

Aus dem Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion
in den Tropen und Subtropen
der Universität Göttingen, Bereich Tierhygiene

eingereicht über das

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Serologische Untersuchungen
zum Nachweis von Antikörpern
gegen *Clostridium botulinum*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Susanne Behrens

aus Kassel

Hannover 1999

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Dr. H. Böhnel

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. F. Gerlach

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. W. Leibold

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1999

Gefördert im Rahmen des Forschungsprojekts Alternativen zum Tierversuch: Entwicklung eines *In-vitro*-Verfahrens zum Ersatz des Tierversuchs zum Botulinum-Toxinnachweis; BMBF (Förderkennzeichen 0311128), Bonn.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
2	Schrifttum	13
2.1	<i>Clostridium botulinum</i>	13
2.1.1	Taxonomie	13
2.1.2	Morphologie und Stoffwechseleigenschaften	14
2.1.3	Toxine	16
2.1.3.1	Typisierung von <i>C. botulinum</i>	17
2.1.3.2	Struktur und Funktion von Progenitor-Toxinen	21
2.1.3.3	Struktur und Wirkungsweise der Neurotoxine	23
2.2	Botulismus	25
2.2.1	Pathogenese und Epizootiologie	25
2.2.1.1	Botulismus beim Wiederkäuer	27
2.2.1.2	Botulismus beim Pferd	29
2.2.1.3	Botulismus beim Schwein	30
2.2.1.4	Botulismus beim Fleischfresser	30
2.2.1.5	Botulismus beim Vogel	31
2.2.1.6	Botulismus beim Mensch	32
2.2.2	Therapie	34
2.2.3	Prophylaxe	35
2.3.	Nachweismethoden von <i>C. botulinum</i> und seinen Toxinen	36
2.3.1	Erregernachweis	37
2.3.1.1	Gaschromatographie	37
2.3.1.2	Chemische und biochemische Methoden	37
2.3.1.3	Immunfluoreszenz	38
2.3.1.4	PCR	39
2.3.2	Toxinnachweis	40
2.3.2.1	<i>In-vivo</i> -Methoden	40
2.3.2.1.1	Maus-Bioassay	40
2.3.2.1.2	Andere Bioassays	41
2.3.2.2	<i>In-vitro</i> -Methoden	42
2.3.2.2.1	Gel-Präzipitations-Techniken	42

2.3.2.2.2	Hämagglutinations-Techniken	43
2.3.2.2.3	Komplementbindungsreaktion (KBR)	43
2.3.2.2.4	Radioimmunoassay (RIA)	44
2.3.2.2.5	Enzymimmunoassay (EIA)	45
2.4.	Nachweismethoden von <i>C. botulinum</i> -Antitoxin	49
2.4.1	<i>In-vivo</i> -Methoden	50
2.4.2	<i>In-vitro</i> -Methoden	52
2.4.2.1	Hämagglutinations-Techniken	52
2.4.2.2	Radioimmunoassay (RIA)	53
2.4.2.3	Enzymimmunoassay (EIA)	53
3	Material und Methoden	59
3.1	Anzucht und Differenzierung der Clostridien-Stämme	59
3.1.1	Bakterienstämme	59
3.1.2	Kolonie- und Zellmorphologie	60
3.1.3	Gaschromatographische Fettsäureanalyse	60
3.1.4	Biochemische Stoffwechselleistungen	63
3.2	Toxine, Toxoide und Impfstoffe	65
3.2.1	Toxinproduktion	65
3.2.2	Toxintypisierung	66
3.2.3	Toxoidierung	66
3.2.3.1	Toxoidimpfstoffe eigener Herstellung	66
3.2.3.2	Kommerzieller Toxoid-Impfstoff	66
3.2.4	Quantitative Proteinbestimmung	67
3.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	68
3.2.6	Färbung, Dokumentation und Archivierung der Gele	68
3.3	Antitoxine	69
3.3.1	Kommerzielle Antitoxine	69
3.3.2	Eigene Antitoxine	70
3.3.2.1	Immunisierung von Kaninchen	70
3.3.2.2	Gewinnung der Antiseren von Kaninchen	71
3.4	Versuchsbetriebe / Bestandsuntersuchungen	71
3.4.1	Betriebsdaten	72
3.4.2	Probenentnahme in den Betrieben	73

3.5	Untersuchungen zum Antikörpernachweis	75
3.5.1	Komplementbindungsreaktion	78
3.5.1.1	Materialien	79
3.5.1.1.1	Standardisierung der Erythrozytensuspension	81
3.5.1.1.2	Ambozeptor	82
3.5.1.1.3	Herstellung des hämolytischen Systems	82
3.5.1.2	Vorversuche zur Methodik	82
3.5.1.2.1	Ambozeptor-Vorversuch	82
3.5.1.2.2	Komplement-Vorversuch	84
3.5.1.2.3	Antigen-Vorversuch	84
3.5.1.3.	Nachweis von <i>C. botulinum</i> -Antikörpern	88
3.5.1.3.1	Photometrische Bestimmung der 50-%-Hämolyse und Auswertung der Ergebnisse	89
3.5.1.3.2	AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen	89
3.5.1.3.3	Nachweis von AK-Kreuzreaktionen	91
3.5.1.3.4	AK-Nachweis in Rinderseren	92
3.5.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	92
3.5.2.1	Materialien	94
3.5.2.1.1	Allgemeines Testprinzip	95
3.5.2.2	Vorversuche zur Methodik	96
3.5.2.2.1	Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten	96
3.5.2.2.2	Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung	97
3.5.2.2.3	Bestimmung des Cut-off-Wertes für den ELISA	98
3.5.2.3	Nachweis von <i>C. botulinum</i> -Antikörpern	99
3.5.2.3.1	AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen	100
3.5.2.3.2	Nachweis von AK-Kreuzreaktionen	101
3.5.2.3.3	AK-Nachweis in Rinderseren	101
3.5.2.4	Auswertung der Ergebnisse	101
3.5.2.5	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISA	102
4	Ergebnisse	103
4.1	Differenzierung der Clostridien-Stämme	103
4.1.1	Kolonie- und Zellmorphologie	103
4.1.2	Gaschromatographische Fettsäureanalyse	105
4.1.3	Biochemische Stoffwechselleistungen	112

4.2	Toxine und Toxoidimpfstoffe	114
4.2.1	Toxinproduktion und -typisierung	114
4.2.2	Quantitative Proteinbestimmung	116
4.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	116
4.3	Serologische Untersuchungen zum Nachweis von AK gegen <i>C. botulinum</i>	119
4.3.1	Komplementbindungsreaktion (KBR)	119
4.3.1.1	Vorversuche zur Methodik	119
4.3.1.1.1	Ambozeptor-Vorversuch	119
4.3.1.1.2	Komplement- und Antigen-Vorversuch	119
4.3.1.2	Nachweis von <i>C. botulinum</i> -Antikörpern	122
4.3.1.2.1	AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen	122
4.3.1.2.2	Nachweis von AK-Kreuzreaktionen	127
4.3.1.2.3	AK-Nachweis in Rinderseren	133
4.3.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	133
4.3.2.1	Vorversuche zur Methodik	133
4.3.2.1.1	Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten	133
4.3.2.1.2	Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung	134
4.3.2.1.3	Bestimmung der Cut-off-Werte für den ELISA	135
4.3.2.2	Nachweis von <i>C. botulinum</i> -Antikörpern	136
4.3.2.2.1	AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen	136
4.3.2.2.2	Nachweis von AK-Kreuzreaktionen	141
4.3.2.2.3	AK-Nachweis in Rinderseren	147
4.3.2.3	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	154
5	Diskussion	156
5.1	Differenzierung der Clostridien-Stämme	156
5.1.1	Kolonie- und Zellmorphologie	156
5.1.2	Gaschromatographische Fettsäureanalyse	156
5.1.3	Biochemische Stoffwechselleistungen	157
5.2	Toxinproduktion und -typisierung	159
5.3	Serologische Untersuchungen zum Nachweis von AK gegen <i>C. botulinum</i>	159
5.3.1	Vorversuche KBR	160
5.3.1.1	Standardisierung von Schaferythrozyten	160
5.3.1.2	Ambozeptor- und Komplement-Vorversuche	161

