellt die Verunreinigung des Futters mit Erdsproren während des Mähens oder durch nichtbetonierte Siloböden eine mögliche Gefahrenquelle dar. Durch den Einsatz von Silierhilfen sollte der pH-Wert schnell abgesenkt werden, bei der späteren Entnahme sind glatte und feste Schnittflächen optimal.

Da ein Phosphormangel in tropischen Gebieten zur Osteophagie bei Rindern führt, empfiehlt SEIFERT (1992) die Substitution über Lecksteine. Gleichzeitig regt er die gezielte Düngung der Futterpflanzen an, um so einem Phosphordefizit vorzubeugen.

Bei Botulismus kommt es nicht zur Ausbildung einer belastbaren Immunität, da die letale Dosis deutlich niedriger ist als die immunisierende (BOROFF u. CABEEN 1954). Infolgedessen sind nach einer Rekonvaleszenz keine protektiven Antikörper vorhanden (FRANCIOSA et al. 2003).

Für den Botulismus des Menschen besteht Meldepflicht (§6 des Infektionsschutzgesetzes). Bei Tieren ist eine Botulismuserkrankung weder anzeige- noch meldepflichtig.

6 DISKUSSION

Obwohl es sich bei *C. botulinum* um einen weltweit vorkommenden Bodenseuchenerreger handelt, tritt die Erkrankung nur sporadisch auf. Ursächlich dafür ist, dass mehrere Voraussetzungen erfüllt sein müssen, um eine Intoxikation oder Infektion zu ermöglichen (JANETSCHKE et al. 1989). Zum einen müssen *C. botulinum*-Sporen im Lebens-/Futtermittel vorhanden sein und diese müssen die Be- und Verarbeitung überleben. Weiterhin sind während der Lagerung Bedingungen wichtig, die das Auskeimen und die Toxinbildung ermöglichen und eine nachträgliche Inaktivierung des BoNT verhindern.

Für eine Infektion müssen prädisponierende Faktoren seitens des Betroffenen, z.B. eine gestörte Magen-Darm-Flora (Kapitel 2.2), vorliegen, damit mit der Nahrung aufgenommene Sporen auskeimen und es mit bakteriellem Wachstum zur BoNT-Bildung im Darm kommen kann.

Aufgrund der schweren klinischen Verläufe, der vielschichtigen Krankheitsbilder und einer mit ca. 20% relativ hohen Mortalitätsrate (HATHEWAY 1995a) ist die Bedeutung dieser Erkrankung, und damit die von *C. botulinum* als Lebensmittelvergifter, nicht zu unterschätzen.

Zunächst soll auf Schwierigkeiten bei der Auswertung von labordiagnostischen Ergebnissen und damit verbundene falsche Rückschlüsse eingegangen werden. Dabei wird auf mögliche Fehlerquellen während der Probenentnahme und –bearbeitung sowie der Auswertung der Ergebnisse eingegangen.

Ein wichtiger Grund für falsch negative Ergebnisse sind Toxininseln im Lebens- bzw. Futtermittel, wenn diese bei der Probengewinnung nicht mit entnommen werden (MEYER u. EDDIE 1951; MEYER u. KIETZMANN 1958; RAY 2001). LÜCKE (1983) sieht aufgrund der „heterogenen Verteilung von Sporen und Toxin“ die Gefahr falscher Probenergebnisse aus Rohschinken. Auch der von SCHULZE und FUNKE (1981) beschriebene Fall, in dessen Rahmen nur ein Krankheitsfall auftrat, obwohl mehrere Personen von dem Schinken gegessen hatten, unterstützt den Verdacht einer ungleichmäßigen Sporen- und Toxinverteilung. Die Autoren gehen davon aus, dass sich die Toxininseln vor allem im Inneren, nahe am Knochen, befinden, da diese Stellen für Konservierungsmittel erst nach längerer Zeit erreichbar sind.

Auch eine nicht fachgerechte Probenbearbeitung kann Ergebnisse verfälschen. Dies wird durch mehrere Autoren (SCHMIDT et al. 1961; TJABERG 1974; SMELT u. HAAS 1978) bei fehlender Trypsinierung der Verdachtsproben beschrieben, besonders bei für *C. botulinum* suboptimalen Bedingungen. MÄDE et al. (2000) verweisen auf Untersuchungen von HAUSCHILD und HILSHEIMER (1983), nach denen Honigproben stark verdünnt werden sollten, wenn in ihnen der Nachweis von *C. botulinum* gelingen soll. Ansonsten hemmt die hohe Zuckerkonzentration, die einen niedrigen a_w -Wert nach sich zieht, das Auskeimen eventuell vorhandener Sporen.

Bei der Auswertung von PCR-Ergebnissen ist zu beachten, dass positive Nachweise nicht immer Aussagen über die Toxizität erlauben, da auch ruhende BoNT-Gene nachgewiesen werden (Kapitel 5.2). ZECHMEISTER et al. (2002) sehen dadurch die Gefahr der „Überschätzung des Giftpotenziales“.

Demnach muss beachtet werden, dass (1) der Nachweis eines Neurotoxin-Gens keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein von BoNT erlaubt und (2) in komplexen, biologischen Systemen PCR-inhibierende Faktoren vorhanden sein können (LANTZ et al. 2000), die zu falsch negativen Ergebnissen führen. Ein weiterer Grund, warum bei positivem BoNT-Nachweis nicht stets vom Vorhandensein von *C. botulinum* ausgegangen werden kann, sind Untersuchungsergebnisse, die auch für andere Spezies die Fähigkeit der BoNT-Synthese belegen (CHAUDHRY et al. 1998; ANNIBALLI et al. 2002). Von BoNT-Nachweisen bei klinisch inapparenten Kühen berichtet BÖHNEL (2004). Gleichzeitig schließt ein fehlender Toxinnachweis in den Verdachtsproben Botulismus nicht aus, da Resorption oder Abbau durch proteolytische Enzyme nicht ausgeschlossen werden können (BÖHNEL et al. 2001a,b; STÖBER 2002). Im umgekehrten Fall kann BoNT postmortal in Kadavern gebildet werden, wenn im GIT vorhandene Sporen auskeimen und es zur Toxinbildung durch vegetative Zellen kommt. So kann eine falsche Todesursache vorgetäuscht werden (SMART u. ROBERTS 1977).

Demnach sollte im Rahmen einer Diagnostik immer sowohl ein Erreger- als auch ein Toxinnachweis angestrebt werden und das Ergebnis im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild und den epidemiologischen Gegebenheiten interpretiert werden.

Wenn das an Botulismus erkrankte Tier empfindlicher auf das BoNT reagiert als die im Tierversuch eingesetzte Maus, können auch infolge des Mäuseletalitätstestes falsch negative Ergebnisse entstehen. So wiesen MOELLER et al. (2003) für laktierende Rinder eine ca. 12-mal höhere Empfindlichkeit gegenüber BoNT-Typ C pro kg Körpergewicht nach als für die Maus und erklären somit Probleme beim Nachweis von Botulismus.

Aus Verbraucherschützerischer Sicht sind vor allem Fakten interessant, die sich mit dem häufigsten Vehikel des Botulismus, dem Nahrungsmittel, befassen.

Anhand der im Kapitel 4 besprochenen Vermehrungs- und Toxinbildungsbedingungen können Eigenschaften von Produkten abgeleitet werden, die das Risiko einer Botulismusintoxikation erhöhen. Zusammenfassend soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass, aufgrund der Vielzahl an Einflussfaktoren, diese Untersuchungsergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar und somit Widersprüche nicht immer erklärbar sind.

Eine klassische Risikogruppe stellen die REPFED-Produkte dar. Für sie stellt *C. botulinum* die größte mikrobiologische Problematik dar (DEL TORRE et al. 2004) - besonders dann, wenn Gemüse verwendet wird, das mit im Boden vorkommenden Sporen verunreinigt ist. Verstärkt wird dies durch ein Abtöten der Begleitflora infolge der relativ milden Wärmebehandlung. Aus diesem Grunde werden pasteurisierte und im Anschluss nicht adäquat gekühlte Lebensmittel als gefährlicher eingestuft als unbehandelte Produkte (LERKE u. FARBER 1971).

Als weitere Risikofaktoren gelten (1) eine zumeist unter Sauerstoffreduktion stattfindende Verpackung, (2) der milde Einsatz konservierender Zusatzstoffe (LINDSTRÖM 2003) sowie (3) die Fähigkeit saccharolytischer *C. botulinum*-Stämme, ab Temperaturen von $>3^{\circ}\text{C}$ zu wachsen. Letzteres lässt vermuten, dass Vergiftungen, die auf derartige Lebensmittel zurückzuführen sind, häufig durch nicht-proteolytische *C. botulinum*-Stämme verursacht werden (Kapitel 3.3). Daraus leitet HYYTIÄ-TREES (1999) die Empfehlung ab, dass Lebensmittel, die bei $3 - 5^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, eine maximale Haltbarkeit von 10 Tagen haben sollten und für Produkte, die bei $<10^{\circ}\text{C}$ gelagert werden ein MHD von höchstens vier bis fünf Tagen empfehlenswert ist. Beträgt die Haltbarkeit mehr als 10 Tage, sollten die Lebensmittel durch einen weiteren Faktor so beeinflusst werden, dass eine Toxinbildung durch *C. botulinum* unterbunden wird.

Auch andere Lebens- oder Futtermittel, die in sauerstoffreduzierter bzw. -freier Atmosphäre verpackt und gelagert werden, sind mit einem höheren Botulismusrisiko behaftet. Hierzu zählen Konserven (LÜCKE 1983), in verschiedene Plastikmaterialien und unter modifizierter Gasatmosphäre gelagerte Lebensmittel (HYYTIÄ et al. 1998; SCHEBOR u. CHIRIFE 2000) und auch in luftdichter Plastikfolie vor Klimaeinflüssen geschützte Heuballen (SEIFERT 2004).

Aber auch Lebensmittel, die aufgrund ihrer Eigenschaften als sicher gelten, können unter für *C. botulinum* begünstigenden Umständen Auslöser für Intoxikationen sein. So sind in den Kapiteln 4.3.2.1.2 und 4.3.2.1.3 mikrobiell bedingte Veränderungen dargestellt, die die Bedingungen im Medium für *C. botulinum* verbessern und somit ein Wachstum mit Toxinbildung ermöglichen. Eine während der Lagerung von Muscheln festgestellte Reduktion des Salzgehaltes führen PATEL et al. (1978) auf eine Bindung des Salzes im Muskelgewebe zurück. Prinzipiell ist ein derartiger Vorgang auch in anderen Lebensmitteln denkbar – womit eine mit zunehmender Lagerungsdauer abnehmende Unterdrückung bakteriellen Wachstums und damit der Toxinsynthese zu erwarten ist. Dies bedarf weiterer Forschung und gegebenenfalls weiterer die Toxinbildung hemmender Zusatzstoffe.

Eine weitere Risikogruppe sind Fische oder marine Säugetiere, die neun von zehn Typ E-Botulismusfälle verursachen (PEDERSEN 1955). Dies spiegelt sich unter anderem in einem gehäuften Auftreten von Botulismus während der Fischfangsaison in Russland wieder (DEHOF 1994). Erklärt werden kann dies mit mehreren prädisponierenden Faktoren: (1) ein gehäuftes Vorkommen von *C. botulinum*-Typ E in der aquatischen Umwelt (PELROY et al. 1982), weshalb der Keim zur natürlichen Mikroflora der Fische gezählt wird (DEHOF et al. 1989), (2) eine milde Bearbeitung der Produkte, die vorhandene Sporen nicht inaktiviert und (3) damit, dass der Typ E psychrotroph und somit durch Kühlmaßnahmen nur schwer kontrollierbar ist (BACH u. MÜLLER-PRASUHN 1971). Erschwerend kommt hinzu, dass (1) Fische und andere Meerestiere einen guten Nährboden für *C. botulinum* darstellen (LERKE u. FARBER 1971), (2) einige Meerestiere (z.B. Austern, Muscheln) nicht tiefgefroren werden (PATEL et al. 1978) und (3) sich eine kontinuierliche Kontrolle des Salzgehaltes z.B. in Räucherfischen schwierig gestaltet (CANN u. TAYLOR 1979). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass durch zügiges Ausnehmen der Fische und eine anschließende Kühlung die Keimbelastung und Gefahr der Toxinbildung minimiert wird (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2000).

Letztendlich soll noch auf das Untersuchungsergebnis von BÖHNEL et al. (2005) hingewiesen werden. Es wurde BoNT im Einzelgemelk einer Kuh nachgewiesen, die aus einem Bestand mit Viszeralem Botulismus stammt. Dieses alarmierende Ergebnis bedarf dringend weiterer Untersuchungen, um die Gefahr, dass BoNT die Blut-Milch-Schranke passiert und somit eine Intoxikationsquelle für den Verbraucher darstellt, realistisch einschätzen zu können.

Neben dem Nahrungsmittel bzw. seiner Ausgangsprodukte an sich ist auch deren Bearbeitung für eine mögliche Toxinsynthese von Bedeutung. Prinzipiell gibt es drei Wege, die Entwicklung von *C. botulinum* zu kontrollieren: (1) die Abtötung eventuell vorhandener Sporen (z.B. Vollkonserven), (2) die Hemmung der Sporenauskeimung und des vegetativen Wachstums (z.B. Obstkonserven) und (3) eine Kombination aus Sporenabtötung und Hemmung der Auskeimung (z.B. lagerfähige Pökelfleischprodukte) (HAUSCHILD 1983). Aufgrund der hohen Hitzeresistenz der *C. botulinum*-Sporen ist es nur schwer möglich, mit Hilfe von Wärmebehandlungen eventuell vorhandene Sporen zu zerstören, ohne die nutritiven und organoleptischen Eigenschaften zu beeinflussen (PETERSON et al. 2002). In diesem Zusammenhang ist weiterhin zu bedenken, dass der D-Wert die Population nur um 90% reduziert, demnach liegen keine sterilen Verhältnisse vor.

Auch wenn eine Zerstörung der Sporen während der industriellen Prozesse nicht immer erreicht wird, so kann doch die Empfindlichkeit gegenüber anderen Hemmfaktoren gesteigert werden (VARNAM u. EVANS 1991). Herstellungsprozesse sind so zu planen, dass eine Toxinbildung ausgeschlossen werden kann. In der Literatur finden sich beispielhafte Sicherheitslücken: (1) Ergebnisse von SUGIYAMA et al. (1981) belegen, dass die Erhitzungsdauer für die untersuchten Kartoffeln nicht ausreicht, um auch im Inneren eine adäquate Erwärmung zu erzielen. BRYAN (1988) geht davon aus, dass fast 80% der Botulismusefälle von 1961 – 1982 durch eine ungenügende Erwärmung der Lebensmittel bedingt wurden. (2) Aus kommerziellen Beweggründen besteht die Tendenz, die Reifezeiten von Rohschinken durch eine höhere Pökelttemperatur zu verkürzen (LÜCKE 1983). Bei sporenfreien Ausgangsprodukten ist dies aus lebensmittelhygienischer Sicht möglich, da dies aber nicht garantiert werden kann, sollte von dieser Veränderung des Bearbeitungsprozesses Abstand genommen werden.

Weiterhin kann durch eine unsachgemäße Lagerung das Botulismusrisiko zunehmen. Besonders bei Produkten, die einer Kühlung bedürfen, ist die Gefahr der Vermehrung von psychotrophen Stämme gegeben. WELT et al. (2003) berichten, dass die Temperaturen in Kühlschränken privater Haushalte zumeist nur bei $<10^{\circ}\text{C}$ liegen, was unter ansonsten optimalen Bedingungen eine Toxinbildung durch saccharolytische *C. botulinum*-Stämme nicht unterbindet. Andererseits kommen im Rahmen der industriellen Herstellung und Lagerung zumeist mehrere hemmende Faktoren zum Einsatz, so dass nicht generell von einer BoNT-Synthese in den in Kühlschränken gelagerten Lebensmitteln ausgegangen werden kann. Zudem werden längere Lagerungszeiten benötigt, um eine gefährliche Toxin-konzentration zu erreichen.

Ein weiteres, für den Verbraucher nicht erkennbares (und wahrscheinlich auch nicht bekanntes) Risiko stellen Lebensmittel dar, in denen eine Toxinsynthese durch *C. botulinum* stattfindet, bevor Verderbniserscheinungen das Produkt ungenießbar machen. Mehrere Untersuchungen belegen dies für verschiedene Lebensmittelgruppen (KAUTTER 1964; SOLOMON et al. 1994,1998; DAIFAS et al. 1999b).

Vergleicht man diese und weitere Veröffentlichungen fällt auf, dass ein Großteil der betroffenen Proben unter modifizierten Gasatmosphären und / oder unter Kühltemperaturen gelagert wurden. Begründet ist dies in der Hemmung der Begleitflora, die zum einen Konkurrenz für *C. botulinum* darstellt und zum anderen für die Verderbniserscheinungen verantwortlich ist. Besonders eine inadäquate Kühlung der Lebensmittel führt zur Unterdrückung der mesophilen Verderbniskeime, während sich psychotrophe *C. botulinum*-Stämme bei Temperaturen >3°C vermehren können (Kapitel 4.1.1.2).

Aufgrund dessen sind weitere, das Wachstum und die Toxinbildung von BoNT-produzierenden Spezies unterbindende Hemmfaktoren nötig, die sich in ihrer anticlostridialen Wirkung ergänzen. Ein Beispiel dafür ist die kühle Lagerung von pasteurisierten Produkten oder der Zusatz verschiedener Hemmstoffe. Weitere Kombinationen von Hemmfaktoren kommen bei Räucherfischen (Salz und Rauch) und REPFED-Produkten (veränderte Gasatmosphäre und niedrige Temperaturen) zum Einsatz. Dabei ist zu bedenken, dass sich alle Faktoren bezüglich ihrer Grenzwerte für *C. botulinum* beeinflussen (Kapitel 4), weshalb Grenzwerte immer relativ betrachtet werden sollten.

Weiterhin zeigen die Untersuchungen von SUAREZ REBOLLO et al. (1997) sowie LARSON und JOHNSON (1999), dass niedrige Bestrahlungsdosen die Verderbnisflora stärker hemmen als *C. botulinum* und somit auch das Botulismusrisiko erhöhen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass Verderbniserscheinungen nicht als Indikator für eine mögliche BoNT-Synthese genutzt werden dürfen. Dies beruht auch auf der Tatsache, dass nicht alle *C. botulinum*-Stämme in der Lage sind, Proteasen zu produzieren.

Aufgrund dessen, dass *C. botulinum*-Keime ubiquitär vorkommen und Botulismus zumeist durch fehlerhafte Lebensmittelherstellung oder –lagerung entsteht, kann nicht mit einer Elimination der Erkrankung gerechnet werden.

Jedoch kann ein Verständnis der Vermehrungs- und Toxinbildungsvoraussetzungen sowie die Kenntnis über Resistenzen von Sporen und Toxin helfen, die Risiken und damit die Erkrankungsfälle zu minimieren. Auch bei der Entwicklung und Herstellung neuer, möglichst wenig bearbeiteter Produkte sind diese und zukünftige Forschungsergebnisse von Bedeutung.

Abschließend muss festgehalten werden, dass einige Fragen offen bleiben.

- (1) Es wurden Diskrepanzen zwischen den Grundlagen des 12-D-Konzeptes und den in Tabelle 12 zusammengefassten Hitzeresistenzen festgestellt. Letztere lagen deutlich niedriger, und es erscheint nur eine Sicherheitsspanne diese Unterschiede erklären zu können.
- (2) Bei SONNENSCHNEIN (1980), TAKUMI et al. (1980), OGUMA et al. (1986) und CARLIER et al. (2004) finden apathogene *C. botulinum*-Stämme Erwähnung. Da *C. botulinum* bzw. der Botulismus jedoch vorrangig über die Toxinbildung oder über das Gen diagnostiziert werden, bleibt offen, wie häufig nicht-toxigene Stämme im Verhältnis zu pathogenen vorkommen.
- (3) Neue Krankheitsbilder bedürfen weiterer Grundlagenforschung. So wird beispielsweise der Viszerale Botulismus nicht in allen Veröffentlichungen als eigenständiges Krankheitsbild anerkannt.

Zuletzt soll noch auf zwei rechtlich offene Fragen hingewiesen werden, die im Sinne des Verbraucherschutzes dringend einer Klärung auf wissenschaftlicher Basis bedürfen. Sowohl bei Geflügelbotulismus als auch bei Viszeralem Botulismus besteht kein Schlachtverbot für (überlebende) Tiere (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2005a,b). In diesem Rahmen sind Untersuchungen bezüglich einer möglichen Gefährdung für den Menschen dringend nötig.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Claudia Preisung

Literaturstudie zum Vermehrungs- und Toxinbildungsvermögen von *Clostridium botulinum*, zu den Eigenschaften des Botulinumtoxins sowie zum Vorkommen und zur Tenazität der *Clostridium botulinum*-Sporen

Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Mai 2006

108 Seiten, 29 Tabellen, 10 Abbildungen, 946 Literaturquellen, im Anhang: 76 Tabellen und 4 Abbildungen

Schlüsselwörter: *C. botulinum*
 Spore
 Botulinumneurotoxin
 Botulismus
 Intoxikation

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt (1) auf Untersuchungsergebnissen zum qualitativen und quantitativen Vorkommen von *C. botulinum* sowie (2) den Wirkungen verschiedener Umweltfaktoren auf vegetative Zelle und Spore sowie auf das Botulinumneurotoxin (BoNT).

Der Autor geht zunächst auf die Pathogenese, die verschiedenen Erkrankungsformen und die Symptomatik des Botulismus ein. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Toxovare nachgewiesen, auf deren Toxine Mensch und Tier mit variierender Sensibilität reagieren. Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften werden die Toxovare zusammen mit anderen Clostridienarten in vier metabole Gruppen eingeteilt. Eine BoNT-Synthese wurde auch für die mit *C. botulinum* verwandten Spezies *C. baratii* und *C. butyricum* nachgewiesen. Damit ist ein automatischer Rückschluss auf das Vorhandensein von *C. botulinum* nur aufgrund eines positiven BoNT-Nachweises nicht richtig.

Weiterhin werden die Bildung der Dauerform sowie das Auskeimen der Sporen erläutert. Verantwortlich für das klinische Bild des Botulismus ist das Botulinumneurotoxin, dessen Synthese und pharmakologische Wirkung besprochen wird. Auch andere Virulenzfaktoren, z.B. das Bildungsvermögen weiterer Toxine und die Bakteriozinbildung, werden kurz dargestellt. Neben der klassischen Form der Intoxikation mit in Lebens-/Futtermitteln präformiertem BoNT werden weitere pathogenetische Mechanismen erläutert und der klinische Verlauf beschrieben. Da für die Entstehung des Krankheitsbildes neben dem

Vorhandensein des BoNT weitere Bedingungen erfüllt sein müssen, handelt es sich im europäischen Raum um eine eher sporadische Erkrankung.

Im Kapitel drei wird das Vorkommen der *C. botulinum*-Sporen sowohl unter qualitativen als auch quantitativen Aspekten betrachtet. Obwohl es sich bei der Spezies *C. botulinum* um einen weltweit ubiquitär lokalisiert vorkommenden Erreger handelt, variieren die toxovarspezifischen Nachweise je nach geographischer Lage und Probenart. Während im europäischen Raum der Typ B dominiert, sind Krankheitsfälle in Amerika vor allem auf den Typ A zurückzuführen. Parallel werden im Allgemeinen die Toxovare A, B, F und G dem Erdboden, der Typ E marinen Proben und die Typen C und D tierischen Kotproben zugeordnet. Weiterhin wurden häufig verursachende Lebens- bzw. Futtermittel sowie epidemiologische Zusammenhänge betrachtet.

Um die Übersichtlichkeit zu wahren, sind physikalische, chemische und biologische Faktoren getrennt dargestellt worden. Dabei wurden die Untersuchungsergebnisse jeweils zum Einfluss auf Spore, vegetative Zelle und BoNT besprochen. Hierbei ist zu beachten, dass es Unterschiede bezüglich der Anforderungen für Sporenauskeimung und für das vegetative Wachstums gibt. Obwohl das Bakterium zu den Anaerobiern zählt, wurde unter geringen Sauerstoffkonzentrationen sowohl Wachstum als auch Toxinbildung beobachtet. Im Gegensatz zum Toxin, welches durch einfaches Kochen zerstört wird, konnte für die Sporen eine, je nach Typ variierende, hohe Hitzeresistenz nachgewiesen werden. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass mit den zum jetzigen Zeitpunkt von der Lebensmittelindustrie eingesetzten Erhitzungsverfahren im Lebensmittel vorhandene Sporen immer sicher zerstört werden. Folglich liegt der Schwerpunkt der Botulismusprophylaxe im Bereich der Wachstums- und Toxinbildungshemmung des Erregers. Um die BoNT-Synthese in Lebensmitteln effektiv zu unterbinden, empfiehlt sich eine Kombination aus mehreren Hemmfaktoren gemäß dem Hürdenkonzept. Ein Vorteil dieses Konzeptes liegt darin, dass die Faktoren, wenn sie in der richtigen Kombination Anwendung finden, synergistisch wirken und damit die für die Vermehrungshemmung und Toxininaktivierung erforderlichen Zusätze oder Erhitzungstemperaturen reduziert werden können.

Schließlich wird in der Arbeit auf die Diagnostik und Therapie eingegangen. Im Rahmen der Diskussion werden unter anderem mögliche Probleme bei der Diagnosestellung besprochen.

Abschließend soll die Bedeutung der Prophylaxe hervorgehoben werden – dabei ist besonders auf die Qualität risikobehafteter Lebens- und Futtermittel zu achten und mögliche Sicherheitslücken sind während der Produktion und Lagerung auszuschließen.

Weiterhin ist festzuhalten, dass besonders die pathogenetischen Kenntnisse zu neuen Krankheitsbildern vertieft werden müssen, um die Entstehungsweise der Erkrankungen besser zu verstehen und somit die Effektivität präventiver Maßnahmen zu erhöhen.

8 SUMMARY

Claudia Preising

Bibliographical study on the ability of *Clostridium botulinum* to reproduce and form toxins, on the properties of the botulinum toxin and on the incidence and tenacity of *Clostridium botulinum* spores

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted on May 2006

108 pages, 29 tables, 10 illustrations, 946 bibliographical sources, with 76 tables and 4 illustrations in the Annex

Keywords: *C. botulinum*
 Spore
 Botulinum neurotoxin
 Botulism
 Intoxication

This paper focuses on (1) the test results for the qualitative and quantitative incidence of *C. botulinum* and (2) the impacts of various environmental factors on the vegetative cell and spore and the botulinum neurotoxin (BoNT).

The author initially deals with the pathogenesis, the various forms of illness and the symptomatology of botulism. Over the years a variety of toxovars have been detected to whose toxins humans and animals react with varying degrees of sensitivity. Owing to their biochemical properties, the toxovars are classified together with other clostridium species in four metabolic groups. A BoNT synthesis has also been demonstrated for the *C. baratii* and *C. butyricum* species related to *C. botulinum*. It is therefore incorrect to automatically conclude the existence of *C. botulinum* solely on the ground of positive evidence of BoNT. Formation of the permanent species and germination of the spores will moreover be elucidated. The botulinum neurotoxin is responsible for the clinical picture of botulism, whose synthesis and pharmacological effect will be described. A brief description of other virulence factors, such as the ability to form further toxins and bacteriocin formation will also be provided. Other pathogenetic mechanisms in addition to the classic form of intoxication with pre-formed BoNT in food and feed sources will be elucidated and their clinical course described. Since other conditions in addition to the existence of BoNT must be fulfilled for the genesis of the clinical picture it tends to be a sporadic illness in the European region.

In chapter three, both the qualitative and quantitative aspects of the incidence of *C. botulinum* spores will be considered. Although the *C. botulinum* species is a globally ubiquitous pathogen that occurs in localised infections, detection of specific toxovars varies according to the geographic location and type of sample. Whereas type B prevails in the European region, cases of illness in America are mainly attributable to type A. Similarly, toxovars A, B, F and G are generally attributable to the soil, type E to marine samples and types C and D to samples of animal faeces. Epidemiological connections to the food or feed sources that frequently cause such illnesses are moreover considered.

Physical, chemical and biological factors have been described separately for the sake of clarity. The test results have consequently been discussed in terms of impact on the spore, vegetative cell and BoNT. It should consequently be noted that there are differences in terms of the requirements for spore germination and vegetative growth. Both growth and toxin formation were observed at low oxygen concentrations even though the bacterium belongs to the anaerobes. Unlike toxins, which are destroyed by normal cooking processes, spores have a demonstrably high resistance to heat, which varies according to the type. It cannot be assumed that the heating process currently employed in the food industry always completely destroys the spores that are present in the food. Botulism prophylaxis consequently focuses on the area of growth and inhibition of toxin formation by the pathogen. In order to effectively prevent BoNT synthesis in food a combination of several inhibitory factors is recommended, in accordance with the hurdle concept. One advantage of this concept is that the factors have a synergetic effect when they are applied in the right combination, thus permitting a reduction in the additives or heating temperatures required to inhibit reproduction or toxin activation.

The paper finally deals with diagnosis and therapy. Potential problems in making a diagnosis, among other things, are addressed in the context of the discussion.

Emphasis is subsequently placed on the importance of the prophylaxis – particular attention must accordingly be paid to the quality of high-risk food and feed sources, and potential safety loopholes during production and storage must be eliminated.

It should moreover be emphasised that pathogenetic knowledge of new syndromes in particular must be extended with a view to improving understanding of the genesis of illnesses, thereby enhancing the efficacy of preventive measures.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abbitt B, Murphy MJ, Ray AC, Reagor JC, Eugster AK, Gayle LG, et al. Catastrophic death losses in a dairy herd attributed to type D botulism. *J Am vet med Ass.* 1984;185:798-801.

Abrahamsson K, Gullmar B, Molin N. The effect of temperature on toxin formation and toxin stability of *Clostridium botulinum* type E in different environments. *Can J Microb.* 1966;12:385-94.

Abrams A, Kegeles G, Hottle GA. The purification of toxin from *Clostridium botulinum* type A. *J B Chem.* 1946;164:63-79.

Adam-Castrillo D, White NA, Donaldson LL, Furr MO. Effects of injection of botulinum toxin type B into the external anal sphincter on anal pressure of horses. *Am J Vet Res.* 2004;65:26-30.

Adami M. Untersuchungen zum Nachweis von *Clostridium botulinum*-Antitoxin in Kolostrum, Milch und Serum immunisierter Ziegen [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 1984.

Adams SG, Conly FM, Gratto-Trevor CL, Cash KJ, Bollinger T. Shorebird use and mortality at a large Canadian prairie lake impacted by botulism. *Waterbirds.* 2003;26:13-25.

Ajmal M. Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* type E. *J appl Bact.* 1968a;31:120-3.

Ajmal M. *Clostridium botulinum* type E: growth and toxin production in food. *J appl Bact.* 1968b;31:124-32.

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

Ala-Huikka K, Nurmi E, Pajulahi H, Raevuori M. The occurrence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish trout farms and the prevention of toxin formation in fresh-salted vacuum-packed trout fillets. *Nord Vet Med.* 1977;29:386-91.

Albert. Persönliche Mitteilung. Landesuntersuchungsanstalt Leipzig; 2003.

Alberto F, Broussolle V, Mason DR, Carlin F, Peck MW. Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. *Lett appl Microbiol.* 2003;36:41-5.

Alderman GG, King GJ, Sugiyama H. Factors in Survival of *Clostridium botulinum* type E Spores through the Fish Smoking Process. J Milk Fd Techn. 1972;35:163-6.

Alderton G, Chen JK, Ito KA. Effect of Lysozyme on the Recovery of Heated *Clostridium botulinum* Spores. Appl Microbiol. 1974;27:613-5.

Alderton G, Chen JK, Ito KA. Heat Resistance of the Chemical Resistance Forms of *Clostridium botulinum* 62A Spores over the Water Activity Range 0 to 0,9. A E M. 1980;40:511-5.

Amigo L, Olano A, Calvo MM. Preservation of raw milk with CO₂. Z Lebensmitt Untersuch. 1995;200:293-6.

Anastasio KL, Soucheck JA, Sugiyama H. Boticinogeny and Actions of the Bacteriocin. J Bact. 1971;107:143-9.

Ando Y. The Germination Requirements of Spores of *Clostridium botulinum* Type E. Jap J Microb. 1971;15:515-25.

Ando Y, Iida H. Factors affecting the Germination of Spores of *Clostridium botulinum* Type E. Japan J Microb. 1970;14:361-70.

Ando Y, Inoue K. Studies on Growth and Toxin Production of *Clostridium botulinum* Type E in Fish Products I: On the Growth in Relation to the Oxidation-Reduction Potential in the Fish Flesh. B J S S F. 1957;23:458-62.

Anellis A, Berkowitz D, Kemper D, Rowley DB. Production of Types A and B Spores of *Clostridium botulinum* by the Biphasic Method: Effect of Spore Population, Radiation Resistance, and Toxicity. Appl Microbiol. 1972;23:734-9.

Anniballi F, Fenicia L, Franciosa G, Aureli P. Influence of pH and Temperature on the Growth of and Toxin Production by Neurotoxicogenic Strains of *Clostridium butyricum* Type E. J Food Prot. 2002;65:1267-70.

Anon. Epidemiology of Emerging Zoonoses in Israel. Emerg Infect Dis. 1997;3:229-38.

Anon. Botulismus: Tote Rinder in Hessen und NRW. 05.07.1999. [citet: 19.03.2006]. Available from: <http://news.agrar.de/archiv/19990705-00000/>

Anon. Botulismus nach dem Verzehr von Räucherfischen. Hyg Med. 2000;25:438-9.

Anon. Botulism – Reporting and Surveillance Guidelines. Washington State Department of Health. October 2002. [cited 15.03.2006]. Available from: <http://www.doh.wa.gov/Notify/guidelines/pdf/botulism.pdf>

Anon. VLA Surveillance report: outbreak of botulism in cattle associated with the spreading of poultry manure. *Vet Rec.* 2003;135:283-6.

Anon. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 7th report 1993-1998. Bundesinstitut für Risikobewertung. [citet: 12.02.2006a]. Available from: <http://www.bfr.bund.de>

Anon. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 8th report 1999-2000. Bundesinstitut für Risikobewertung. [citet: 12.02.2006b]. Available from: <http://www.bfr.bund.de>

Armada M, Love S, Barrett E, Monroe J, Peery D, Sobel J. Foodborne Botulism in a Six-Month-Old Infant Caused by Home-Canned Baby Food. *Ann Emerg Med.* 2003;42:226-9.

Arnholdt W, Mühler J. Wundbotulismus – ein Fallbericht. Robert Koch-Institut: *Epidemiologisches Bulletin.* 2004;43:371.

Arnon SS. Infant Botulism: Anticipating the Second Decade. *J infect Dis.* 1986;154:201-6.

Arnon SS, Midura TF, Clay SA, Wood RM, Chin J. Infant Botulism: Epidemiological, Clinical, and Laboratory aspects. *J Am Med Assoc.* 1977;237:1946-51.