5.3.1.3	Antigen-Vorversuch	161
5.3.2	Vorversuche ELISA	162
5.3.2.1	Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten	162
5.3.2.2	Antigen-Vorversuche	162
5.3.3	Nachweis von <i>C. botulinum</i> -Antikörpern	163
5.3.3.1	AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen	164
5.3.3.2	Nachweis von AK-Kreuzreaktionen	168
5.3.3.3	AK-Nachweis in Rinderseren	171
5.3.3.3.1	Geimpfte Rinder	171
5.3.3.3.2	Ungeimpfte Kälber	173
5.3.3.3.3	Erkrankte Rinder	174
5.3.3.4	Schlußbetrachtung	175
5.3.4	Schlußfolgerung	176
6	Zusammenfassung	178
	Summary	179
7	Literaturverzeichnis	180
8	Anhang	I
8.1	Medien, Puffer und Lösungen	I
8.1.1	Medien, Puffer und Reagenzien für Anzucht, Toxinbildung und -typisierung von Clostridien	I
8.1.2	Reagenzien für die Gaschromatographie	IV
8.1.3	Chemikalien und Lösungen zur Proteinbestimmung	IV
8.1.4	Chemikalien und Lösungen für Elektrophorese und Gelfärbung	V
8.1.5	Puffer und Reagenzien für die KBR	IX
8.1.6	Puffer und Reagenzien für den ELISA	X
8.2	Tabellenanhang	XII

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillatum
AP	Alkalische Phosphatase
AG	Antigen
AK	Antikörper
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
C.	Clostridium
C. bot.	Clostridium botulinum
C. spp.	Clostridium species
CDC	Centers for Disease Control
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ELCA	Enzyme-Linked Coagulation Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
KM	Körpermasse
LD ₅₀	50 % tödliche Dosis
min	Minute
MLD	Mäuse Letale Dosis
ng	Nanogramm
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
pg	Picogramm
PHA	Passive Hämagglutination
p. vacc.	postvakzinal (nach Impfung)
RIA	Radio-Immuno-Assay
SDS	sodium-dodecyl-sulfate (Natriumdodecylsulfat)
s. c.	subkutan

μm Mikrometer

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillatum
AP	Alkalische Phosphatase
AG	Antigen
AK	Antikörper
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
C.	Clostridium
C. bot.	Clostridium botulinum
C. spp.	Clostridium species
DLM	Dosis Letalis (Maus)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
KM	Körpermasse
LD ₅₀	50 % tödliche Dosis
min	Minute
MLD	Mäuse Letale Dosis
ng	Nanogramm
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
pg	Picogramm
p. vacc.	postvakzinal (nach Impfung)
RIA	Radio-Immuno-Assay
SDS	sodium-dodecyl-sulfate (Natriumdodecylsulfat)
s. c.	subkutan
µm	Mikrometer

1 Einleitung

Botulismus ist eine häufig tödlich verlaufende, neuromuskuläre Erkrankung, die bei Säugetieren, Vögeln, Fischen und beim Menschen vorkommt. Während bei landwirtschaftlichen Nutztieren v.a. in den tropischen Gebieten die Erkrankung von großer Bedeutung ist, scheint sie in Deutschland hingegen langsam in Vergessenheit geraten zu sein (BÖHNEL 1999).

Die Erfahrungen der Veterinärmedizin in den letzten Jahren zeigen jedoch, daß die Inzidenz von Botulismusintoxikationen sowohl durch umweltrelevante Gesichtspunkte, als auch moderne Methoden der Futterwerbung und -lagerung, sowie Problemen bei der Entsorgung von tierischen Exkrementen aus der Massentierhaltung gestiegen ist (BEHRENS u. BÖHNEL 1995; BÖHNEL et al. 1996; KEHLER u. SCHOLZ 1996; BÖHNEL 1999).

Aber auch das immer zahlreichere Auftreten von Botulismus in Zusammenhang mit dem Plötzlichen Kindstod (BEHRENS et al. 1998; BÖHNEL et al. 1999), sowie der Einsatz von Botulinumtoxin zu therapeutischen Zwecken in der Humanmedizin unterstreichen die Forderung nach einem stärkeren Bewußtsein gegenüber *C. botulinum*.

In der Veterinärmedizin liegt der Schwerpunkt der Botulismusbekämpfung in der Prophylaxe durch aktive Immunisierungen. Durch den Einsatz von Toxoid-Impfstoffen konnten v.a. in tropischen Gebieten mit extensiver Nutztierhaltung die mit großen wirtschaftlichen Schäden einhergehenden Verluste durch Botulismus stark reduziert werden (TAMMEMAGI u. GRANT 1967; JANSEN et al. 1976; BLOOD u. RADOSTITS 1989).

Nachdem in den Jahren 1991-1995 in hessischen Rinderbeständen mehrere hunderte Rinder an Botulismus verendet waren, entschied man sich im Rahmen eines Feldversuchs in den betroffenen Betrieben eine kommerzielle Botulismus-Toxoid-Vakzine einzusetzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Antikörper gegen *C. botulinum* zur Kontrolle des Impferfolges nachzuweisen. Der Nachweis von Antitoxinen gegen *C. botulinum* wird international üblich im Tierversuch durchgeführt. Labortests ohne Versuchstiere sind im Handel nicht erhältlich.

Mit der wachsenden Forderung zur Reduzierung von Tierversuchen sollten in der vorliegenden Arbeit zwei *In-vitro*-Methoden (KBR und ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. botulinum* nach dem Einsatz einer südafrikanischen Botulinus-Vaccine beim enzootischen Botulismus in hessischen Rinderbeständen etabliert werden.

Alternative Methoden (PHA, RIA, EIA) wurden bereits beschrieben, beschäftigten sich jedoch nur mit dem Nachweis einzelner und nicht aller *C. botulinum*-Antikörper (Typ A-E) und enthielten keine oder nur unvollständige Daten über ihr kreuzreaktives Verhalten.

Die Auswahl der Methoden fiel auf die KBR und den ELISA, weil beide Methoden keine aufwendigen Sicherheitsmaßnahmen erfordern und auch unter Feldbedingungen relativ einfach, schnell und preisgünstig einsetzbar sind.

In den serologischen Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob und wie sich die Antikörperbildung nach einer Immunisierung quantitativ erfassen läßt und ob Kreuzreaktionen (bzw. -immunitäten) nachweisbar sind.

Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, in experimentellen Fragestellungen und zur Impfstoffkontrolle die Verwendung von Versuchstieren zu reduzieren und damit im Sinne des Tierschutzes zu wirken.

2 Schrifttum

2.1 *Clostridium botulinum*

2.1.1 Taxonomie

Bei der Taxonomie von Botulinum-Bakterien müssen 3 verschiedene, aber in Wechselbeziehung stehende Kriterien herangezogen werden:

- die Systematik von *C. botulinum*, sowie physiologisch und genetisch verwandter Bakterien
- andere *Clostridium spp.*, die Botulinum-Neurotoxine bilden
- das Botulinum-Neurotoxin (BoNT).

Nach BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1986) gehört die Gattung *Clostridium* zu den endosporenbildenden gram-positiven Stäbchen und stellt ein Genus der Familie *Bacillaceae* dar (CATO et al. 1986).

Die unter dem Speziesnamen *C. botulinum* zusammengefaßte Gruppe von Bakterien ist ein Konglomerat mehrerer kulturell und serologisch verschiedener Spezies, die meist nur eines gemeinsam haben: sie sind Anaerobier, Sporenbildner und bilden Neurotoxine (SMITH 1977).

Aufgrund der Fähigkeit, Botulinum-Neurotoxine (BoNT) zu bilden, definierte PRÉVOT (1953) *C. botulinum* als die Spezies, die die Fähigkeit besitzen, bei Mensch und Tier die Erkrankung Botulismus zu verursachen.

Basierend auf der serologischen Spezifität der gebildeten Toxine werden die Stämme von *C. botulinum* traditionell in 7 antigenetisch unterschiedliche Typen (A-G) unterteilt (DODDS 1994).

Aus rein taxonomischem Gesichtspunkt ist die Einteilung weit komplizierter. Eine Nomenklatur allein basierend auf der BoNT-Produktion ist nicht immer befriedigend möglich, da die Toxinproduktion kein stabiles Charakteristikum darstellt. Einerseits können Stämme von *C. botulinum* ihre Fähigkeit zur Toxinproduktion verlieren, andererseits kann durch phagenassoziierten Gentransfer die Fähigkeit zur Toxinbildung auf andere Organismen übertragen werden (EKLUND et al. 1989; OGUMA 1976).

Zahlreiche Studien belegen außerdem, daß auch Stämme von *C. butyricum* (AURELI et al. 1986; MCCROSKEY et al. 1986) und *C. baratii* (HALL et al. 1985; MCCROSKEY et al. 1991) in der Lage sind, BoNT zu bilden.

Auf die Toxine und neuere Untersuchungen, die die o.g. Systematik als nicht mehr zeitgemäß bzw. inadäquat (GIMÉNEZ u. GIMÉNEZ 1993) erscheinen lassen, wird im Kap. 2.1.3.1 näher eingegangen.