Arnon SS, Midura TF, Damus K, Wood RM, Chin J. Intestinal infection and toxin production by *Clostridium botulinum* as one cause of sudden infant death syndrome. *Lancet.* 1978;1:1273-7.

Aureli P, Fenicia B, Pasolini M. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *J infect Dis.* 1986;154:207-11.

Aureli P, Franciosa G, Pourshaban M. Food-borne botulism in Italy. *Lancet.* 1996;348:1594.

Austin JW, Dodds KL, Blanchfield B, Farber JM. Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* on Inoculated Fresh-Cut Packaged Vegetables. *J Food Prot.* 1998;61:324-8.

Azizi A. Thermal Processing Required for Canning. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Vol 2. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.1008-16.

Bach R. Untersuchungen zur Klärung von Erkrankungen des Menschen an Botulismus nach Genuß geräucherter, vakuumverpackter Forellenfilets [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1971.

Bach R, Müller-Prasuhn G. Teichforellen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus 1. Mitteilung. *Arch Leb Mitt Hyg.* 1971;22:64-8.

Bach R, Wenzel S, Müller-Prasuhn G, Gläsker H. Teichforellen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus. 3. Mitteilung. Arch Leb Mitt Hyg. 1971;22:107-12.

Baird-Parker AC. Factors Affecting the Production of Bacterial Food Poisoning Toxins. J appl Bact. 1971;34:181-97.

Baird-Parker AC, Freame B. Combined Effect of Water Activity, pH and Temperature on the Growth of *Clostridium botulinum* from Spore and Vegetative Cell Inocula. J appl Bact. 1967;30:420-9.

Baker DA, Genigeorgis C. Predicting the Safe Storage of Fresh Fish Under Modified Atmospheres with Respect to *Clostridium botulinum* Toxigenesis by Modeling Length of the Lag Phase of Growth. J Food Prot. 1990;53:131-40.

Baker DA, Genigeorgis C, Garcia G. Prevalence of *Clostridium botulinum* in Seafood and Significance of Multiple Incubation Temperatures for Determination of Its Presence and Type in Fresh Retail Fish. J Food Prot 1990;53:668-73.

Bakheit AMO, Ward CD, McLellan DL. Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum type A: a report of two cases. J Neurol Neuros Psychiat. 1997;62:198.

Baljer G, Chorherr S, Hoffmann R, Knöppler H, Wiedemann H. *Clostridium botulinum* Toxin vom Typ C als Ursache eines Vogelsterbens an einem oberbayrischen See. Tierärztl Prax. 1974;2:191-7.

Banks H, Nickelson R, Finne G. Shelf-life studies on carbon dioxide-packaged finfish from the Gulf of Mexico. J Food Sci. 1980;45:157.

Barbut S, Tanaka N, Maurer AJ. Effects of varying levels of chloride salts on *Clostridium botulinum* toxin production in Turkey Frankfurters. J Food Sci. 1986;51:1129-31.

Bartlett JC. Infant botulism in adults. N Engl J Med. 1986;315:254-5.

Bartram U, Singer D. Säuglingsbotulismus und Plötzlicher Kindstod: Eine kritische Bestandsaufnahme. Klin Päd. 2004;216:26-30.

Bauernfeind A, Shah PM. Botulismus. In: Bauernfeind A, Shah PM, editors. Lexikon der Mikrobiologie und der Infektiologie. 2nd ed. Stuttgart, New York: Schattauer-Verlag; 1995. p.47.

Bäumer J. Beschleunigung der Abtötung von Sporen des *Clostridium tetani* und *Clostridium botulinum* durch Kochen unter Zusatz von Korsyl-Bacillol, Sporil bzw. Zephirol [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 1956.

- Baumgart J. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ E. 1. Mitteilung: Toxinnachweis bei Plattfischen. Arch Leb Mitt Hyg. 1970a;21:102-4.
- Baumgart J. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ E. Fleischw. 1970b;11:1545-6.
- Baumgart J. Vorkommen und Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ E in Seefischen. 2. Mitteilung. Arch Leb Mitt Hyg. 1972;23:34-9.
- Baumgart J. Vorkommen, Bedeutung und Nachweis aerober und anaerober Sporenbildner in Lebensmitteln. KIN-Mitteilung. 1975;86:407-10.
- Bayoumi S. Nisin and yoghurt manufacture. Chem Mikrobiol Techn Lebensm. 1991;13:65-9.
- Bean NH, Goulding JS, Daniels MT, Angulo FJ. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 1988-1992. J Food Prot. 1997;60:1265-86.
- Bean NH, Griffin PM. Foodborne Disease Outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, Vehicles, and Trends. J Food Prot. 1990;53:804-17.
- Becker H. Nisin. In: Wiesner E, Ribbeck R, editors. Lexikon der Veterinärmedizin. 4th ed. Stuttgart: Enke-Verlag; 2000. p.1031.
- Beer J. Botulismus. In: Beer J, editor. Infektionskrankheiten der Haustiere. 3rd ed; Vol 2. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag; 1987. p.737-44.
- Beers WH, Reich E. Isolation and characterization of *Clostridium botulinum* type B toxin. J B Chem. 1969;244:4473-9.
- Behrens S. Serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Clostridium botulinum* [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1999.
- Behrens S, Sukop U, Saternus K-S, BöhnelH. SID und Botulismus. Lässt sich ein Zusammenhang nachweisen?. In: Saternus K-S, Karimow S, editors. Rechtsmedizinische Forschungsergebnisse, Band 18 „Säuglingssterblichkeit – plötzlicher Kindstod. Lübeck: Schmidt-Römhild Verlag; 1998. p.121-6.
- Bell C, Kyriakides A. *Clostridium botulinum* – A practical approach to the organism and its control in foods. Oxford: Blackwell Science – practical food microbiology series. 2000.
- Bellinger H, Körnlein M, Lembke A. Das Verhalten des Toxins von *Clostridium botulinum* und *Salmonella enteritidis* gegenüber Chemotherapeutika, Antibiotika und Farbstoffen. Zbl Bakt Parasit Kde. Abt.I 1951;156:430-45.

Bernard W, Divers TJ, Whitlock RH, Messick J, Tulleners E. Botulism as a sequel to open castration in a horse. *J Am vet med Ass.* 1987;191:73-4.

Berndt SF. Botulismus. *Med Klin.* 1978;73:879-87.

Berweck S, Heinen F. Use of Botulinum Toxin in Pediatric Spasticity (Cerebral Palsy). *Movement Disorders.* 2004;19:S162-7.

Betts GD. Code of Practice for the Manufacture of Vacuum and Modified Atmosphere Packaged Chilled Foods with Particular Regard to the Risks of Botulism, Guideline No. 11. Chipping Campden, UK: Campden and Chorleywood Food Research Association; 1996.

Betts GD, Gaze JE. Growth and heat resistance of psychotrophic *Clostridium botulinum* in relation to sous vide products. *Food Con.* 1995;6:57-63.

Bhattacharyya SD, Sugiyama H. Inactivation of Botulinum and Tetanus Toxins by Chelators. *Infect Immun.* 1989;57:3053-7.

Bhattacharyya SD, Sugiyama H, Rust P, Lacey D. Evidence that subunits of type A botulinum toxin need not be linked by disulfide. *Toxicon.* 1988;26:817-25.

Black JD, Dolly JO. Interaction of ¹²⁵I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 1986;103:535-44.

Blandford TB, Roberts TA, Ashton WLG. Losses from botulism in mallard duck and other water fowl. *Vet Rec.* 1969;85:541-3.

Blatz R. *Clostridium botulinum* (Botulismus, „Wurstvergiftung“). In: Blatz R, editor. *Medizinische Mikrobiologie und Immunologie systematisch.* Bremen: UNI-MED; 1999. p.147-9.

Blocher JC, Busta FF. Influence of Potassium Sorbate and Reduced pH on the Growth of Vegetative Cells of Four Strains of Type A and B *Clostridium botulinum*. *J Food Sci.* 1983a;48:574-80.

Blocher JC, Busta FF. Bacterial Spore Resistance to Acid. *Food Techn.* 1983b;37:87-99.

Blocher JC, Busta FF. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduce pH and sorbate. *J appl Bact.* 1985;59:469-78.

Blocher JC, Busta FF, Sofos JN. Influence of Potassium Sorbate and ph on Ten Strains of Type A and B *Clostridium botulinum*. *J Food Sci.* 1982;47:2028-32.

Bögl KW, Nelle N, Schreiber GA. Kontrolle und Nachweis der Lebensmittelbestrahlung. In: Todt A, Murr C, Müller G, editors. Tagungsreihe Neubewertung von Lebensmittelqualität: Neue Technologien im Lebensmittelsektor: Gentechnik und Lebensmittelbestrahlung. Köln: Katalyse-Institut für angewandte Umweltforschung in Kooperation mit buntstift e.V. & Evangelische Akademie Mülheim/Ruhr; 1993. p.64-79.

Böhnel H. Ökologische Einflüsse auf den Ausbruch von Bodenseuchen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1987;100:347-52.

Böhnel H. Botulismus. In: Blobel H, Schließer T, editors. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. 2nd ed; Vol 2/4. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1995. p.89-153.

Böhnel H. Botulismus – eine vergessene Erkrankung?. Berl Münch tierärztl Ws. 1999;112:139-45.

Böhnel H. Viszeraler Botulismus – ein neues Krankheitsbild beim Rind?. Vortragsband bpt-Kongress 2004. Vol: Schwein, Rind, kleiner Wiederkäuer. Frankfurt am Main: bpt-Akademie GmbH; 2004. p.109-16.

Böhnel H, Behrens S, Loch P, Lube K, Gessler F. Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Bacteriological results obtained in Central Germany. Eur J Ped. 2001a;160:623-8.

Böhnel H, Gessler F. Botulismusdiagnose seit 1995. Ein Erfahrungsbericht. Berl Münch Tierärztl Ws. 2003;116:269-73.

Böhnel H, Gessler F. Die Entwicklungskaskade des Botulismus. Tierärztl Umsch. 2004;59:12-9.

Böhnel H, Lube K. *Clostridium botulinum* and Bio-compost. A Contribution to the Analysis of Potential Health Hazards Caused by Bio-waste Recycling. J Vet Med. 2000;47:785-95.

Böhnel H, Neufeld K, Gessler F. Botulinum neurotoxin type B in milk of a cow affected by visceral botulism. Vet J. 2005;169:124-5.

Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F. Visceral Botulism – A New Form of Bovine *Clostridium botulinum* Toxication. J Vet Med. 2001b;48:373-83.

Böhnel H, Wernery U, Gessler F. Two Cases of Equine Grass Sickness with Evidence for Soil-borne Origin Involving Botulinum neurotoxin. J Vet Med. 2003;50:178-82.

Bongers JH, Damen CPRM, Grimme NWFA, Tinnemans LAN. Sterfte bij runderen ten gevolge van *Clostridium botulinum* type D veroorzaakt door het gebruik van kuikenmest als ligboxenstrooisel. Tijdschrift Diergeneesk. 1988;113:691-2.

Bonventre PF, Kempe LL. Toxicity enhancement of *Clostridium botulinum* type A and B culture filtrates by proteolytic enzymes. J Bact. 1959a;78:892-3.

Bonventre PF, Kempe LL. Physiology of Toxin Production by *Clostridium botulinum* Types A and B III. Effect of pH and Temperature during Incubation on Growth, Autolysis, and Toxin Production. Appl Microbiol. 1959b;7:374-7.

Bonventre PF, Kempe LL. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B I: Growth, autolysis and toxin production. J Bact. 1960a;79:18-23.

Bonventre PF, Kempe LL. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B IV: Activation of the toxin. J Bact. 1960b;79:24-32.

Boroff D. Study of toxins of *Clostridium botulinum* III: Relation of autolysis to toxin production. J Bact. 1955;70:363-7.

Boroff DA, Cabeen HD. Studies of toxins of *Clostridium botulinum* II: Immunization of rabbits with an atoxic variant of *Clostridium botulinum*, Type C. J Bact. 1954;67:198-201.

Boroff DA, Raynaud M, Prevot AR. Studies of Toxin of *Clostridium botulinum* Type D. J Imm. 1952;68:503-11.

Boroff DA, Reilly JR. Studies of the toxin of *Clostridium botulinum*. V: Prophylactic immunization of pheasants and ducks against avian botulism. J Bact. 1959;77:142-6.

Bossi P, Bricaire F. La toxine botulique, arme bioterroriste. Presse Med. 2003;32:463-5.

Bostedt H. Erkrankungen des neugeborenen Fohlens. In Dietz O, Huskamp B, editors. Handbuch der Pferdepraxis. 2nd ed. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1999. p.145-79.

Bott TL, Deffner JS, McCoy E, Foster EM. *Clostridium botulinum* Type E in Fish from the Great Lakes. J Bact. 1966;91:919-24.

Bott TL, Johnson J, Foster EM, Sugiyama H. Possible Origin of the High Incidence of *Clostridium botulinum* Type E in an Inland Bay (Green Bay of Lake Michigan). J Bact. 1968;95:1542-7.

Bow R, Ferguson H, Madson C, Mather J, Moress G, Furguele T, et al. Botulism – Idaho, Utah. M M W R. 1974;23:241-2.

Bowles LB, Miller AJ. Antibotulinal Properties of Selected Aromatic and Aliphatic Aldehydes. *J Food Prot.* 1993a;56:788-94.

Bowles LB, Miller AJ. Antibotulinal Properties of Selected Aromatic and Aliphatic Ketones. *J Food Prot.* 1993b;56:795-800.

Boyer A, Girault C, Bauer F, Korach JM, Salomon J, Moiro E, et al. Two Cases of Foodborne Botulism Type E and Review of Epidemiology in France. *Eur J Clin Microbiol.* 2001;20:192-5.

Braconnier A, Broussolle V, Dargaignaratz C, Nguyen-The C, Carlin F. Growth and Germination of Proteolytic *Clostridium botulinum* in Vegetable-Based Media. *J Food Prot.* 2003;66:833-9.

Brashear A, Gordon MF, Elovic E, Kassicieh D, Marciniak C, Do M, et al. Intramuscular injection of botulinum toxin for the treatment of wrist and finger spasticity after a stroke. *New Engl J Med.* 2002;347:395-400.

Bread RB, Bradshaw JG, Francis DW. Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* type E in milk. *J D Sci.* 1970;53:1183-6.

Brett MM. Evaluation of the use of the bioMerieux Rapid ID32A for the identification of *Clostridium botulinum*. *Lett appl Microbiol.* 1998;26:81-4.

Breukink HJ, Wagenaar G, Wensing T, Notermans S, Poulos PW. Voedselvergiftiging bij Runderen veroorzaakt door het Eten van Bierbostel besmet met *Clostridium botulinum* Type B. *Tijd Diergeneesk.* 1978;103:303-11.

Brewer MS. Traditional preservatives – Sodium Chloride. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol 3. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.1723-8.

Briozzo J, de Lagarde EA, Chirife J, Parada JL. Effect of Water Activity and pH on Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type G. *A E M.* 1986;51:844-8.

Broussolle V, Alberto F, Shearman CA, Mason DR, Botella L, Nguyen-The C, et al. Molecular and Physiological Characterisation of Spore Germination in *Clostridium botulinum* and *C. sporogenes*. *Anaerobe.* 2002;8:89-100.

Bruckstein S, Tromp AM. Food poisoning in three family dairy herds associated with *Clostridium botulinum* type B. *Isr J vet Med.* 2001;56:95-8.

Bryan FL. Risks of Practices, Procedures and Processes that Lead to Outbreaks of Foodborne Diseases. *J Food Prot.* 1988;51:663-73.

Bucknavage MW, Pierson MD, Hackney CR, Bishop JR. Thermal inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores in oyster homogenates at minimal processing temperatures. J Food Sci. 1990;55:372-3, 429.

Bulatova E, Chulkova JF, Anisimova LI. Detection in the UdSSR of *Clostridium botulinum* type F and its differential diagnosis with type E. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1973;50:105-7.

Bulman C, Ayres JC. Preservative Effect of Various Concentrations of Curing Salts in Comminuted Pork. Food Techn. 1952;6:255-9.

Bundesinstitut für Risikobewertung (ehemals Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin). Merkblatt: Hinweise für Verbraucher zum Botulismus durch Lebensmittel. Berlin: 2001.

Bundesinstitut für Risikobewertung – A. Viszeraler Botulismus – Ein neues Krankheitsbild?. Stellungnahme des BfR vom 17.02.2004. [cited 18.07.2005]. www.bfr.bund.de/cm/208/viszeraler_botulismus_ein_neues_krankheitsbild.pdf.

Bundesinstitut für Risikobewertung – B. Botulismus durch Geflügelfleisch. Stellungnahme des BfR vom 12.08.2004. [cited 18.07.2005]. www.bfr.bund.de/cm/208/botulismus_durch_geflugelfleisch.pdf.

Cai P, Harrison MA, Huang Y, Silva JL. Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type E in Packaged Channel Catfish. J Food Prot. 1997;60:1358-63.

Call JE, Cooke PH, Miller AJ. *In situ* characterization of *Clostridium botulinum* neurotoxin synthesis and export. J appl Bact. 1995;79:257-63.

Calsow P, Helbing H, Ludwig C, Schlegelmilch R. Seuchenhaftes Sterben von Wasservögeln an einem Stausee – Fallbericht. Tierärztl Umsch. 1995;50:477-80.

Cann DC, Taylor LY. The control of the botulism hazard in hot-smoked trout and mackerel. J Food Technol. 1979;14:123-9.

Cann DC, Taylor LY, Hobbs G. The Incidence of *Clostridium botulinum* in Farmed Trout Raised in Great Britain. J appl Bact. 1975;39:331-6.

Cann DC, Wilson BB, Hobbs G, Shewan JM. The Growth and Toxin Production of *Clostridium botulinum* Type E in certain Vacuum Packed Fish. J appl Bact. 1965;28:431-6.

Cann DC, Wilson BB, Hobbs G, Shewan JM. Toxin production by *Clostridium botulinum* type E in vacuum packaged fish. In: Ingram M, Roberts TA, editors. Botulism 1966. In: Proceedings of the Vth International Symposium of Food Microbiology, Moskau, UdSSR. London, England: Chapman and Hall, Ltd.; 1967. p.202-6

Cann DC, Wilson BB, Shewan JM, Hobbs G. Incidence of *Clostridium botulinum* type E in fish products in the United Kingdom. Nature. 1966b;211:205-6.

Cann DC, Wilson BB, Shewan JM, Roberts TA, Rhodes DN. A Comparison of Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type E in Irradiated and Unirradiated Vacuum Packed Fish. J appl Bact. 1966a;29:540-8.

Cardoso F, Jankovic J. Clinical Use of Botulinum Neurotoxins. In: Montecucco C, editor. Clostridial Neurotoxins. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1995. p.123-41.

Carlier J-P, K'ouas G, Lozniewski A, Sirveaux F, Cailloux P, Mory F. Osteosynthesis-Associated Bone Infection Caused by a Nonproteolytic, Nontoxigenic *Clostridium botulinum* Like Strain. J clin Microbiol. 2004;42:484-6.

Carlin F, Peck MW. Growth of and Toxin Production by Nonproteolytic *Clostridium botulinum* in Cooked Pureed Vegetables at Refrigeration Temperatures. A E M. 1996;62:3069-72.

Carroll BJ, Garrett ES, Reese GB, Ward BQ. Presence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Venezuela and the Gulf of Darién. Appl Microbiol. 1966;14:837-8.

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

Castell CH. Growth of *Clostridium botulinum* in seaweeds and marine fish. J Fish Res Board. 1947;7:62-9.

Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus *Clostridium*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Baltimore, MD, USA: Williams and Wilkins. 1986. p.1141-200.

Chai T-J, Liang KT. Thermal Resistance of Spores from Five Type E *Clostridium botulinum* Strains in Eastern Oyster Homogenates. J Food Prot. 1992;55:18-22.

Chaibi A, Ababouch LH, Busta FF. Inhibition of Bacterial Spores and Vegetative Cells by Glycerides. J Food Prot. 1996a;59:716-22.

Chaibi A, Ababouch LH, Busta FF. Inhibition by Monoglycerides of L-Alanine-Triggered *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* Spore Germination and Outgrowth. J Food Prot. 1996b;59:832-7.

Chandan RC, Ereifej KI. Determination of lysozyme in raw fruits and vegetables. J Food Sci. 1981;46:1278-9.

Chaudhry R, Dhawan B, Kumar D, Bhatia R, Gandhi JC, Patel RK, et al. Outbreak of Suspected *Clostridium butyricum* Botulism in India. Emerg Inf Dis. 1998;4:506-7.

Chea FP, Chen Y, Montville TJ, Schaffner DW. Modeling the Germination Kinetics of *Clostridium botulinum* 56A Spores as Affected by Temperature, pH, and Sodium Chloride. J Food Prot. 2000;63:1071-9.

Cherington M. Clinical spectrum of botulism. Mus Ner. 1998;21:701-10.

Chia JK, Clark JB, Ryan CA, Pollack M. Botulism in an adult associated with food-borne intestinal infection with *Cl. botulinum*. N Engl J Med. 1986; 315:239-41.

Christiansen LN. Factors influencing botulinal inhibition by nitrite. Food Techn. 1980;34:237-9.

Christiansen LN, Deffner J, Foster EM, Sugiyama H. Survival and Outgrowth of *Clostridium botulinum* Type E Spores in Smoked Fish. Appl Microbiol. 1968;16:133-7.

Christiansen LN, Johnston RW, Kautter DA, Howard JW, Aunan WJ. Effect of Nitrite and Nitrate on Toxin Production by *Clostridium botulinum* and on Nitrosamine Formation in Perishable Canned Comminuted Cured Meat. Appl Microbiol. 1973;25:357-62.

Christopher FM, Seideman SC, Carpenter ZL, Smith GC, Vanderzant C. Microbiology of Beef Packaged in Various Gas Atmospheres. J Food Prot. 1979a;42:240-4.

Christopher FM, Vanderzant C, Carpenter ZL, Smith GC. Microbiology of Pork Packaged in Various Gas Atmospheres. J Food Prot. 1979b;42:323-7.

Chulkova IE, Bulatova TJ, Anisimova LI. Contamination of fish with the causative agents of botulinum type F, and its differentiation with type E. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1976;53:74-6.

Ciccarelli AS, Whaley DN, McCroskey LM, Gimenez DF, Dowell VR, Hatheway CL. Cultural and Physiological Characteristics of *Clostridium botulinum* Type G and the Susceptibility of Certain Animals to Its Toxin. A E M. 1977;34:843-8.

Ciplef DJ, Wobeser G. Observations on waterfowl carcasses during a botulism epizootic. J Wildlife Dis. 1993;29:8-14.

Coenen M. Fütterungsbedingungen und Botulismus beim Pferd. Vortragszusammenfassungen BPT-Kongress. 1997;145-6.

Collins-Thompson DL, Chang PC, Davidson CM, Larmond E, Pivnick H. Effect of nitrite and storage temperature on the organoleptic quality and toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in vacuum-packaged side bacon. J Food Sci. 1974;39:607-9.

Cone RD, Lechowich RV. Differentiation of *Clostridium botulinum* Types A, B, and E by Pyrolysis-Gas-Liquid Chromatography. Appl Microbiol. 1970;19:138-45.

Cottrell DF, McGorum BC, Pearson GT. The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanism. Neurogastroenterol.Mot. 1999;11:79-92.

Craig JM, Pilcher KS. *Clostridium botulinum* Type F: Isolation from Salmon from the Columbia River. Science. 1966;153:311-2.

Crandall AD, Montville TJ. Inhibition of *Clostridium botulinum* Growth and Toxigenesis in a Model Gravy System by Coinoculation With Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. J Food Prot. 1993;56:485-8, 492.

Crandall AD, Winkowski K, Montville TJ. Inability of *Pediococcus pentosaceus* to Inhibit *Clostridium botulinum* in *sous vide* Beef With Gravy at 4 and 10°C. J Food Prot. 1994;57:104-7.

Crawford Mechem C, Walter FG. Wound Botulism. Vet Human Toxicol. 1994;36:233-7.

Crisley FD, Peeler JT, Angelotti R, Hall HE. Thermal Resistance of Spores of Five Strains of *Clostridium botulinum* Type E in Ground Whitefish Chubs. J Food Sci. 1968;33:411-6.

Cunningham FE, Proctor VA, Goetsch SJ. Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. Wild Poult Sci J. 1991;47:141-63.

Cuppett SL, Gray JI, Pestka JJ, Booren AM, Price JF, Kutil CL. Effect of Salt Level and Nitrite on Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type E Spores in Smoked Great Lakes Whitsfish. J Food Prot. 1987;50:212-7.

Dack GM, Starin WA, Werner M. Growth of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* in veal infusion broth under reduced pressure. J infect Dis. 1927;40:525-32.

Dack GM, Williston EH. Effect of oxygen on the viability of young cultures of *Clostridium botulinum*. J infect Dis. 1929;44:26-32.

Dack GM, Wood WL. The mechanism of toxin production by *Clostridium botulinum*. J infect Dis. 1928;42:213-7.

Dahlenborg M, Borch E, Radström P. Development of a Combined Selection and Enrichment PCR Procedure for *Clostridium botulinum* Types B, E and F and Its Use To Determine Prevalence in Fecal Samples from Slaughtered Pigs. A E M. 2001;67:4781-8.

Dahlenborg M, Borch E, Radström P. Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. *Int J Food Microbiol.* 2003;82:105-10.

Daifas DP, Smith JP. Challenge studies with proteolytic *Clostridium botulinum* in yeast and chemically leavened crumpets packaged under modified atmospheres. *J Food Saf.* 2003;23:107-25.

Daifas DP, Smith JP, Blanchfield B, Austin JW. Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in English-style Crumpets Packaged Under Modified Atmospheres. *J Food Prot.* 1999a;62:349-55.

Daifas DP, Smith JP, Blanchfield B, Austin JW. Effect of pH and CO₂ on Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in English-Style Crumpets Packaged under Modified Atmospheres. *J Food Prot.* 1999b;62:1157-61.

Daifas DP, Smith JP, Blanchfield B, Sanders G, Austin JW, Koukoutsis J. Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int J Food Microbiol.* 2004;94:313-22.

DasGupta BR, Berry LJ, Boroff DA. Purification of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Biochim biophys A.* 1970;214:343-9.

DasGupta BR, Boroff DA. Separation and characterization of hemagglutinin from crystalline toxin of *Clostridium botulinum* type A by anion exchange chromatography and determination of their dimensions by gel filtration. *J B Chem.* 1968;243:1065-72.

DasGupta BR, Boroff DA, Cheong K. Isolation of chromatographically pure toxin of *Clostridium botulinum* type B. *Biochem Biophys Res Comm.* 1968;32:1057-63.

DasGupta BR, Sugiyama H. A common subunit structure in *Clostridium botulinum* type A, B and E toxins. *Biochem Biophys Res Comm.* 1972;48:108-12.

DasGupta BR, Sugiyama H. Biochemistry and pharmacology of botulinum and tetanus neurotoxins. In: Bernheimer AW, editor. *Perspectives in toxinology.* New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1977. p. 88-119.

Davies EA, Delves-Broughton J. Nisin. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.191-8.

Davies AB, Roberts TA, Bradshaw PR. Probable botulism in calves. *Vet Rec.* 1974;94:412-4.

Day BPF. Principles. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.403-10.

Dehof E. Untersuchungen über die Haltbarkeit heißgeräucherter, vakuumverpackter Forellenfilets unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum* Typ E [Dissertation troph.]. Bonn, Universität Bonn; 1994.

Dehof E, Greuel E, Krämer J. Zur Tenazität von *Clostridium botulinum* Typ E in heißgeräucherten vakuumverpackten Forellenfilets. Arch Leb Mitt Hyg. 1989;40:27-9.

Dekleva ML, DasGupta BR. Nicking of single chain *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by an andogenous protease. Biochem Biophys Res Comm. 1989;162:767-72.

del Torre M, Stecchini ML, Braconnier A, Peck MW. Prevalence of *Clostridium* species and behaviour of *Clostridium botulinum* in gnocchi, a REPFED of italian origin. Int J Food Microbiol. 2004;96:115-31.

del Torre M, Stecchini ML, Peck MW. Investigation of the Ability of Proteolytic *Clostridium Botulinum* to Multiply and Produce Toxin in Fresh Italian Pasta. J Food Prot. 1998;61:988-93.

Demarchi J, Mourgues C, Orio J, Prevot AR. Existence du botulisme humain de type D. Bull Acad nat Med. 1958;142:580-2.

Denny CB, Goeke DJ, Sternberg R. Inoculation tests of *Clostridium botulinum* in canned breads with specific reference to water activity. Res Rep. 1969;4:69.

Dezfulian M. Aerobic Growth and Toxingenicity of *Clostridium botulinum* Types A and B. Fol microbiol. 1999;44:167-70.

Dickson EC. Dormancy or delayed germination of spores of *Clostridium botulinum* subjected to heat. Proc Soc exp Biol Med. 1928;25:426-7.

Diehl JF. Sterilisation von Lebensmitteln durch Strahlen. Zbl Bakt Hyg. Abt. I, Orig. B 1972;156:157-70.

Dietz B. Botulismus beim Pferd – Ein Fallbericht. Pferdeheilk. 1998;14:373-6.

Divers TJ, Bartholomew RC, Messick JB, Whitlock RH, Sweeney RW. *Clostridium botulinum* type B toxicosis in a herd of cattle and a group of mules. J Am vet med Ass. 1986;188:382-6.

Döbereiner J, Tokarnia CH, Langenegger J, Dutra IS. Epizootic Botulism of cattle in Brazil. Dt T W. 1992;99:188-90.

Dodds KL. Combined Effect of Water Activity and pH on Inhibition of Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Cooked, Vacuum-Packed Potatoes. A E M. 1989;55:656-60.

Dodds KL, Austin JW. *Clostridium botulinum*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Washington, D.C.: ASM Press; 1997. p.288-304.

Doellgast GJ, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Rho BH, Roman MG, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Enzyme-Linked Coagulation Assay for Detection to *Clostridium botulinum* Neurotoxins A, B, and E and Solution-Phase Complexes with Dual-Label Antibodies. J Clin Microbiol. 1994;32:105-11.

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

Dolman CE, Chang H. The Epidemiology and Pathogenesis of Type E and Fish-Borne Botulism. Can J publ Hlth. 1953;44:231-44.

Dolman CE, Chang E. Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. Can J Microb. 1972;18:67-76.

Dolman CE, Chang H, Kerr DE, Shearer AR. Fish-Borne and Type E Botulism: Two Cases Due to Home-Pickled Herring. Can J publ Hlth. 1950;41:215-29.

Dolman CE, Murakami L. *Clostridium botulinum* type F with recent observations on other types. J infect Dis. 1961;109:107-28.

Dolman CE, Tomsich M, Campbell CCR, Laing WB. Fish eggs as a cause of human botulism. J infect Dis. 1960;106:5-19.

Doyle MP. Effect of Carbon Dioxide on Toxin Production by *Clostridium botulinum*. Eur J appl Microbiol Biotechnol. 1983;17:53-6.

Dozier CC. Optimum and limiting hydrogen-ion concentrations for *Bacillus botulinus* and quantitative estimation of its growth. J infect Dis. 1924a;35:105-33.

Dozier CC. Inhibitive influence of sugars and salt on viability, growth, and toxin production of *Bacillus botulinus*. J infect Dis. 1924b;35:134-55.

Dressler D. Botulinum Toxin Therapy. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2000.

Dressler D. Botulismus durch Räucherlachsverzehr. Nervenarzt. 2005;76:763-6.

Duda JJ, Slack JM. Toxin Production in *Clostridium botulinum* as Demonstrated by Electron Microscopy. J Bact. 1969;97:900-4.

Duff JT, Wright GG, Yarinsky A. Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J Bact. 1956;72:455-60.

Düllick B. Vergleichende Untersuchungen über die Toxinbildung von *Clostridium botulinum* in Leberbouillon, steriler Magermilch, steriler Magermilch, pasteurisierter Milch und Rohmilch [Dissertation med. vet.]. Berlin: Humboldt Universität Berlin; 1957.

Duncan CL, Foster EM. Effect of Sodium Nitrite, Sodium Chloride, and Sodium Nitrate on Germination and Outgrowth of Anaerobic Spores. Appl Microbiol. 1968;16:406-11.

Duncan RM, Jensen WI. A relationship between avian carcasses and living intervertebrates in the epizootiology of avian botulism. J Wildlife Dis. 1976;12:116-26.

Dymicky M, Bencivengo M, Buchanan RL, Smith JL. Inhibition of *Clostridium botulinum* 62A by Fumarates and Maleates and Relationship of Activity to Some Physiochemical Constants. A E M. 1987;53:110-3.

Easton EJ, Meyer KF. Occurrence of *Bacillus botulinus* in human and animal excreta. J infect Dis. 1924;35:207-12.

Ebert H. Über das Vorkommen anaerober Bazillen in der Umgebung fischverarbeitender Betriebe unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum* [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1954.

Eckner KF, Dustman WA, Rys-Rodriguez .AA. Contribution of Composition, Physiochemical Characteristics and Polyphosphates to the Microbiological Safety of Pasteurized Cheese Spreads. J Food Prot. 1994;57:295-300.

Eisner M. Die Pasteurisation von Schinkenhalbkonserven mit Hilfe des selektiven Stufenverfahrens. Fleischw. 1979;59:1443-51.

Eklund MW. Significance of *Clostridium botulinum* in fishery products preserved short of sterilization. Food Techn. 1982;36:112-5.

Eklund MW, Pelroy GA, Paranjpye R, Peterson ME, Teeny FM. Inhibition of *Clostridium botulinum* Types A and E Toxin Production by Liquid Smoke and NaCl in Hot-Process Smoke-Flavored Fish. J Food Prot. 1982;45:935-41.

Eklund MW, Peterson ME, Paranjpye R, Pelroy GA. Feasibility of a Heat-Pasteurization Process for the Inactivation of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* types B and E in Vacuum-Packaged, Hot-Process (Smoked) Fish. J Food Prot. 1988a;51:720-6.

Eklund MW, Poysky FT. *Clostridium botulinum* type F from marine sediments. Science. 1965;149:306.

Eklund MW, Poysky FT. Activation of a Toxic Component of *Clostridium botulinum* Types C and D by Trypsin. Appl Microbiol. 1972;24:108-13.

Eklund MW, Poysky FT. Interconversion of Type C and D Strains of *Clostridium botulinum* by Specific Bacteriophages. Appl Microbiol. 1974;27:251-8.

Eklund MW, Poysky FT, Boatman ES. Bacteriophages of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F and Nontoxigenic Strains Resembling Type E. J Virol. 1969;3:270-4.

Eklund MW, Poysky FT, Meyers JA, Pelroy GA. Interspecies Conversion of *Clostridium botulinum* Type C to *Clostridium novyi* Type A by Bacteriophage. Science. 1974;186:456-8.

Eklund MW, Poysky FT, Mseitif LM, Strom MS. Evidence for Plasmid-Mediated Toxin and Bacteriocin Production in *Clostridium botulinum* Type G. A E M. 1988b;54:1405-8.

Eklund MW, Poysky FT, Peterson ME, Paranpye RN, Pelroy GA. Competitive Inhibition between Different *Clostridium botulinum* Types and Strains. J Food Prot. 2004;67:2682-7.