Basierend auf physiologischen Unterschieden teilten SMITH und HOLDEMAN (1968) *C. botulinum* A-F in 3 Gruppen ein, denen allerdings auch noch andere *Clostridia* zugeordnet sind. Die Einteilung in diese drei Gruppen wurde durch serologische Techniken (WALKER u. BATTY 1964), Pyrolyse-Gaschromatographie (GUTTERIDGE et al. 1980) und DNA-Homologie-Studien bestätigt (BOM et al. 1986). Erstmals von GIMÉNEZ und CICCARELLI (1970 a) beschriebene, aus Erdboden isolierte Stämme vom Typ G, wurden in eine vierte Gruppe eingeordnet (SMITH u. HOBBS 1974; CATO et al. 1986).

- Gruppe I Typ A, proteolytische Stämme der Typen B und F, *C. sporogenes*
- Gruppe II Typ E, nicht proteolytische Stämme der Typen B und F
- Gruppe III Typen C und D, *C. novyi A*
- Gruppe IV Typ G, *C. subterminale*

C. parabotulinum ist die Bezeichnung für proteolytische *C. botulinum*-Stämme und für *C. botulinum*-ähnliche, nicht proteolytische Isolate, die nur schwer von *C. sporogenes* zu trennen sind. *C. sporogenes* wird wiederum als apathogenes *C. botulinum* bezeichnet.

C. parabotulinum als nichtproteolytischer Neurotoxinbildner wurde mit *C. perenne* und *C. paraperfringens* zu *C. baratii* zusammengefaßt (LEE u. RIEMANN 1970; CATO et al. 1986).

2.1.2 Morphologie und Stoffwechseleigenschaften

Morphologie

Die Organismen aller 4 Gruppen sind mittelgroße bis große, gerade bis leicht gekrümmte Stäbchen mit einer Dicke von 0,5-2 µm und einer Länge von 1,6-22 µm. Die vegetativen Formen sind peritrich begeißelte, normalerweise bewegliche Gram positive Stäbchen (CATO et al. 1986); in älteren Kulturen, v. a. wenn die Versporung begonnen hat, werden sie gramnegativ (BÖHNEL 1995).

Sporen

Die Sporenbildung ist bei *C. botulinum* sehr variabel, nicht nur bei den verschiedenen Typen sondern auch innerhalb gleicher Typen bei verschiedenen Stämmen. Die Sporen sind oval, liegen meist subterminal und treiben die Zelle auf. Stark toxinogene Stämme sind gewöhnlich wenig sporenbildend, proteolytische Stämme versporen schnell (SMITH 1977).

Stoffwechsel

In Tab. 1 sind die wichtigsten Stoffwechseleistungen der 4 Gruppen von *C. botulinum* aufgeführt. Ergänzt wurde die Aufstellung durch ebenfalls BoNT-produzierende Stämme von *C. butyricum* und *C. baratii*.

Tab. 1. Eigenschaften von Organismen mit der Fähigkeit BoNT zu bilden
(mod. nach CATO et al. 1986; HATHEWAY 1993)

	<i>C. botulinum</i>				<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
	I	II	III	IV	(E)	(F)
Toxin-Typen	A,B,F	B,E,F	C,D	G	(E)	(F)
Proteolyse	+	-	-	+	-	-
Hydrolyse von						
Gelatine	+	+	+	+	-	-
Aesculin	+	-	-	-	+	+
Stärke	-	+/-	-	-	+	+/-
Fermentation von						
Glukose	+	+	+	-	+	+
Fruktose	+/-	+	+/-	-	+	+
Mannose	-	+	+	-	+	+
Maltose	+/-	+	+/-	-	+	+
Sucrose	-	+	-	-	+	+
Trehalose	-	+	-	-	+	-
Bildung von						
Wasserstoff	+	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	-	-	-
Lezithinase	-	-	-	-	-	+
Indol	-	-	+/-	-	-	-

+ alle Stämme positiv - alle Stämme negativ +/- einige Stämme positiv, einige negativ.

Die biochemischen Eigenschaften variieren insbesondere bei den Kulturen der Typen C und D deutlich. So bildeten beispielsweise bei OGUMA et al. (1995) alle 21 untersuchten Stämme der Typen C und D Lipase, 67 % der Stämme waren indol-positiv, 4 Stämme waren lezithinase-negativ, die anderen positiv. HENDERSON et al. (1997) beschreiben die proteolytische Aktivität der Gruppe III (C und D) mit +/-, die Lipasebildung als negativ.

Bei der Fermentation von Zuckern durch verschiedene Stämme von *C. botulinum* wird ebenfalls von einer weit gefächerten Variabilität berichtet (OGUMA et al. 1995; LOCH 1999).

2.1.3 Toxine

Botulinum-Toxin kann von einer Vielzahl von Clostridien gebildet werden (s.o.). Bei der heterogenen Gruppe von *C. botulinum* werden 8 antigenetisch unterschiedliche Toxintypen A, B, C1, C2, D, E, F und G unterschieden (SMITH 1977). Alle diese Toxine, mit Ausnahme von C2, sind Neurotoxine (SIMPSON 1982).

Die Neurotoxine von *C. botulinum* werden üblicherweise als „Botulinum-Toxine“ bezeichnet. Sie blockieren die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin an den Nervenendigungen, was im Organismus von Wirbeltieren zu Muskellähmungen (GIMÉNEZ u. GIMÉNEZ 1993) mit häufig letalem Ausgang führen kann (SAKAGUCHI 1986).

BoNT gehören zu den potentesten bekannten Toxinen. Die 50 % tödliche Dosis (LD₅₀) bei Wirbeltieren variiert zwischen 0,1 und 2,5 ng Toxin/kg KM. Die Unterschiede der Sensitivität einiger Spezies gegenüber den verschiedenen Botulinum-Toxinen sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tab. 2. Tödliche Dosis von *C. botulinum*-Toxinen (mod. nach GILL 1982)

<i>C. botulinum</i>	LD ₅₀ / kg KM				
	Maus	Meerschw.	Kaninchen	Affe	Mensch
Typ A	(1,2 ng i.p.)	(0,6 ng) ^a	(0,5 ng) ^a	(0,5-0,7 ng) ^a	(ca. 1 ng) ^a
Typ B	1,2-2 ng i.p.	0,6 ng i.p.			
Typ C1	1,1 ng i.v.	(ca. 1,1 ng) ^a	(ca. 0,15 ng) ^a	(ca. 0,4 ng) ^a	
Typ C2	1,2 ng i.p.				

Typ D	0,4 ng i.p.	0,1 ng ^a	0,08 ng ^a	40 ng ^a
Typ E	(1,1 ng)	0,6 ng ^a	1,1 ng ^a	1,1 ng ^a
Typ F	2,5 ng i.v.			

() unsauberes, ungereinigtes Material

^a Wo nur Verhältnisse angegeben oder pures Toxin verwendet wurde, werden die Ergebnisse im Verhältnis zur Mäusetoxizität berechnet. Der Mensch soll ähnlich empfindlich sein wie die Maus. Bei einer angenommenen Weltbevölkerung von 5,6 Milliarden Menschen mit einer durchschnittlichen Körpermasse von 70 kg würden 39,2 g BoNT ausreichen, die Menschheit zu vernichten (ARNON 1997).

Die letale Wirkung des C2-Toxins basiert nicht auf einer neurotoxischen, sondern einer cytotoxischen Aktivität (JENSEN u. DUNCAN 1980; SIMPSON 1982) und wird daher einer anderen Toxinkategorie zugeordnet (GIMÉNEZ u. SUGIYAMA 1988). C2 ist ein binäres Cytotoxin und wurde zwischenzeitlich als ADP-Ribosyltransferase identifiziert. Es verursacht eine Permeabilitätssteigerung der Gefäße mit einer Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen und Hämorrhagien in den Lungen, sowie Flüssigkeitsaustritt aus Lungen und Trachea (SIMPSON 1982).

Ein C3-Toxin wurde von AKTORIES et al. (1987), zwei weitere C3-Toxine von MORIISHI et al. (1991) bei den Typen C bzw. D nachgewiesen. Beide wirken wie das C2-Toxin als ADP-Ribosyltransferase (JOHNSON 1997).

2.1.3.1 Typisierung von *C. botulinum*

Unter Botulismus (lat. botulus = Wurst) wurde ursprünglich eine schwere, durch kontaminierte Wurst hervorgerufene, häufig tödliche Erkrankung des Menschen verstanden. Die Erkrankung wurde bereits seit dem Ende des 18. Jahrhunderts dokumentiert, aber es dauerte 100 Jahre, bis die bakterielle Ätiologie und seine toxikopathologische Natur ans Licht kam.