Eklund MW, Poysky FT, Reed SM, Smith CA. Bacteriophage and the Toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. Science. 1971;172:480-2.

Eklund MW, Poysky FT, Wieler DI. Characteristics of *Clostridium botulinum* Type F Isolated from the Pacific Coast of the United States. Appl Microbiol. 1967b;15:1316-23.

Eklund MW, Wieler DI, Poysky FT. Outgrowth and Toxin Production of Nonproteolytic Type B *Clostridium botulinum* at 3,3 to 5,6°C. J Bact. 1967a;93:1461-2.

Elad D, Yas-Natan E, Aroch I, Shamir MH, Kleinbart S, Hadash D, et al. Case Reports. Natural *Clostridium botulinum* Type C Toxicosis in a Group of Cats. J Clin Microb. 2004;42:5406-8.

Elias PS. Die gesundheitliche Unbedenklichkeit bestrahlter Lebensmittel. In: Ehlermann DAE, Wolf WEL, editors. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung: Lebensmittelbestrahlung. Karlsruhe; 1992. p.16-31.

Eller C, Edwards FF, Wynne ES. Sporicidal Action of Auto-oxidized Asorbic Acid for *Clostridium*. Appl Microb. 1968;16:349-54.

Elliott PH, Schaffner DW. Germination, Growth, and Toxin Production of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* as Affected by Multiple Barriers. J Food Sci. 2001;66:575-9.

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

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

Emodi AS, Lechowich RV. Low temperature growth of Type E *Clostridium botulinum* spores I: Effects of sodium chloride, sodium nitrite and pH. J Food Sci. 1969a;34:78-81.

Emodi AS, Lechowich RV. Low temperature growth of Type E *Clostridium botulinum* spores II: Effect of solutes and incubation temperature. J Food Sci. 1969b;34:82-7.

Enfors S-O, Molin G. The influence of high concentrations of Carbon Dioxide on the germination of bacterial spores. J appl Bact. 1978;45:279-85.

Eyles MJ, Warth AD. Assessment of the risk of botulism from vacuum-packaged raw fish: a review. Food Techn Austr. 1981;33:574-80.

Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP, Popoff MR. PCR and Gene Probe Identification of Botulinum Neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-Producing *Clostridium* spp. and Evaluation in Food Samples. A E M. 1995;61:389-92.

Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaingaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of *Clostridium botulinum* in Fish and Environmental Samples from a Coastal Area in Northern France. A E M. 2002;68:5870-6.

Fantasia LD, Duran AP. Incidence of *Clostridium botulinum* Type E in Commercially and Laboratory Dressed Whitefish Chubs. Food Techn. 1969;23:85-6.

Farber JM. Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere Packaging Technology – A Review. J Food Prot. 1991;54:58-70.

Farchim G. Zur Statistik der Fleischvergiftungen im Jahre 1949. Mh Vet Med. 1950;5:296-8.

Farchim G. Zur Statistik der Lebensmittelvergiftungen und zu den Erkrankungen nach dem Genuß von Lebensmitteln. Mh Vet Med. 1954;2:39-40.

Farrow BRH, Murrell WG, Revington ML, Stewart BJ, Zuber RM. Type C botulism in young dogs. Aust vet J. 1983;60:374-7.

Fehlhaber K. *Clostridium botulinum*. In: Fehlhaber K, Janetschke P, editors. Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene. Jena Stuttgart: Gustav-Fischer Verlag; 1992. p.62-4.

Fehlhaber K. Persönliche Mitteilung. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig; 2004.

Feldmeier H. Bedrohung durch Biowaffen. Praxis. 2002;91:338-9.

Fenicia L, Ferrini AM, Aureli P, Pocecco M. A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. Eur J Epidemiol. 1993;9:671-3.

Fenske G, Pioch G. Veterinärhygienische Anforderungen an den Einsatz von Küchenabfällen. Mh Vet Med. 1983;38:781-4.

Fernandez RA, Ciccarelli AS, de Centorbi ONP, Centorbi H, Rosetti FA, de Jong LIT, et al. Infant botulism in Argentina, 1982-1997. Anaerobe. 1999;5:177-9.

Fernandez PS, Peck MW. Predictive Model Describing the Effect of Prolonged Heating at 70 to 80°C and Incubation at Refrigeration Temperatures on Growth and Toxigenesis by Nonproteolytic *Clostridium botulinum*. J Food Prot. 1997;60:1064-71.

Fernandez PS, Peck MW. A predictive model that describes the effect of prolonged heating at 70 to 90°C and subsequent incubation at refrigeration temperatures on growth from spores and toxigenesis by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in the presence of lysozyme. A E M. 1999;65:3449-57.

Fernandez E, Tang T, Grecz N. Toxicity of Spores of *Clostridium botulinum* Strain 33A in Irradiated Ground Beef. J gen Microbiol. 1969;56:15-21.

Firstenberg-Eden R, Rowley DB, Shattuck GE. Factors affecting growth and toxin production by *Clostridium botulinum* type E on irradiated (0,3Mrad) chicken skins. J Food Sci. 1982;47:867-70.

Fischer D, Freisleder A, Jorch G. Plötzlicher Tod bei Zwillingen: Botulismus durch Kontamination von Gemüsebrei. Klin Päd. 2004;216:31-5.

Fish NA, Mitchell WR, Barnum DA. A Report of a National Outbreak of Botulism in Pheasants. Can J publ Hlth. 1967;58:30.

FitzGerald S, Lyons R, Ryan J, Hall W, Gallagher C. Botulism as a cause of respiratory failure in injecting drug users. Ir J Med Sci. 2003;172:143-4.

Flemmig R, Stojanowic V. Untersuchungen von Bienenhonig auf *Clostridium botulinum* Sporen. Arch Leb Mitt Hyg. 1980;31:179-80.

Foegeding PM, Busta FF. Effect of Carbon Dioxide, Nitrogen and Hydrogen Gases on Germination of *Clostridium botulinum* Spores. J Food Prot. 1983;46:987-9.

Foreyt WJ, Abinanti FR. Maggot-associated type C botulism in game farm pheasants. J Am vet med Ass. 1980;177:827-8.

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

Foster JW, Wynne ES. The problem of „Dormancy“ in bacterial spores. J Bact. 1948;55:623-5.

Franciosa G, Aureli P, Schechter R. *Clostridium botulinum*. In: Miliotis MD, Bier JW, editors. International Handbook of Foodborne Pathogens. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.; 2003. p.61-90.

Franciosa G, Ferreira JL, Hatheway CL. Detection of Type A, B, and E Botulism Neurotoxin Genes in *Clostridium botulinum* and Other *Clostridium* Species by PCR: Evidence of Unexpressed Type B Toxin Genes in Type A Toxigenic Organisms. J Clin Microbiol. 1994;32:1911-7.

Franciosa G, Pourshaban M, Gianfranceschi M, Gattuso A, Fenicia L, Ferrini AM, et al. *Clostridium botulinum* Spores and Toxin in Mascarpone Cheese and Other Milk Products. J Food Prot. 1999;62:867-71.

Frean J, Arntzen L, van den Heever J, Perovic O. Fatal type A botulism in South Africa. Trans Roy Soc trop med hyg. 2004;98:290-5.

Galey FD, Terra R, Walker R, Adaska J, Etchebarne MA, Puschner B, et al. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. J vet Diagn Invest. 2000;12:204-9.

Gao QY, Huang YF, Wu JG, Liu HD, Xia HQ. A Review of Botulism in China. Biomed Environm Sci. 1990;3:326-36.

Gao Q, Liu HD, Wu JG, Hou EE, Yao JW, Chen XN, et al. Investigations on the distribution of toxin-producing *Clostridium botulinum* in coastal areas. Chin J Prev Med (Beijing). 1984;18:129-31.

Garcia G, Genigeorgis C. Quantitative Evaluation of *Clostridium botulinum* Nonproteolytic Types B, E and F Growth Risk in Fresh Salmon Tissue Homogenates Stored under Modified Atmospheres. J Food Prot. 1987;50:390-7.

Garcia G, Genigeorgis C, Lindroth S. Risk of Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* Nonproteolytic Types B, E and F in Salmon Fillets Stored Under Modified Atmospheres at Low and Abused Temperatures. J Food Prot. 1987;50:330-6.

Garren DM, Harrison MA, Huang Y-W. Growth and Production of Toxin of *Clostridium botulinum* Type E in Rainbow Trout Under Various Storage Conditions. J Food Prot. 1995;58:863-6.

Gaze JE, Brown GD. Determination of the heat resistance of a strain of non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B and a strain of type E, heated in cod and carrot homogenate over the temperature range 70 to 90°C. Chipping Campden, UK: Campden Food and Drink Research Association Technical Memorandum No.592; 1990.

Genigeorgis C, Meng J, Baker DA. Behaviour of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B and E spores in cooked turkey and modeling lag phase and probability of toxigenesis. J Food Sci. 1991;56:373-9.

Gerber H. Grass Sickness und verwandte Krankheiten. In: Gerber H, editor. Pferdekrankheiten. Vol 1. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 1994a. p.191-3.

Gerber H. Botulismus. In: Gerber H, editor. Pferdekrankheiten. Vol 1. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 1994b. p.239-41.

Gerwing J, Dolman CE, Bains HS. Isolation and characterization of a toxic moiety of low molecular weight from *Clostridium botulinum* type A. J Bact. 1965b;89:1383-6.

Gerwing J, Dolman CE, Kason DV, Tremaine JH. Purification and characterization of *Clostridium botulinum* type B toxin. J Bact. 1966;91:484-7.

Gerwing J, Dolman CE, Ko A. Mechanism of tryptic activation of *Clostridium botulinum* type E toxin. J Bact. 1965a;89:1176-9.

Gerwing J, Dolman CE, Reichmann ME, Bains HS. Purification and molecular weight determination of *Clostridium botulinum* type E toxin. J Bact. 1964;88:216-9.

Gerwing J, Morrell RW, Nitz RM. Intracellular synthesis of *Clostridium botulinum* Type B Toxin I. Demonstration of Toxin Synthesis and Sedimentation Studies in Toxic Products. J Bact. 1968;95:22-7.

Gessler F, Böhnel H. Grundlagen der Bakteriologie beim Botulismus und praktische Relevanz bei der Silagefütterung des Pferdes. In: Bundesverband Praktischer Tierärzte e.V., editor. BPT-Kongress 2001 – Vortragszusammenfassungen; 2001a. p.212-7.

Gessler F, Böhnel H. Eine (un-)bekannte Krankheit im Rinderstall: Botulismus. Arbeitsergebnisse. 2001b;51:14-9.

Gessler F, Böhnel H. Nachweis von Botulinum-Neurotoxinen – ein methodischer Über- und Ausblick. Tierärztl Umsch. 2004;59:5-9.

Gibson AM, Ellis-Brownlee RCL, Cahill ME, Szabo EA, Fletcher GC, Bremer PJ. The effect of 100% CO₂ on the growth of nonproteolytic *Clostridium botulinum* at chill temperatures. *Int J Food Microbiol.* 2000;54:39-48.

Gibson AM, Modi NK, Roberts TA, Shone CC, Hambleton P, Melling J. Evaluation of a monoclonal antibody-based immunoassay for detecting type A *Clostridium botulinum* toxin produced in pure culture and an inoculated model cured meat system. *J appl Bact.* 1987;63:217-26.

Gill DM. Bacterial Toxins: a Table of Lethal Amounts. *Microbiol Rev.* 1982;46:86-94.

Gilliland SE, Speck ML. Antagonistic Action of *Lactobacillus acidophilus* Toward Intestinal and Foodborne Pathogens in Associative Cultures. *J Food Prot.* 1977;40:820-3.

Gimenez DF, Ciccarelli AS. *Clostridium botulinum* Type F in the Soil of Argentina. *Appl Microbiol.* 1968;16:732-4.

Gimenez DF, Ciccarelli AS. Another Type of *Clostridium botulinum*. *Zbl Bakt Hyg. I.Abt.Orig.* 1970;215:221-4.

Girardin H, Albagnac C, Dargaignaratz C, Nguyen-The C, Carlin F. Antimicrobial Activity of Foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. *J Food Prot.* 2002;65:806-13.

Girlanda P, Vita G, Nicolosi C, Milone S, Messina C. Botulinum toxin therapy: distant effects on neuromuscular transmission and autonomic nervous system. *J Neurol Neuros Psychiat.* 1992;55:844-5.

Glass KA, Doyle MP. Relationship between water activity of fresh pasta and toxin production by proteolytic *Clostridium botulinum*. *J Food Prot.* 1991;54:162-5.

Glass KA, Kaufman KM, Smith AL, Johnson EA, Chen JH, Hotchkiss J. Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Pateurized Milk Treated with Carbon Dioxide. *J Food Prot.* 1999;62:872-6.

Gonzalez-Fandos E, Gimenez M, Olarte C, Sanz S, Simon A. Effect of packaging conditions on the growth of microorganisms and the quality characteristics of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored at inadequate temperatures. *J appl Microbiol.* 2000;89:624-32.

Gould GW. Injury and repair mechanism in bacterial spores. In: Andrew MHE, Russell AD, editors. *The revival of injured microbes.* London: Academic Press; 1984. p.199-220.

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

Graham JM. Inhibition of *Clostridium botulinum* type C by Bacteria Isolated from Mud. J appl Bact. 1978;45:205-11.

Graham AF, Lund BM. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. J appl Bact. 1986;61:39-49.

Graham AF, Lund BM. The effect of temperature on the growth of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. Lett appl Microbiol. 1993;16:158-60.

Graham AF, Mason DR, Maxwell FJ, Peck MW. Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* at chill temperatures. Lett appl Microbiol. 1997;24:95-100.

Graham AF, Mason DR, Peck MW. Inhibitory Effect of Combinations of Heat Treatment, pH, and Sodium Chloride on Growth from Spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* at Refrigeration Temperature. A E M. 1996a;62:2664-8.

Graham AF, Mason DR, Peck MW. Predictive model of the effect of temperature, pH and sodium chloride on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. Int J Food Microbiol. 1996b;31:69-85.

Graikoski JT, Kempe LL. Heat Resistance of *Clostridium botulinum* Type Espores. Bacterial Proc Am Soc Microbiologists. 1964;3.

Grecz N, Arvay LH. Effect of Temperature on Spore Germination and Vegetative Cell Growth of *Clostridium botulinum*. A E M. 1982;43:331-7.

Grecz N, Lin CA, Tang T, So WL, Sehgal LR. The Nature of Heat Resistant Toxin in Spores of *Clostridium botulinum*. Japan J Microbiol. 1967;11:384-94.

Grecz N, Snyder OP, Walker AA, Anellis A. Effect of Temperature of Liquid Nitrogen on Radiation Resistance of Spores of *Clostridium botulinum*. Appl Microbiol. 1965;13:527-36.

Grecz N, Wagenaar RO, Dack GM. Relation of Fatty Acids to the Inhibition of *Clostridium botulinum* in Aged Surface Ripened Cheese. Appl Microbiol. 1959;7:228-34.

Grecz N, Walker AA, Anellis A, Berkowitz D. Effect of irradiation temperature in the range – 196 to 95°C on the resistance of spores of *Clostridium botulinum* 33A in cooked beef. Can J Microb. 1971;17:135-42.

Greenberg RA. Nitrite in the control of *Clostridium botulinum*. In: American Meat Institute, editor. Proceedings of the Meat Industry Research Conference. Chicago; 1972. p.25-34.

Greenwood AG. Diagnosis and treatment of botulism in lions. Vet Rec. 1985;117:58-60.

Gregory AR, Ellis TM, Jubb TF, Nickels RJ, Cousins DV. Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. Austr Vet J. 1996;73:55-61.

Greve M, Beushausen T, Ziesing S. Säuglings-Botulismus – Eine seltene Ursache des Floppy-infant-Syndroms. MS Kinderheilk. 1993;141:33-5.

Gritzai Parkinson N, Ito K. Botulism. In: Cliver DO, Riemann HP, editors. Foodborne Diseases. 2nd ed. Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2002. p.249-59.

Grizan M. pers. Mitteilung. Sächsisches Staatsministerium für Soziales; 2002.

Große-Herrenthey A. Untersuchungen zu den Einflussfaktoren einer effizienten Bekämpfungsstrategie für Rinderbotulismus in Brasilien. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig; 2004.

Großklaus D. Lebensmittelhygienische Aspekte der Zoonosenbekämpfung. Fleischw. 1977;57:1649-52.

Grubb WB. Avian botulism in western australia. Austr J exp Biol med Sci. 1964;42:17-26.

Guilfoyle DE, Yager JF. Survey of Infant Foods for *Clostridium botulinum* Spores. J Ass Off Anal Chem.1983;66:1302-4.

Gunnison JB, Cummings JR, Meyer KF. *Clostridium botulinum* type E. Proc Soc Exp Biol Med. 1937;35:278-80.

Gutteridge CS, Mackey BM, Norris JR. A pyrolysis gas-liquid chromatography study of *Clostridium botulinum* and related organisms. J appl Bact. 1980;49:165-74.

Haagsma J, Over HJ, Smit T, Hoekstra J. Botulism in Waterfowl in the Netherlands in 1970. Neth J vet Sci. 1972;5:11-33.

Haagsma J, ter Laak EA. Atypische gevallen van botulismus type B bij runderen, veroorzaakt door de bijvoeding van bierbostel. Tijdschr Diergeneeskd. 1978;103:312.

Haagsma J, ter Laak EA. Eerste geval van botulismus type D bij runderen in Nederland vastgesteld. Tijdschr Diergeneeskd. 1979;104:609-13.

Haines RB. The occurrence of toxigenic anaerobes, especially *Clostridium botulinum*, in some english soils. J Hyg. 1942;42:323-7.

Hall MA, Maurer AJ. Spice Extracts, Lauricidin, and Propylene Glycol as Inhibitors of *Clostridium botulinum* in Turkey Frankfurter Slurries. Poul Sci. 1986;65:1167-71.

Hall JD, McCroskey LM, Pincomb BJ, Hatheway CL. Isolation of an Organism Resembling *Clostridium baratii* Which Produces Type F Botulinal Toxin from an Infant with Botulism. J Clin Microbiol. 1985;21:654-5.

Hallis B, James BAF, Shone CC. Development of Novel Assays for Botulinum Type A and B Neurotoxins Based on Their Endopeptidase Activities. J Clin Microbiol. 1996;34:1934-8.

Halpern JL, Neale EA. Neurospecific Binding, Internalization, and Retrograde Axonal Transport. In: Montecucco C, editor. Clostridial Neurotoxins. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1995. p.221-36.

Hao Y-Y, Brackett RE, Beuchat LR, Doyle MP. Microbiological Quality and Production of Botulinal Toxin in Film-Packaged Broccoli, Carrots, and Green Beans. J Food Prot. 1999;62:499-508.

Haq I, Sakaguchi G. Prevalence of *Clostridium botulinum* in fishes from markets in Osaka. Jap J med Sci Biol. 1980;33:1-6.

Haq I, Suhadi F. Incidence of *Clostridium botulinum* in coastal and inland areas of West Java. Jap J med Sci Biol. 1981;34:231-5.

Harrigan KE. Botulism in broiler chickens. Austr Vet J. 1980;56:603-5.

Harrison MA, Garren DM, Huang Y-W, Gates KW. Risk of *Clostridium botulinum* Type E Toxin Production in Blue Crab Meat Packaged in Four Commercial-Type Containers. J Food Prot. 1996;59:257-60.

Hartgen H. Untersuchungen von Honigproben auf Botulinustoxin. Arch Leb Mitt Hyg. 1980;31:177-8.

Hashimoto T, Frieben WR, Conti SF. Germination of Single Bacterial Spores. J Bact. 1969;98:1011-20.

Hatheway CL. Botulism: the present status of the disease. Curr Top Microbiol. 1995a;195:55-75.

Hatheway CL. Botulism: The Present Status of the Disease. In: Montecucco C, editor. Clostridial Neurotoxins. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1995b. p.55-75.

Hauschild AHW. Assessment of Botulism hazards from cured meat products. Food Techn. 1982;36:95-104.

Hauschild AHW. Das Botulismus-Risiko bei Fleischerzeugnissen. In: Schriftenreihe der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene, editor. Neue Erkenntnisse über die Erreger mikrobieller Lebensmittelvergiftungen;1983. p.3-29.

Hauschild AHW. *Clostridium botulinum* toxins. Int J Food Microbiol. 1990;10:113-124.

Hauschild AHW, Aris BJ, Hilsheimer R. *Clostridium botulinum* in Marinated Products. Can Inst Food Sci Technol J. 1975;8:84-87.

Hauschild AHW, Hilsheimer R. Effect of Salt Content and pH on Toxigenesis by *Clostridium botulinum* in Caviar. J Food Prot. 1979;42:245-248.

Hauschild AHW, Hilsheimer R. Incidence of *Clostridium botulinum* in commercial bacon. J Food Prot. 1980;43:564-565.

Hauschild AHW, Hilsheimer R. Detection of *Clostridium botulinum* in honey by a procedure involving membrane filtration. Can Inst Food Sci Technol. 1983;16:256-258.

Hauschild AHW, Hilsheimer R, Weiss KF, Burke RB. *Clostridium Botulinum* in Honey, Syrups and Dry Infant Cereals. J Food Prot. 1988;51:892-894.

Hauser D, Gibert M, Boquet P, Popoff MR. Plasmid localization of a type E botulinal neurotoxin gene homologue in toxigenic *Clostridium butyricum* strains, and absence of this gene in non-toxigenic *Clostridium butyricum* strains. FEMS Microbiology Letters. 1992;99:251-256.

Heinzel G, Lenk V, Schneider V. Ergebnisse bakteriologischer Untersuchungen zum plötzlichen unerwarteten Säuglingstod unter besonderer Berücksichtigung des Säuglingsbotulismus. Beiträge zur gerichtlichen Medizin. 1985;43:377-380.

Hentschke J, Raethel S. Intoxikationen durch *Clostridium botulinum* Typ C bei Wassergeflügel Berliner Gewässer. Tierärztl Umsch. 1977;4:168-171.

Hielm S. Molecular detection, typing and epidemiology of *Clostridium botulinum* [Dissertation med. vet.]. Helsinki: Universität Helsinki; 1999.

Hielm S, Hyytiä E, Andersin A-B, Korkeala H. A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. J appl Microbiol. 1998a;84:133-7.

Hielm S, Björkroth J, Hyytiä E, Korkeala H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish Trout Farms: Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing Reveals Extensive Genetic Diversity among Type E Isolates. *A E M*. 1998b;64:4161-7.

Hirsch A, Grinsted E, Chapman HR, Mattick ATR. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. *J Dairy Res*. 1951;18:205-7.

Hobbs G. *Clostridium botulinum* and its importance in fishery products. *Adv Food Res*. 1976;22:135-85.

Hobbs G. *Clostridium botulinum* in irradiated fish. *Food Irr Inf*. 1977;7:39-54.

Hobbs G, Crowther JS, Neaves P. Detection and isolation of *Clostridium botulinum*. In: Corry JEL, Roberts D, Skinner FA, editors. *Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms*. 1982.

Hodgkiss W, Ordal ZJ. Morphology of the Spore of Some Strains of *Clostridium botulinum* Type E. *J Bact*. 1966;91:2031-6.

Hodgkiss W, Ordal ZJ, Cann DC. The Morphology and Ultrastructure of the Spore and Exosporium of Some *Clostridium* Species. *J gen Microbiol*. 1967;47:213-25.

Hofer JW, Davis J. Survival and Dormancy of Clostridia spores. *Tex Med*. 1972;68:80-1.

Hoffman RE, Pincomb BJ, Skeels MR, Burkhart MJ. Type F Infant Botulism. *Am J Dis Child*. 1982;136:270-1.

Hogg RA, White VJ, Smith GR. Suspected botulism in cattle associated with poultry litter. *Vet Rec*. 1990;126:476-9.

Holdeman LV, Smith LD. A study of the nutritional requirements and toxin production of *Clostridium botulinum* type F. *Can J Microb*. 1965;11:1009-13.

Holland D, Barker AN, Wolf J. The Effect of Carbon Dioxide on Spore Germination in Some Clostridia. *J appl Bact*. 1970;3:274-84.

Holley RA. Review of the Potential Hazard from Botulism in Cured Meats. *Can Inst Food Sci Technol J*. 1981;14:183-95.

Holman ME, Spitzer NC. Action of botulinum toxin on transmission from sympathetic nerves to the vas deferens. *Brit J Pharm*. 1973;47:431-3.

Holzer E. Botulismus durch Inhalation. *Med Klin*. 1962;57:1735-8.

Holzhauser M. Botulismus bei Rindern in den Niederlanden. Tierärztl Umsch. 2004;59:29-31.

Hotchkiss JH, Banco MJ. Influence of New Packaging Technologies on the Growth of Microorganisms in Produce J Food Prot. 1992;55:815-20.

Hotchkiss JH, Banco MJ, Busta FF, Genigeorgis CA, Kociba R, Rheume L, et al. The Relationship Between Botulinal Toxin Production and Spoilage of Fresh Tomatoes Held at 13 and 23°C Under Passively Modified and Controlled Atmospheres and Air. J Food Prot. 1992;55:521-7.

Hou Z, Ren SR, Yan YX, Liu GH. Results of studies on botulism and *Clostridium botulinum* inspection in Hebei province. Chin J Med Exam. 1989;12:38-9.

Houtsma PC, Heuvelink A, Dufrenne J, Notermans S. Effect of Sodium Lactate on Toxin Production, Spore Germination and Heat Resistance of Proteolytic *Clostridium botulinum* Strains. J Food Prot. 1994;57:327-30.

Hubálek Z, Halouzka J. Thermal sensitivity of *Clostridium botulinum* type C toxin. Epidem Inf. 1988;101:321-5.

Hubálek Z, Halouzka J. Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (*Calliphoridae*) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. J Wildlife Dis. 1991;27:81-5.

Hughes R, Whaler BC. Influence of nerve-ending activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by *Clostridium botulinum* type A toxin. J Phys. 1962;160:221-33.

Hughey VL, Johnson EA. Antimicrobial Activity of Lysozyme against Bacteria Involved in Food Spoilage and Food-Borne Disease. A E M. 1987;53:2165-70.

Huhtanen CN. Inhibition of *Clostridium botulinum* Toxin Formation by *C. sporogenes* in Culture Media and in a Meat system. J Food Prot. 1991;54:50-2.

Huhtanen CN, Naghski J, Custer CS, Russell RW. Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Moldy Tomato Juice. A E M. 1976;32:711-5.

Hungate RE. A roll tube method of cultivation of strict anaerobes. In: Norris JR, Ribbons DW, editors. Methods in Microbiology. Vol 3. London: Academic Press; 1969. p.117-32.

Hunter LC, Miller JK, Poxton IR. The association of *Clostridium botulinum* type C with equine grass sickness: a toxicoinfection?. Equine Vet J. 1999;31:492-9.

Huss HH. Distribution of *Clostridium botulinum*. A E M. 1980;39:764-9.

- Huss HH, Pedersen A. *Clostridium botulinum* in fish. Nord Vet Med. 1979;31:214-21.
- Huss HH, Pedersen A, Cann DC. The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish trout farms I: Distribution in fish and their environment. J Food Technol. 1974a;9:445-50.
- Huss HH, Pedersen A, Cann DC. The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish trout farms II: Measures to reduce contamination of the fish. J Food Technol. 1974b;9:451-8.
- Huss HH, Petersen ER. The stability of *Clostridium botulinum* type E toxin in salty and/or acid environment. J Food Technol. 1980;15:619-27.
- Huss HH, Schaeffer I, Rye Petersen E, Cann DC. Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type E in Fresh Herring in Relation to the Measured Oxidation Potential (Eh). Nord Med Vet. 1979;31:81-6.
- Hussain AM, Ehlermann D, Diehl J-F. Comparison of toxin production by *Clostridium botulinum* type E in irradiated and unirradiated vacuum-packed trout (*Salmo gairdneri*). Arch Leb Mitt Hyg. 1977;28:23-7.
- Hustad GO, Gerveny JG, Trenk H, Deibel RH, Kautter DA, Fazio T, et al. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. Appl Microbiol. 1973;26:22-6.
- Hyun S-H, Sakaguchi G. Association between the Cell-wall Peptidoglycan and the Progenitor Toxin of *Clostridium botulinum* type C. Jap Vet Sci. 1989;51:169-76.
- Hyytiä E, Eerola S, Hielm S, Korkeala H. Sodium nitrite and potassium nitrate in control of nonproteolytic *Clostridium botulinum* outgrowth and toxigenesis in vacuum-packed cold-smoked rainbow trout. Int J Food Microbiol. 1997;37:63-72.
- Hyytiä E, Hielm S, Korkeala H. Prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish fish and fishery products. Epidemiol Infect. 1998;120:245-50.
- Hyytiä E, Hielm S, Morkkila M, Kinnunen A, Korkeala H. Predicted and observed growth and toxigenesis by *Clostridium botulinum* type E in vakuu-packaged fishery product challenge tests. Int J Food Microbiol. 1999;47:161-9.
- Hyytiä-Trees E. Prevalence, molecular epidemiology and growth of *Clostridium botulinum* type E in fish and fishery products [Dissertation med. vet.]. Helsinki: Universität Helsinki; 1999.
- Hyytiä-Trees E, Lindström M, Schalch B, Stolle A, Korkeala H. *Clostridium botulinum* type E in Bavarian fish. Arch Leb Mitt Hyg. 1999;50:79-82.

Hyttiä-Trees E, Skyttä E, Morkkila M, Kinnunen A, Lindström M, Lähteenmäki L, et al. Safety Evaluation of Sous Vide-Processed Products with Respect to Nonproteolytic *Clostridium botulinum* by Use of Challenge Studies and Predictive Microbiological Models. *A E M*. 2000;66:223-9.

Iida H. Toxin production and phage in *Clostridium botulinum* types C and D. In: Lewis GE, Angel PS, editors. Biomedical aspects of botulism. New York: Academic Press; 1981. p.109-20.

Iida H, Inoue K. Rhabdosomes of *Clostridium botulinum* type E. *Japan J Microb*. 1968;12:353-5.

Iida H, Ono T, Karashimada T, Ando Y. Studies on the serum therapy of type E botulism: absorption of toxin from the gastrointestinal tract. *Jap J med Sci Biol*. 1970;23:282-5.

Imai H, Oshita K, Hashimoto H, Fukushima D. Factors Inhibiting the Growth and Toxin Formation of *Clostridium botulinum* Types A and B in "Tsuyu" (Japanese noodle soup). *J Food Prot*. 1990;53:1025-32.

Ingram M. Probleme bei der Verwendung von Nitrit. *Fleischw*. 1977;57:211-7.

Ingram M, Robinson R. A discussion of the literature on botulism in relation to acid foods. *J appl Bact*. 1951;14:78-84.

Ingram M, Roberts TA. The ecology of *Clostridium botulinum*. In: Proceedings of the 3rd International Congress of Food Science and Technology. Chicago: Institute of Food Technologists; 1971. p. 654-60.

Inoue K, Iida H. Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. *J Virol*. 1968;2:537-40.

Inoue K, Iida H. Conversion of Toxigenicity in *Clostridium botulinum* Type C. *Japan J Microb*. 1970;14:87-9.

Inoue K, Iida H. Phage-conversion of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D. *Jap J med Sci Biol*. 1971;24:53-6.

Ismail AA, Pierson MD. Inhibition of Germination, Outgrowth, and Vegetative Growth of *Clostridium botulinum* 67B by Spice Oils. *J Food Prot*. 1990a;53:755-8.

Ismail AA, Pierson MD. Effect of Sodium Nitrite and Origanum Oil on Growth and Toxin Production of *Clostridium botulinum* in TYG Broth and Ground Pork. *J Food Prot*. 1990b;53:958-60.

Ito KA, Chen JK, Lerke PA, Seeger ML, Unverferth JA. Effect of Acid and Salt Concentrations in Fresh-Pack Pickles on the Growth of *Clostridium botulinum* Spores. *A E M*. 1976;32:121-4.

Ito KA, Chen JK, Seeger ML, Unverferth JA, Kimball RN. Effect of pH on the growth of *Clostridium botulinum* in canned figs. *J Food Sci*. 1978;43:1634-5.

Ito KA, Seslar DJ, Mercer WA, Meyer KF. The thermal and germicidal resistance of *Clostridium botulinum* types A, B and E spores. In: Herzberg M, editor. *Toxic Microorganisms*. Washington D.C.: US Gvt. Printing office; 1970. p.410-5.

Ivey FJ, Shaver KJ, Christiansen LN, Tompkin RB. Effect of Potassium Sorbate on Toxigenesis by *Clostridium botulinum* in Bacon. *J Food Prot*. 1978;41:621-5.

Iwand A. Botulismus. *Dt Ärztebl*. 1979;37:2325-6.

Jahn R, Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Ann Rev Biochem*. 1999;68:863-911.

Janetschke P, Mengert U, Pazout V. Zur lebensmittelhygienischen Bedeutung von Clostridien. *Mh Vet Med*. 1989;44:242-6.

Jansen BC. The toxic antigenetic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. *Onderstep J vet Res*. 1971;38:93-8.

Jansen BC, Knoetze PC. Tryptic activation of *Clostridium botulinum* type C_β toxin. *Onderstep J vet Res*. 1971;38:237-8.

Jansen BC, Knoetze PC, Visser F. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids. *Onderstep J vet Res*. 1976;43:165-74.

Jean D, Fecteau G, Scott D, Higgins R, Quessy S. *Clostridium botulinum* type C intoxication in feedlot steers being fed ensiled poultry litter. *Can vet J*. 1995;36:626-8.

Jensen WI, Duncan RM. The susceptibility of the mallard duck (*anas platyrhynchos*) to *Clostridium botulinum* C₂ toxin. *Jap J med Sci Biol*. 1980;33:81-86.

Jensen MJ, Genigeorgis C, Lindroth S. Probability of growth of *Clostridium botulinum* as affected by strain, cell and serologic type, inoculum size and temperature and time of incubation in a model broth system. *J Food Saf*. 1987;8:109-26.

Jenselius M, Løvstad RZ, Dhaenens G, Rørvik LM. A heroin user with a wobbly head. *Lancet*. 2000;356:1160.

Johannsen A. Presence and distribution of *Clostridium botulinum*, type E, with special reference to the Öresund region. Nord Vet Med. 1962;14:441-74.

Johannsen A. *Clostridium botulinum* in Sweden and the Adjacent waters. J appl Bact. 1963;26:43-7.

Johannsen A. *Clostridium botulinum* Type E in Foods and the Environment Generally. J appl Bact. 1965;28:90-4.

Johnson EA. *Clostridium botulinum*. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.458-66.

Jordan EO, Dack GM. The effect of *C. sporogenes* on *C. botulinum*. J infect Dis. 1924;35:576-80.

Jubb TF, Ellis TM, Gregory AR. Diagnosis of botulism in cattle using ELISA to detect antibody to botulinum toxins. Austr Vet J. 1993;70:226-7.

Juneja VK, Eblen BS. Influence of Sodium Chloride on Thermal Inactivation and Recovery of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type B Strain KAP B5 Spores. J Food Prot. 1995;58:813-6.