1897 gelang VAN ERMENGEM der Nachweis einer von anaeroben Bakterien gebildeten toxischen Substanz, die bei 34 Musikern in Belgien 1895 nach dem Verzehr von Schinken eine neuroparalytische Erkrankung ausgelöst hatte. Er nannte den Organismus *Bacillus botulinus*. Es sollte sich jedoch bald herausstellen, daß Botulismus nicht nur mit Fleisch und Fleischprodukten in Verbindung zu bringen ist. 1904 starben in Darmstadt 11 Menschen nach dem Verzehr von weißem Bohnensalat an Botulismus (LANDMANN 1904).

Die in Darmstadt von LANDMANN (1904) und in Belgien von VAN ERMENGEM (1897) zuerst identifizierte Bakterien wurden später von MEYER und GUNNISON (1929) in die Typen A und B klassifiziert.

1922 wurden weitere Erreger im Zusammenhang mit Erkrankungen von Geflügel aus Fliegenlarven in den USA (BENGTSON 1922) und an Bulbärparalyse verendeter Rinder in Australien (SEDDON 1922) isoliert, die dann die Bezeichnung Typ C erhielten; später wurden diese beiden Typen von MEYER und GUNNISON (1929) in die Subtypen C α und C β aufgeteilt.

THEILER et al. (1927) berichten erstmals über eine Typ D-Intoxikation bei einem Rind aus Südafrika, und GUNNISON et al. (1936) isolierten und identifizieren Typ E aus dem Darm eines Störes aus der Ukraine. In Dänemark isolierten MØLLER und SCHEIBEL (1960) in Leberpastete einen neuen Typ *C. botulinum*, der von DOLMAN und MURAKAMI (1961) Typ F benannt wurde.

Keine klinische Erkrankung soll der aus Erdboden isolierte *C. botulinum* Typ G auslösen (GIMÉNEZ u. CICCARELLI 1970 a). Zwischenzeitlich wird er aber auch mit Erkrankungen beim Mensch in Verbindung gebracht (SONNABEND et al. 1987; SUEN et al. 1988).

Die Toxintypen und ihre Entdecker sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3. Nachweis der verschiedenen Typen von *C. botulinum*

Typ	Quelle	Jahr
A	LANDMAN	1904
B	VAN ERMENGEM	1897
C	BENGTSON / SEDDON	1922
D	THEILER et al.	1927
E	GUNNISON et al.	1936
F	MØLLER u. SCHEIBEL	1960
G	GIMÉNEZ u. CICCARELLI	1970 a

Serologische Analysen von Stämmen der Typen C und D zeigten, daß diese Typen verschiedene Toxin-Komponenten produzieren und Kreuzreaktionen untereinander aufweisen (MASON u. ROBINSON 1935). *C. botulinum* Typ C α produziert C1-, C2- und etwas D-Toxin, Typ C β produziert nur C2-Toxin, Typ D produziert überwiegend D-Toxin, aber auch geringe Mengen C1-Toxin (JANSEN 1971).

Es wurden Hybridkonstruktionen (Mosaik-Toxine) von Typ C-Stämmen nachgewiesen, die antigenetische Charakteristika der leichten Kette von BoNT/C und der schweren Kette von BoNT/D aufwiesen (OCHANDA et al. 1984).

Bei der Differenzierung von *C. botulinum* mit Hilfe der Toxinneutralisation wurden zunehmend Stämme gefunden, die auch geringe Mengen anderer Toxine bilden, was zur Schaffung von Subtypen, z. B. Af (GIMÉNEZ und CICCARELLI 1970 b) und Ba (GIMÉNEZ 1984) führte.

Die Entwicklung von Primern für den spezifischen Nachweis von Neurotoxin-Genen mittels PCR hat weitere Untersuchungen über Stämme, die mehr als ein BoNT produzieren, ermöglicht. FRANCIOSA et al. (1994) fanden bei 79 untersuchten *C. botulinum*-A-Stämmen 43 Stämme, die ebenfalls typische BoNT/B-Gensequenzen enthielten. Nur einer jedoch produzierte BoNT/B und das auch nur in einer sehr geringen Menge (25 MLD).

Ähnliche Beobachtungen machten auch HUTSON et al. (1996), die ebenfalls sogenannte stille („unexpressed“) BoNT/B-Gene in einigen *C. botulinum* A-Stämmen fanden (multiple Toxin-Phänotypen/Genotypen).

Botulinumtoxine wurden serologisch außerdem bei anderen, nicht mit *C. botulinum* verwandten *Clostridium spp.* nachgewiesen. HALL et al. (1985) isolierten einen BoNT/F-produzierenden *C. baratii* bei einem Säugling in New Mexico. In Stuhl- und Serumproben eines Erwachsenen wurde BoNT/F identifiziert und *C. baratii* als neurotoxischer Organismus isoliert (MCCROSKEY et al. 1991). Bei zwei Fällen von Botulismus Typ E bei Säuglingen in Italien wurde das Neurotoxin von *C. butyricum* produziert (AURELI et al. 1986; MCCROSKEY et al. 1986).

DNA-Hybridisierungen zeigten, daß die toxischen Isolate nahe mit den Typstämmen der Spezies, denen sie ähnelten, verwandt waren. Das Isolat aus New Mexiko war zu 86 % verwandt mit *C. baratii* (ATCC 27638), das erste Isolat aus Italien zeigte 78 % Verwandtschaft zu *C. butyricum* (ATCC 19398) (SUEN 1988).

In Anlehnung an die zuvor gemachten Ausführungen zeigt Tab. 4 das erweiterte klassische Neurotoxinmuster von *C. botulinum*; das C2-Toxin ist nicht als Neurotoxin berücksichtigt.

Noch keine Berücksichtigung in der Nomenklatur von *C. botulinum* hat die Tatsache gefunden, daß bei verschiedenen Stämmen Virulenzfaktoren mit extrachromosomalen genetischen Faktoren assoziiert sein können (JOHNSON 1997).

In *C. botulinum*-Stämmen wurden Phagen nachgewiesen, die für die spezifische Toxinproduktion verantwortlich gemacht werden (INOUE u. IIDA 1968; EKLUND et al. 1971). Werden die Stämme von Phagen „gereinigt“ (UV-Licht, Acridin-Orange), verlieren sie die Fähigkeit zur Toxinbildung. Durch Reinfektion dieser gereinigten Organismen mit Phagen erlangen die Bakterien wieder die Fähigkeit zur Toxinproduktion (EKLUND et al. 1989). Ein Phagenverlust und der Verlust des Toxinbildungsvermögens kann auch durch wiederholte Laborpassagen auftreten (OGUMA 1976).

Bakteriophagen sind in nahezu allen Typen von *C. botulinum* nachgewiesen worden, eine phagen-assoziierte BoNT-Produktion wurde nur für C- und D-Typen gefunden. (HATHEWAY 1993; JOHNSON 1997). Die Gene der A-, B-, E- und F-Neurotoxine liegen in den bakteriellen Chromosomen (BINZ et al. 1990 b; THOMPSON et al. 1990). Für das Gen Typ G ist bewiesen, daß es sich auf einem Plasmid befindet (EKLUND et al. 1988).

Durch Verlust der Phagen und dem damit verbundenen Verlust der Toxinbildung verwischt auch die Einteilung in die verschiedenen Typen bzw. in die Gruppe *C. botulinum* gemäß der Definition von PRÉVOT (1953).

Tab. 4. Bildung von Neurotoxin (Botulinumtoxin) durch *Clostridium spp.* (mod. nach BÖHNEL 1995)

<i>Clostridium</i>	Neurotoxin-Typ						
	A	B	C1	D	E	F	G
<i>botulinum</i> Typ A	+						
<i>botulinum</i> Typ A Subtyp AB	+	+					
<i>botulinum</i> Typ A Subtyp Ab	+	+					
<i>botulinum</i> Typ A Subtyp Af	+					+	
<i>botulinum</i> Typ B		+					
<i>botulinum</i> Typ B Subtyp Ba	+	+					
<i>botulinum</i> Typ B Subtyp Bf		+				+	
<i>botulinum</i> Typ C α			+	+			
<i>botulinum</i> Typ C β			+	+			
<i>botulinum</i> Typ D			+	+			
<i>botulinum</i> Typ E					+	+	
<i>botulinum</i> Typ F					+	+	
<i>botulinum</i> Typ G ¹⁾							+
<i>baratii</i>						+	

ähnlich <i>baratii</i>	+
<i>butyricum</i>	+
ähnlich <i>butyricum</i>	+

+ in großen Mengen gebildet

+ in geringen Mengen gebildet

¹⁾ Synonym für *C. argentinense*

Auf Einzelheiten zu den kompletten Aminosäureanalysen und zur Sequenzierung der verschiedenen Botulinumtoxine soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Sie werden umfangreich bei

BINZ et al. (1990 b), THOMPSON et al. (1990) für BoNT/A,

HUTSON et al. (1994), DASGUPTA u. WOODY (1984) für BoNT/B,

HAUSER et al. (1990) für BoNT/C,

BINZ et al. (1990 a) für BoNT/D,

DASGUPTA und FOLEY (1989), POULET et al. (1992) für BoNT/E und

DASGUPTA und RASMUSSEN (1983) für BoNT/F

dargestellt.