Juneja VK, Snyder OP, Marmer BS. Potential for Growth from Spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* and Vegetative Cells of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Serotypes in Cooked Ground Beef during Cooling. J Food Prot. 1997;60:272-5.

Kaffezakis JG, Palmer SJ, Kramer A. Microbiology of Fresh Apple and Potato Plugs Preserved by Gas Exchange. J Food Sci. 1969;34:426-9.

Kalzendorf C. Strategien zur Reduzierung der Clostridienbelastung in Silagen. Vortragsband bpt-Kongress 2004. Vol: Schwein, Rind, kleiner Wiederkäuer. Frankfurt am Main: bpt-Akademie GmbH, 2004. p.117-28.

Karaioannoglou PG, Mantis AJ, Panetsos AG. The Effect of Garlic Extract on Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus Plantarum*) in Culture Media. Lebensm-Wiss u Technol. 1977;10:148-50.

Kauf C, Lorent JP, Mosimann J, Schlatter I, Somaini B, Velvart J. Type B botulism epidemic. Schweiz Med Wochenschr. 1974;104:677-85.

Kautter DA. *Clostridium botulinum* Type E in Smoked Fish. J Food Sci. 1964;29:843-9.

Kautter DA, Harmon SM, Lynt K, Lilly T. Antagonistic effect on *Clostridium botulinum* Type E by organisms resembling it. *Appl Microbiol.* 1966;14:616-22.

Kautter DA, Lynt RK, Lilly T, Solomon HM. Evaluation of the Botulism Hazard from Nitrogen-Packed Sandwiches. *J Food Prot.* 1981;44:59-61.

Kehler W, Scholz H. Botulismus des Rindes. *Übers Tierern.* 1996;24:83-91.

Kelly AP, Jones RT, Gillick JC, Sims LD. Outbreak of botulism in horses. *Equine vet J.* 1984;16:519-21.

Kempe LL, Graikoski JT. Gamma-ray Sterilization and Residual Toxicity Studies of Ground Beef Inoculated with Spores of *Clostridium botulinum*. *Appl Microbiol.* 1962;10:31-6.

Kempe LL, Graikoski JT, Gillies RA. Gamma Ray Sterilization of Canned Meat Previously Inoculated with Anaerobic Bacterial Spores. *Appl Microbiol.* 1954;2:330-2.

Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. Identification and Characterization of Two Novel Clostridial Bacteriocins, Circularin A and Closticin 574. *A E M.* 2003;69:1589-97.

Ketz A. Fischvergiftungen. *Mh Vet Med.* 1956;11:179-83.

Kietzmann U. Beobachtungen bei Tierversuchen zum Nachweis von Botulinus-Toxin. *Berl Münch Tierärztl Wschr.* 1957;70:366-8.

Kinde H, Bettley RL, Ardans A, Galey FD, Daft BM, Walker RL, et al. *Clostridium botulinum* type-C intoxication associated with consumption of processed alfalfa hay cubes in horses. *JAVMA.* 1991;199:742-6.

Kindler SH, Mager J. Production of toxin by resting cells of *Clostridium parobotulinum* type A. *Science.* 1955;122:926-7.

Kitamura M. Behaviour for toxin released from the cells of *Clostridium botulinum* type E. *Biochem Biophys Res Comm.* 1970;40:925-31.

Kitamura M, Sakaguchi S, Sakaguchi G. Dissociation of *Clostridium botulinum* type E toxin. *Biochem Biophys Res Comm.* 1967;29:892-7.

Kitamura M, Sakaguchi S, Sakaguchi G. Significance of 12S toxin of *Clostridium botulinum* type E. *J Bact.* 1969;98:1173-8.

Kiupel H, Seils G, Radtke A. Botulismus beim Rind – Ein Beitrag zur Diagnostik und Differentialdiagnostik plötzlicher Todesfälle bei Weiderindern. *Mh Vet Med.* 1979;34:164-8.

Klarmann D. Untersuchungen zum Vorkommen von *Clostridium botulinum* in Kotproben von Rind und Schwein sowie in Rohmaterialien und Tierkörpermehlen verschiedener Tierkörperbeseitigungsanstalten [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1987.

Klarmann D. Nachweis von *Clostridium botulinum* in Kotproben von Rind und Schwein sowie in Rohmaterialien und Tiermehlen verschiedener Tierkörperbeseitigungsanstalten. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1989;102:84-6.

Kley M. Infektionsversuche mit *Clostridium botulinum* Typ B [Dissertation med. vet.]. München: Universität München; 1962.

Kobayashi H, Fujisawa K, Saito Y, Kamijo M, Oshima S, Kubo M, et al. A Botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of *Clostridium botulinum* type Ab. Jap J Infect Dis. 2003;56:73-4.

Köhler B. Botulismus. In: Beer J, editor. Infektionskrankheiten der Haustiere. 3rd ed; Vol 2. Jena: Gustav – Fischer – Verlag; 1987. p.737-44.

Köhler B, Feller M, Friedrichs F, Böttcher E. Ausbruch von Botulismus bei Wasservögeln. Mh Vet Med. 1977;32:178-82.

Kolb E. Botulismus-Toxine. In: Wiesner E, Ribbeck R, editors. Lexikon der Veterinärmedizin. 4th ed. Stuttgart: Enke-Verlag; 2000a. p.205.

Kolb E. Lysozym. In: Wiesner E, Ribbeck R, editors. Lexikon der Veterinärmedizin. 4th ed. Stuttgart: Enke-Verlag; 2000b. p.894.

Kozaki S. Interaction of botulinum type A, B and E derivate toxins with synaptosomes of rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Archiv. 1979;308:67-70.

Krämer J. *Clostridium botulinum*. In: Krämer J, editor. Lebensmittel-Mikrobiologie. 4th ed. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2002. p.54-60.

Krawtschenko AT, Shiskulina LM. Symposium über Botulismus. Moskau; 1966.

Kriegelstein K. Über die Struktur von Tetanustoxin und Botulinum A Toxin: Lokalisation der Disulfidbrücken, der Sulfhydrylgruppen und limitierte Proteolyse [Dissertation phar.]. Marburg: Universität Marburg; 1990.

Kronthaler O. Botulinus-Vergiftung in der Junggeflügelmast. D G S. 1983;35:314-5.

Krysinski EP, Sugiyama H. Nature of Intracellular Type A Botulinum Neurotoxin. A E M. 1981;41:675-8.

Kwan PL, Lee JS. Compound Inhibitory to *Clostridium botulinum* Type E Produced by a *Moraxella* Species. *Appl Microb.* 1974;27:329-32.

Lalitha KV, Gopakumar K. Distribution and ecology of *Clostridium botulinum* in fish and aquatic environments of a tropical region. *Food Microbiol.* 2000;17:535-41.

Lalitha KV, Iyer KM. Isolation of *Clostridium botulinum* from tropical fish. *Lett appl Microbiol.* 1990;11:179-81.

Lalitha KV, Surendran PK. Occurrence of *Clostridium botulinum* in fresh and cured fish in retail trade in Cochin (India). *Int J Food Microbiol.* 2002;72:169-74.

Lamanna C. The most poisonous poison. *Science.* 1959;130:763-72.

Lamanna C, Glassman HN. The isolation of type B botulinum toxin. *J Bact.* 1947;54:575-84.

Lamanna C, McElroy OE, Eklund HW. The purification and crystalization of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Science.* 1946;103:613-4.

Lambert AD, Smith JP, Dodds KL. Combined Effect of Modified Atmosphere Packaging and Low-Dose Irradiation on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Fresh Pork. *J Food Prot.* 1991a;54:94-101.

Lambert AD, Smith JP, Dodds KL. Effect of Initial O₂ and CO₂ and Low-Dose Irradiation on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in MAP Fresh Pork. *J Food Prot.* 1991b;54:939-44.

Lambert AD, Smith JP, Dodds KL. Effect of Headspace CO₂ Concentration on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in MAP, Irradiated Fresh Pork. *J Food Prot.* 1991c;54:588-92.

Landmann G. Ueber die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung. *Hygienische Rundschau.* 1904;14:449-52.

Lantz P-G, Abu Al-Soud W, Knutsson R, Hahn-hägerdal B, Rådström P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechn Ann Rev.* 2000;5:87-130.

Lara JAF, Senigalia SWB, Oliveira TCRM, Dutra IS, Pinto MF, Shimokomaki M. Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meats. *Meat Sci.* 2003;65:609-13.

Larson AE, Johnson EA. Evaluation of Botulinal Toxin Production in Packaged Fresh-Cut Cantaloupe and Honeydew Melons. *J Food Prot.* 1999;62:948-52.

Lau AHS, Hawirko RZ, Chow CT. Purification and properties of boticin P produced by *Clostridium botulinum*. Can J Microb. 1974;20:385-90.

Lawlor KA, Pierson MD, Hackney CR, Claus JR, Marcy JE. Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Toxigenesis in Cooked Turkey Stored under Modified Atmospheres. J Food Prot. 2000;63:1511-6.

Lechowich RV, Brown WL, Deibel RH, Somers II. The role of nitrite in the production of canned cured meat products. Food Techn. 1978;32:45-58.

Lee VH, Vadlamudi S, Hanson RP. Blow Fly Larvae as a source of botulinum toxin for game farm pheasants. J Wildlife Man. 1962;26:411-3.

Leighton G, Buxton JB. The Distribution of *Bacillus botulinus* in scottish soils. J Hyg. 1928;28:79-82.

Leistner L. Neue Nitrit-Verordnung der Bundesrepublik Deutschland. Fleischw. 1981;61:338-46.

Leistner L, Mirna A. Das Redoxpotential von Pökellagen. Fleischw. 1959;11:659-66.

Lerke P. Evaluation of potential risk of botulism from seafood cocktails. Appl Microbiol. 1973;25:807-10.

Lerke P, Farber L. Heat pasteurization of crab and shrimp from the Pacific Coast of the United States: public health aspects. J Food Sci. 1971;36:277-9.

Levetzow R. *Costridium botulinum* – Intoxikationen. In: Grossklaus D, editor. Geflügelfleischhygiene. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1979. p.335-6.

Lewis GE, Kulinski SS, Fallon EH, Klyza JP, Bryans JT. Evaluation of a *Clostridium botulinum* toxoid, type B, for the prevention of shaker foal syndrome. Proc Amer Ass equ Pract. 1982;27:233-7.

Lewis JCM, Smith GR, White VJ. An outbreak of botulism in captive hamadryas baboons. Vet.Rec. 1990;126:216-217.

Licciardello JJ. Botulism and Heat-Processed Seafoods. Mar fish Rev. 1983;45:1-7.

Licciardello JJ, Ribich CA, Nickerson JTR, Goldblith SA. Kinetics of the Thermal Inactivation of Type E *Clostridium botulinum* Toxin. Appl Microbiol. 1967;15:344-9.

Lie Ø, Evensen Ø, Sørensen A, Frøysadal E. Study on lysozyme activity in some fish species. Dis aqu Org. 1989;6:1-5.

Lim YH, Hamdy MK, Toledo RT. Combined effects of ionizing-irradiation and different environments on *Clostridium botulinum* type E spores. Int J Food Microbiol. 2003;89:251-63.

Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu Rev cell Dev Biol. 2000;16:19-49.

Lindner KE, Bechtel D. Experimenteller Beitrag zum Botulismus beim Huhn. Arch Exp Vet Med. 1969;4:999-1012.

Lindqvist R, Andersson Y, de Jong B, Norberg P. A Summary of Reported Foodborne Disease Incidents in Sweden, 1992 to 1997. J Food Prot. 2000;63:1315-20.

Lindroth SE, Genigeorgis CA. Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish stored under modified atmospheres. Int J Food Microbiol. 1986;3:167-81.

Lindström M. Diagnostics of *Clostridium botulinum* and thermal control of non-proteolytic *Clostridium botulinum* in refrigerated processed foods [Dissertation med. vet.]. Helsinki: Universität Helsinki; 2003.

Lindström M, Jankola H, Hielm S, Hyytiä E, Korkeala H. Identification of *Clostridium botulinum* with the API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999;24:267-74.

Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in Food and Fecal Samples. A E M. 2001a;67:5694-9.

Lindström M, Morkkila M, Skyttä E, Hyytiä-Trees E, Lähteenmäki L, Hielm S, et al. Inhibition of Growth of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type B in Sous Vide Cooked Meat Products Is Achieved by Using Thermal Processing but Not Nisin. J Food Prot. 2001b;64:838-44.

Lindström M, Nevas M, Hielm S, Lähteenmäki L, Peck MW, Korkeala H. Thermal Inactivation of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type E Spores in Model Fish Media and in Vacuum-Packaged Hot-Smoked Fish Products. A E M. 2003;69:4029-36.

Lücke F-K. Botulismus in Europa – epidemiologische und experimentelle Befunde. In: Schriftenreihe der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene, editor. Neue Erkenntnisse über die Erreger mikrobieller Lebensmittelvergiftungen. 1983. Heft 13; p.30-50.

Lücke F-K, Hechelmann H, Leistner L. Botulismus nach Verzehr von Rohschinken. Experimentelle Untersuchungen. Fleischw. 1982;62:203-6.

Lund BM. Foodborn disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. Lancet. 1990;336:982-6.

Lund BM, George SM, Franklin JG. Inhibition of type A and type B (proteolytic) *Clostridium botulinum* by sorbic acid. A E M. 1987;53:935-41.

Lund BM, Peck MW. Heat resistance and recovery of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with an extended shelf-life. J appl Bact Symposium Supplement. 1994;76:115S-28S.

Lund BM, Wyatt GM. The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of *Clostridium botulinum* type E from spore inocula. Food Microbiol. 1984;1:49-65.

Lúquez C, Bianco MI, de Jong LIT, Sagua MD, Arenas GN, Ciccarelli AS, et al. Distribution of Botulinum Toxin-Producing Clostridia in Soils of Argentina. A E M. 2005;71:4137-9.

Lutz W. Botulismus in Bergsenkungen – Beitrag zum Botulismus bei Wasserflugwilg. Z Jagdwiss. 1992;38:288-9.

Luisetto S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F. Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice. Toxicon. 2003;41:475-81.

Lynt RK, Kautter DA, Solomon HM. Heat resistance of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type F in phosphate buffer and crabmeat. J Food Sci. 1979;44:108-11.

Lynt RK, Kautter DA, Solomon HM. Heat resistance of proteolytic *Clostridium botulinum* type F in phosphate buffer and crabmeat. J Food Sci. 1982;47:204-6,230.

Lynt RK, Solomon HM, Lilly T, Kautter DA. Thermal death time of *Clostridium botulinum* type E in meat of the blue crab. J Food Sci. 1977;42:1022-5.

Lyon WJ, Reddmann CS. Bacteria Associated with Processed Crawfish and Potential Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type E in Vacuum-Packaged and Aerobically Packaged Crawfish Tails. J Food Prot. 2000;63:1687-96.

Maas MR, Glass KA, Doyle MP. Sodium Lactate Delays Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Cook-in-Bag Turkey Products. A E M. 1989;55:2226-9.

MacDonald KL, Spengler RF, Hatheway CL, Hargrett NT, Cohen ML. Type A botulism from sauteed onions. J Am med Ass. 1985;253:1275-8.

MacKay RJ, Berkhoff GA. Type C Toxicoinfectious Botulism in a Foal. J Am vet med Ass. 1982;180:163-4.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Kontrolle des mikrobiellen Wachstums. In: Madigan MT, Martinko JM, Parker J, editors. Mikrobiologie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2001. p.825-62.

Mäde D, Trümper K, Stark R. Nachweis von *Clostridium botulinum* in Honig durch Polymerase-Kettenreaktion. Arch Leb Mitt Hyg. 2000;51:68-70.

Maier E. Das Verhalten des Botulinustoxins im Flusswasser, in Erdböden und verschiedenen Nahrungsmitteln [Dissertation med.]. Frankfurt am Main: Universität Frankfurt am Main; 1954.

Malizio CJ, Johnson EA. Evaluation of the Botulism Hazard from Vacuum-packaged Enoki Mushrooms (*Flammulina velutipes*). J Food Prot. 1991;54:20-1.

Margosch D, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF. Comparison of Pressure and Heat Resistance of *Clostridium botulinum* and Other Endospores in Mashed Carrots. J Food Prot 2004;67:2530-7.

Marion WR, O'Meara TE, Riddle GD, Berkhoff HA. Prevalence of *Clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implications for epizootics of avian botulism. J Wildlife Dis. 1983;19:302-7.

Marshall BJ, Ohye DF, Christian JHB. Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. Appl Microbiol. 1971;21:363-4.

Martin S. *Clostridium botulinum* type D intoxication in a dairy herd in Ontario. Can vet J. 2003;44:493-5.

Marx JL. Botulism in Infants: A Cause of Sudden Death?. Science. 1978;201:799-801.

Mayhew JW, Gorbach SL. Rapid Gas Chromatographic Technique for Presumptive Detection of *Clostridium botulinum* in Contaminated Food. Appl Microbiol. 1975;29:297-9.

Mazzotta AS, Crandall AD, Montville TJ. Nisin Resistance in *Clostridium botulinum* Spores and Vegetative Cells. A E M. 1997;63:2654-9.

Mazzotta AS, Modi K, Montville TJ. Nisin-resistant (Nis^r) *Listeria monocytogenes* and Nis^r *Clostridium botulinum* Are Not Resistant to Common Food Preservatives. J Food Sci. 2000;65:888-90.

Mazzotta AS, Montville TJ. Characterization of Fatty Acid Composition, Spore Germination, and Thermal Resistance in a Nisin-Resistant Mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the Wild-Type Strain. A E M. 1999;65:659-64.

McClure PJ, Cole MB, Smelt JPPM. Effects of water activity and pH on growth of *Clostridium botulinum*. J appl Bact. Symposium Supplement. 1994;76:105S-14S.

McCroskey LM, Hatheway CL. Laboratory Findings in Four Cases of Adult Botulism Suggest Colonization of the Intestinal Tract. J Clin Microbiol. 1988;26:1052-4.

McCroskey LM, Hatheway CL, Fenicia L, Pasolini B, Aureli P. Characterization of an Organism That Produces Type E Botulinal Toxin But Which Resembles *Clostridium butyricum* from the Feces of an Infant with Type E Botulism. J Clin Microbiol. 1986;23:201-2.

McCroskey LM, Hatheway CL, Woodruff BA, Greenberg JA, Jurgenson P. Type F botulism due to neurotoxigenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. J Clin Microbiol. 1991;29:2618-20.

McLoughlin MF, McIlroy SG, Neill SD. A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. Vet Rec. 1988;122:579-81.

McMaster P, Piper S, Schell D, Gillis J, Chong A. Instructive Case – A taste of honey. J paediatr child health. 2000;36:596-7.

McNally RE, Morrison MB, Berndt JE, Fisher JE, Bo-Berry JI, Packett VE. Effectiveness of Medical Defense Interventions against Predicted Battlefield Levels of Botulinum Toxin A. In: Joppa MD, editor. Science Applications International. 1994.

Mehler M. Untersuchungen über die Empfindlichkeit japanischer Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) gegenüber *Clostridium botulinum* Toxinen [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 1981.

Meng J, Genigeorgis CA. Modelling lag phase of non-proteolytic *Clostridium botulinum* toxigenesis in cooked turkey and chicken breast as affected by temperature, sodium lactate, sodium chloride and spore inoculum. Int J Food Microbiol. 1993;19:109-22.

Meng X, Karasawa T, Zou K, Kuang X, Wang X, Lu C, et al. Characterization of a neurotoxigenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. J Clin Microbiol. 1997;35:2160-2.

Merson MH, Dowell VR. Epidemiologic, clinical and laboratory aspects of wound botulism. N Engl J Med. 1973;289:1005-10.

Meyer KF. Botulismus. In: Kolle W, Kraus R, Uhlenhuth P, editors. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 3rd ed; Vol 4. Jena, Wien, Berlin: Gustav Fischer und Urban & Schwarzenberg; 1928. p.1269 – 1364.

Meyer KF. Maximum oxygen tolerance of *Clostridium botulinum* A, B and C, of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium welchii*. J infect Dis. 1929;44:408-11.

Meyer R. Zur Statistik der Fleischvergiftungen im Jahre 1948. Mh Vet Med. 1950;1:13-5.

Meyer JD, Cerveny JG, Luchansky JB. Inhibition of Nonproteolytic, Psychotrophic Clostridia and Anaerobic Sporeformers by Sodium Diacetate and Sodium Lactate in Cook-in-Bag Turkey Breast. J Food Prot. 2003;66:1474-8.

Meyer H, Coenen M. Silage. In: Meyer H, Coenen M, editors. Pferdefütterung. 4th ed. Berlin: Parey Buchverlag; 2002. p.89-92.

Meyer KF, Eddie B. Perspectives concerning botulism. Zeitschr f Hygiene. 1951;133:255-63.

Meyer KF, Gunnison JB. Botulism due to home bartlett pears.XXXIX. J infect Dis. 1929;45:135-47.

Meyer V, Kietzmann U. Das Verhalten von Botulinuskeimen in Geleeheringen. Arch Leb Mitt Hyg. 1958;9:280-6.

Midura TF, Arnon SS. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxin in faeces. Lancet. 1976;2:934-6.

Midura TF, Snowden S, Wood RM, Arnon SS. Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. J Clin Microbiol. 1979;9:282-3.

Milbradt H. *Clostridium botulinum* Toxin Typ C als Ursache eines Massensterbens von Wasserwildgeflügel. Dt T W. 1976;83:331-2.

Miller AJ, Call JE, Whiting RC. Comparison of Organic Acid Salts for *Clostridium botulinum* Control in an Uncured Turkey Product. J Food Prot. 1993;56:958-62.

Mitscherlich E, Marth EH. Microbial survival in the environment: bacteria and rickettsiae important in human health. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1984.

Miura T, Sakaguchi S, Sakaguchi G, Miyaki K. Radiosensitivity of type E botulinum toxin and its protection by proteins, nucleic acids and some related substances. In: Herzberg M, editors. Toxic Microorganisms. Washington, D.C.: US Gvt.Printing Office; 1970. p.454-8.

Miyazaki S, Iwasaki M, Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* Type D Toxin: Purification, Molecular Structure, and Some Immunological Properties. Infect Imm. 1977;17:395-401.

Miyazaki S, Sakaguchi G. Experimental botulism in chickens; the cecum as the site of production and adsorbtion of botulinum toxin. Jap J med Sci Biol. 1978;31:1-15.

- Moeller RB, Puschner B, Walker RL, Rocke T, Galey FD, Cullor JS, et al. Determination of the median toxic dose of type C *Clostridium botulinum* in lactating dairy cows. J vet Diagn Invest. 2003;15:523-6.
- Moeschlin S. Botulismus. In: Moeschlin S, editor. Klinik und Therapie der Vergiftungen. 7th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1986. p.668-74.
- Molin N, Snygg BG. Effect of Lipid Materials on Heat Resistance of Bacterial Spores. Appl Microbiol. 1967;15:1422-6.
- Molin G, Stenstrom IM, Ternstrom A. The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen, or air at 2°C. J appl Bact. 1983;55:49-56.
- Monaco S, Freddi N, Francavilla E, Meneghetti F, Fenicia L, Franciosa G, et al. Transient tonic pupils in botulism type B. J Neurol Sci. 1998;156:96-8.
- Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP. Irradiation Inactivation of Food-Borne Microorganisms. J Food Prot. 1995;58:197-208.
- Montecucco C, Schiavo GP. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. Q Rev Biophys. 1995;28:423-72.
- Montville TJ. Interaction of pH and NaCl on Culture Density of *Clostridium botulinum* 62A. A E M. 1983;46:961-3.
- Morris JG. Oxygen and the oxligate anaerobe. J appl Bact. 1976;40:229-44.
- Morris JG, Hatheway CL. Botulism in the United States, 1979. J infect Dis. 1980;142:302-5.
- Morris JG, O'Brien RW. Oxygen and clostridia: a review. In: Barker AN, Gould GS, Wolf J, editors. Spore research – 1971. London, NewYork: Academic Press; 1971. p.1-37.
- Mortojudo JW, Siagian EG, Suhadi F, Ward BQ, Ward WMS. The presence of *Clostridium botulinum* in Indonesian waters. J appl Bact. 1973;36:437-40.
- Mossel DAA, Ingram M. The physiology of the microbial spoilage of foods. J appl Bact. 1955;18:232-68.
- Motarjemi Y, Moarefi A, Jacob M. Food borne disease: a focus for health education. World Health Organization, Geneva, 2000.
- Müller G. Botulismus. In: Müller G, editor. Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie. 7th ed. Leipzig: VEB Fachbuchverlag; 1989a. p.214-7.

Müller G. Verfahrensgrundlagen zur Konservierung von Lebensmitteln. In: Müller G, editor. Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie. 7th ed. Leipzig: VEB Fachbuch-verlag; 1989b. p.245-320.

Müller J, Wissel J. Spastikbehandlung der oberen Extremität mit Botulinum Toxin Typ A. Wien Klin Ws. 2001;113(Suppl.4):16-9.

Müller-Bunke H, Höck A, Schöntube M, Noack R. Säuglingsbotulismus. Mon Kinderheilkd. 2000;148:242-5.

Murrell WG, Scott WJ. The heat resistance of bacterial spores at various water activities. J gen Microbiol. 1966;43:411-25.

Nakamura Y, Iida H, Saeki K, Kanzawa K, Karashimada T. Type E Botulism in Hokkaido, Japan. Japan J med Sci Biol. 1956;9:45-58.

Nakamura S, Serikawa T, Yamakawa K, Nishida S, Kozaki S, Sakaguchi G. Sporulation and C₂ Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type C Strains Producing No C₁ Toxin. Microbiol. Immunol. 1978;22:591-6.

Nakano H, Okabe T, Hashimoto H, Sakaguchi G. Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origins. J Med Sci Biol. 1990;43:183-95.

Nakano H, Yoshikuni Y, Hashimoto H, Sakaguchi G. Detection of *Clostridium botulinum* in natural sweetening. Int J Food Microbiol. 1992;16:117-21.

Nasr SE. Der Nachweis und die hygienische Bedeutung anaerober Sporenbildner im Oberflächenwasser [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 1958.

Nattermann H. *Clostridium botulinum*. In: Wiesner E, Ribbeck R, editors. Lexikon der Veterinärmedizin. 4th ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2000. p.277.

Neufeld B, Belihart-Neufeld A. Chronischer viszeraler Botulismus in einem Kuhbestand im Allgäu. Tierärztl Umsch. 2004a;59(1):19-24.

Neufeld B, Belihart-Neufeld A. Botulismus beim Mensch – ein Krimi mit Widersprüchen?. Tierärztl Umsch. 2004b;59:47-52.

Nevas M, Hielm S, Lindström M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol. 2002;72:45-52.

Nevas M, Korhonen A-R, Lindström M, Turkki P, Korkeala H. Antibacterial Efficiency of Finnish Spice Essential Oils against Pathogenic and Spoilage Bacteria. *J Food Prot.* 2004;67:199-202.

Nicolet J. *Clostridium botulinum*. In: Nicolet J, editor. *Kompendium der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. Berlin, Hamburg: Pareys Studentexte; 1985. p.154-8.

Nikolaeva SA, Mazokhina NN. Multiplication of *Clostridium botulinum* type B in preserved mushroom sauce. *Vopr Pitan.* 1972;31:83-6.

Nol P, Rocke TE, Gross K, Yuill TM. Prevalence of neurotoxigenic *Clostridium botulinum* type C in the gastrointestinal tracts of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in the Salton Sea. *J Wildlife Dis.* 2004;40:414-9.

Notermans S, Breukink HJ, Wensing Th, Wagenaar G. Voorkomen van *Clostridium botulinum* in pensinhoud en faeces van runderen gevoederd met bostel welke natuurlijk besmet was met *Clostridium botulinum*. *Tijd Diergeneesk.* 1978;103:1327-33.

Notermans S, Dufrenne J, Keijbets MJH. Vacuum-Packed Cooked Potatoes: Toxin Production by *Clostridium botulinum* and Shelf Life. *J Food Prot.* 1981;44:572-5.

Notermans S, Dufrenne J, Keybets MJH. Use of Preservatives to Delay Toxin Formation by *Clostridium botulinum* (Type B, Strain Okra) in Vacuum-Packed, Cooked Potatoes. *J Food Prot.* 1985;48:851-5.

Notermans S, Dufrenne J, Lund BM. Botulism Risk of Refrigerated, Processed Foods of Extended Durability. *J Food Prot.* 1990;53:1020-4.

Notermans S, Kozaki S, Dufrenne J, van Schothorst M. In vitro inactivation of *Clostridium botulinum* toxins types B, C and E by digestive juices of man and ducks. *Jap J med Sci Biol.* 1980;33:255-61.

Notermans S, Kozaki S, van Schothorst M. Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Grass. *A E M.* 1979;38:767-71.

Nunn F, Cave TA, Knottenbelt C, Poxton IR. Association between key-Gaskell syndrome and infection by *Clostridium botulinum* type C/D. *Vet Rec.* 2004;155:111-5.

Nychas G-JE, Tassou CC. Traditional Preservatives – Oils and Spices. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol 3. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.1717-22.

O'Connor-Shaw RE, Reyes VG. Use of Modified-atmosphere Packaging. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.410-6.

O'Keeffe T, Hill C. Potential in Food Preservation. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.183-91.

Oates JA, Wood AJJ. Therapeutic uses of botulinum toxin. *New Engl J Med.* 1991;324:1186-94.

Odlaug TE, Pflug IJ. *Clostridium botulinum* and Acid Foods. *J Food Prot.* 1978;41:566-73.

Odlaug TE, Pflug IJ. *Clostridium botulinum* Growth and Toxin Production in Tomato Juice Containing *Aspergillus gracilis*. *A E M.* 1979;37:496-504.

Oguma K, Iida H, Shiozaki M., Inoue K. Antigenicity of Converting Phages Obtained from *Clostridium botulinum* Types C and D. *Infect Imm.* 1976;13:855-60.

Oguma K, Syuto B, Agui T, Iida H, Kubo S. Homogeneity and Heterogeneity of Toxins Produced by *Clostridium botulinum* Type C and D Strains. *Infect Imm.* 1981;34:382-8.

Oguma K, Syuto B, Iida H, Kubo S. Antigenetic Similarity of Toxins Produced by *Clostridium botulinum* Type C and D Strains. *Infect Imm.* 1980;30:656-60.

Oguma K, Yamaguchi T, Sudou K, Yokosawa N, Fujikawa Y. Biochemical Classification of *Clostridium botulinum* Type C and D Strains and Their Nontoxigenic Derivates. *A E M.* 1986;51:256-60.

Oguma K, Iida H, Sugiyama H. Adsorption of *Clostridium botulinum* cultures of phage controlling type C botulinum toxin production. *Japan J med Sci Biol.* 1979;32:125-6.

Oguma K, Yokota K, Hayashi S, Takeshi K, Kumagai M, Itoh N, et al. Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin. *Lancet.* 1990; 336:1449-50.

Ohishi I. Lethal and Vascular Permeability Activities of Botulinum C₂ Toxin Induced by Separate Injections of the Two Toxin Components. *Infect Imm.* 1983a;40:336-39.

Ohishi I. Response of Mouse Intestinal Loop to Botulinum C₂ Toxin: Enterotoxic Activity Induced by Cooperation of Nonlinked Protein Components. *Infect Imm.* 1983b;40:691-5.

Ohishi I, Miyake M, Ogura H, Nakamura S. Cytopathic effect of botulinum C₂ toxin on tissue-culture cells. *FEMS Microbiol Lett.* 1984;23:281-4.

Ohishi I, Odagiri Y. Histopathological Effect of Botulinum C₂ Toxin on Mouse Intestines. *Infect Imm.* 1984;43:54-8.

Ohishi I, Sakaguchi G. Activation of Botulinum Toxins in the Absence of Nicking. *Infect Imm.* 1977;17:402-7.

Ohishi I, Sakaguchi G. Divergency of nicking of the toxin from the proteolytic activity of *Clostridium botulinum* of different types. *Jap J med Sci Biol.* 1979;32:130-2.

Ohishi I, Sugii S, Sakaguchi G. Oral Toxicities of *Clostridium botulinum* Toxins in Response to Molecular Size. *Infect Imm.* 1977;16:107-9.

Ohye DF, Christian JHB. Combined effects of temperature, pH and water activity on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* types A, B and E. In: Ingram M, Roberts TA, editors. *Botulism 1966*. London: Chapman & Hall; 1967. p.217-24.

Ohye DF, Scott WJ. The temperature relations of *Clostridium botulinum*, types A and B. *Austr J Biol Sci.* 1953;6:178-89.

Ohye DF, Scott WJ. Studies in the physiology of *Clostridium botulinum* type E. *Austr J Biol Sci.* 1957;10:85-94.

Okereke A, Montville TJ. Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *A E M.* 1991a;57:3423-8.

Okereke A, Montville TJ. Bacteriocin Inhibition of *Clostridium botulinum* Spores by Lactic Acid Bacteria. *J Food Prot.* 1991b;54:349-53.

Ono T, Karashimada T, Iida H. Studies on the serum therapy of type E botulism (part III). *Jap J med Sci Biol.* 1970;23:177-91.

Otte J, Emmrich P. Diagnostische und therapeutische Probleme des Botulismus im Kindesalter. *Klin Pädiatr.* 1982;194:18-22.

Pace PJ, Krumbiegel ER. *Clostridium botulinum* and smoked fish: production: 1963-1972. *J Milk Fd Techn.* 1973;36:42-9.

Pace PJ, Krumbiegel ER, Angelotti R, Wisniewski HJ. Demonstration and Isolation of *Clostridium botulinum* Types from Whitsfish Chubs Collected at Fish Smoking Plants of the Milwaukee Area. *Appl Microbiol.* 1967;15:877-84.

Pace PJ, Krumbiegel ER, Wisniewski HJ. Interrelationship of Heat and Relative Humidity in the Destruction of *Clostridium botulinum* Type E Spores in Whitefish Chubs. *Appl Microbiol.* 1972;23:750-7.

Passaro DJ, Werner SB, McGee J, Kenzie WRM, Vugia DJ. Wound Botulism Associated With Black Tar Heroin Among Injecting Drug Users. *J Am med Ass.* 1998;279:859-63.

Patel HR, Patel PC, York GK. Growth and Toxigenesis of *Clostridium botulinum* Type E on Marine Molluscs at Low Temperatures. *J Food Sci Technol.* 1978;15:231-5.

Paterson DL, King MA, Boyle RS, Pond SM, Whitby M, Wright M, et al. Severe botulism after eating home-preserved asparagus. *Med J Aust.* 1992;157:269-70.

Paton E, Waud D. The Margin of Safety of Neuromuscular Transmission. *J Physiol.* 1967;191:595-9.

Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed foods of extended durability. *Tren Food Sci Technol.* 1997;8:186-92.

Peck MW, Fairbairn DA, Lund BM. The effect of recovery medium on the estimated heat-inactivation of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Lett appl Microbiol.* 1992a;15:146-51.

Peck MW, Fairbairn DA, Lund BM. Factors affecting growth from heat-treated spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Lett appl Microbiol.* 1992b;15:152-5.

Peck MW, Fairbairn DA, Lund BM. Heat-resistance of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* estimated in medium containing lysozyme. *Lett appl Microbiol.* 1993;16:126-31.

Peck MW, Fernandez PS. Effect of lysozyme concentration, heating at 90°C, and then incubation at chilled temperatures on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Lett appl Microbiol.* 1995;21:50-4.

Peck MW, Lund BM, Fairbairn DA, Kaspersson AS, Undeland PC. Effect of Heat Treatment on Survival of, and Growth from, Spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* at Refrigeration Temperatures. *A E M.* 1995;61:1780-5.

Pedersen HO. On Type E Botulism. *J appl Bact.* 1955;18:619-28.

Pelroy GA, Eklund MW, Paranjpye RN, Suzuki EM, Peterson ME. Inhibition of *Clostridium botulinum* Types A and E Toxin Formation by Sodium Nitrite and Sodium Chloride in Hot-Process (Smoked) Salmon. *J Food Prot.* 1982;45:833-41.

Perkins WE. Production of Clostridial Spores. *J appl Bact.* 1965;28:1-6.

Perkins WE, Tsuji K. Sporulation of *Clostridium botulinum* II: Effect of arginine and its degradation products on sporulation in a synthetic medium. *J Bact.* 1962;84:86-94.

Peterson DR, Eklund MW, Chinn NM. The Sudden Infant Death Syndrome and Infant Botulism. *Rev infect Dis.* 1979;1:630-4.

Peterson ME, Paranjpye RN, Poysky FT, Pelroy GA, Eklund MW. Control of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Types B and E in Crab Analogs by Combinations of Heat Pasteurization and Water Phase Salt. *J Food Prot.* 2002;65:130-9.

Peterson ME, Pelroy GA, Poysky FT, Paranjpye RN, Dong FM, Pigott GM, et al. Heat-Pasteurization Process for Inactivation of Nonproteolytic Types of *Clostridium botulinum* in Picked Dungeness Crabmeat. *J Food Prot.* 1997;60:928-34.

Petran RL, Sperber WH, Davis AB. *Clostridium botulinum* Toxin Formation in Romaine Lettuce and Shredded Cabbage: Effect of Storage and Packaging Conditions. *J Food Prot.* 1995;58:624-7.

Pfeilsticker K. Ist die Lebensmittelbestrahlung notwendig?. In: Todt A, Murr C, Müller G, editors. Tagungsreihe Neubewertung von Lebensmittelqualität: Neue Technologien im Lebensmittelsektor: Gentechnik und Lebensmittelbestrahlung. Köln: Katalyse-Institut für angewandte Umweltforschung in Kooperation mit buntstift e.V. & Evangelische Akademie Mülheim/Ruhr; 1993. p.85-9.

Pfenninger W. Toxic-immunologic and serologic relationship of *Bacillus botulinus*, type C, and *Bacillus parobotulinus*, "Seddon". *J infect Dis.* 1924;35:347-52.

Pickett J, Berg B, Chaplin E, Brunstetter-Shafer M. Syndrome of botulism in infancy: Clinical and electrophysiologic study. *New Engl J Med.* 1976;295:770-2.

Pierson MD, Payne SL, Ades GL. Heat Injury and Recovery of Vegetative Cells of *Clostridium botulinum* Type E. *Appl Microbiol.* 1974;27:425-6.

Pierson MD, Reddy NR. *Clostridium botulinum* – Status summary. *Food Techn.* 1988;42:196-8.

Pierson MD, Smoot LA. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 1982;17:141-87.

Pivnick H, Barnett H. Effect of salt and Temperature on Toxinogenesis by *Clostridium Botulinum* in Perishable Cooked Meats Vacuum-Packed in Air-Impermeable Plastic Pouches. *Food Techn.* 1965;19:1164-7.

Pivnick H, Barnett HW, Nordin HR, Rubin LJ. Factors affecting the safety of canned, cured, shelf-stable luncheon meat inoculated with *Clostridium botulinum*. *Can Inst Food Technol J.* 1969;2:141.

Pivnick H, Johnston MA, Thacker C, Loynes R. Effect of Nitrite on Destruction and Germination of *Clostridium Botulinum* and Putrefactive Anaerobes 3679 and 3679h in Meat and in Buffer. *Can Inst Food Technol J.* 1970;3:103-9.

Plowman J, Peck MW. Use of a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F to a wide range of germinants and conditions. *J appl Microbiol.* 2002;92:681-94.

Polip I. Untersuchungen zur Unterbindung von Buttersäuregärung und Clostridienaktivität in Silagen aus nitratarmen Grünfütter [Dissertation rer. agr.]. Berlin: Universität Berlin; 2001.

Popoff MR. Ecology of Neurotoxic Strains of Clostridia. In: Montecucco C, editor. *Clostridial Neurotoxins.* Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1995. p.1-29.

Popoff MR, Lecoanet J. Botulinum type D toxin and *Clostridium perfringens* enterotoxin in a bull calf. *Vet Rec.* 1987;121:591-2.

Post LS, Amoroso TL, Solberg M. Inhibition of *Clostridium botulinum* Type E in Model Acidified Food Systems. *J Food Sci.* 1985a;50:966-8.

Post LS, Lee DA, Solberg M, Furgang D, Specchio J, Graham C. Development of Botulinal Toxin and Sensory Deterioration During Storage of Vacuum and Modified Atmosphere Packaged Fish Fillets. *J Food Sci.* 1985b;50:990-6.

Potter MD, Meng J, Kimsey P. An ELISA for Detection of Botulinal Toxin Types A, B, and E in Inoculated Food Samples. *J Food Prot.* 1993;56:856-61.

Poxton IR, Hunter L, Lough H, Miller K. Is Equine Grass Sickness (Mal Seco?) a Form of Botulism?. *Anaerobe.* 1999;5:291-3.

Prévot A-R, Brygoo ER. Nouvelles recherches sur le Botulisme et ses cinq types toxiques. *Ann Inst Past.* 1953;85:544-75.

Prévot A-R, Terrasse J, Daumail J, Cavaroc M, Riol J, Sillic R. Existence en France du botulisme humain de type C. *Bull Acad nat Med.* 1955;139:355-8.

Proctor VA, Cunningham FE. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 1988;26:359-95.

Putnam FW, Lamanna C, Sharp DG. Molecular weight and homogeneity of crystalline botulinus A toxin. *J B Chem.* 1946;165:735-6.

Quortrup ER, Sudheimer RL. Some ecological relations of *Pseudomonas aeruginosa* to *Clostridium botulinum* Type C. *J Bact.* 1943;45:551-4.

Raatjes GJM, Smelt JPPM. *Clostridium botulinum* can grow and form toxin at pH values lower than 4,6. *Nature*. 1979;281:398-9.

Rand MJ, Whaler BC. Impairment of sympathetic transmission by botulinum toxin. *Nature*. 1965;206:588-91.

Ray B. *Fundamental Food Microbiology*. 2nd ed. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press; 2001.

Read RB, Bradshaw JG, Francis DW. Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* Type E in milk. *J Dairy Sci*. 1970;53:1183-6.

Reddy NR, Paradis A, Roman MG, Solomon HM, Rhodehamel EJ. Toxin Development by *Clostridium botulinum* in Modified Atmosphere-Packaged Fresh Tilapia During Storage. *J Food Sci*. 1996;61:632-5.

Reddy NR, Roman M, Villanueva M, Solomon HM, Kautter DA, Rhodehamel EJ. Shelf Life and *Clostridium botulinum* Toxin Development during Storage of Modified Atmosphere-packaged Fresh Catfish Fillets. *J Food Sci*. 1997b;62:878-84.

Reddy NR, Solomon HM, Yep H, Roman MG, Rhodehamel EJ. Shelf Life and Toxin Development by *Clostridium botulinum* during Storage of Modified-Atmosphere-Packaged Fresh Aquacultured Salmon Fillets. *J Food Prot*. 1997a;60:1055-63.

Reeves P. The bacteriocins. *Bacteriol. Rev*. 1965;29:24-45.

Reuner KH, Presek P, Boschek CB, Aktories K. Botulinum C₂ Toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. *Eur J Cell Biol*. 1987;43:134-40.

Rhodehamel EJ, Solomon HM, Lilly T, Kautter DA, Peeler JT. Incidence and heat resistance of *Clostridium botulinum* type E spores in menhaden surimi. *J Food Sci*. 1991;56:1562-3.

Riemann H. The effect of the number of spores on growth and toxin formation by *Clostridium botulinum* type E in inhibitory environments. In: Meraham M, Roberts TA, editors. *Botulism 1966*. London: Chapman and Hall; 1967. p.150-2.

Riemann H. Botulinum Food Poisoning. *Can Inst Food Sci Technol J*. 1973;6:111-23.

Robert-Koch-Institut. Botulismus nach dem Verzehr von Räucherfisch. *Hygiene und Medizin*. 2000;25:438-9.

Roberts TA. Sporulation of *Clostridium botulinum* Type E in Different Culture Media. *J appl Bact*. 1965;28:142-6.

Roberts D. Bacteria of public health significance. In: Brown MH, editor. Meat Microbiology. London, New York: Applied Science Publishers; 1982.

Roberts TA. Botulism. In: Stark BA, Wilkinson JM, editors. Silage and Health. Marlow: Chalcombe Publications; 1988. p.35-43.

Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB. *Clostridium botulinum*. In: Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB, editors. Microorganisms of Food N^o 5 - Microbiological specifications of food pathogens. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic & Professional; 1996. p.66-111.

Roberts TA, Gibson AM, Robinson A. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats I: Growth in pork slurries prepared from low pH meat (pH range 5,5-6,3). J Food Technol. 1981a;16:239-66.

Roberts TA, Gibson AM, Robinson A. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats II: Growth in pork slurries prepared from high pH meat (range 6,3-6,8). J Food Technol. 1981b;16:267-281.

Roberts TA, Gibson AM, Robinson A. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats III: The effect of potassium sorbate. J Food Technol. 1982;17:307-26.

Roberts TA, Hitchins AD. Resistance of spores. In: Gould GW, Hurst A, editors. The bacterial spore. New York: Academic Press; 1969.

Roberts TA, Ingram M. The Resistance of Spores of *Clostridium botulinum* Type E to Heat and Radiation. J appl Bact. 1965a;28:125-41.

Roberts TA, Ingram M. Radiation Resistance of Spores of *Clostridium* Species in an Aqueous Suspension. J Food Sci. 1965b;30:879-85.

Roberts TA, Smart JL. Inhibition of spores of *Clostridium* spp. by sodium nitrite. J appl Bact. 1974;37:261-4.

Roberts TA, Thomas AI, Gilbert RJ. A third outbreak of type C botulism in broiler chickens. Vet Rec. 1973;92:107-9.

Robinson A, Gibson AM, Roberts TA. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. J Food Technol. 1982;17:727-44.

Rodgers S, Peiris P, Casadei G. Inhibition of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* with Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins at Refrigeration Temperatures. J Food Prot. 2003a;66:674-8.

Rodgers S, Peiris P, Kailasapathy K, Cox J. Inhibition of Non-proteolytic *Clostridium botulinum* with Lactic Acid Bacteria in Extended Shelf-Life Cook-Chill Soups. Food Biotechn. 2003b;17:39-52.

Rodloff AC. Obligat anaerobe sporenbildende Stäbchen (Clostridien). In: Hahn H, editor. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 4th ed. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokyo: Springer-Verlag; 2001. p.537-65.

Roman MG, Humber JY, Hall PA, Reddy NR, Solomon HM, Triscott MX, et al. Amplified Immunoassay ELISA-ELCA for Measuring *Clostridium botulinum* Type E Neurotoxin in Fish Fillets. J Food Prot. 1994;57:985-90.

Rompf A, Jahn D. Influence of Redox Potential and pH. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.556-63.

Rose SA, Modi NK, Tranter HS, Bailey NE, Stringer MF, Hambleton P. Studies on the irradiation of toxins of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus*. J appl Bact. 1988;65:223-9.

Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. Toxicon. 2001;39:27-41.

Rowley DB, Anellis AA. Factors affecting outgrowth of *Clostridium botulinum* in foods. In: 76th annual meeting of the American Society for Microbiology. Seminar on prevention of food-borne botulism. Atlantic City: NJ May; 1976. p.2-7.

Rowley DB, Feeherry F. Conditions Affecting Germination of *Clostridium botulinum* 62A Spores in a Chemically Defined Medium. J Bact. 1970;104:1151-7.

Rowley DB, Firstenberg-Eden R, Powers EM, Shattuck GE, Wasserman AE, Wierbicki E. Effect of irradiation on the inhibition of *Clostridium botulinum* toxin production and the microbial flora in bacon. J Food Sci. 1983a;48:1016-21,1030.

Rowley DB, Firstenberg-Eden R, Shattuck E. Radiation-injured *Clostridium botulinum* type E spores: outgrowth and repair. J Food Sci. 1983b;48:1829-31,1848.

Saadia D, Voustianiouk A, Wang AK, Kaufmann H. Botulinum toxin type A in primary palmar hyperhidrosis. Neur. 2001;57:2095-9.

Sadick NS. Botulinum Toxin Type B. Derm Surg. 2003;29:348-51.

Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* Toxins. Pharm Ther. 1983;19:165-94.

Sakaguchi G, Ohishi I, Kozaki S. Botulism – Structure and Chemistry of Botulinum. In: Tu AT, editor. Handbook of Natural Toxins. Vol 4. New York, Basel: Marcel Dekker Inc.; 1988. p.191-216.

Sakaguchi G, Sakaguchi S. Studies on toxin production of *Clostridium botulinum* type E III: Characterization of toxin precursor. J Bact. 1959;78:1-9.

Sakaguchi G, Sakaguchi S. Development of antibody to each component of *Clostridium botulinum* type E progenitor toxin. Jap J med Sci Biol. 1973;26:187-95.

Sakaguchi G, Sakaguchi S, Imai N. Comparative gel filtration of toxin precursor and trypsin-activated toxin of *Clostridium botulinum* type E. J Bact. 1964;87:401-7.

Sakaguchi G, Sakaguchi S, Kawabata T, Nakamura Y, Akano T, Shiromizu K. Influence of oxytetracycline upon the toxin production of type E *Clostridium botulinum*. Jap J med Sci Biol. 1960;13:13-22.

Sakaguchi G, Tohyama Y. Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* type E I: A strain of genus *Clostridium* having the action to promote type E botulinal toxin production in a mixed culture. Jap J med Sci Biol. 1955a;8:247-53.

Sakaguchi G, Tohyama Y. Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* type E II: The mode of action of the contaminant organism to promote toxin production of type E organisms. Jap J med Sci Biol. 1955b;8:255-62.

Saupe C. Mikrobiell bedingte Gefährdung des Menschen durch Fisch und Fischerzeugnisse und Möglichkeiten ihrer Verhinderung. Mh Vet Med. 1989;44:54-9.

Schaffner RM. Government's role in preventing foodborne botulism. Food Technol. 1982;36:87-9,115.

Schallehn G. Die Sporenbildner. In: Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G, editors. Medizinische Mikrobiologie. 7th ed. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag; 1994. p.522-41.

Schebor C, Chirife J. A Survey of Water Activity and pH Values in Fresh Pasta Packed under Modified Atmosphere Manufactured in Argentina and Uruguay. J Food Prot. 2000;63:965-9.

Scheibner G. Der Einfluss von Ultraschallwellen auf das Botulinustoxin. Tierärztl Umsch. 1955;10:364-6.

Schettler CH. *Clostridium botulinum* Typ C – Intoxikation bei Broilern in Nordwestdeutschland. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1979;92:50-7.

Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 1992;359:832-5.

Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Phys Rev*. 2000;80:717-66.

Schiefelbein EB. Lebensmittelbedingte Infektionen und Intoxikationen der Jahre 1960-1983: Erfassung, Auswertung, Validität der WHO-Daten. [Dissertation med.]. Bonn: Universität Bonn; 1986.

Schiefer G. Intoxikation mit *Clostridium botulinum*. In: Zickrick K, Wegner K, Schreiter M, Schiefer G, Saupe C, Münch H-D, editors. *Mikrobiologie tierischer Lebensmittel*. 2nd ed. Leipzig: VEB Fachbuchverlag; 1986. p.445.

Schimmel D. Ergebnisse der Differenzierung von Referenz- und Konsiliarlaboratorien in den Jahren 1995 bis 2001. Bericht des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin; Fachbereich Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen, Jena. 2002.

Schmidt CF. Dose Requirements for the Radiation Sterilization of Food. *Int J appl Radiat Isotop*. 1963;14:19-26.

Schmidt CF. In: Lewis KH, Cassel K. editors. *Botulism – Proceedings of a symposium*. Public Health Service Publication No.999-FD-1, 1964. p.69-82.

Schmidt CF, Lechowich RV, Folinazzo JF. Growth and Toxin Production by Type E *Clostridium botulinum* Below 40°F. *J Food Sci*. 1961;26:626-30.

Schmidt CF, Lechowich RV, Nank WK. Radiation Resistance of spores of Type E *Clostridium* As Related to Extension of the Refrigerated Storage Life of Foods. *J Food Sci*. 1962b;27:85-9.

Schmidt CF, Nank WK. Radiation sterilization of Food. I: Procedures for the Evaluation of the Radiation Resistance of Spores of *Clostridium botulinum* in Food Products. *Food Res*. 1960;25:321-7.

Schmidt CF, Nank WK, Lechowich RV. Radiation Sterilization of Food. II: Some Aspects of the Growth, Sporulation, and Radiation Resistance of Spores of *Clostridium botulinum*, Type E. *J Food Sci*. 1962a;27:77-84.

Schnider P. Botulinumtoxin: Therapeutischer Einsatz in der Neurologie. *Wien klin Ws*. 2001;23-24a:22-3.

Schnider P, Moraru E, Kittler H, Voller B, Kranz G, Auff E. Intradermale Botulinumtoxin-injektionen in der Behandlung fokaler Hyperhidrosen. Wien klin Ws. 2001;113(Suppl.4):36-41.

Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E, Sorbara JOB, Rossi OD, Gerbasi LER. Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999;24:379-82.

Schoenholz P, Meyer KF. The occurrence of the spores of *B. botulinus* in the Hawaiian Islands and China. J infect Dis. 1922;31:610-3.

Schoenholz P, Meyer KF. Effect of direct sunlight, diffuse daylight and heat on the potency of botulinus toxin in culture mediums and vegetable products. J infect Dis. 1924;35:361-89.

Schoop G, Harms F. Über Botulinustoxin. Dt T W. 1935;43:755-7.

Schreiner MS, Field E, Ruddy R. Infant botulism: a review of 12 years' experience at the Children's Hospital of Philadelphia. Pediatrics. 1991;87:159-65.

Schulze K. Botulismus nach dem Verzehr von selbsteingelegten Heringen. Toxin- und Keimnachweis. Arch Leb Mitt Hyg. 1986;37:125.

Schulze K, Funke R. Ein Fall von Botulismus unter dem besonderen Aspekt der Diagnose am Lebensmittel. Arch Leb Mitt Hyg. 1981;32:83-7.

Schüppel H. Zu Fragen der hemmenden Konzentration des Nitrits auf lebensmittelhygienisch bedeutsame Keime. Mh Vet Med. 1985;40:243-6.

Schwagerick B. Klinische Fälle von viszeralem Botulismus bei Milchrindern in Mecklenburg-Vorpommern. Tierärztl Umsch. 2004a;59:25-9.

Schwagerick B. Fallbeispiele zum viszeralem Botulismus beim Rind. Vortragsband bpt-Kongress 2004. Vol: Schwein, Rind, kleiner Wiederkäuer. Frankfurt am Main: bpt-Akademie GmbH, 2004b. p.98-108.

Schwagerick B, Böhnel H. Eine chronische Erkrankung bei Milchkühen mit Nachweis von Botulinumtoxin – eine Fallstudie. Prakt TA. 2001;82:516-24.

Schwarz W. Untersuchungen zur Stabilität von gereinigtem und ungereinigtem Botulinumtoxin des Serotyps B (Stamm ATCC 7949). Arch Leb Mitt Hyg. 1979;30:29-33.

Scott WJ. Water relations of food spoilage microorganisms. Adv Food Res. 1957;7:83-5.

Scott VN. Interaction of Factors to Control Microbiological Spoilage of Refrigerated Foods. J Food Prot. 1989;52:431-5.

Scott VN, Bernard DT. Heat Resistance of Spores of Non-Proteolytic Type B *Clostridium botulinum*. J Food Prot. 1982;45:909-12.

Scott VN, Duncan CL. Cryptic plasmids in *Clostridium botulinum* and *Clostridium botulinum*-like organisms. FEMS Microbiol Lett. 1978;4:55-8.

Scott VN, Taylor SL. Effect of Nisin on the Outgrowth of *Clostridium botulinum* Spores. J Food Sci. 1981;46:117-20.

Segner WP, Schmidt CF. Heat Resistance of Spores of Marine and Terrestrial Strains of *Clostridium botulinum* Type C. Appl Microbiol. 1971;22:1030-3.

Segner WP, Schmidt CF, Boltz JK. Effect of Sodium Chloride and pH on the Outgrowth of Spores of Type E *Clostridium botulinum* at Optimal and Suboptimal Temperatures. Appl Microbiol. 1966;11:49-54.

Segner WP, Schmidt CF, Boltz JK. Enrichment, Isolation, and Cultural Characteristics of Marine Strains of *Clostridium botulinum* Type C. Appl Microbiol. 1971a;22:1017-24.

Segner WP, Schmidt CF, Boltz JK. Minimal Growth Temperature, Sodium Chloride Tolerance, pH Sensitivity, and Toxin Production of Marine and Terrestrial Strains of *Clostridium botulinum* Type C. Appl Microbiol. 1971b;22:1025-9.

Seidel G. *Clostridium botulinum*. In: Seidel G, Kiese-walter J, editors. Bakterielle Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen. 3rd ed. Berlin: Akademie-Verlag; 1992. p.336-62.

Seifert HSH. Botulismus. In: Seifert HSH, editor. Tropentierhygiene. Jena, Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag; 1992. p.263-6.

Seifert HSH. Evolution, Pathogenese und Epizootiologie von Bodenseuchen. Tierärztl Umsch. 2004;59:9-12.

Selbitz HJ. *Clostridium botulinum*. In: Selbitz HJ, editor. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992. p.192-5.

Selbitz HJ. Botulismus. In: Rolle M, Mayr A, editors. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7th ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2002. p.533-4.

Sell C. *Clostridium botulinum* Typ E [Dissertation med.]. Bonn: Universität Bonn; 1985.

Seward RA, Deibel RH, Lindsay RC. Effects of Potassium Sorbate AND Other Antibotulinal Agents on Germination and Outgrowth of *Clostridium botulinum* Type E Spores in Microcultures. A E M. 1982;44:1212-21.

Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL. Botulism in the United States: A Clinical and Epidemiological Review. *Ann Intern Med.* 1998;129:221-8.

Shayegani M, Stone WB, Hannett GE. An outbreak of botulism in waterfowl and fly larvae in New York State. *J Wildlife Dis.* 1984;20:86-9.

Sherman JM, Stark CN, Stark P. The destruction of botulinum toxin by intestinal bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1926;24:546-7.

Shukla HD, Sharma SK. *Clostridium botulinum*: A Bug with Beauty and Weapon. *Crit Rev Microbiol.* 2005;31:11-8.

Siegel LS, Metzger JF. Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type A Under Various Fermentation Conditions. *A E M.* 1979;38:606-11.

Simpson LL. The Action of Botulinal Toxin. *Rev infect Dis.* 1979;1:656-9.

Simpson LL. The Origin, Structure, and Pharmacological Activity of Botulinum Toxin. *Pharm Rev.* 1981;33:155-88.

Simpson LL. A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C₁ and C₂ toxins. *J Pharmacol exp Ther.* 1982;223:695-701.

Simpson MV, Smith JP, Dodds K, Ramaswamy HS, Blanchfield B, Simpson BK. Challenge Studies with *Clostridium botulinum* in a Sous-Vide Spaghetti and Meat-Sauce Product. *J Food Prot.* 1995;58:229-34.

Simunovic J, Oblinger JL, Adams JP. Potential for Growth of Nonproteolytic Types of *Clostridium botulinum* in Pateurized Restructured Meat Products: A Review. *J Food Prot.* 1985;48:265-76.

Sinell H-J. Botulismus. In: Sinell H-J, editor. *Einführung in die Lebensmittelhygiene.* Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1992. p.58-61.

Sinell H-J, Kolb H. Lebensmittelvergiftungen in der Bundesrepublik Deutschland im Spiegel der Literatur. *Fleischw.* 1981;61:573-7.

Skinner GE, Solomon HM, Fingerhut GA. Prevention of *Clostridium botulinum* Type A, Proteolytic B and E Toxin Formation in Refrigerated Pea Soup by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *J Food Sci.* 1999;64:724-7.

Skovgaard N. Bacterial association of and metabolic activity in fish in North Western Europe. *Arch Leb Mitt Hyg.* 1979;30:106-9.

Skulberg A. The Resistance of *Clostridium botulinum* Type E Toxin to Radiation. J appl Bact. 1965;28:139-41.

Smart JL, Roberts TA. An outbreak of type C botulism in broiler chickens. Vet Rec. 1977;100:378-80.

Smart JL, Roberts TA, McCullagu KG, Lucke VM, Pearson H. An outbreak of type C botulism in captive monkeys. Vet Rec. 1980;107:445-6.

Smelt JPPM, Haas H. Behaviour of Proteolytic *Clostridium botulinum* Types A and B near the Lower Temperature Limits of Growth. Europ J appl Microbiol Biotechnol. 1978;5:143-54.

Smelt JPPM, Raatjes GJM, Crowther JS, Verrips CT. Growth and toxin formation by *Clostridium botulinum* at low pH values. J appl Bact. 1982;52:75-82.

Smith LD. Comon Mesophilic Anaerobes, Including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, in 21 Soil Specimens. Appl Microbiol. 1975a;29:590-4.

Smith LD. Inhibition of *Clostridium botulinum* by Strains of *Clostridium perfringens* Isolated from Soil. Appl Microbiol. 1975b;30:319-23.

Smith GR. Individual variation in botulism. Br J exp Path. 1986;67:617-21.

Smith GR, Moryson CJ. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. J Hyg. 1975;75:371-9.

Smith GR, Moryson CJ. A comparison of the distribution of *Clostridium botulinum* in soil and in lake mud. J Hyg. 1977;78:39-41.

Smith MV, Pierson MD. Effect of reducing agents on oxidation-reduction potential and the outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores. A E M. 1979;37:978-84.

Smith L, Sugiyama H. The Spore. In: Smith L, Sugiyama H, editors. Botulism: the organism, its toxin, the disease. 2nd ed. Springfield, Illinois: Charlres C Thomas; 1988. p.39-54.

Smith GR, Young AM. *Clostridium botulinum* in British soil. J Hyg Camb. 1980;85:271-4.

Smoot LA, Pierson MD. Effect of Oxidation-reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores. J Food Sci. 1979;44:700-4.

Smoot LA, Pierson MD. Mechanisms of Sorbate Inhibition of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A Spore Germination. A E M. 1981;42:477-83.

Snowdon JA, Cliver DO. Microorganisms in honey. Int J Food Microbiol. 1996;31:1-26.

Snyder ML. The normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age. *J infect Dis.* 1940;66:1-16.

Sofos JN. Botulism in Home-Processed Foods. In: Tu AT, editor. *Food poisoning*. Vol 7. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker; 1992. p.171-203.

Sofos JN, Busta FF. Antimicrobial Activity of Sorbate. *J Food Prot.* 1981;44:614-22.

Sofos JN, Busta FF, Allen CE. Effects of sodium nitrite on *Clostridium botulinum* toxin formation in frankfurter emulsions formulated with meat and soy proteins. *J Food Sci.* 1979b;44:1267.

Sofos JN, Busta FF, Allen CE. Influence of pH on *Clostridium botulinum* control by sodium nitrite and sorbic acid in chicken emulsions. *J Food Sci.* 1980a;45:7-12.

Sofos JN, Busta FF, Bhothipaksa K, Allen CE. Sodium nitrite and sorbic acid effects on *Clostridium botulinum* toxin formation in chicken Frankfurter-type emulsions. *J Food Sci.* 1979a;44:668-72,675.

Sofos JN, Busta FF, Bhothipaksa K, Allen CE, Robach MC, Paquette MW. Effects of various concentrations of sodium nitrate and potassium sorbate on *Clostridium botulinum* toxin production in commercially prepared bacon. *J Food Sci.* 1980b;45:1285-92.

Sojer M, Wissel J, Müller J, Poewe W. Botulinumtoxin in der Behandlung fokaler Dystonien. *Wien Klin Ws.* 2001;113(Suppl.4):6-10.

Sojka B. Die Auswirkungen hohen hydrostatischen Druckes auf die Inaktivierung und auf Stoffwechselfvorgänge während der Auskeimung von Bakteriensporen [Dissertation rer. nat.]. Heidelberg: Universität Heidelberg; 1996.

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 1993;362:18-324.

Solomon HM, Kautter DA. Outgrowth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Bottled Chopped Garlic. *J Food Prot.* 1988;51:862-5.

Solomon HM, Kautter DA, Lilly T, Rhodehamel EJ. Outgrowth of *Clostridium botulinum* in Shredded Cabbage at Room Temperature Under a Modified Atmosphere. *J Food Prot.* 1990;53:831-3.

Solomon HM, Lynt RK, Lilly T, Kautter DA. Effect of Low Temperatures on Growth of *Clostridium botulinum* Spores in Meat of the Blue Crab. *J Food Prot.* 1977;40:5-7.

Solomon HM, Rhodehamel EJ, Kautter DA. Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Sliced Raw Potatoes Under Vacuum With and Without Sulfite. J Food Prot. 1994;57:878-81.

Solomon HM, Rhodehamel EJ, Kautter DA. Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* on Sliced Raw Potatoes in a Modified Atmosphere with and without Sulfite. J Food Prot. 1998;61:126-8.

Somers EB, Taylor SL. Further studies on the antibotulinal effectiveness of Nisin in acidic media. J Food Sci. 1981;46:1972-3.

Sommer EW, Sommer H. Studies on botulinus toxin V: Influence of nitrogenous and lipid compounds on the potency of botulinus toxin. J infect Dis. 1928;43:496-506.

Sonnabend O, Sonnabend W, Heinzle R, Sigrist T, Dirnhofer D, Krech U. Isolation of *Clostridium botulinum* Type G and Identification of Type G Botulinal Toxin in Humans: Report of Five Sudden Unexpected Deaths. J infect Dis. 1981;143:22-7.

Sonnabend WF, Sonnabend UP, Krech T. Isolation of *Clostridium botulinum* Type G from Swiss Soil Specimens by Using Sequential Steps in an Identification Scheme. A E M. 1987;53:1880-4.

Sonnenborn U, Greinwald R. Entwicklung und Veränderung der Darmflora während des menschlichen Lebens. In: Sonnenborn U, Greinwald R, editors. Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora. 2nd ed. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag; 1991. p.9-11.

Sonnenschein B. *Clostridium botulinum*. In: Blobel H, Schließer T, editors. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Vol 2. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; 1980. p.691-745.

Spanyar P, Kevei E, Blazovich M. Über Fragen des Räucherns von Lebensmitteln. Z Lebensmittl Unters. 1966;129:84-91.

Sperber WH. Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. Food Techn. 1982;36:89-94.

Spieß H. Botulismus beim Mastgeflügel. Deut Geflügelw Schweineprod. 1978;49:1220-1.

Stark PL, Lee A. Clostridia isolated from the feces of infants during the first year of life. J Ped. 1982;100:362-5.

Stark CN, Sherman JM, Stark PW. The influence of the filtrates of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* upon the growth of each of these organisms. J Bact. 1928;15:18.

Stewart GJ. Studies on spores of *Clostridium botulinum* [Ph.D.Thesis]. Morgantown: West Virginia University; 1963.

Stier RF, Bell L, Ito KA, Shafer BD, Brown LA, Seeger ML, et al. Effect of Modified Atmosphere Storage on *C. Botulinum* Toxigenesis and the Spoilage Microflora of Salmon Fillets. *J Food Sci.* 1981;46:1639-42.

Stöber M. Botulismus. In: Dirksen G, Gründer HD, Stöber M, editors. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.* 4th ed. Berlin: Parey-Verlag; 2002. p.1113-8.

Stocker E. Neurologische Syndrome, Differentialdiagnosen und Therapie des Botulismus [Dissertation med.]. München: Universität München; 1980.

Strasline GA. Rapid Germination of *Clostridium botulinum* Type E Spores. *J Fish Res Bd Can.* 1967;24:595-606.

Stratford M. Traditional Preservatives. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Vol 3. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.1729-37.

Straub OC. Vom Gift zum Therapeutikum. *Tierärztl Umsch.* 2004;59:3-4.

Stringer SC, Haque N, Peck MW. Growth from Spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* in Heat-Treated Vegetable Juice. *A E M.* 1999;65:2136-42.

Stringer SC, Peck MW. Combinations of Heat Treatment and Sodium Chloride That Prevent Growth from Spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *J Food Prot.* 1997;60:1553-9.

Strobl W. Botulinumtoxin Typ A bei Spastizität im Kindesalter. *Wien Klin Ws.* 2001;113(Suppl.4):30-5.

Strom MS, Eklund MW, Poysky FT. Plasmids in *Clostridium botulinum* and Related *Clostridium* Species. *A E M.* 1984;48:956-63.

Suarez-Rebollo MP, Rodriguez HR, Masana MO, Lasta JA. Sodium Propionate To Control *Clostridium botulinum* in a Shelf-Stable Beef Product Prepared by Using Combined Processes Including Irradiation. *J Food Prot.* 1997;60:771-6.

Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogenous group of all strains of *Clostridium botulinum* Toxintype G and some nontoxicogenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* and *Clostridium hastiforme*. *Int J Syst Bact.* 1988a;38:375-81.

Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Genetic confirmation of identities of neurotoxigenic *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* implicated as agents of infant botulism. J Clin Microbiol. 1988b;26:2191-2.

Sugi S, Ohishi I, Sakaguchi G. Molecular sizes of botulinum toxins in foods. Jap J med Sci Biol. 1978;31:159-61.

Sugimoto N, Haque A, Horiguchi Y, Matsuda M. Coronary vasoconstriction is the most probable cause of death of rats intoxicated with botulinolysin, a hemolysin produced by *Clostridium botulinum*. Toxicon. 1995;33:1215-30.

Sugiyama H. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. J Bact. 1951;62:81-96.

Sugiyama H. Animal Models for the Study of Infant Botulism. Rev Infect Dis. 1979;1:683-8.

Sugiyama H. *Clostridium botulinum* Neurotoxin. Microbiol Rev. 1980;44:419-48.

Sugiyama H. Botulism hazards from nonprocessed foods. Food Techn. 1982;36:113-5.

Sugiyama H, King GJ. Isolation and taxonomic significance of bacteriophages for non-proteolytic *Clostridium botulinum*. J gen Microbiol. 1972;70:517-25.

Sugiyama H, Mayeruauer B, Gogat G, Heimsch RC. Immunological reactivity of trypsinized *Clostridium botulinum* type E toxin. Proc Soc Exp Biol Med. 1967;126:690-4.