Die Aminosäuresequenzen der Toxintypen A-G weisen etwa 30-60 % Homologien auf (OGUMA et al. 1995).

2.1.3.2 Struktur und Funktion von Progenitor-Toxinen

Botulinumtoxine verschiedener Typen bestehen aus einer neurotoxischen und einer nicht toxischen Komponenten und werden in diesem Proteinkomplex als Progenitortoxine bezeichnet (BOROFF et al. 1966; MIYAZAKI et al. 1977; OGUMA et al. 1995).

Die kompletten Botulinum-Toxine können, basierend auf ihrer Molekülgröße, in drei Gruppen unterteilt werden, genannt 12S, 16S und 19S, die auch als M (medium)-, L (large)- und LL (extra large)-Toxine bezeichnet werden. Das 7S-Derivattoxine (=Neurotoxin) wird „small-sized“ oder S-Toxin benannt (HAUSCHILD 1990).

Die Molekülgrößen der Progenitortoxine verschiedener Toxintypen sind in Tab. 5, ihre schematische Struktur in Abb. 1 dargestellt.

Tab. 5. Molekulargewichte der Progenitortoxine von *C. botulinum* A-F

Toxintyp	12S	16S	19S	Quelle
	300 kDa	500 kDa	900 kDa	
A	x	x	x	SUGII u. SAKAGUCHI (1976)
B	x	x		KOZAKI et al. (1974)
C	x	x		IWASAKI und SAKAGUCHI (1978)
D	x	x		MIYAZAKI et al. (1977)
E	x			KITAMURA et al. (1968)
F	x			OHISHI und SAKAGUCHI (1975)

Ein 300 kDa Progenitor-Toxin entsteht durch Assoziation eines Neurotoxins mit einer nichttoxischen Komponente ohne Hämagglutinin-Aktivität (nichttoxisches Nichthäm-agglutinin). 500 kDa und 900 kDa Toxine werden durch Konjugation eines 300 kDa-Toxins mit einem Hämagglutinin (HA) geformt.

Bezüglich der Funktion der nichttoxischen Komponente gibt es folgende Erklärungen: die nichttoxische Komponente des Progenitor-Toxins schützt das instabile Neurotoxin vor den Säuren und Proteasen des Magens. Das erklärt auch die deutlich höhere orale Toxizität des Progenitortoxins im Vergleich zu der des Neurotoxins allein. Nach dem Passieren des Magens dissoziieren diese Progenitortoxine im Dünndarm unter alkalischen Bedingungen in das Neurotoxin und die nichttoxische Komponente. Danach werden die Neurotoxine über Lymph- und Blutgefäße zu den Zielorganen abgeführt (OGUMA et al. 1995).

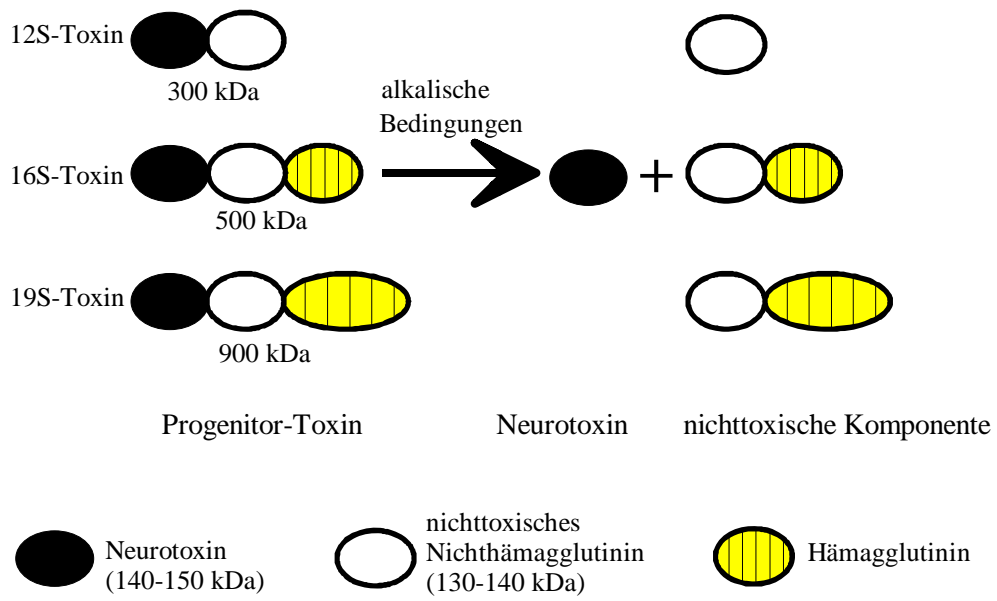
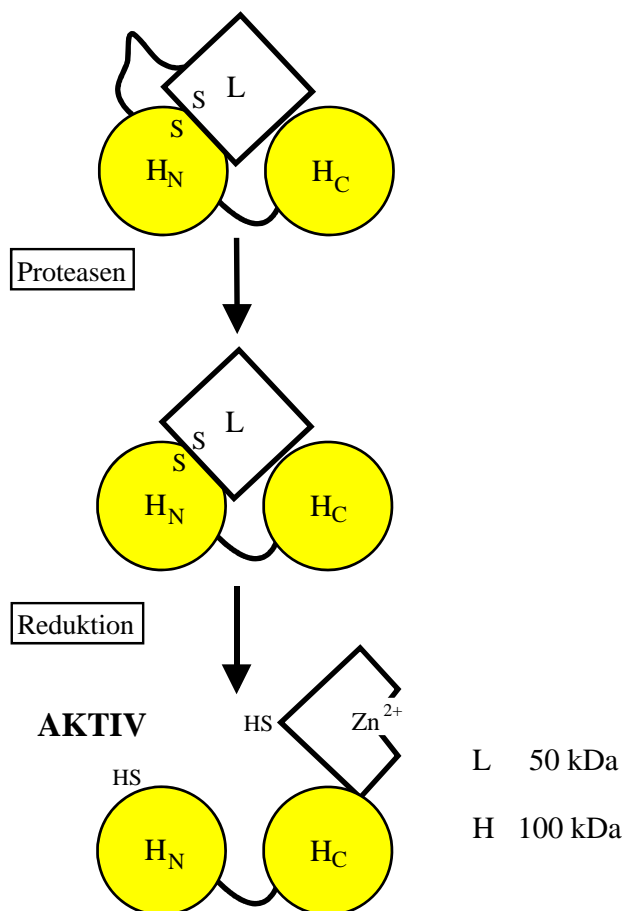


Abb. 1. Schematische Struktur von *C. botulinum* Progenitor-Toxinen (OGUMA et al. 1995)

2.1.3.3 Struktur und Wirkungsweise der Neurotoxine

BoNT werden als inaktive einzelne Polypeptidstränge (Protoxin) mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa synthetisiert. Diese werden durch endogene oder exogene (bakterielle oder wirtseigene) Proteasen in ein aktives Doppelstrang-Toxin selektiv gespalten. Dieses besteht aus einer leichten (L) Kette (50 kDa) und einer schweren (H) Kette (100 kDa), verbunden durch eine einzelne Disulfidbrücke (MONTECUCCO u. SCHIAVO 1994; OGUMA et al. 1995). Die Struktur des BoNT ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die dreidimensionale kristalline Struktur von BoNT/A ist mittlerweile auch beschrieben (LACY et al. 1998).



L = leichte Kette
H = schwere Kette
H_N = Amino-terminale Domäne der schweren Kette
H_C = Carboxy-terminale Domäne der schweren Kette

S-S = Disulfid-Brücke
H-S = Sulfhydrylgruppe

Abb. 2. Struktur und Aktivierungsmechanismus von Botulinum-Neurotoxinen (mod. nach SCHIAVO u. MONTECUCCO 1997)

Das BoNT hemmt die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin an der Zielzelle durch einen mehrstufigen Mechanismus:

- Bindung an Gangliosidrezeptoren
- Translokation
- Verhinderung der synaptischen Vesikelfusion

Das Neurotoxin bindet an den präsynaptischen Nervenendigungen cholinergischer Neurone mit der carboxy-terminale Domäne der schweren Kette (H_C), während die N-terminale Domäne der schweren Kette (H_N) Poren/Kanäle in die Membran formt, welche die Translokation der katalytischen Domäne (L-Kette) in das Cytosol ermöglicht (BLACK u. DOLLY 1986 a, b; KOZAKI et al. 1989 b; OGUMA et al. 1995; SCHIAVO u. MONTECUCCO 1997; LINIAL 1995).