Sugiyama H, Mills DC. Intraintestinal Toxin in Infant Mice Challenged Intragastrically with *Clostridium botulinum* Spores. Infect Imm. 1978;21:59-63.

Sugiyama H, Mills DC, Kuo LC. Number of *Clostridium botulinum* Spores in Honey. J Food Prot. 1978;41:848-50.

Sugiyama H, Mizutani K, Yang KH. Basis of type A and F toxicities of *Clostridium botulinum* Strain 84. Proc Soc Exp Biol Med. 1972;141:1063-7.

Sugiyama H, Woodburn M, Yang KH, Movroydis C. Production of Botulinum Toxin in Inoculated Pack Studies of Foil-Wrapped Baked Potatoes. J Food Prot. 1981;44:896-8.

Sullivan NM, Mills DC, Riemann HP, Arnon SS. Inhibition of Growth of *Clostridium botulinum* by Intestinal Microflora Isolated from Healthy Infants. Microb Ecol Health Dis. 1988;1:179-92.

Swercek T. Toxicoinfectious botulism in foals and adult horses. J Am vet med Ass. 1980a;176:217-20.

Swerczek T. Experimentally induced toxicoinfectious botulism in horses and foals. *Am J Vet Res.* 1980b;41:348-50.

Swift PK, Wehausen JD, Ernest HB, Singer RS, Pauli AM, Kinde H, et al. Desert Bighorn Sheep Mortality Due to Presumptive Type C Botulism in California. *J Wildlife Dis.* 2000;36:184-9.

Syuto B, Kubo S. Purification and characterization of *Clostridium botulinum* type C toxin. *Jap J med Sci Biol.* 1978;31:169-70.

Szabo EA, Pemberton JM, Gibson AM, Eyles MJ, Desmarchelier PM. Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B and E in food, soil and infant faeces. *J appl Bact.* 1994;76:539-45.

Szegedi K. Plötzlicher Kindstod durch *Clostridium botulinum* [Dissertation med.]. Ulm: Universität Ulm; 1988.

Tacket CO, Shandera WX, Mann JM, Hargrett NT, Blake PA. Equine Antitoxin Use and Other Factors That Predict Outcome in Type A Foodborne Botulism. *Am J Med.* 1984;76:794-8.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Bact Rev.* 1976;40:722-56.

Takagi A, Kawata T, Yamamoto S. Electron microscope studies on ultrathin sections of spores of the *Clostridium* group, with special reference to the sporulation and germination process. *J Bact.* 1960;80:37-46.

Tanaka N. Toxin Production by *Clostridium Botulinum* in Media at pH Lower Than 4,6. *J Food Prot.* 1982;45:234-7.

Tanaka N, Traisman E, Lee MH, Cassens RG, Foster EM. Inhibition of Botulinum Toxin Formation in Bacon by Acid Development. *J Food Prot.* 1980;43:450-7.

Tanasugarn L. *Clostridium botulinum* in the Gulf of Thailand. *A E M.* 1979;37:194-7.

Tanner FW, Beamer PR, Rickher CJ. Further studies on development of *Clostridium botulinum* in refrigerated foods. *Food Res.* 1940;5:323-33.

Tanner FW, Evans FL. Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria I. Sodium chloride. *Zbl Bakt Parasit Kde. Abt.II.* 1933a;88:44-54.

Tanner FW, Evans FL. Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria II: Sodium nitrate. *Zbl Bakt Parasit Kde. Abt.II.* 1933b;89:48-54.

Tanner FW, Evans FL. Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria III: Sodium nitrite. *Zbl Bakt Parasit Kde. Abt.II.* 1934;91:1-14.

Tanner FW, McCrea FD. *Clostridium botulinum* IV: Resistance of spores to moist heat. *J Bact.* 1923;8:269-76.

Tanner FW, Oglesby EW. Influence of temperature on growth and toxin production by *Clostridium botulinum*. *Food Res.* 1941;1:481-94.

Taylor LY, Cann DD, Welch BJ. Antibotulinal Properties of Nisin in Fresh Fish Packaged in an Atmosphere of Carbon Dioxide. *J Food Prot.* 1990;53:953-7.

Telzak EE, Bell EP, Kautter DA, Crowell L, Budnick LD, Morse DL, et al. An international outbreak of Type E botulism due to uneviscerated fish. *J Inf Dis.* 1990;161:340-2.

ter Steeg PF, Cuppers HGAM. Growth of Proteolytic *Clostridium botulinum* in Process Cheese products: II: Predictive Modeling. *J Food Prot.* 1995;58:1100-8.

ter Steeg PF, Cuppers HGAM, Hellemons JC, Rijke G. Growth of Proteolytic *Clostridium botulinum* in Process Cheese Products: I. Data Acquisition for Modeling the Influence of pH, Sodium Chloride, Emulsifying Salts, Fat Dry Basis, and Temperature. *J Food Prot.* 1995;58:1091-9.

Teuscher E, Lindequist U. Neurotoxine aus *Clostridium botulinum*. In: Teuscher E, Lindequist U, editors. *Biogene Gifte*. 2nd ed. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag; 1994. p.556.

Thayer DW, Christopher JP, Campbell LA, Ronning DC, Dahlgren RR, Thomson GM, et al. Toxicology Studies of Irradiation-Sterilized Chicken. *J Food Prot.* 1987;50:278-88.

Therre H. Botulism in the European Union. *Eurosurveillance.* 1999;4:2-7.

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

Thomas LV, Ingram RE, Bevis HE, Davies EA, Milne CF, Delves-Broughton J. Effective Use of Nisin To Control *Bacillus* and *Clostridium* Spoilage of a Pasteurized Mashed Potato Product. *J Food Prot.* 2002;65:1580-5.

Thompson JA, Glasgow LA, Warpinski JR, Olson C. Infant Botulism: Clinical Spectrum and Epidemiology. *Ped.* 1980;66:936-42.

Thompson L, Tanner FW. Toxin production by *Clostridium botulinum* in canned foods. *J infect Dis.* 1925;37:344-52.

- Tjaberg TB. Proteases of *Clostridium botulinum* – VI: The role of trypsin, *Clostridium botulinum* proteases and protease inhibitors in the formation and activation of toxin in growing cultures of *Clostridium botulinum*. Acta vet scand. 1974;15:487-506.
- Todd ECD. Foodborne Disease in Canada – a 10-year Summary from 1975 to 1984. J Food Prot. 1992;55:123-32.
- Tompkin RB. Botulism from meat and poultry products – a historical perspective. Food Techn. 1980;34:229-36,257.
- Tompkin RB, Christiansen LN, Shaparis AB. Antibotulinal efficacy of sulfur dioxide in meat. A E M. 1980;39:1096-9.
- Tontis A, Stute MM. *Clostridium perfringens* Typ D. Veterinärspiegel. 2003;1:44-7.
- Townsend CT, Yee L, Mercer WA. Inhibition of the growth of *Clostridium botulinum* by acidification. Food Res. 1954;19:536-42.
- Tranter HS, Modi NK, Hambleton P, Melling J, Rose S, Stringer MF. Food irradiation and bacterial toxins. Lancet. 1987;II:48.
- Treadwell PE, Jann GJ, Salle AJ. Studies on factors affecting the rapid germination of spores of *Clostridium botulinum*. J Bact. 1958;76:549-56.
- Tsang N, Post LS, Solberg M. Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Model Acidified Systems. J Food Sci. 1985;50:961-5.
- Tsuji K, Perkins WE. Sporulation of *Clostridium botulinum* I: Selection of an aparticulate sporulation medium. J Bact. 1962;84:81-5.
- Turner HD, Brett EM, Gilbert RJ, Ghosh AC, Liebeschuetz HJ. Infant botulism in England. Lancet. 1978;8077;1277-8.
- Upadhyay J, Wilks AD. Thermal Resistance of *Clostridium botulinum* 33A in Different Suspending Media. Bacteriological Proceedings. Baltimore; 1969. p.17.
- Van der Lugt JJ, De Wet SC, Bastianello SS, Kellerman TS, Van Jaarsveld LP. Two outbreaks of tyce C and type D botulism in sheep and goats in South Afrika. JI S Afr vet Ass. 1995; 66:77-82.
- Van Ermengen E. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. Z Hyg Inf Kr. 1897;26:1-56.

Varnam AH, Evans MG. *Clostridium botulinum*. In: Varnam AH, Evans MG, editors. Foodborne pathogens – an illustrated text. Ort: Wolfe Publishing Ltd.; 1991. p.289-311.

Vary JC, Halvorson HO. Initiation of Bacterial Spore Germination. J Bact. 1968;95:1327-34.

Venner M. Botulismus beim Pferd. Dt T W. 1999;106:73.

Vincenzi FF. Effect of Botulinum toxin on autonomic nerves in a dually innervated tissue. Nature. 1967;213:394-5.

Wagner JE, Mann PC. Botulism in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) – A case report. J Zoo An Med. 1979;9:142-5.

Wagner Sommer E, Sommer H, Meyer KF. The purification of botulinum toxin. J infect Dis. 1926;39:345-50.

Wallhäußer KH, Schmidt H. Sterilisation durch Hitze. In: Wallhäußer KH, Schmidt H, editors. Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1967. p.43-74.

Ward BQ, Carroll BJ, Garrett ES, Reese GB. Survey of the U.S. Gulf Coast for the Presence of *Clostridium botulinum*. Appl Microbiol. 1967a;15:629-36.

Ward BQ, Garrett ES, Reese GB. Further Indications of *Clostridium botulinum* in Latin American Waters. Appl Microbiol. 1967b;15:1509.

Weickert MJ, Chambliss GH, Sugiyama H. Production of Toxin by *Clostridium botulinum* Type A Strains Cured of Plasmids. A E M. 1986;51:52-6.

Weißbach F. Analyse der Ursachen und Möglichkeiten zur Verminderung hoher Clostridin-Last im Grundfutter. Tierärztl Umsch. 2004;59:32-41.

Welt BA, Sage DS, Berger KL. Performance Specification of Time-temperature Integrators Designed to Protect Against Botulism in Refrigerated Fresh Foods. J Food Sci. 2003;68:2-9.

Wentz MW, Scott RA, Vennes JW. *Clostridium botulinum* Type F: Seasonal Inhibition by *Bacillus licheniformis*. Science. 1967;155:89-90.

Wenzel S, Bach R, Müller-Prasuhn G. Teichforellen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus. Arch Leb Mitt Hyg. 1971;22:131-5.

Werner H. *Clostridium*. In: Werner H, editor. Medizinische Mikrobiologie mit Repetitorium. Berlin, New York: Verlag Walter de Gruyter; 1992. p.154-66.

Werner SB, Passaro D, McGee J, Schechter R, Vugia DJ. Wound Botulism in California, 1951-1998: Recent Epidemic in Heroin Injectors. *Clin Infect Dis.* 2000;31:1018-24.

Wheaton E, Pratt GB, Jackson JM. Radioresistance of Five Strains of *Clostridium botulinum* in Selected Food Products. *J Food Sci.* 1961;26:345-50.

Whiting RC, Naftulin KA. Effect of Headspace Oxygen Concentration on Growth and Toxin Production by Proteolytic Strains of *Clostridium botulinum*. *J Food Prot.* 1992;55:23-7.

Whiting RC, Oriente JC. Time-to-turbidity model for non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *Int J Food Microbiol.* 1997;35:49-60.

Wilhelm KA. Extended fresh storage of fishery products with modified atmospheres: a survey. *Mar Fish Rev.* 1982;44:17-20.

Wilkins PA, Palmer JE. Botulism in foals less than 6 months of age: 30 cases (1989-2002). *J Vet Intern Med.* 2003;17:702-7.

Wilkinson JM. Silage and Animal Health. *Natural Tox.* 1999;7:221-32.

Williams FT. Attempts to increase the heat resistance of bacterial spores. *J Bact.* 1936;32:589-97.

Williams-Walls NJ. *Clostridium botulinum* Type F: Isolation from Crabs. *Science.* 1968;162:375-6.

Wobeser G, Marsden S, MacFarlane RJ. Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* Type C in the soil of wetlands in Saskatchewan. *J Wildlife Dis.* 1987;23:67-76.

Wollanke B. Botulismus in einem Bestand mit 16 Pferden und Ponys. *Prakt TA.* 2004;85:252-61.

Wong DM, Young-Perkins KE, Merson RL. Factors Influencing *Clostridium botulinum* Spore Germination, Outgrowth, and Toxin Formation in Acidified Media. *A E M.* 1988;54:1446-50.

Woodburn MJ, Somers E, Rodriguez J, Schantz EJ. Heat inactivation rates of botulinum toxins A, B, E and F in some foods and buffers. *J Food Sci.* 1979;44:1658-61.

Yamakawa K, Nakamura S. Prevalence of *Clostridium botulinum* type E and coexistence of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B in the river soil of Japan. *Microbiol Immunol.* 1992;36:583-91.

Yang KH, Sugiyama H. Purification and Properties of *Clostridium botulinum* Type F Toxin. *Appl Microbiol.* 1975;29:598-603.

Yeruham I, Elad D, Avidar Y, Grinberg K, Tiomkin D, Monbaz A. Outbreak of botulism type B in a dairy cattle herd: clinical and epidemiological aspects. *Vet Rec.* 2003;153:270-2.

York GK, Vaughn RH. Use of sorbic acid enrichment media for species of clostridium. *J Bact.* 1954;68:739-44.

Young-Perkins KE, Merson RL. *Clostridium botulinum* Spore Germination, Outgrowth, and Toxin production Below pH 4,6; Interactions Between pH, Total Acidity, and Buffering Capacity. *J Food Sci.* 1987;52:1084-8.

Zaleski SJ. *Clostridium botulinum* type E, its occurrence and technological importance in the fish industry. In: Roberts TA, Hobbs G, Christian JHB, Skovgaard N, editors. Psychotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. New York: Academic Press; 1981. p.485-9.

Zaun W. Lebensmittelvergiftungen und andere Intoxikationen durch das *Clostridium botulinum* [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 1951.

Zechmeister TC, Farnleitner AH, Rocke TE, Pittner F, Rosengarten R, Mach RL, et al. PCR und ELISA – Alternativen zum Maustest für die Analyse des Botulismus-Neurotoxin-C1 Giftpotentials in Umweltproben?. *Alt Tierexp. Supp.* 2002;19:49-54.

Zhao L, Montville TJ, Schaffner DW. Inoculum Size of *Clostridium botulinum* 56A Spores Influences Time-To-Detection and Percent Growth-Positive Samples. *J Food Sci.* 2000;65:1369-75.

Zhao L, Montville TJ, Schaffner DW. Time-to-detection, percent-growth-positive and maximum growth rate models for *Clostridium botulinum* 56A at multiple temperatures. *Int J Food Microb.* 2002;77:187-97.

Zhao L, Montville TJ, Schaffner DW. Computer Simulation of *Clostridium botulinum* Strain 56A Behaviour at Low Spore Concentrations. *A E M.* 2003;69:845-51.

Zhou Y, Sugiyama H, Johnson EA. Transfer of Neurotoxigenicity from *Clostridium butyricum* to a Nontoxigenic *Clostridium botulinum* Type E-Like Strain. *A E M.* 1993;59:3825-31.

Zitierte Gesetze

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen. Vom 20.07.2000 (BGBl 2000, 1045).

Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden. Vom 21.09.1998 (BGBl. I S. 2955), geändert am 10.12.2001 (BGBl. I S. 3379, 3411), am 25.04.2002 (BGBl. I S. 1488, 1492) und am 26.11.2003 (BGBl. I S. 2373, 2378).

Deutsches Institut für Normung e.V.. DIN 10102 Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen; Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin. Vom 01.06.1988. Beuth Verlag GmbH: Berlin.

Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, LFGB vom 01.09.2005, BGBl. I Nr. 55 vom 6.9.2005. S. 2618.

Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen (Lebensmittelbestrahlungsverordnung - LMBestV. Vom 14. Dezember 2000 (BGBl. I S. 1730) (BGBl. III 2125-40-79) geändert durch Siebente Zuständigkeitsanpassungsverordnung vom 29. Oktober 2001 (BGBl. I S. 2785, 2853)).

Richtlinie 1999/2/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Februar 1999 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über mit ionisierenden Strahlen behandelte Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile.
Amtsblatt Nr. L 066 vom 13/03/1999 S. 0016-0023.

Richtlinie 1992/3/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Februar 1999 über die Festlegung einer Gemeinschaftsliste von mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen.
Amtsblatt Nr. L 066 vom 13/03/1999 S. 0024-0025.

10 Anhangsverzeichnis

Abb. A1	2-Kettenstruktur des BotulinumNeuroToxin	VII
Abb. A2	kristaline Struktur des BoNT-Typ A	VII
Abb. A3	Entwicklungskaskade des klinischen Botulismus	VIII
Abb. A4	Pathomechanismus der Wirkung von BoNT	IX
Tab. A1	Geschichtlicher Überblick zur Entdeckung der Toxintypen	X
Tab. A2	Biochemische Eigenschaften von BoNT-produzierenden Spezies	X
Tab. A3	Morphologische Eigenschaften von <i>C. botulinum</i> und verwandten Clostridienstämmen	XI
Tab. A4	Metabole Gruppen der <i>C. botulinum</i> -Toxovare und anderer <i>Clostridium</i> spp.	XII
Tab. A5	BoNT-Synthese durch <i>C. botulinum</i>	XII
Tab. A6	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Sporenbildung von <i>C. botulinum</i> -Typ E	XII
Tab. A7	Zusammenfassung von in der Literatur angegebenen letalen BoNT-Dosen für den Menschen	XIII
Tab. A8	Letale Dosis des BoNT-Typ G in Abhängigkeit von Tierart und Art der Verabreichung	XIII
Tab. A9	Lokalisation der genetischen Information zur Synthese von botulinogenen und ähnlichen Neurotoxinen	XIII
Tab. A10	Auswirkung des Wachstums von S5 auf die Toxinbildung von <i>C. botulinum</i> -Typ E	XIV
Tab. A11	Klinische Einteilung des Botulismus beim Menschen	XIV
Tab. A12	Vorkommen von Botulismus beim Menschen in den USA, 1978-1984	XIV

II

Tab. A13	Auswirkung der Ernährung von Säuglingen auf das Darmmilieu und die Darmflora	XVI
Tab. A14	Auftreten der Toxovare bei verschiedenen Tierarten	XVI
Tab. A15	Häufig auftretende Botulismussymptome	XVI
Tab. A16	Geographische Verbreitung und Wirtsspektrum der Toxovaren von <i>C. botulinum</i>	XVII
Tab. A17	Prozentualer Anteil an <i>C. botulinum</i> -Typ E-positiven Proben in europäischen Meerestieren verschiedener Herkunft	XVII
Tab. A18	Nachweise von <i>C. botulinum</i> in Asien	XVII
Tab. A19	Quantitative Nachweise von <i>C. botulinum</i> -Sporen in klinisch unauffälligen Haustierbeständen	XVIII
Tab. A20	Botulismusausbrüche in Zusammenhang mit sauren Lebensmitteln in Amerika, 1899-1975	XVIII
Tab. A21	Botulismus auslösende Lebensmittelgruppen in den USA, 1899-1981	XIX
Tab. A22	Botulismus auslösende Lebensmittelgruppen in Franken	XIX
Tab. A23	Botulismus auslösende Lebensmittelgruppen, weltweit	XX
Tab. A24	Beeinflussung des Nachweises von <i>C. botulinum</i> -Typ B in Schweinekotproben durch Jahreszeit und Haltungssystem	XX
Tab. A25	Vorkommen von <i>C. botulinum</i> -Typ E in rohen Fischen aus Deutschland	XXI
Tab. A26	Auftreten von Botulismus in Kanada, 1975-1984	XXI
Tab. A27	Auftreten von Botulismus in den USA, 1988-1992	XXII

III

Tab. A28	Beispielhafte Umweltbedingungen, die das Wachstum von <i>C. botulinum</i> hemmen	XXII
Tab. A29	Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Toxinbildung von <i>C. botulinum</i> -Typ B	XXII
Tab. A30	Hemmung von <i>C. botulinum</i> -Typ E durch NaCl sowie einer Kombination von NaCl und NO ₂	XXII
Tab. A31	Wachstum von <i>C. botulinum</i> -Typ E in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und a _w -Wert	XXIII
Tab. A32	Mindest-a _w -Werte für das Wachstum von <i>C. botulinum</i> -Typ B in Abhängigkeit vom pH-Wert	XXIII
Tab. A33	BoNT-Synthese in gekochten, pürierten und vakuumverpackten Kartoffeln bei einer Inkubationstemperatur von 25°C	XXIII
Tab. A34	Toxinbildung eines proteolytischen <i>C. botulinum</i> -Typ B-Stammes in Grassilage	XXIV
Tab. A35	Teilungsraten verschiedener <i>C. botulinum</i> -Typen pro Stunde in Abhängigkeit von der Temperatur	XXIV
Tab. A36	Hitzeresistenz der <i>C. botulinum</i> -Sporen	XXV
Tab. A37	Einfluss des Nährmediums auf das Wachstum von <i>C. botulinum</i> -Typ E	XXV
Tab. A38	Toxinsynthese durch <i>C. botulinum</i> -Typ B (nicht-proteolytisch) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur	XXV
Tab. A39	Inaktivierung von <i>C. botulinum</i> -Typ C-Toxin bei verschiedenen Temperaturen	XXV
Tab. A40	Wirkung ionisierender Strahlen auf Lebensmittel mit Anwendungsbeispielen	XXVI
Tab. A41	Zerstörung von <i>C. botulinum</i> -Sporen infolge Bestrahlung	XXVI
Tab. A42	Beeinflussung des D-Wertes durch die Bestrahlungstemperatur	XXVI

Tab. A43	In Ländern der EU zur γ -Bestrahlung zugelassene Lebensmittel	XXVII
Tab. A44	Beeinflussung des D- und z-Wertes von <i>C. botulinum</i> -Typ A-Sporen durch den a_w -Wert	XXVIII
Tab. A45	Mindest- a_w -Werte für die Vermehrung in Abhängigkeit von <i>C. botulinum</i> -Typ und verwendeter wasserbindender Substanz	XXVIII
Tab. A46	Beeinflussung der BoNT-Synthese durch Verwendung verschiedener Salze zur Regulierung des a_w -Wertes	XXVIII
Tab. A47	Repräsentative a_w -Werte in einigen Lebens-/Futtermitteln	XXIX
Tab. A48	Einfluss eines reduzierten pH-Wertes auf die BoNT-Synthese	XXIX
Tab. A49	Wachstum und Toxinproduktion durch <i>C. botulinum</i> in Soja-angereicherten Medien bei 30°C	XXIX
Tab. A50	Nachgewiesene pH-Werte in frischen Pastaprodukten	XXX
Tab. A51	Toxinnachweise in Lebensmitteln mit variierendem Säuregrad	XXX
Tab. A52	Verlust der Toxizität in Abhängigkeit vom pH-Wert	XXX
Tab. A53	Auswirkung der Trypsinkonzentration und des pH-Wertes auf die Aktivierung von <i>C. botulinum</i> 89G-Toxin	XXX
Tab. A54	pH-Werte ausgewählter Lebensmittel	XXXI
Tab. A55	Einfluss des Sauerstoffpartialdruckes auf den E_h -Wert und die Mindestanzahl der zu inokulierenden Sporen, um Wachstum von <i>C. botulinum</i> nachzuweisen	XXXI
Tab. A56	Wachstum von <i>C. botulinum</i> -Typ E in Abhängigkeit von reduzierenden Agenzien	XXXII
Tab. A57	E_h -Werte einiger Lebensmittelgruppen	XXXII
Tab. A58	Zusammenhang zwischen der Qualität einer Pökellage und deren Redoxpotential	XXXIII

Tab. A59	BoNT-Bildung in „sous-vide“ Lebensmitteln unter Kühlbedingungen	XXXIII
Tab. A60	Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die BoNT-Synthese in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur	XXXIII
Tab. A61	Einfluss der Gasatmosphäre auf die Toxinbildung von <i>C. botulinum</i> in inokuliertem frischen Schweinefleisch bei 15°C	XXXIV
Tab. A62	Zusammenhang von CO ₂ -Gehalt und Inokulumgröße bezüglich der BoNT-Synthese in Lachsfilet, gelagert bei 10°C	XXXIV
Tab. A63	Zusammenwirken von pH-Wert, Salzgehalt und Sauerstoffkonzentration auf die Toxinbildung von <i>C. botulinum</i> bei 20°C	XXXIV
Tab. A64	Beeinflussung der die BoNT-Synthese hemmenden Nitritkonzentration durch die Temperatur	XXXV
Tab. A65	Medium- und <i>C. botulinum</i> -Stamm-abhängige Salzkonzentrationen, die das Wachstum bzw. die Toxinbildung hemmen	XXXV
Tab. A66	BoNT-Nachweis in inokuliertem, unbehandeltem Geflügelfleisch, dem verschiedene Konzentrationen an Salzen organischer Säuren zugesetzt wurden	XXXVI
Tab. A67	Hemmung der BoNT-Synthese durch verschiedene Säuren mit zwei Carboxylgruppen	XXXVI
Tab. A68	Inaktivierung von BoNT-Typ A nach Zugabe von Chelatbildnern bei 37°C für 30 Minuten	XXXVII
Tab. A69	Inaktivierung verschiedener BoNT-Typen durch Inkubation in 40 mM 1,10-Phenantholin bei 37°C für 30 Minuten	XXXVII
Tab. A70	Beziehung zwischen Inokulumgröße und Nachweis lebensfähiger Sporen	XXXVII
Tab. A71	Toxinproduktion von <i>C. botulinum</i> -Typ A in Abhängigkeit von der inokulierten Sporenmenge	XXXVIII

Tab. A72	Vergleich der Hemmzonen in Abhängigkeit von <i>C. botulinum</i> -Stamm und verwendetem Nisin-/Pediocinproduzierendem Mikroorganismus	XXXVIII
Tab. A73	Hemmung der BoNT-Synthese (durch $1,6 \times 10^3$ <i>C. botulinum</i> -Typ F-Zellen/ml) durch <i>Bacillus licheniformis</i>	XXXVIII
Tab. A74	Verstärkung der die BoNT-Synthese hemmenden Wirkung von <i>Lactobacillus plantarum</i> durch die Zugabe fermentierender Kohlenhydrate	XXXIX
Tab. A75	LD ₅₀ von Maus, Fasan und Ente pro ml BoNT-Typ C	XXXIX
Tab. A76	Bewertung des BoNT-Typ A sensitiven ELISA im Vergleich zum Mäuseletalitätstest	XXXIX

11 ANHANG

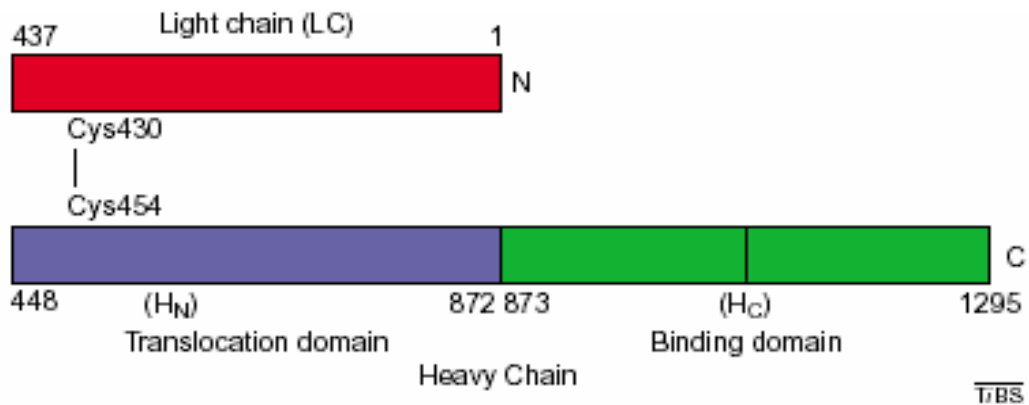


Abbildung A1: 2-Kettenstruktur des BotulinumNeuroToxin (TURTON et al. 2002)

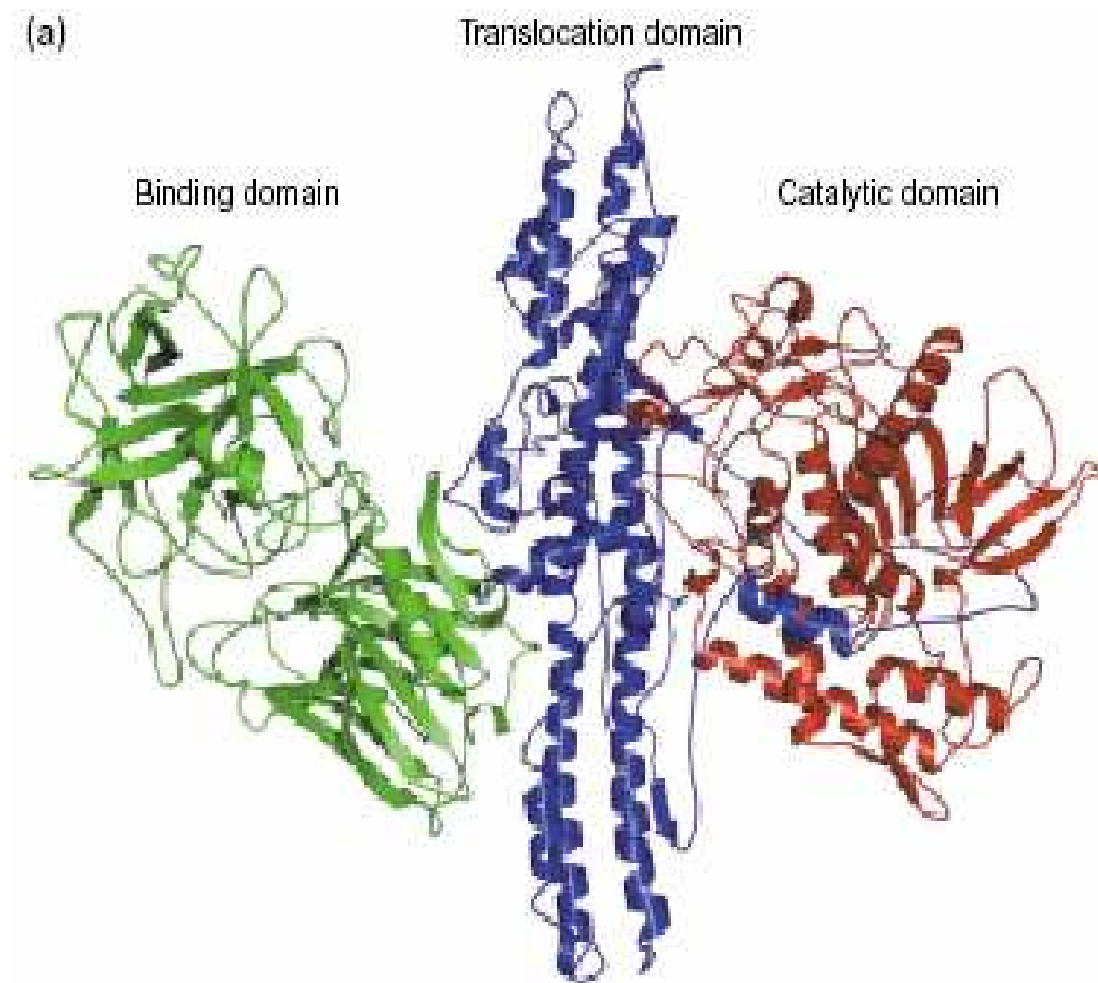


Abbildung A2: kristalline Struktur des BoNT-Typ A (TURTON et al. 2002)