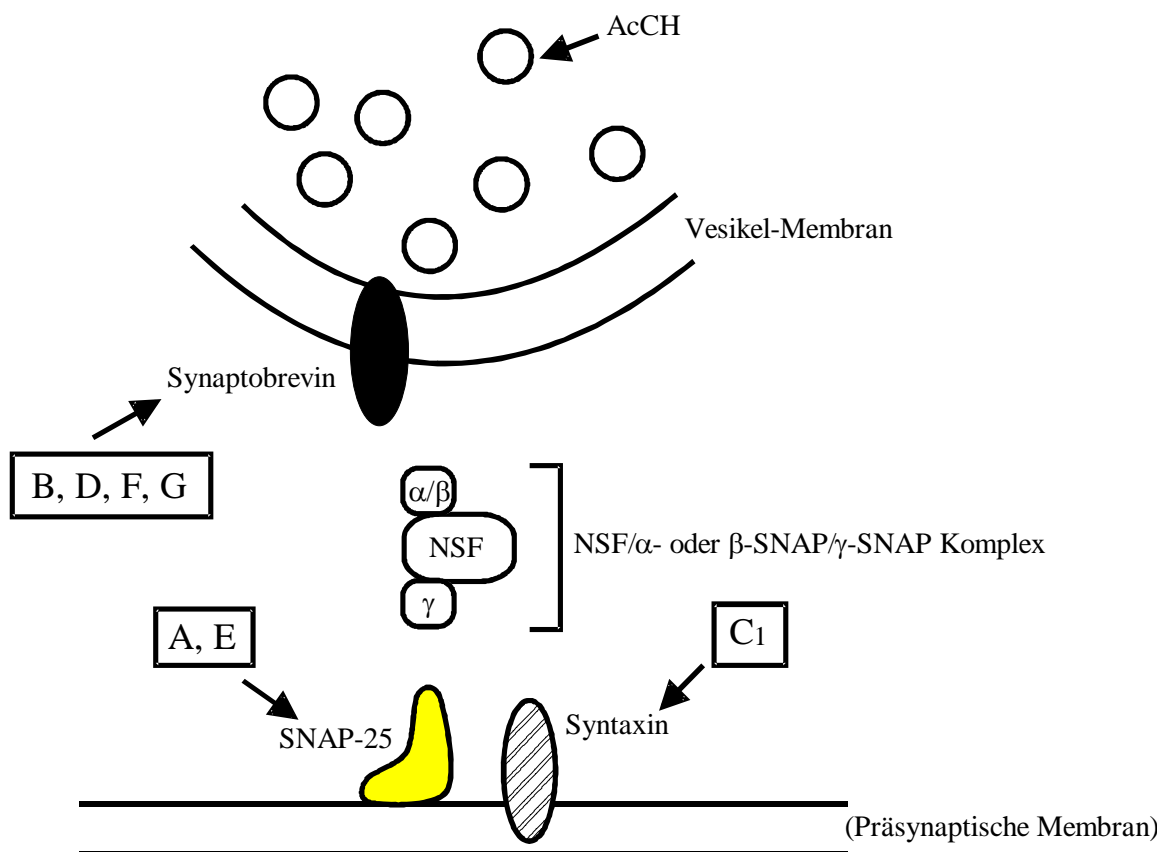


Abb. 3. Ziel-Proteine von BoNT (mod. nach OGUMA et al. 1995).

In der Abbildung sind die Proteine dargestellt, von denen angenommen wird, daß sie für die synaptische Vesikelfusion von entscheidender Bedeutung sind. Je nach Typ spalten die Neurotoxine von *C. botulinum* die SNAP (synaptosome-associated protein)-Rezeptoren der präsynaptischen Membran (SNAP-25 und Syntaxin) und der Vesikelmembran (Synaptobrevin). Dies bewirkt eine Hemmung der Acetylcholin (AcCH)-Sekretion an der Zielzelle.

Die katalytische Domäne (Zn^{2+} -abhängige Endopeptidase) der BoNT schneidet spezifisch eines von drei Proteinkomponenten, die für die synaptische Vesikelfusion essentiell sind (MONTECUCCO u. SCHIAVO 1994; ARNON 1997).

Je nach Typ spaltet BoNT die Rezeptoren SNAP-25 (synaptosome-associated protein) oder Syntaxin an der präsynaptischen Membran oder Synaptobrevin (VAMP = vesicle-associated membrane Proteins) an der Vesikelmembran (LINIAL 1995; SCHIAVO u. MONTECUCCO 1997; LACY et al. 1998). Diese Spaltung bewirkt die Hemmung der Acetylcholinsekretion (Abb. 3).

2.2. Botulismus

2.2.1 Pathogenese und Epizootiologie

C. botulinum A, B, E, F und G befinden sich als Bodenbakterien überall auf der Welt. Sie vermehren sich im Boden, sofern geeignete Wachstumsbedingungen herrschen. Als Dauerformen (Sporen) überleben sie unter ungünstigen Umweltbedingungen (BÖHNEL 1995).

C. botulinum Typ C und D finden sich auch als normale Bewohner des Intestinaltraktes völlig gesunder Säuger und Vögel, wo sie sich vermehren und über die Faeces bis zu acht Wochen nach Infektion in großen Mengen ausgeschieden werden können (NOTERMANS et al. 1978 a). Sie sind ebenfalls in Schlamm, Meeresschlick und Fischen gefunden worden (SMITH 1977; SMITH u. MORYSON 1975).

Solange *C. botulinum* keine Toxine produziert, bleibt es weitgehend (s.u.) unschädlich.

Unter anaeroben Bedingungen, steigenden Temperaturen und steigendem pH z. B. in verwesendem, eiweißreichen Material (Tierkadaver) kann *C. botulinum* Toxine synthetisieren, die als Exotoxine während der Wachstumsphase ausgeschieden, oder während einer möglichen Versporungsphase freigesetzt werden.

In den letzten Jahren sind vermehrt Fälle beschrieben worden, in denen eine Toxinbildung auch ohne Anwesenheit von tierischem Material erfolgte. In pflanzlichen Materialien wie Grassilage, Biertreber und Braugerste kann ebenso wie charakteristischerweise für menschliche Erkrankungen in Gemüse (v. a. Bohnen) BoNT gebildet werden (BÖHNEL 1995; BÖHNEL 1999).

Vor vielen Jahren wurde Botulismus ausschließlich als eine Lebensmittelvergiftung (klassischer Lebensmittel-Botulismus) angesehen. Diese häufigste Form der Erkrankung wird durch die Aufnahme toxinhaltiger Lebens- bzw. Futtermittel (Intoxikation) verursacht.

Andere Erkrankungsformen von Botulismus sind Infektionen durch sich in Wunden vermehrende Toxinbildner (Wundbotulismus) oder Toxinbildung im Darm nach intestinaler Kolonisation (intestinale Toxikation/Säuglingsbotulismus) von *C. botulinum* (DOWELL 1984; ONDERDONK u. ALLEN 1995).

Die Epizootiologie des Botulismus ist in ihren Grundzügen in Abb. 4 wiedergegeben.

Das klinische Bild des Botulismus ist geprägt durch die Wirkung des Neurotoxins, unabhängig vom Ort der Toxinbildung und führt zu einer schlaffen Lähmung der Muskulatur, die ggf. zum Tode durch Kreislaufversagen und Ersticken führt. Intensität und Verlauf der Erkrankung hängen von der Menge des aufgenommenen Toxins ab.

Alle Formen können sowohl Mensch und Tier betreffen (CRITCHLEY 1991).