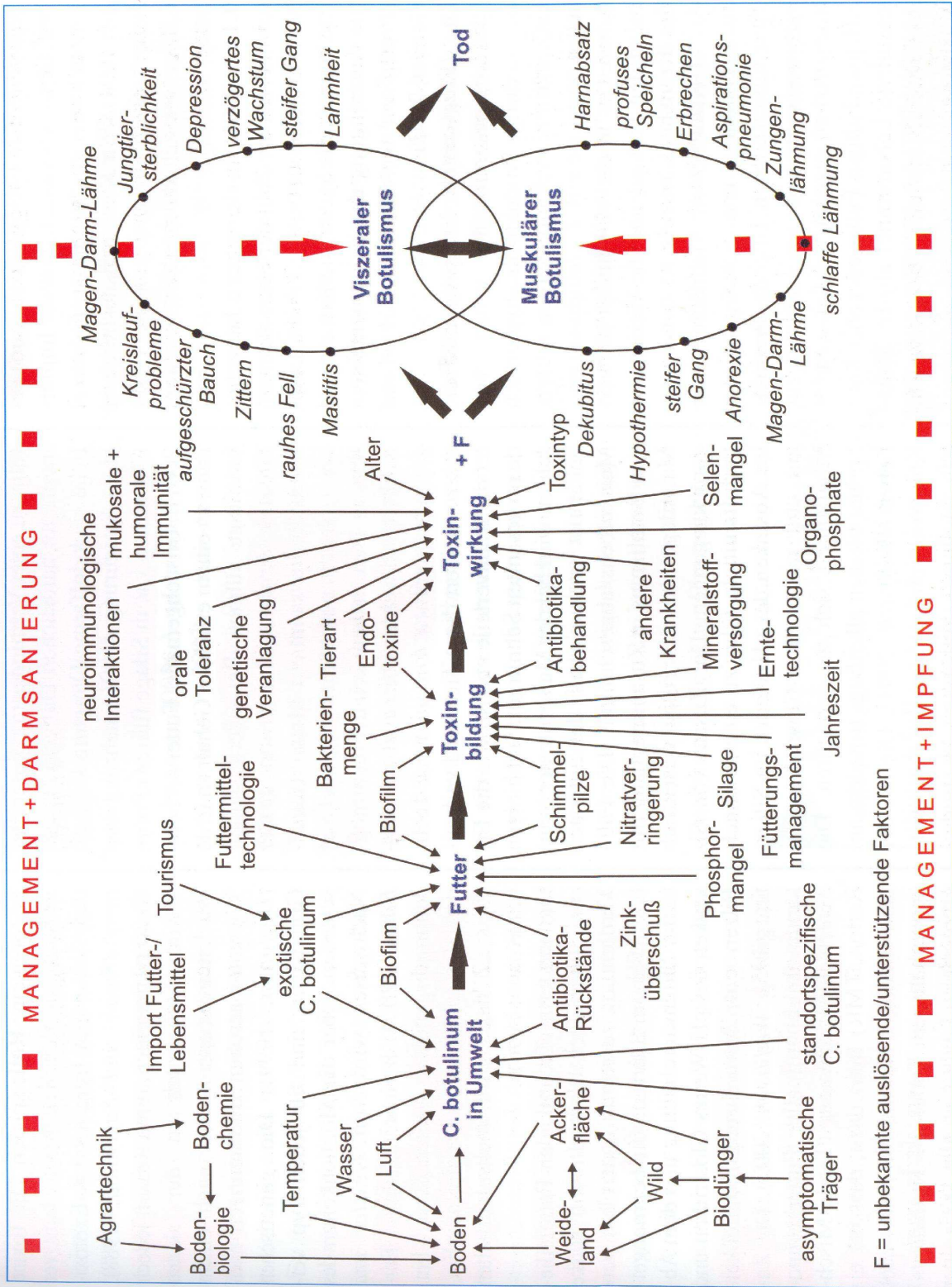
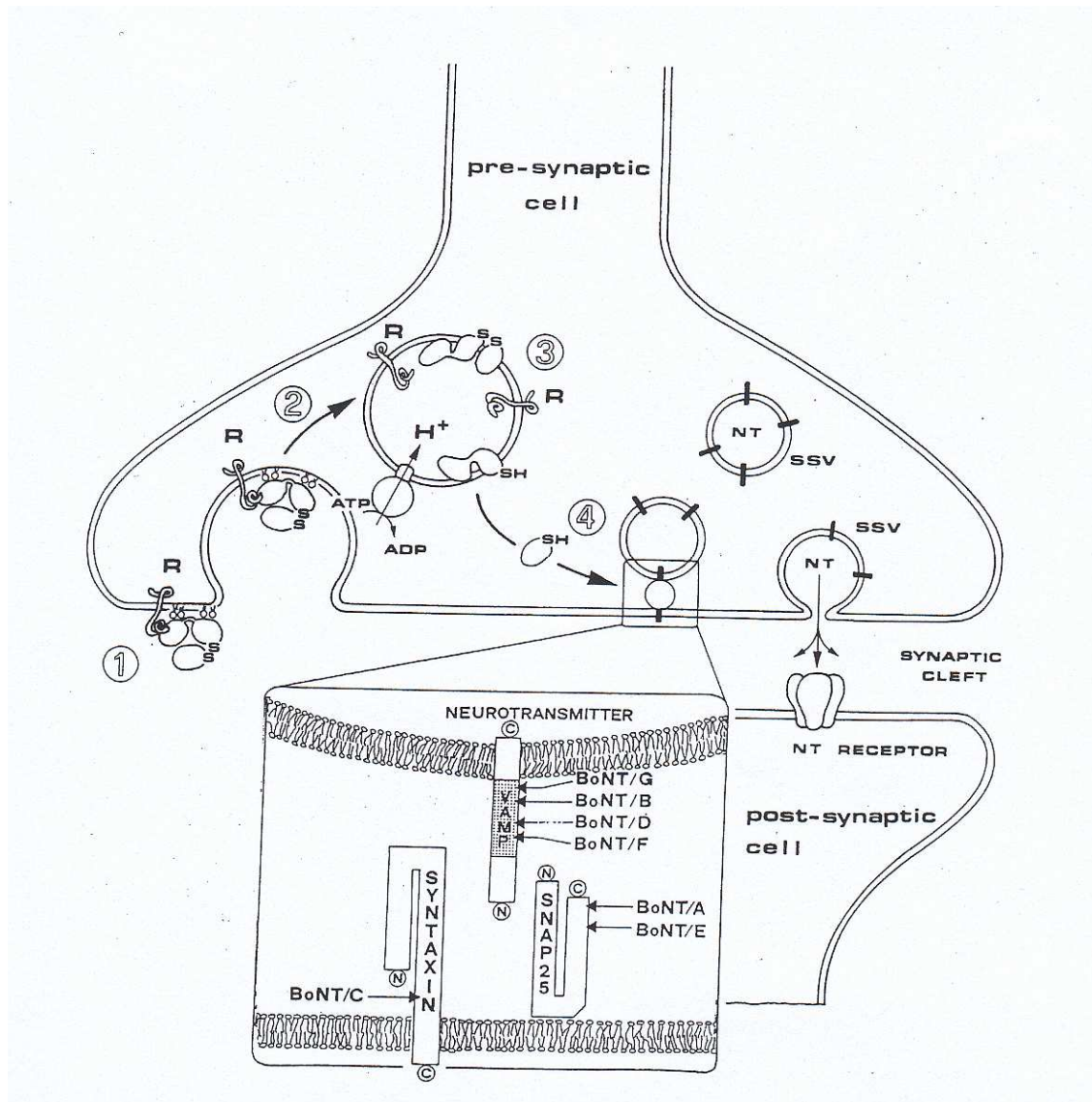


Abbildung A3: Entwicklungskaskade des klinischen Botulismus (BÖHNEL u. GESSLER 2004)



SSV Small Synaptic Vesicles
 NT NeuroTransmitter

Abbildung A4: Pathomechanismus der Wirkung von BoNT (FRANCIOSA et al. 2003)

- (1) Bindung des BoNT an spezifische Rezeptoren der präsynaptischen Membran**
- (2) Bildung eines Vesikels um den Toxin-Rezeptor-Komplex**
- (3) Spaltung der Disulfidbrücke und Transport der L-Kette in das Zytosol**
- (4) Aktivierung der Zink-Endopeptidase**

Tabelle A1: Geschichtlicher Überblick zur Entdeckung der Toxintypen (LOCH 2000)

Toxintyp	Ursprung	Herkunft	Jahr	Erstmalige Beschreibung
B	Roher Schinken	Belgien	1897	VAN ERMENGEN (1897)
A	Grüne Bohnen	Deutschland	1904	LANDMANN (1904)
C₁	Huhn	USA	1922	BENGSTON (1922)
C₂*	Rind	Australien	1922	SEDDON (1922)
D	Rind	Südafrika	1928	MEYER und GUNNISON (1928)
E	Hering	USA	1934	HAZEN (1942)
	Fisch	Ukraine	1934	GUNNISON et al. (1937)
F	Leberpastete	Dänemark	1960	MÖLLER und SCHEIBEL (1960)
G	Erde	Argentinien	1970	GIMENEZ und CICCARELLI (1970)

*kein Neurotoxin

Tabelle A2: Biochemische Eigenschaften von BoNT-produzierenden Spezies (BELL und KYRIAKIDES 2000)

Eigenschaften		<i>C. botulinum</i> -Gruppen				<i>C. baratii</i>	<i>C. butyricum</i>
		I	II	III	IV		
Toxintypen		A, B, F	B, E, F	C, D	G	F	E
Lecithinaseproduktion		-	-	+/-	-	+	-
Verflüssigung von Gelantine		+	+	+	+	-	-
Fermentation von	Glucose	+	+	+	-	+	+
	Fructose	+/-	+	+/-	-	+	+
	Mannose	-	+	+	-	+	+
	Maltose	+/-	+	+/-	-	+	+
	Sucrose	-	+	-	-	+	+
	Trehalose	-	+	-	-	-	+
	Xylose	-	-	-	-	-	+
Lipase		+	+	+	-	-	-
Metabolische Säuren	Acetat	+	+	+	+	+	+
	Propionat			+			
	Butyrat	+	+	+	+	+	+
	Isobutyrat	+			+		
	Isovaleriat	+			+		
	Phenylacetat				+		

Tabelle A3: Morphologische Eigenschaften von *C. botulinum* und verwandten Clostridienstämmen (modifiziert nach LOCH 2000)

Spezies	<i>C. botulinum</i>				<i>C. baratii</i>	<i>C. butyricum</i>
	I	II	III	IV		
Gruppe						
Gramfärbung	+	+	+	+	+	+
Beweglichkeit	+	+	+	+	-	+
Mikromorphologie	gerade/leicht gekrümmte Stäbchen	gerade Stäbchen	gerade Stäbchen	gerade Stäbchen	gerade Stäbchen	gerade Stäbchen
		einzelnen oder paarweise	einzelnen oder paarweise	einzelnen oder paarweise	einzelnen oder paarweise	einzelnen oder paarweise, kurze Ketten, selten Fäden
Breite in µm	0,6-1,4	0,8-1,6	0,5-2,4	1,3-1,9	0,5-1,9	0,5-1,7
Länge in µm	3,0-20,2	1,7-15,7	3,0-22,0	1,6-9,4	1,6-10,2	2,4-7,6
Sporenlage	subterminal	subterminal	subterminal	subterminal	subterminal bis terminal	Subterminal - mittelständig
	aufreibend	aufreibend	aufreibend	aufreibend	aufreibend	nicht aufreibend
Versporung		Leicht		sehr selten	selten	sehr leicht
Kolonie-durchmesser	2-6mm	1-5mm	1-5mm	1-4mm	0,5-2mm	1-6mm
Hämolyse	β	B	β	β	β (α/keine)	keine
Kolonieform	rund bis ausgefranst	unregelmäßig	rund bis leicht unregelmäßig	rund bis unregelmäßig	rund bis ausgefranst	rund bis unregelmäßig
	flach/erhaben	erhaben	flach/erhaben	erhaben	flach/leicht erhaben	erhaben
Koloniefarbe	durchsichtig/ semiopak	durchsichtig/ opak	durchsichtig	durchsichtig	durchsichtig/ opak	durchsichtig
	grau	grauweiß	grauweiß			
Besonderheiten		Schwärmer		raue Spiegeleikultur Schwärmer		

Tabelle A4: Metabole Gruppen der *C. botulinum*-Toxovare und anderer *Clostridium*-Spezies

Metabole Gruppe	Zugehöriges <i>C. botulinum</i> -Toxovar bzw. andere Spezies
I	Toxovar A, proteolytische Stämme der Toxovare B und F
	<i>C. sporogenes</i>
II	Toxovar E, saccharolytische Stämme der Toxovare B und F
III	Toxovare C und D
	<i>C. novyi A</i>
IV	Toxovar G
	<i>C. subterminale</i>

Tabelle A5: BoNT-Synthese durch *C. botulinum* (modifiziert nach BÖHNEL 1995)

<i>C. botulinum</i>	Neurotoxin-Typ						
	A	B	C	D	E	F	G
Typ A	+						
Typ A Subtyp AB	+	+					
Typ A Subtyp Ab	+	+					
Typ A Subtyp Af	+					+	
Typ B		+					
Typ B Subtyp Ba	+	+					
Typ B Subtyp Bf		+				+	
Typ C _α			+	+			
Typ C _β			+	+			
Typ D			+	+			
Typ E					+	+	
Typ F					+	+	
Typ G							+

+ in großen Mengen gebildet

+ in geringen Mengen gebildet

Tabelle A6: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Sporenbildung von *C. botulinum*-Typ E (PECK et al. 1995)

Inkubations- temperatur (°C)	Prozent an			Anzahl gebildeter Sporen
	vegetativen Zellen	sporulierenden Zellen	freien Sporen	
25	15	5	80	2,8x10 ¹⁰
30	40	0	60	2,2x10 ¹⁰
35	90	0	10	2,8x10 ⁹

XIII

Tabelle A7: Zusammenfassung von in der Literatur angegebenen letalen BoNT-Dosen für den Menschen

Letale Dosis	Literaturquelle
$6 \times 10^{-4/5}$ µg (Aerosolform)	BLATZ (1999)
0,000035 µg	MACHOLZ und LEWERENZ (1989)
0,003 µg (Typ A)	BACH und MÜLLER-PRASUHN (1971) sowie BEER (1987)
0,005 – 0,05µg/kg	CRAWFORD MECHEM und WALTER (1994)
0,05 – 0,1 µg	CHERINGTON (1998)
0,06 µg	SELBITZ (1992)
0,1 – 1 µg	LEVETZOW (1979); SINELL (1992); LOCH (2000); JOHNSON (2000); KÖHLER (2001)
1 µg (Typ A, B und E)	IWAND (1979)
<1 µg (Typ A und B) 10 µg (Typ E und F)	BELL und KYRIAKIDES (2000)

Tabelle A8: Letale Dosis des BoNT-Typ G in Abhängigkeit von Tierart und Art der Verabreichung (CICCARELLI et al. 1977)

Tierart	Applikation des BoNT	LD ₅₀ /kg
Affe	intragastral	33000
	intravenös	120
Huhn	oral	3125
	subkutan	1200 - 2600
Meerschwein	intragastral	10000 - 20000
	intraperitoneal	100

Tabelle A9: Lokalisation der genetischen Information zur Synthese von botulinogenen und ähnlichen Neurotoxinen (modifiziert nach POPOFF 1995)

Spezies	Toxin-Typ	Genlokalsation
<i>C. botulinum</i> -Typ A	BoNT Typ A	Chromosom
<i>C. botulinum</i> -Typ B	BoNT Typ B	Chromosom
<i>C. botulinum</i> -Typ C	BoNT Typ C ₁	Phage
<i>C. botulinum</i> -Typ D	BoNT Typ D	Phage
<i>C. botulinum</i> -Typ E	BoNT Typ E	Chromosom
<i>C. butyricum</i> -Typ E	BuNT Typ E	Chromosom
<i>C. botulinum</i> -Typ F	BoNT Typ F	Chromosom
<i>C. baratii</i> -Typ F	BaNT Typ F	?
<i>C. botulinum</i> -Typ G	BoNT Typ G	Plasmid

Tabelle A10: Auswirkung des Wachstums von S5 auf die Toxinbildung von *C. botulinum*-Typ E (modifiziert nach KAUTTER et al. 1966)

Sporeninokulum		MLD/ml der <i>C. botulinum</i> -Stämme				
Typ E	S5	Minnesota	D8	070	Beluga	Iwanai
100	-	>20,000	10,000	>20,000	2,000	2,000
1,000	-	>20,000	>20,000	>20,000	20,000	2,000
10,000	-	>20,000	>20,000	>20,000	20,000	2,000
100	10,000	<10	<10	<10	<10	<10
100	1,000	20	<10	<10	<10	<10
100	100	200	<10	200	20	<10
1,000	100	2,000	<10	>20,000	1,000	<10
10,000	100	>20,000	100	>20,000	1,000	20

Tabelle A11: Klinische Einteilung des Botulismus beim Menschen (modifiziert nach CHERINGTON 1998)

Klinische Form		Erste Beschreibung	
Klassischer Botulismus		1897	
Wundbotulismus	traumatisch oder chirurgisch bedingt	1943	
	Drogenkonsum bedingt	parenteral	1982
		intranasal	1985
Säuglingsbotulismus		1976	
Erwachsenenbotulismus		1977	
Iatrogen Botulismus		1997	

Tabelle A12: Vorkommen von Botulismus beim Menschen in den USA, 1978 – 1984 (SMITH und SUGIYAMA 1988)

US-Bundesstaat	Fälle			
	Lebensmittelbedingter Botulismus	Säuglingsbotulismus	Wundbotulismus	Quelle unbekannt
Alaska	23	1	0	0
Arizona	4	8	0	0
Arkansas	0	3	0	0
Californien	31	202	8	9
Colorado	15	5	0	0
Conneticut	0	1	0	1
Delaware	0	7	0	0
D. Columbia	0	1	0	0

Fortsetzung der Tabelle A12

Florida	0	1	0	1
Georgia	1	1	0	0
Hawaii	1	14	0	0
Idaho	1	3	0	0
Illinois	28	3	0	1
Indiana	0	1	0	0
Iowa	0	1	0	0
Kansas	0	3	0	1
Kentucky	6	5	0	0
Louisiana	1	3	0	0
Maryland	2	4	0	1
Massachusetts	1	2	0	1
Michigan	2	0	0	2
Montana	1	2	0	0
Nebraska	1	1	0	0
Nevada	0	2	0	0
New Jersey	0	5	0	0
New Mexico	34	9	0	0
New York	3	5	1	3
North Carolina	1	2	0	0
North Dakota	1	0	0	0
Ohio	1	6	0	0
Oklahoma	1	1	0	0
Oregon	6	7	0	1
Pennsylvania	2	58	1	0
Tennessee	0	5	0	1
Texas	4	11	2	4
Utah	3	26	0	0
Virginia	1	2	0	0
Washington	14	20	2	0
West Virginia	5	1	0	0
Wisconsin	5	1	0	0
Wyoming	1	1	0	0
Puerto Rico	3	0	0	0
Gesamt	199	434	14	26

Tabelle A13: Auswirkung der Ernährung von Säuglingen auf das Darmmilieu und die Darmflora (ARNON 1986)

Eigenschaften	Ernährung mit Muttermilch	Ernährung mit kommerziell hergestellter Nahrung
pH-Wert der Faeces	5,1 – 5,4	5,9 – 8,0
vorherrschende Bakterien	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp. Clostridien anaerobe Streptococcen

Tabelle A14: Auftreten der Toxovare bei verschiedenen Tierarten (modifiziert nach KOLB 2000a)

Toxovar	Bevorzugte Wirte
A	Mensch, Pferd, Rind, Küken
B	Mensch, Pferd, Rind, Schwein
C_α	Wassergeflügel, Küken, Puten, Pflanzenfresser, Hund, Fisch
C_β	Nerz, Schaf, Rind, Pferd
D	Rind, Schaf, Pferd
E	Mensch, Nerz, Fisch
F	Mensch
G	Unbekannt

Tabelle A15: Häufig auftretende Botulismussymptome (modifiziert nach MACDONALD et al. 1985)

Symptome	In % der Fälle (n=28)
Verschwommener Blick	90
Doppeltsehen	78
Schluckstörungen	78
Ptosis	75
Mundtrockenheit	70
Heiserkeit	60
Müdigkeit	60
Schwindelgefühl	60
Extraokuläre Muskellähmungen	40
Übelkeit / Brechreiz	37
Muskelschwäche	36
Gliedmaßenschwäche	36
Gesichtsmuskelschwäche	32

Tabelle A16: Geographische Verbreitung und Wirtsspektrum der Toxovaren von *C. botulinum* (SELBITZ 1992)

Toxovar	Verbreitung	Bevorzugte Wirte
A	USA, Ukraine	Mensch, Huhn, Nerz
B	USA, Nord- und Mitteleuropa	Mensch, Pferd, Rind, Huhn
C*	Europa, Nord- und Südamerika, Russland, Australien, Südafrika	Wasservogel, Rind, Nerz, Pferd
D	Südafrika, Australien (Europa, Russland, Amerika selten)	Rind
E	Nordeuropa, Russland, Kanada, Alaska, Japan	Mensch, Fische
F	Nordeuropa, Russland, USA	Mensch
G	Südamerika	Keine Erkrankungen

*Während *C. botulinum*-Typ C_α Botulismus bei Wildgeflügel verursacht, konnte *C. botulinum*-Typ C_β bei Botulismusfällen von Pferden, Rindern, Schafen und Nerzen nachgewiesen werden (MITSCHERLICH u. MARTH 1984).

Tabelle A17: Prozentualer Anteil an *C. botulinum*-Typ E-positiven Proben in europäischen Meerestieren verschiedener Herkunft (modifiziert nach HUSS und PEDERSEN 1979)

Proben	Ostsee	Dänische Fjorde & Meerenge	Kattegat	Skagerrak & Nordsee	Nordatlantik
Hering	4	-	2	0	1
Makrele, Lachs	20	-	57	0	0
Kabeljau, Aal, Scholle	39	43	23	8	0
Schalentiere	-	11	24	7	-
Gesamt	21,8	36,2	18,7	4,8	0,4

Tabelle A18: Nachweise von *C. botulinum* in Asien (DODDS 1993, zitiert bei POPOFF 1995)

Erd- & Sedimentproben aus	% pos. Proben	<i>C. botulinum</i> -Typ (%)				
		A	B	C/D	E	F
Ehemalige SU, Kaspisches Meer	15	8	18	2	72	0
China, Thailand, Bangladesh	69	16	14	61	8	1
Japan	Norden	12	0	0	99	1
	Süden	28	0	0	92	0

XVIII

Tabelle A19: Quantitative Nachweise von *C. botulinum*-Sporen in klinisch unauffälligen Haustierbeständen

Sporen/Gramm	Probenart	Literaturangabe
<4 (in 71% der Proben)	Kotproben schwedischer Schweine	DAHLENBORG et al. (2001)
<1,5 (Sommer) und >4 (Winter)	Kotproben schwedischer Rinder	DAHLENBORG et al. (2003)
>10000	Kotproben holländischer Rinder	NOTERMANS et al. (1978)

Tabelle A20: Botulismusausbrüche in Zusammenhang mit sauren Lebensmitteln in Amerika, 1899 - 1975 (modifiziert nach ODLAUG und PFLUG 1978)

Jahr	Staat	Lebensmittel	Toxintyp	Krankheitsfälle	pH-Werte
1910	Kalifornien	Birnen	n.v.	12	
1915	Kalifornien	Aprikosen	n.v.	5	
1915	Illinois	Tomatenketchup	n.v.	2	
1918	Kalifornien	Birnen	n.v.	1	
1918	Kalifornien	Aprikosen	A	8	
1918	Kalifornien	Aprikosen	n.v.	2	
1922	Kalifornien	Eingelegte Tomaten	A	2	
1924	Washington	Sauer Eingelegtes	A	2	
1927	Kalifornien	Birnen	A	2	3,86
1929	Colorado	Grüne Tomaten	n.v.	4	
1931	Oregon	Apfelsoße	n.v.	2	
1933	Kanada	Tomaten	n.v.	3	
1935	Kalifornien	Tomatensaft	n.v.	2	
1936	Kalifornien	Tomaten	A	1	
1938	Kalifornien	Grüne Tomaten & Paprika	n.v.	2	
1939	Kalifornien	Tomaten	n.v.	5	
1940	Kalifornien	Tomaten	A	5	
1940	Kalifornien	Aprikosen	A	3	
1940	Tennessee	Tomaten	B	2	4,0
1941	Nebraska	Tomaten	n.v.	3	
1942	Kalifornien	Sauer Eingelegtes	A	4	
1943	Kalifornien	Tomaten	n.v.	2	
1947	New Mexico	Pfirsiche	A	4	
1948	Kalifornien	Tomaten	n.v.	3	
1948	Kalifornien	Birnen	A	2	
1951	Kalifornien	Tomaten	n.v.	2	

Fortsetzung der Tabelle A20

1953	Kalifornien	Heidelbeersaft	A	1	
1954	Kalifornien	Pfirsiche	A	4	
1964	Kansas	Sauer Eingelegtes	A	7	
1965	Alabama	Tomatensaft	n.v.	1	
1969	Kentucky	Tomatensaft	B	1	
1973	Kentucky	Blaubeeren	B	2	
1974	Alabama	Tomaten	B	1	
1974	Idaho	Tomatensaft	A	1	4,2
1975	New Jersey	Apfeloße	B	1	

n.v. - nicht verfügbar

Tabelle A21: Botulismus auslösende Lebensmittelgruppen in den USA, 1899-1981 (modifiziert nach SCHAFFNER 1982)

Produkt	Anzahl der Ausbrüche	
	hausgemacht	industriell hergestellt
Gemüse	432	40
Fleisch	25	6
Fisch	25	8
Saure Lebensmittel	40	1
Gesamt	522	55

Tabelle A22: Botulismus auslösende Lebensmittelgruppen in Franken (BERNDT 1978)

Lebensmittel	Prozentualer Anteil
Roher, selbstgeräucherter Schinken	35,5
Kommerziell hergestellter roher Schinken	-
Wurst	22,6
Fleisch (incl. Rauchfleisch)	19,3
Fisch	3,2
Unbekannt	19,4

Tabelle A23: Botulismus auslösende Lebensmittelgruppen, weltweit (modifiziert nach SOFOS 1992)

Land	Produkte aus (%)				Verarbeitung (%)	
	Fleisch	Fisch	Pflanzen	Andere	privat	industriell
Alaska	45	55	0	0	100	0
Argentinien	3	10	73	13	77	23
Belgien	60	20	20	0	60	40
CSSR	72	7	14	7	100	0
China	10	0	86	4	-	-
Frankreich	86	5	7	2	88	12
Iran	3	97	0	0	-	-
Japan	0	99	1	0	98	2
Kanada	70	22	8	0	97	3
Polen	87	11	2	0	68	32
Spanien	42	0	58	0	92	8
Schweden	17	83	0	0	83	17
Ungarn	67	0	3	29	100	0
Ehem. SU	17	67	16	0	97	3
USA	14	17	60	9	90	10

Tabelle A24: Beeinflussung des Nachweises von *C. botulinum*-Typ B in Schweinekotproben durch Jahreszeit und Haltungssystem (modifiziert nach DAHLENBORG ET AL. 2001)

Einflussfaktoren		positive Proben / untersuchte Proben	% positive Proben
Jahreszeit	Sommer	21/45	47
	Winter	27/33	82
Haltungsbedingungen	Freiland	12/36	33
	Stall	36/42	86

Tabelle A25: Vorkommen von *C. botulinum*-Typ E in rohen Fischen aus Deutschland (modifiziert nach HYYTIÄ-TREES et al. 1999)

Probenart		% positive Proben	durchschnittliche Sporenanzahl/g
Regenbogenforelle	Eingeweide	4	115
	Oberfläche	0	0
Döbel	Eingeweide	50	345
	Oberfläche	94	300
Maräne	Eingeweide	0	0
	Oberfläche	0	0
Lachsforelle	Eingeweide	0	0
	Oberfläche	80	165
Brasse	Eingeweide	75	45
	Oberfläche	100	435
Bachforelle	Eingeweide	0	0
	Oberfläche	33	45
Saibling	Eingeweide	0	0
	Oberfläche	50	100

Tabelle A26: Auftreten von Botulismus in Kanada, 1975 - 1984 (modifiziert nach TODD 1992)

Jahr	Ausbrüche	Einzelkrankungen
1975	6	13
1976	4	15
1977	5	8
1978	6	11
1979	-	-
1980	3	5
1981	3	4
1982	3	6
1983	7	11
1984	10	17

Tabelle A27: Auftreten von Botulismus in den USA, 1988-1992 (BEAN et al. 1997)

Jahr	Ausbrüche		Einzelfälle		Todesfälle	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
1988	20	4,4	49	0,3	1	5,3
1989	13	2,6	24	0,2	2	11,8
1990	12	2,3	22	0,1	5	33,3
1991	11	2,1	25	0,2	2	20,0
1992	4	1,0	13	0,1	1	12,5

Tabelle A28: Beispielhafte Umweltbedingungen, die das Wachstum von *C. botulinum* hemmen (modifiziert nach ROBERTS et al. 1996)

Faktoren	<i>C. botulinum</i> -Gruppe			
	I	II	III	IV
mind. Temperatur (°C)	10-12	3,3	15	12
Hemmung durch % NaCl	10	5	3	>3

Tabelle A29: Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Toxinbildung von *C. botulinum*-Typ B (modifiziert nach SPERBER 1982)

Temperatur	Tage bis BoNT-Nachweis positiv
5,6	27
4,4	33
3,3	129

Tabelle A30: Hemmung von *C. botulinum*-Typ E durch NaCl sowie einer Kombination von NaCl und NO₂ (modifiziert nach SCOTT 1989)

Fischart	hemmende Konzentrationen	
	NaCl %	NaCl% (+NO ₂ (100ppm))
Lachs	3,8	2,5
Maräne	3,9	3,2
Karpfen	4,2	3,7

XXIII

Tabelle A31: Wachstum von *C. botulinum*-Typ E in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und a_w -Wert (OHYE und CHRISTIAN 1967, zitiert bei SELL 1985)

Temp. (°C)	10			20			30			40		
pH-Wert	6	7	8	6	7	8	6	7	8	6	7	8
a_w -Wert	Inkubationszeit bis zur Feststellung von Wachstum (in Tagen)											
0,997	9	7	8	2	1	1	1	1	1	3	1	1
0,99	14	9	-	2	2	2	1	1	1	1	1	17
0,98	-	-	-	7	2	2	2	1	1	-	1	1
0,97	-	-	-	-	7	-	-	2	2	-	-	7
0,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A32: Mindest- a_w -Werte für das Wachstum von *C. botulinum*-Typ B in Abhängigkeit vom pH-Wert (BAIRD-PARKER und FREAME 1967)

pH-Wert	a_w -Werte					
	0,997	0,99	0,98	0,97	0,96	0,95
7,0	+	+	+	+	+	-
6,0	+	+	+	+	-	-
5,5	+	+	+	+	-	-
5,3	+	+	+	-	-	-
5,0	+	-	-	-	-	-

Tabelle A33: BoNT-Synthese in gekochten, pürierten und vakuumverpackten Kartoffeln bei einer Inkubationstemperatur von 25°C (modifiziert nach DODDS 1989)

a_w -Wert	pH-Wert	Tage bis zum positiven Toxinnachweis
0,980	6,10	7
0,981	5,45	7
0,977	4,83	35
0,972	6,04	7
0,973	5,50	14
0,969	4,96	>35
0,959	5,74	35
0,960	5,46	>35
0,964	4,95	>35

Tabelle A34: Toxinbildung eines proteolytischen *C. botulinum*-Typ B-Stammes in Grassilage (modifiziert nach NOTERMANS et al. 1979)

pH-Wert	a _w -Wert	Toxingehalt (LD ₅₀ /ml) nach Inkubation (37°C, 7d)
6,5	0,995	1,5 x 10 ⁵
	0,968	1,5 x 10 ⁵
	0,962	1,5 x 10 ⁵
	0,957	10 ² - 10 ^{3*}
	0,943	<10 *
	0,940	TN neg.
5,8	0,993	8,7 x 10 ⁴
	0,963	7,5 x 10 ⁵
	0,955	4,3 x 10 ⁵
	0,951	10 ² - 10 ^{3*}
	0,944	<10 *
	0,935	TN neg.
5,3	0,995	4,0 x 10 ⁴
	0,985	10 ² - 10 ^{3*}
	0,975	TN neg.

TN neg. - Toxinnachweis negativ

* Nach 14 Tagen Inkubation

Tabelle A35: Teilungsraten verschiedener *C. botulinum*-Typen pro Stunde in Abhängigkeit von der Temperatur (modifiziert nach OHYE und SCOTT 1953,1957)

Temperatur (°C)	<i>C. botulinum</i>		
	Typ A	Typ B	Typ E
5,0			0,0234
10,0			0,139
12,5	0,0119	0,0107	
15,0	0,0359	0,0346	0,326
17,5	0,131	0,128	
20,0	0,260	0,259	0,539
25,0	0,535	0,533	1,006
30,0	0,917	0,990	1,492
35,0			1,777
37,0	1,485	1,576	
42,5	1,305	1,076	
45,0	0,533	0,477	

Tabelle A36: Hitzeresistenz der *C. botulinum*-Sporen (modifiziert nach HATHEWAY 1995)

<i>C. botulinum</i> -Gruppe			
I	II	III	IV
112°C	80°C	104°C	104°C

Tabelle A37: Einfluss des Nährmediums auf das Wachstum von *C. botulinum*-Typ E (SPERBER 1982)

Temperatur °C	Wachstum und Toxinbildung in	
	Nährboullion	Krabbenfleisch
4	+	-
8	+	-
12	+	+

Tabelle A38: Toxinsynthese durch *C. botulinum*-Typ B (nicht-proteolytisch) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur (modifiziert nach EKLUND et al. 1967a)

Temperatur (°C)	Zeitspanne bis zum Toxinnachweis (d)
5,6	18
4,4	27
3,3	85

Tabelle A39: Inaktivierung von *C. botulinum*-Typ C-Toxin bei verschiedenen Temperaturen (HUBÁLEK und HALOUZKA 1988)

Temperatur (°C)	Benötigte Zeit für eine Inaktivierung von	
	90%	99%
-70	> 5 Jahre	> 5 Jahre
-20	4 Jahre	> 5 Jahre
+5	30 Tage	6 Monate
+20	3 Tage	21 Tage
+28	2 Tage	14 Tage
+37	1 Tag	2 Tage
+42	5 Stunden	9 Stunden
+56	< 30 Minuten	< 30 Minuten
+60	< 20 Minuten	< 20 Minuten
+80	< 5 Minuten	< 5 Minuten

Tabelle A40: Wirkung ionisierender Strahlen auf Lebensmittel mit Anwendungsbeispielen (MÜLLER 1989)

Dosis (kGy)	Wirkung
0,05 – 0,15	Verhinderung des Auskeimens, Reifeunterbrechung (z.B. bei Kartoffeln & Zwiebeln, Tomaten & Bananen)
0,1 – 1,0	Vernichtung tierischer Schädlinge (Getreide, Mehl)
0,5 – 10,0	Radurisation (Erdbeeren, Mango, Fisch, Hähnchen, Schinkenspeck)
1 - 50	Radicitation, Radappertisation (Gewürze, Trockensuppen)
1000	Enzyminaktivierung

Tabelle A41: Zerstörung von *C. botulinum*-Sporen infolge Bestrahlung (modifiziert nach ROBERTS et al. 1996)

Typ	Bestrahlungstemperatur (°C)	D-Wert (kGy)	Medium
A	18-23	1,2-1,4	Wasser
	24	3,2-3,6	Rindfleisch
B (prot.)	18-23	1,1	Wasser
	22	2,4	Rindfleischartopf
C	18-23	1,4	Wasser
D	18-23	2,2	Wasser
E	18-23	0,8-1,6	Wasser
	1,7	0,8-2,2	Schellfisch
F	18-23	2,5	Wasser

Tabelle A42: Beeinflussung des D-Wertes durch die Bestrahlungstemperatur (modifiziert nach GRECZ et al. 1971)

Bestrahlungstemperatur (°C)	D-Wert des Typ A (Mrad)	D-Wert des Typ B (Mrad)
-175	0,556	0,571
-150	0,532	0,543
-125	0,507	0,515
-100	0,483	0,486
-75	0,458	0,460
-50	0,434	0,430
-25	0,409	0,401
0	0,385	0,373
25	0,360	0,345
45	0,341	0,322
65	0,321	0,299
85	0,275	0,221

Tabelle A43: In Ländern der EU zur γ -Bestrahlung zugelassene Lebensmittel (ANONYM 2006)

Produkte	Land und Maximaldosis (kGy)				
	B	F	I	NL	UK
Tiefgefrorene Gewürzkräuter		10			
Kartoffeln	0,15		0,15		0,2
Süßkartoffeln					0,2
Zwiebeln	0,15	0,075	0,15		0,2
Knoblauch	0,15	0,075	0,15		0,2
Schalotten	0,15	0,075			0,2
Gemüse, einschließlich Hülsenfrüchte					1
Hülsenfrüchte				1	
Obst (einschließlich Pilze, Tomaten, Rhabarber)					2
Getrocknete Gemüse und Früchte		1		1	
Getreide					1
Getreideflocken und -keime für Milchprodukte		10			
Getreideflocken				1	
Reismehl		4			
Gummiarabikum		3		3	
Hühnerfleisch				7	
Geflügel		5			
Geflügel (Hausgeflügel, Gänse, Enten, Perlhühner, Tauben, Wachteln und Truthähne)					7
Mechanisch gewonnenes Hühnerfleisch		5			
Innereien von Hühnern		5			
Tiefgefrorene Froschschenkel	5	5		5	
Dehydriertes Blut, Plasma, Koagulate		10			
Fische und Muscheln (einschl. Aale, Krustentiere und Weichtiere)					3
Tiefgefrorene geschälte Garnelen	5	5			
Garnelen				3	
Eiklar			3	3	
Kasein, Kaseinate		6			

XXVIII

Tabelle A44: Beeinflussung des D- und z-Wertes von *C. botulinum*-Typ A-Sporen durch den a_w -Wert (modifiziert nach ALDERTON et al. 1980)

a_w -Wert	D-Wert (min) bei festgesetzter Temperatur								z-Wert
	°C	D	°C	D	°C	D	°C	D	°C
0,0	93	19,8	96	10,8	99	7,0	103	4,8	16,4
0,1	115	34,8	117	24,1	120	15,9	123	9,6	14,6
0,2	125	33,3	130	21,4	133	12,2	135	10,6	19,2
0,3	125	45,5	130	28,3	135	13,4	138	6,5	15,7
0,4	125	30,5	127	29,9	130	18,8	135	6,3	14,7
0,5	115	45,1	117	42,9	120	15,8	125	5,5	10,2
0,6	107	38,6	110	17,4	113	11,1	116	7,3	12,7
0,7	101	50,7	104	29,8	107	16,5	110	11,4	13,6
0,8	95	60,5	98	24,1	101	19,8	104	6,4	9,9
0,9	94	48,2	97	26,9	100	10,3	103	5,7	9,4