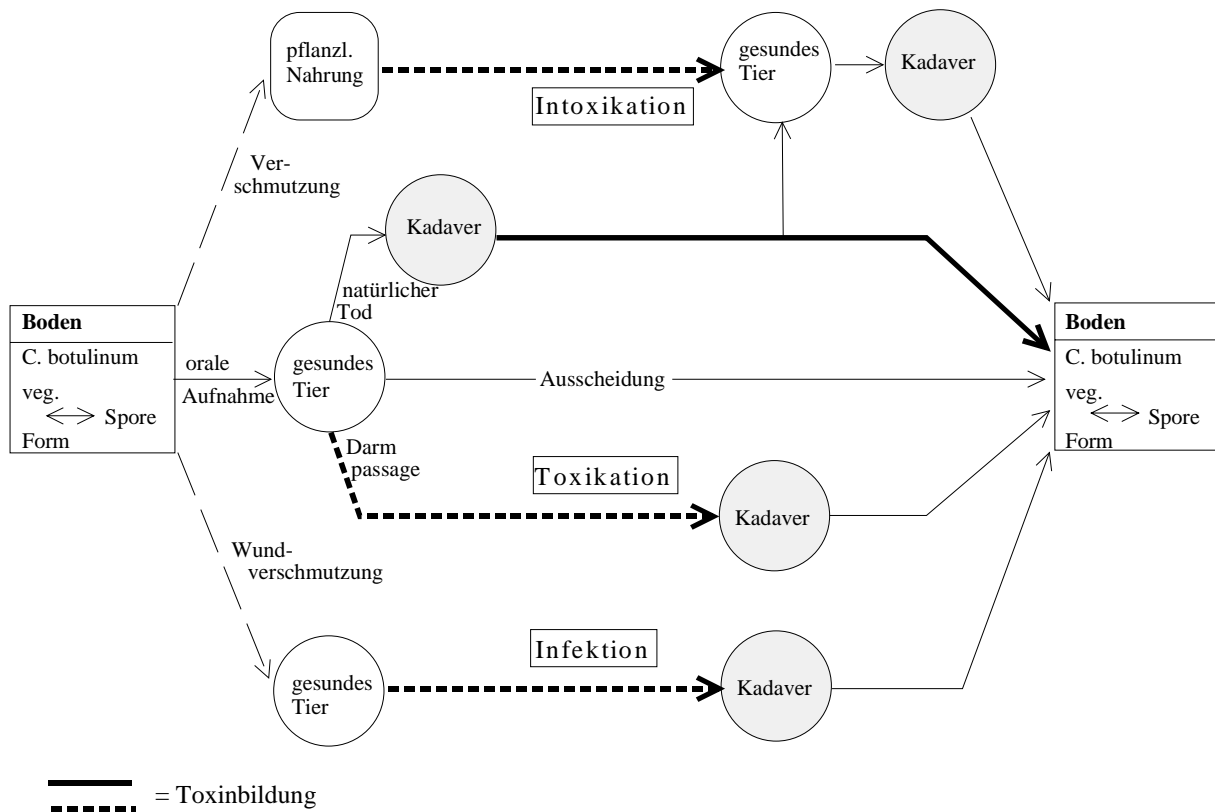


Abb. 4. Grundzüge der Epizootiologie des Botulismus bei Tieren (mod. nach BÖHNEL 1995)

2.2.1.1 Botulismus beim Wiederkäuer

Mit Einschränkungen über das möglicherweise weltweite Vorkommen der verschiedenen *C. botulinum*-Typen, werden beim Rind hauptsächlich die Toxintypen C1 und D (ABBITT et al. 1984; BENNETTS u. HALL 1938; HAAGSMA 1991) für Botulismuserkrankungen verantwortlich gemacht. In Argentinien traten jedoch auch Todesfälle durch die Typen A und D auf, 1990 wird über einen Ausbruch von Typ A bei Zebus in Brasilien berichtet (BÖHNEL 1995; SEIFERT 1992, 1996). Obwohl berichtet wird, daß die Typen B und E apathogen für Rinder sind, konnten in eigenen Untersuchungen die Typen A-E identifiziert werden (BÖHNEL et al. 1996; BÖHNEL 1999).

Botulismus ist eine klassische Seuche der ariden und semiariden Weidegebiete der Tropen und steht im Zusammenhang mit der Phosphorarmut des Bodens. Da auch pflanzliche Nahrung entsprechend mineralarm ist, versuchen Rinder und Schafe instinktiv ihren Mineralstoffbedarf durch Aufnahme phosphorhaltiger organischer Substanz tierischen Ursprungs zu decken, d.h. sie knabbern an Kadaverresten und Knochen verendeter Tiere

(Osteophagie). Auch tote Kleinsäuger und Vögel, für die *C. botulinum* Typ C bzw. D offenbar zur normalen Darmflora gehört, stellen die wichtigsten Intoxikationsquellen dar (SEIFERT 1992, 1996). Ist erst ein Tier einer Herde an Botulismus verendet, so wird dessen Kadaver für die anderen Tiere der Herde zu einer tödlichen Mineralstoff- und Toxinquelle.

Diese Form von Botulismus, die jährlich viele tausend Oper fordert, tritt v. a. in Südafrika, Australien, aber auch in Teilen der USA und manchen anderen außereuropäischen Ländern unter ursprünglich verschiedenen Namen (toxische Bulbärparalyse, Lamziekte, loin disease) auf (ROSENBERGER 1970; ONDERDONK u. ALLEN 1995).

In mitteleuropäischen Gebieten gilt Botulismus eher als ein sporadisches Ereignis und tritt bei Wiederkäuern vornehmlich als Einzeltierkrankung infolge von Futtermittelvergiftungen auf. Ursache sind Kadaver von Kleintieren (meist Katzen, Nager), die zufällig und unbemerkt in das Futter (Heu, Silage) gelangen.

Es wird jedoch eine steigende Inzidenz beobachtet, die unter anderem durch die modernen Methoden bei Futteranbau und -werbung, sowie der Silagebereitung begünstigt wird (BEHRENS u. BÖHNEL 1995; BEHRENS 1996; BÖHNEL et al. 1996; KEHLER u. SCHOLZ 1996; BÖHNEL 1999).

Strohwerbung und Silagebereitung in Rundballen schaffen anaerobe Bedingungen, die zur Toxinbildung durch *C. botulinum* notwendig sind. So berichten WILSON et al. (1995) von einer Botulismusintoxikation bei Rindern nach Aufnahme von „eingepacktem Rundballenheu“, bei der 8 von 12 erkrankten Tieren verendeten. Als Ursache kommen tierische Kadaver oder Verschmutzungen mit Erde in Frage (RICKETTS et al. 1984; KELLY et al. 1984; DIVERS et al. 1986; KINDE et al. 1991; WICHTEL u. WHITLOCK 1991), denn in dem durch Hochdruck verdichteten Futter kann es zu einer massenhaften Vermehrung der Erreger kommen.

Im Raum Nordhessen traten seit Sommer 1991 mehrere hundert Todesfälle bei Rindern auf, deren Ursache zunächst ungeklärt blieb. In Zusammenarbeit mit dem Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Nordhessen konnte durch Toxinnachweis im Institut für Tropentierhygiene die von der Tierärztlichen Hochschule Hannover gestellte klinische Verdachtsdiagnose Botulismus bestätigt werden (BEHRENS 1996).

Die zunächst unbekannte Herkunft des regional gehäuft auftretenden toxischen Agens konnte bald geklärt werden: allen Betrieben war der Einsatz von Hühnermist oder Tiefstreu aus der

Geflügelhaltung zur Düngung der Futterflächen gemeinsam (BECKER¹; KEHLER u. SCHOLZ 1996).

Aus Literaturberichten sind ätiologische Zusammenhänge zwischen der Entsorgung von Hühnermist zur Düngung von Futterflächen und Botulismusintoxikationen bei Rindern bekannt (APPLEYARD u. MOLLISON 1985; SMART et al. 1987; HOGG et al. 1990).

Es wird vermutet, daß Sporen von *C. botulinum* über die Komponenten Tierkörper, Knochenmehl und/oder Fischmehl mit dem Futter den Hühnern zugeführt werden; die Erreger vermehren sich im Caecum der Tiere, ohne bei den Tieren zur Bildung von letal wirkendem Toxin zu führen. Es kommt zur Anreicherung von Sporen/Toxin im Kot. Durch wiederholte Düngung der Felder kommt es wiederum zu einer Anreicherung der Sporen auf den Feldern bzw. Futterflächen, von denen die Tiere beim Grasens direkt, oder über die Futterwerbung *C. botulinum* aufnehmen. (BÖHNEL 1995; BEHRENS 1996; BÖHNEL 1999)

Auch epizootologisch ähnliche, aus Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen gemeldete Botulismus-Ausbrüche bei Rindern sind vermutlich auf den Einsatz von Hühnermist zur Düngung der Futterflächen zurückzuführen.

Die in manchen Ländern übliche, in Deutschland nicht zugelassene Verwendung von Hühnermist als Rinderfutter führt zu seuchenhaften Verlusten in der Rinderhaltung. Bei einem Ausbruch in Israel verendeten 34 % von 1000 Rindern an Typ D (EGYED et al. 1978), in Irland erkrankten mehr als 80 von 150 Rindern, von denen 68 verendeten (Typ C) (MCLOUGHLIN et al. 1988; NEILL et al. 1989). Nach der Einstreu von Hühnermist in Liegeboxen kam es in Holland ebenfalls zu Todesfällen durch Typ D, nachdem Rinder Reste von Hühnerkadavern aufgenommen hatten (BONGERS et al. 1988).