Tabelle A45: Mindest- a_w -Werte für die Vermehrung in Abhängigkeit von *C. botulinum*-Typ und verwendeter wasserbindender Substanz (DEL TORRE et al. 1998; RAY 2001)

<i>C. botulinum</i>	Wasserbindende Substanzen	
	NaCl	Glycerol
Proteolytische Typen	0,94	0,93
Nicht-proteolytische Typen	0,97	0,94

Tabelle A46: Beeinflussung der BoNT-Synthese durch Verwendung verschiedener Salze zur Regulierung des a_w -Wertes (BARBUT et al. 1986)

a_w -Wert	positiver BoNT-Nachweis (27°C, nach d)	Verwendetes Salz
0,947	30	NaCl
0,950	6	KCl
0,956	12	NaCl
0,956	8	KCl
0,967	4	NaCl + KCl
0,973	4	NaCl
0,976	3	MgCl ₂
0,984	3	NaCl + MgCl ₂

Tabelle A47: Repräsentative a_w -Werte in einigen Lebens-/Futtermitteln (modifiziert nach KRIST et al. 2000)

Lebensmittel	durchschnittlicher a_w -Wert
Milch, Obst & Gemüse	0,995-0,998
Frisches Fleisch, Fisch	0,990-0,995
Gekochtes Fleisch, kalt geräucherter Lachs	0,965-0,980
Leberwurst	0,96
Streichkäse	0,95
Kaviar	0,92
Brot	0,90-0,95
Salami (getrocknet)	0,85-0,90
Feuchtfutter (Tiere)	0,83
Früchtekuchen	0,80
Gesalzener Fisch, Honig	0,75
Getrocknete Früchte	0,60-0,75
Süßwaren, Erdnussbutter	0,70-0,80
Eis bei -40°C	0,68
Gewürze, Milchpulver	0,20-0,60
Gefriergetrocknete Lebensmittel	0,10-0,25

Tabelle A48: Einfluss eines reduzierten pH-Wertes auf die BoNT-Synthese (modifiziert nach SIMPSON et al. 1995)

pH-Wert	Tage bis zum Toxinnachweis
4,4	>42
5,0	>42
5,25	35
5,5	21
5,75	21
6,0	14

Tabelle A49: Wachstum und Toxinproduktion durch *C. botulinum* in Soja-angereicherten Medien* bei 30°C (modifiziert nach SMELT et al. 1982)

Anfangs-pH-Wert	erster Toxin-nachweis (Wochen)	pH-Wert bei pos. Toxin-nachweis	10-fache Zellzahl (Wochen)	pH-Wert bei 10-facher Zellzahl	Max. pH-Wert insgesamt
4,2	4	4,2	6	4,3	4,3
4,3	2	4,4	2	4,4	4,4
4,4	4	4,5	4	4,5	4,5

*Pasteurisation bei 100°C für 5min

Tabelle A50: Nachgewiesene pH-Werte in frischen Pastaprodukten (DEL TORRE et al. 1998)

Art der Pastafüllung	Artischocke	Fleisch	Spinat	Lachs
pH-Wert	5,61	6,19	5,94	6,09

Tabelle A51: Toxinnachweise in Lebensmitteln mit variierendem Säuregrad (modifiziert nach THOMPSON und TANNER 1925)

Lebensmittel	pH-Wert	Durchschnittliche Inkubationszeit	Anzahl verdorbener Proben/Gesamtzahl	Anzahl toxischer Proben/Gesamtzahl
Kartoffeln	4,6	12 Tage	4/4	4/4
Erbsen	5,2	3 Tage	4/4	4/4
rote Bohnen	5,2	4,5 Tage	4/4	4/4

Tabelle A52: Verlust der Toxizität in Abhängigkeit vom pH-Wert (modifiziert nach MAIER 1954)

BoNT	Mainwasserverdünnung	0,85%ige NaCl-Lösung
Typ A	pH = 6,5; Toxin nach 19 Tagen unwirksam	pH = 5,9; Toxin nach 25 Tagen unwirksam
Typ B	pH = 7,0; Toxin nach 16 Tagen unwirksam	pH = 6,2; Toxin nach 23 Tagen unwirksam

Tabelle A53: Auswirkung der Trypsinkonzentration und des pH-Wertes auf die Aktivierung von *C. botulinum* 89G-Toxin (BRIOZZO et al. 1986)

pH-Wert	BoNT-Aktivierung* bei Trypsinkonzentration (%)		
	1,0	0,1	0,05
7,0	2,000	20,000	10,000
6,5	10,000	20,000	20,000
6,0	2,000	20,000	10,000
5,5	1,000	2,000	2,000

*MLD/ml

Tabelle A54: pH-Werte ausgewählter Lebensmittel (modifiziert nach ROMPF und JAHN 2000)

pH-Wert-Bereich	Lebensmittel	pH-Wert
alkalisch (>7,0)	Eiweiß	bis 9,6
neutral (7,0–6,5)	Frisches Fleisch	7,2
	Milch	7,0-6,8
	Austern	6,7-6,3
	Geflügelfleisch	6,7-6,3
geringgradig sauer (6,5-5,3)	Fisch	6,6-5,7
	Kochschinken	6,4-6,0
	Geräucherter Schinken	5,8-5,3
	Weißbrot	6,0-5,0
mittelgradig sauer (5,3-4,5)	Geräucherte Wurst	5,2-4,9
sauer (4,5-3,7)	Tomaten	4,4-4,0
	Joghurt	4,2-3,8
	Obst	4,5-3,0
hochgradig sauer (<3,7)	Sauerkraut	3,7-3,1
	Zitronen	2,4-2,2

Tabelle A55: Einfluss des Sauerstoffpartialdruckes auf den E_h -Wert und die Mindestanzahl der zu inokulierenden Sporen, um Wachstum von *C. botulinum* nachzuweisen (modifiziert nach LUND et al. 1984)

pO_2 (Atm x 10^{-2})	E_h (mV)	Log der Sporenanzahl, die für einen positiven Wachstumsnachweis nötig sind, nach			
		2d	3d	5d	14d
1,67	+294	>5,41	>5,41	>5,41	>5,41
1,30	+280	>5,41	5,36	5,01	4,69
1,12	+271	>5,41	5,36	5,36	5,05
0,79	+250	>5,41	4,77	4,10	3,87
0,72	+245	2,63	2,22	1,14	0,97
0,39	+208	4,33	0,63	0,63	0,63
0,21	+170	0,55	0,55	0,55	0,55
0	ca. -400	0	0	0	0

Tabelle A56: Wachstum von *C. botulinum*-Typ E in Abhängigkeit von reduzierenden Agenzien (modifiziert nach SMITH und PIERSON 1979)

Wirkstoff	Konzentration(%)	Wachstum* nach		
		6 Stunden	10 Stunden	16 Stunden
Natriumaldehyd-sulfoxylat	0,01	0,33	0,65	0,84
	0,03	0,36	0,68	0,87
	0,05	0,26	0,57	0,80
2-Mercaptoethanol	0,01	0,33	0,62	0,83
	0,05	0,28	0,50	0,75
	0,15	0,12	0,37	0,59
Cysteinhydrochlorid	0,05	0,33	0,65	0,82
	0,075	0,28	0,53	0,76
	0,10	0,22	0,43	0,72
Natriumthioglucolat	0,01	0,26	0,55	0,74
	0,05	0,19	0,44	0,63
	0,10	0,05	0,26	0,49
Ascorbinsäure	0,01	0,29	0,58	0,79
	0,05	0,26	0,51	0,75
	0,10	0,21	0,42	0,63

* Wert gibt die optimale Dichte bei einer Inkubationstemperatur von 30°C an

Tabelle A57: E_h-Werte einiger Lebensmittelgruppen (modifiziert nach KRÄMER 2002)

E _h -Wert-Bereiche		Lebensmittel
Obst- und Gemüsesäfte		+300 bis +400mV
Fleisch	nach der Schlachtung	+250mV
	während der Schlachtung	Abfall bis auf -200mV
Käse		-20 bis -200mV
Dosenkonserven		-20 bis -150mV

Tabelle A58: Zusammenhang zwischen der Qualität einer Pökellake und deren Redoxpotenzial (LEISTNER und MIRNA 1959)

Bereich des E _n -Wertes (mV)	Spritzlaken	Aufgusslaken					
		frisch	wenig genutzt	typisch	instabil	sauer	faulig
+600 bis +451	83%	100%	14%				
+450 bis +351	17%		70%	14%			
+350 bis +201			16%	83%	15%	23%	
+200 bis -149				3%	85%	77%	3%
-150 bis - 400							97%

Tabelle A59: BoNT-Bildung in „sous-vide“ Lebensmitteln unter Kühlbedingungen (modifiziert nach BETTS und GAZE 1995)

<i>C. botulinum</i>	Lebensmittel	Temperatur (°C)	Zeit bis zum Toxinnachweis (d)
Typ B	Hühnerfleisch	8	42
	Dorsch	5	70
Typ E	Hühnerfleisch	8	28
	Dorsch	5	42

Tabelle A60: Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die BoNT-Synthese in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (modifiziert nach LAMBERT et al. 1991a)

Lagerungstemperatur (°C)	O ₂ -konzentration (%)	Positiver Toxinnachweis nach Tagen
25	20	2
	0	2
15	20	14
	0	21
5	20	>44
	0	>44

Tabelle A61: Einfluss der Gasatmosphäre auf die Toxinbildung von *C. botulinum* in inokuliertem frischem Schweinefleisch bei 15°C (modifiziert nach LAMBERT et al. 1991b)

Atmosphäre			Positiver Toxinnachweis nach Tagen				
O ₂	CO ₂	N ₂	19	21	28	35	42
20	0	80	2/3	2/3	3/3	2/3	3/3
20	20	60	0/3	1/3	1/3	3/3	-
0	20	80	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3
0	0	100	0/3	0/3	2/3	2/3	2/3
0	0	100	0/3	0/3	3/3	-	-

Tabelle A62: Zusammenhang von CO₂-Gehalt und Inokulumgröße bezüglich der BoNT-Synthese in Lachsfilet, gelagert bei 10°C (modifiziert nach EKLUND 1982)

Atmosphäre	Verderbnis- erscheinungen	Anzahl der toxischen Proben/Gesamtprobenzahl		
		10 ² /100g	10 ³ /100g	10 ⁴ /100g
Luft	+	1/3	3/3	3/3
60% CO ₂	-	0/3	3/3	3/3
90% CO ₂	-	0/3	0/3	3/3

+ verdorben / - genießbar

Tabelle A63: Zusammenwirken von pH-Wert, Salzgehalt und Sauerstoffkonzentration auf die Toxinbildung von *C. botulinum* bei 20°C (WHITING und NAFTULIN 1992)

pH-Wert	% NaCl	% Sauerstoff oberhalb des Mediums				
		0,0	1,6	3,5	10,0	15,0
7,0	0,0	2*	2	3	3	3
7,0	4,0	7	TN neg.	TN neg.		
6,5	1,0	3	2	3	7	TN neg.
6,5	3,0	6	TN neg.	TN neg.		
6,0	0,0	4	2	3	3	7
6,0	2,0	3	3	8	7	TN neg.
6,0	4,0	TN neg.	TN neg.	TN neg.		
5,5	1,0	5	3	6	7	TN neg.
5,5	3,0	5	TN neg.	TN neg.		
5,0	0,0	7	TN neg.	TN neg.	TN neg.	TN neg.

TN neg. - Toxinnachweis negativ

* Tag des ersten Toxinnachweises

Tabelle A64: Beeinflussung der die BoNT-Synthese hemmenden Nitritkonzentration durch die Temperatur (BELL und KYRIAKIDES 2000)

Lebensmittel	<i>C. botulinum</i> -Typ	NaCl (%)	NaNO ₂ (ppm bzw. mg/kg)	Lagerungstemperatur (°C)	BoNT-Nachweis (d)
Geschnittener, vakuumverpackter Kochschinken	A und prot. B	3,1	88	15	>30
				25	2-5
		4,1	0	20	15
					25
					>25
					30
			50	25	3
					4
					5
					8
			100	30	2
					3
					3
					8
			200	20	30
					20
10					
10					
In Aspik eingelegte vakuumverpackte Schweinezunge	A und prot. B	4,3	75	20	30
					150
			75	25	10
					150
			75	30	6
					150

Tabelle A65: Medium- und *C. botulinum*-Stamm-abhängige Salzkonzentrationen, die das Wachstum bzw. die Toxinbildung hemmen (modifiziert nach TANNER und EVANS 1933)

<i>C. botulinum</i>	glucosehaltiges Medium		schweinefleischhaltiges Medium	
	Hemmung des Wachstums (%NaCl)	Hemmung der Toxinbildung (% NaCl)	Hemmung des Wachstums (%NaCl)	Hemmung der Toxinbildung (%NaCl)
Typ A	8,887	7,350	10,345	10,446
Typ A	10,553	8,887	10,345	10,446
Typ B	7,350	7,350	8,619	10,446
Typ B	7,350	8,887	10,345	10,345
Typ B	6,055	7,350	10,345	10,446
Typ B	4,913	3,644	10,345	10,446
Typ B	6,055	6,055	-	-

Tabelle A66: BoNT-Nachweis in inokuliertem, unbehandeltem Geflügelfleisch, dem verschiedene Konzentrationen an Salzen organischer Säuren zugesetzt wurden (MILLER et al. 1993)

Probe	Anzahl der Inkubationstage (bei 28°C)											
	0	2	3	4	5	6	7	8	9	11	14	18
Kontrolle	-	4/6	6/6	6/6								
Propionat	2%	-	-	-	-	1/6	5/6					
	6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zitrat	2%	-	1/6	3/6								
	6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/6
Acetat	2%	-	-	-	-	6/6	6/6					
	6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactat	2%	-	-	-	5/6	6/6						
	6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvat	2%	-	2/6	5/6								
	6%	-	-	-	-	-	-	2/6	5/6			

Tabelle A67: Hemmung der BoNT-Synthese durch verschiedene Säuren mit zwei Carboxylgruppen (MILLER und CALL 1994)

2%ige Säure (M)	positive Proben/Gesamtprobenanzahl (Inkubation bei 28°C)						
	0d	2d	5d	10d	15d	20d	25d
Kontrolle	0/6	5/6	6/6				
Asparaginsäure (0,13)	0/6	0/6	6/6	3/3			
Fumarsäure (0,15)	0/6	0/6	6/6	3/3			
Maleinsäure (0,15)	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Apfelsäure (0,13)	0/6	0/6	6/6	3/3			
Bernsteinsäure (0,15)	0/6	0/6	6/6	3/3			

Tabelle A68: Inaktivierung von BoNT-Typ A nach Zugabe von Chelatbildnern bei 37°C für 30 Minuten (modifiziert nach BHATTACHARYYA und SUGIYAMA 1989)

Chelatbildner		LD ₅₀ /ml Toxin in		% Inaktivierung
		Kontrollprobe	Versuchsprobe	
1,10-Phenantholin	10 mM	4,7 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	70
	20 mM	4,7 x 10 ⁶	<1,0 x 10 ³	>99
2,2-Bipyridin	10 mM	7,6 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	60
	20 mM	7,6 x 10 ⁶	<1,0 x 10 ³	>99,9
Naphthylazoxine	40 mM	1,1 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁵	63
	70 mM	1,1 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁴	96
EDTA	100 mM	2,8 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	0
	200 mM	2,8 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	0

Tabelle A69: Inaktivierung verschiedener BoNT-Typen durch Inkubation in 40 mM 1,10-Phenantholin bei 37°C für 30 Minuten (modifiziert nach BHATTACHARYYA und SUGIYAMA 1989)

BoNT-Typ	LD ₅₀ /ml Toxin in		% Inaktivierung
	Kontrollprobe	Versuchsprobe	
A	2,0 x 10 ⁵	2,0 x 10 ²	99,9
B	1,2 x 10 ⁵	<3,0 x 10 ²	>99,0
E	1,0 x 10 ⁴	0	100

Tabelle A70: Beziehung zwischen Inokulumgröße und Nachweis lebensfähiger Sporen (CHRISTIANSEN et al. 1968)

Inokulumgröße / Fisch	Fisch mit überlebenden Sporen / untersuchte Fische
10 ⁰	1/8
10 ¹	2/9
10 ²	3/9
10 ³	6/9
10 ⁴	9/9
10 ⁵	9/9

XXXVIII

Tabelle A71: Toxinproduktion von *C. botulinum*-Typ A in Abhängigkeit von der inokulierten Sporenmenge (modifiziert nach SOLOMON und KAUTTER 1988)

Sporen/g	5 Tage (log ₁₀ MLD Toxin/ml)	10 Tage (log ₁₀ MLD Toxin/ml)	15 Tage (log ₁₀ MLD Toxin/ml)
1	-	-	4
2	-	3	3
5	3	3	
45	4	4	

Tabelle A72: Vergleich der Hemmzonen in Abhängigkeit von *C. botulinum*-Stamm und verwendetem Nisin-/Pediocinproduzierenden Mikroorganismus (modifiziert nach MONTVILLE et al. 1992)

<i>C. botulinum</i> -Stamm	Hemmzone (mm) produziert durch				
	<i>L. lactis</i> 11454	<i>P. pentosaceus</i> 43200	<i>P. pentosaceus</i> 43201	<i>L. plantarum</i> BN	Nisaplin
169	7,24	5,65	5,23	2,88	6,06
25765	3,27	5,29	5,33	3,02	5,68
56A	3,08	5,55	5,84	3,00	4,51

Tabelle A73: Hemmung der BoNT-Synthese ($1,6 \times 10^3$ *C. botulinum*-Typ F-Zellen/ml) durch *Bacillus licheniformis* (WENTZ et al. 1967)

<i>B. licheniformis</i> (Zellen/ml)	Verstorbene Mäuse/gesamte Mäuse
$7,3 \times 10^6$	0/3
$7,3 \times 10^5$	0/3
$7,3 \times 10^3$	4/6
$7,3 \times 10^1$	3/6
0	6/6

Tabelle A74: Verstärkung der die BoNT-Synthese hemmenden Wirkung von *Lactobacillus plantarum* durch die Zugabe fermentierender Kohlenhydrate (modifiziert nach TANAKA et al. 1980)

NaNO ₂ (ppm)	Saccharosezusatz ¹	Zugabe von Lactobazillen	Toxische Proben / Gesamtprobenzahl
0	-	+	26/27
0	+	-	50/52
0	+	+	1/49
40	-	-	47/50
40	+	+	0/30
120	-	-	17/28
120	-	+	34/68
120	+	-	4/149
120	+	+	1/192

¹ – Saccharosekonzentration mindestens 0,5%

Tabelle A75: LD₅₀ von Maus, Fasan und Ente pro ml BoNT-Typ C (BOROFF und REILLY 1959)

Tierart	Intramuskuläre Gabe	Orale Gabe
Maus	500,000	100
Fasan	10,000	1,000
Ente	1,000	100

Tabelle A76: Bewertung des BoNT-Typ A sensitiven ELISA im Vergleich zum Mäuseletalitätstest (modifiziert nach GIBSON et al. 1987)

<i>C. botulinum</i>	Untersuchte Stämme	Mäuseletalitätstest ¹	ELISA	
			positiv	negativ
Typ A	15	15	14	1 ²
Typ B	10	10	0	10
Typ C	1	1	0	1
Typ D	1	1	0	1
Typ E	10	10	0	10
Typ F	2	2	0	2
freie Kulturen	1	0	0	1

¹ Anzahl der flüssigen Kulturüberstände, die laut Mäuseletalitätstest spezifische Toxintypen enthalten

² dieser Stamm enthielt >500 LD₅₀/ml Type A Toxin

12 LITERATURVERZEICHNIS DES ANHANGS

- Alderton G, Chen JK, Ito KA. Heat Resistance of the Chemical Resistance Forms of *Clostridium botulinum* 62A Spores over the Water Activity Range 0 to 0,9. A E M. 1980;40:511-5.
- Anon. Bestrahlung von Lebensmitteln in Europa. [citet: 22.02.2006]. Available from: www.umweltinstitut.org/frameset.htm.
- Arnon SS. Infant Botulism: Anticipating the Second Decade. J infect Dis. 1986;154:201-6.
- Bach R, Müller-Prasuhn G. Teichforellen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus 1. Mitteilung. Arch Leb Mitt Hyg. 1971;22:64-8.
- Baird-Parker AC, Freame B. Combined Effect of Water Activity, pH and Temperature on the Growth of *Clostridium botulinum* from Spore and Vegetative Cell Inocula. J appl Bact. 1967;30:420-9.
- Barbut S, Tanaka N, Maurer AJ. Effects of varying levels of chloride salts on *Clostridium botulinum* toxin production in Turkey Frankfurters. J Food Sci. 1986;51:1129-31.
- Bean NH, Goulding JS, Daniels MT, Angulo FJ. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 1988-1992. J Food Prot. 1997;60:1265-86.
- Beer J. Botulismus. In: Beer J, editor. Infektionskrankheiten der Haustiere. 3rd ed; Vol 2. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag; 1987. p.737-44.
- Bell C, Kyriakides A. *Clostridium botulinum* – A practical approach to the organism and its control in foods. Oxford: Blackwell Science – practical food microbiology series. 2000.
- Berndt SF. Botulismus. Med Klin. 1978;73:879-87.
- Betts GD, Gaze JE. Growth and heat resistance of psychotrophic *Clostridium botulinum* in relation to sous vide products. Food Con. 1995;6:57-63.
- Bhattacharyya SD, Sugiyama H. Inactivation of Botulinum and Tetanus Toxins by Chelators. Infect Immun. 1989;57:3053-7.
- Blatz R. *Clostridium botulinum* (Botulismus, „Wurstvergiftung“). In: Blatz R, editor. Medizinische Mikrobiologie und Immunologie systematisch. Bremen: UNI-MED; 1999. p.147-9.
- Böhnel H. Botulismus. In: Blobel H, Schließer T, editors. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. 2nd ed; Vol 2/4. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1995. p.89-153.

- Böhnel H, Gessler F. Die Entwicklungskaskade des Botulismus. Tierärztl Umsch. 2004;59:12-9.
- Boroff DA, Reilly JR. Studies of the toxin of *Clostridium botulinum*. V: Prophylactic immunization of pheasants and ducks against avian botulism. J Bact. 1959;77:142-6.
- Briozzo J, de Lagarde EA, Chirife J, Parada JL. Effect of Water Activity and pH on Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type G. A E M. 1986;51:844-8.
- Cherington M. Clinical spectrum of botulism. Mus Ner. 1998;21:701-10.
- Christiansen LN, Deffner J, Foster EM, Sugiyama H. Survival and Outgrowth of *Clostridium botulinum* Type E Spores in Smoked Fish. Appl Microbiol. 1968;16:133-7.
- Ciccarelli AS, Whaley DN, McCroskey LM, Gimenez DF, Dowell VR, Hatheway CL. Cultural and Physiological Characteristics of *Clostridium botulinum* Type G and the Susceptibility of Certain Animals to Its Toxin. A E M. 1977;34:843-8.
- Crawford Mechem C, Walter FG. Wound Botulism. Vet Human Toxicol. 1994;36:233-7.
- Dahlenborg M, Borch E, Radström P. Development of a Combined Selection and Enrichment PCR Procedure for *Clostridium botulinum* Types B, E and F and Its Use To Determine Prevalence in Fecal Samples from Slaughtered Pigs. A E M. 2001;67:4781-8.
- Dahlenborg M, Borch E, Radström P. Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. Int J Food Microbiol. 2003;82:105-10.
- del Torre M, Stecchini ML, Peck MW. Investigation of the Ability of Proteolytic *Clostridium Botulinum* to Multiply and Produce Toxin in Fresh Italian Pasta. J Food Prot. 1998;61:988-93.
- Dodds KL. Combined Effect of Water Activity and pH on Inhibition of Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Cooked, Vacuum-Packed Potatoes. A E M. 1989;55:656-60.
- Dodds KL. *Clostridium botulinum* in the environment. In: Hauschild AHW, Dodds KL, editors. *Clostridium botulinum: ecology and control in foods*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1993. p.21-51.
- Eklund MW. Significance of *Clostridium botulinum* in fishery products preserved short of sterilization. Food Techn. 1982;36:112-5.
- Eklund MW, Wieler DI, Poysky FT. Outgrowth and Toxin Production of Nonproteolytic Type B *Clostridium botulinum* at 3,3 to 5,6°C. J Bact. 1967;93:1461-2.

Franciosa G, Aureli P, Schechter R. *Clostridium botulinum*. In: Miliotis MD, Bier JW, editors. International Handbook of Foodborne Pathogens. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.; 2003. p.61-90.

Gibson AM, Modi NK, Roberts TA, Shone CC, Hambleton P, Melling J. Evaluation of a monoclonal antibody-based immunoassay for detecting type A *Clostridium botulinum* toxin produced in pure culture and an inoculated model cured meat system. J appl Bact. 1987;63:217-26.

Grecz N, Walker AA, Anellis A, Berkowitz D. Effect of irradiation temperature in the range – 196 to 95°C on the resistance of spores of *Clostridium botulinum* 33A in cooked beef. Can J Microb. 1971;17:135-42.

Hatheway CL. Botulism: the present status of the disease. Curr Top Microbiol. 1995a;195:55-75.

Hubálek Z, Halouzka J. Thermal sensitivity of *Clostridium botulinum* type C toxin. Epidem Inf. 1988;101:321-5.

Huss HH, Pedersen A. *Clostridium botulinum* in fish. Nord Vet Med. 1979;31:214-21.

Hyytiä-Trees E, Lindström M, Schalch B, Stolle A, Korkeala H. *Clostridium botulinum* type E in Bavarian fish. Arch Leb Mitt Hyg. 1999;50:79-82.

Iwand A. Botulismus. Dt Ärztebl. 1979;37:2325-6.

Johnson EA. *Clostridium botulinum*. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.458-66.

Kautter DA, Harmon SM, Lynt K, Lilly T. Antagonistic effect on *Clostridium botulinum* Type E by organisms resembling it. Appl Microbiol. 1966;14:616-22.

Köhler W. Sporenbildende gram-positive Bakterien (*Bacillus*, *Clostridium*) – Milzbrand, Tetanus, Gasbrand, pseudomembranöse Colitis, Botulismus. In: Köhler W, editor. Medizinische Mikrobiologie. 8th ed. München, Jena: Verlag Urban und Fischer; 2001. p.390-406.

Kolb E. Botulismus-Toxine. In: Wiesner E, Ribbeck R, editors. Lexikon der Veterinärmedizin. 4th ed. Stuttgart: Enke-Verlag; 2000. p.205.

Krämer J. *Clostridium botulinum*. In: Krämer J, editor. Lebensmittel-Mikrobiologie. 4th ed. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2002. p.54-60.

Krist K, Nichols DS, Ross T. Influence of Available Water. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.539-47.

Lambert AD, Smith JP, Dodds KL. Combined Effect of Modified Atmosphere Packaging and Low-Dose Irradiation on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Fresh Pork. J Food Prot. 1991a;54:94-101.

Lambert AD, Smith JP, Dodds KL. Effect of Initial O₂ and CO₂ and Low-Dose Irradiation on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in MAP Fresh Pork. J Food Prot. 1991b;54:939-44.

Leistner L, Mirna A. Das Redoxpotential von Pökellagen. Fleischw. 1959;11:659-66.

Levetzow R. *Costridium botulinum* – Intoxikationen. In: Grossklaus D, editor. Geflügelfleischhygiene. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1979. p.335-6.

Loch PV. Kulturell-biochemische und molekularbiologische Untersuchungen sowie Pathogenitätsprüfung von *Clostridium botulinum*-Stämmen: ein Beitrag zur Taxonomie [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2000.

Lund BM, Wyatt GM. The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of *Clostridium botulinum* type E from spore inocula. Food Microbiol. 1984;1:49-65.

MacDonald KL, Spengler RF, Hatheway CL, Hargrett NT, Cohen ML. Type A botulism from sauteed onions. J Am med Ass. 1985;253:1275-8.

Macholz R, Lewerenz HJ. Lebensmitteltoxikologie. Berlin: Akademie Verlag; 1989.

Maier E. Das Verhalten des Botulinustoxins im Flusswasser, in Erdböden und verschiedenen Nahrungsmitteln [Dissertation med.]. Frankfurt am Main: Universität Frankfurt am Main; 1954.

Miller AJ, Call JE. Inhibitory Potential of Four-Carbon Dicarboxylic Acids on *Clostridium botulinum* Spores in an Uncured Turkey Product. J Food Prot. 1994;57:679-83.

Miller AJ, Call JE, Whiting RC. Comparison of Organic Acid Salts for *Clostridium botulinum* Control in an Uncured Turkey Product. J Food Prot. 1993;56:958-62.

Montville TJ, Rogers AM, Okereke A. Differential Sensitivity of *Clostridium botulinum* Strains to Nisin is Not Biotype-Associated. J Food Prot. 1992;55:444-8.

Müller G. Verfahrensgrundlagen zur Konservierung von Lebensmitteln. In: Müller G, editor. Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie. 7th ed. Leipzig: VEB Fachbuchverlag; 1989. p.245-320.

Notermans S, Breukink HJ, Wensing Th, Wagenaar G. Voorkomen van *Clostridium botulinum* in pensinhoud en faeces van runderen gevoederd met bostel welke natuurlijk besmet was met *Clostridium botulinum*. Tijdschrift Diergeneesk. 1978;103:1327-33.

Notermans S, Kozaki S, van Schothorst M. Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Grass. A E M. 1979;38:767-71.

Odlaug TE, Pflug IJ. *Clostridium botulinum* and Acid Foods. J Food Prot. 1978;41:566-73.

Ohye DF, Christian JHB. Combined effects of temperature, pH and water activity on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* types A, B and E. In: Ingram M, Roberts TA, editors. Botulism 1966. London: Chapman & Hall; 1967. p.217-24.

Ohye DF, Scott WJ. The temperature relations of *Clostridium botulinum*, types A and B. Austr J Biol Sci. 1953;6:178-89.

Ohye DF, Scott WJ. Studies in the physiology of *Clostridium botulinum* type E. Austr J Biol Sci. 1957;10:85-94.

Peck MW, Lund BM, Fairbairn DA, Kaspersson AS, Undeland PC. Effect of Heat Treatment on Survival of, and Growth from, Spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* at Refrigeration Temperatures. A E M. 1995;61:1780-5.

Popoff MR. Ecology of Neurotoxicogenic Strains of Clostridia. In: Montecucco C, editor. Clostridial Neurotoxins. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1995. p.1-29.

Ray B. Fundamental Food Microbiology. 2nd ed. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press; 2001.

Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB. *Clostridium botulinum*. In: Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB, editors. Microorganisms of Food N^o 5 - Microbiological specifications of food pathogens. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic & Professional; 1996. p.66-111.

Rompf A, Jahn D. Influence of Redox Potential and pH. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 1. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2000. p.556-63.

Schaffner RM. Government's role in preventing foodborne botulism. Food Technol. 1982;36:87-9,115.

Scott VN. Interaction of Factors to Control Microbiological Spoilage of Refrigerated Foods. J Food Prot. 1989;52:431-5.

Selbitz HJ. *Clostridium botulinum*. In: Selbitz HJ, editor. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992. p.192-5.

Sell C. *Clostridium botulinum* Typ E [Dissertation med.]. Bonn: Universität Bonn; 1985.

Simpson MV, Smith JP, Dodds K, Ramaswamy HS, Blanchfield B, Simpson BK. Challenge Studies with *Clostridium botulinum* in a Sous-Vide Spaghetti and Meat-Sauce Product. J Food Prot. 1995;58:229-34.

Sinell H-J. Botulismus. In: Sinell H-J, editor. Einführung in die Lebensmittelhygiene. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1992. p.58-61.

Smelt JPPM, Raatjes GJM, Crowther JS, Verrips CT. Growth and toxin formation by *Clostridium botulinum* at low pH values. J appl Bact. 1982;52:75-82.

Smith MV, Pierson MD. Effect of reducing agents on oxidation-reduction potential and the outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores. A E M. 1979;37:978-84.

Smith L, Sugiyama H. The Spore. In: Smith L, Sugiyama H, editors. Botulism: the organism, its toxin, the disease. 2nd ed. Springfield, Illinois: Charlres C Thomas; 1988. p.39-54.

Sofos JN. Botulism in Home-Processed Foods. In: Tu AT, editor. Food poisoning. Vol 7. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker; 1992. p.171-203.

Solomon HM, Kautter DA. Outgrowth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Bottled Chopped Garlic. J Food Prot. 1988;51:862-5.

Sperber WH. Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. Food Techn. 1982;36:89-94.

Tanaka N, Traisman E, Lee MH, Cassens RG, Foster EM. Inhibition of Botulinum Toxin Formation in Bacon by Acid Development. J Food Prot. 1980;43:450-7.

Tanner FW, Evans FL. Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria I. Sodium chloride. Zbl Bakt Parasit Kde. Abt.II. 1933;88:44-54.

Thompson L, Tanner FW. Toxin production by *Clostridium botulinum* in canned foods. J infect Dis. 1925;37:344-52.

Todd ECD. Foodborne Disease in Canada – a 10-year Summary from 1975 to 1984. J Food Prot. 1992;55:123-32.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci.* 2002;27:552-8.

Wentz MW, Scott RA, Vennes JW. *Clostridium botulinum* Type F: Seasonal Inhibition by *Bacillus licheniformis*. *Science.* 1967;155:89-90.

Whiting RC, Naftulin KA. Effect of Headspace Oxygen Concentration on Growth and Toxin Production by Proteolytic Strains of *Clostridium botulinum*. *J Food Prot.* 1992;55:23-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn **Prof. Dr. K. Fehlhaber** für die Überlassung dieses interessanten Themas, die geduldige Betreuung, die effektiven Hilfestellungen und das immer zügige Lesen.

Frau **Prof. M. Krüger** sowie Frau **Dr. A. Große-Herrenthey** danke ich für Ihre konstruktiven Ratschläge und Einblicke in mikrobiologische Arbeitsweisen.

Meinen Arbeitgebern, zunächst **Dr. G. Dutschka** und jetzt **Prof. Dr. A. Sobiraj**, bin ich für die flexible Gestaltung meiner Arbeitszeiten dankbar, ohne dies wäre eine Fertigstellung erheblich erschwert gewesen.

Vielen Dank auch den **Mitarbeitern der Deutschen Bücherei Leipzig** sowie denen **der Universitätsbibliothek der Universität Leipzig**, die immer wieder Wege fanden, scheinbar verschollene Artikel aufzuspüren.

Weiterhin bedanke ich mich bei **meiner Familie**, insbesondere bei **meinem Mann Dirk**, für die vielseitigen Hilfen, den Zuspruch in schwierigen Momenten und die tatkräftige Unterstützung in der Endphase.