Klinische Symptome einer Botulismusintoxikation beim Rind sind allmählich zunehmende Kau- und Schluckbeschwerden sowie Bewegungsstörungen. Die schlaffe Lähmung der Schlund- und Kaumuskulatur bewirkt eine verzögerte Futteraufnahme, Priemen, Speicheln, in fortgeschrittenen Fällen den Vorfall der Zunge. Das Maul läßt sich widerstandslos öffnen, das Betasten der Ohrmuschelinnenseite löst keine Abwehrbewegungen (Ohrenschlagen, Kopfschütteln) mehr aus. Gleichzeitig mit den Schlingstörungen zeigen die Tiere einen steifen, unsicheren Gang und eine vermehrte Neigung sich hinzulegen. Nach 1-3 d kommt es zum Festliegen in Halbseitenlage. Das Tier wird zunehmend teilnahmslos und verendet nach vollständiger Lähmung der Atemmuskulatur (ROSENBERGER 1970; ONDERDONK u. ALLEN 1995).

¹ BECKER, W., pers. Mitt. 8.9.1994, Hofgeismar

Bei perakuten Todesfällen von Rindern wird das Tier verendet aufgefunden, ohne daß Krankheitszeichen festgestellt worden wären.

Auch wird über das Auftreten von „atypischen“ Verlaufsformen berichtet, die durch Lähmungen der Hinterhand bis zum Festliegen gekennzeichnet sind. Da Lähmungen von Zungen-, Kau- und Schluckmuskulatur ausbleiben, bleibt die Futteraufnahme unbeeinträchtigt. Nach einigen Wochen Krankheitsdauer können die Tiere wieder gesunden (BRENTROP 1996; KEHLER u. SCHOLZ 1996).

Seltener treten Intoxikationen bei Schaf und Ziege auf, wobei die klinischen Symptome denen des Rindes ähneln (BENNETTS u. HALL 1938; VAN DE LUGT et al. 1995). Im Allgemeinen sind die ersten und typischsten Zeichen ein aufgekrümmter Rücken mit gelähmt herunterhängendem Schwanz, Kopf und Nacken. Lähmungen der Kau- und Schluckmuskulatur werden bei der Ziege selten beobachtet (KRIEK u. ODENDAAL 1994).

2.2.1.2 Botulismus beim Pferd

Beim Pferd, das gegenüber allen BoNT-Typen sehr empfindlich ist (SMITH 1957) kommt es ebenfalls am häufigsten durch die Aufnahme toxischer Futtermittel zur Botulismus-Intoxikation (RICKETTS et al. 1984).

Als Futtermittel-Intoxikationen kommen v. a. Typ C (KINDE et al. 1991) und Typ B (RICKETTS et al. 1984; SMITH u. MURRAY 1984; BÖHNEL et al. 1996) vor. Diese Autoren berichten über Erkrankungen nach dem Verzehr von verdorbenem Hafer, Kartoffeln, Heu (KINDE et al. 1991) und Silage (RICKETTS et al. 1984). Auch hier gelangten BoNT über Erdboden, Kadaver kleiner Säugetiere und Vögel, sowie Hühnerdung in die Futtermittel. Es handelt sich dabei i.d.R. um Einzeltierkrankungen. Sie können jedoch auch gehäuft auftreten wenn mehrere Tiere das selbe verdorbene Futter (oder Wasser) aufgenommen haben.

Einen Typ B-Ausbruch beschreiben DIVERS et al. (1986) nach der Verfütterung von Silage an Maultiere.

Klinische Zeichen beginnen mit unsicherem Gang, Kopf und Hals werden hängen gelassen, Speichel tropft aus dem Maul, Futter kann aus dem Maul, teilweise auch aus den Nüstern austreten. Nach Festliegen und Hypomotilität kommt es zu Koliken, die Tiere verenden nach 18 Stunden bis 6 Tagen (HARTIGAN 1985).

Unter Shaker foal syndrome (Schüttelsyndrom bei Fohlen) wird eine neuromuskuläre paralytische Erkrankung 2-4 Wochen alter Fohlen bezeichnet, bei denen es nach oraler Aufnahme von *C. botulinum* B zur intestinaler Kolonisation und zur Toxinbildung kam. Nach Resorption des Toxins endet die Krankheit i.d.R. 24-72 Stunden nach Auftreten der ersten klinischen Symptome tödlich (SWERCZEK 1980 a, b; HARTIGAN 1985; KRIEK u. ODENDAAL 1994).

Beim Pferd wird außerdem über eine Form des Wundbotulismus nach offener Kastration berichtet (BERNARD et al. 1987).

2.2.1.3 Botulismus beim Schwein

Das Schwein wird als relativ resistent gegenüber BoNT angesehen (SMITH et al. 1971). BEIERS und SIMMONS (1967) berichten über einen Ausbruch von Botulismus (Typ C) bei Sauen nach Aufnahme toter Fische aus einer Lagune in Queensland. Schlaaffe Paralyse und die Unfähigkeit, Futter und Wasser aufzunehmen werden als klinische Symptome beschrieben (BLOOD u. RADOSTITS 1989).

2.2.1.4 Botulismus beim Fleischfresser

Fleischfresser sind mit Ausnahme der marderartigen relativ unempfindlich gegenüber Botulinumtoxin (SMITH 1977).

Katzen sind gegen Toxintyp C sehr resistent und können durch den Verzehr infizierter Vögel und Kleinnager größere Mengen Toxin aufnehmen, ohne selbst zu erkranken. Katzenkot kann erhebliche Mengen Toxin enthalten, Verunreinigungen des Heus durch solcherart kontaminierten Katzenkot hält BOTIJA (1954) als eine der Hauptursachen für Botulismusausbrüche bei Pferden in Spanien.

Beim Hund werden Botulismusfälle durch Typ A (SMITH 1957) und Typ C (BLAKEMORE et al. 1977; BARSANTI et al. 1978; RICHMOND et al. 1978) beschrieben, wobei in diesen Fällen das Toxin durch den Verzehr von rohem Hühnerfleisch aufgenommen wurde.

Die klinischen Zeichen sind ebenfalls die einer fortschreitenden Paralyse, Koordinationschwierigkeiten beim Laufen und bei der Kopfhaltung (SMITH 1957, 1977).

Schwere Verluste wurden dagegen regelmäßig bei Nerzfarmen gemeldet, ebenso bei Frettchen, die insbesondere für den Typ C außerordentlich empfänglich sind (DINTER und KULL 1955 a, b).

2.2.1.5 Botulismus beim Vogel

Die zahlenmäßig größten Verluste durch Botulismus treten beim Wildgeflügel auf. So starben beispielsweise 1983 bei einem Massenausbruch an der Wesermarsch ca. 40000 Vögel (WESTPHAL 1991).

Für praktisch alle Botulismusausbrüche bei Wild- und Hausgeflügel ist *C. botulinum* Typ C verantwortlich, ausnahmsweise können aber auch die Typen A und E beteiligt sein, wobei dabei verseuchte Fische als Toxinquelle anzusehen sein dürften (WESTPHAL 1991).

Gegen die Typen B, D, F und G sollen Vögel resistent sein (HAAGSMA 1987), können aber diese Typen weiter verbreiten.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit einzelner Arten gibt es teilweise erhebliche Differenzen: so sind beispielsweise Fasanen viel empfindlicher als Hühner. Greifvögel, Krähen und Möwen besitzen eine gewisse Resistenz gegenüber BoNT (OHISHI et al. 1979).

In der Geflügelhaltung stellt wie bereits oben erwähnt Typ-C-Botulismus ein großes Problem dar. Im Caecum der Tiere kommt es zu einer Anreicherung von *C. botulinum* mit nachfolgender Toxinbildung, ohne daß die Tiere selbst daran erkranken (WESTPHAL 1991). Nicht nur Futter oder Einstreu enthalten *C. botulinum*, auch Fliegenmaden können *C. botulinum* transportieren: in Fasanerien kommt es gelegentlich zu seuchenhaften Verlusten, wenn entweder verdorbene Fleischabfälle oder kommerziell gezogene Fliegenmaden verfüttert werden, die *C. botulinum* und das entsprechende Toxin beherbergen (DINTER u. KULL 1954; SMITH u. MORYSON 1975).

Aasfresser gelten ganz allgemein als ziemlich widerstandsfähig gegen Botulinumtoxine.

Es wird angenommen, daß aasfressende Vögel und Säuger über eine angeborene Resistenz unbekannter Natur verfügen. Die Ergebnisse von OHISHI et al. (1979) lassen vermuten, daß diese Tiere durch zirkulierende Antikörper geschützt sind. Ob die AK-Bildung auf eine orale Toxinaufnahme oder auf Toxinproduktion nach intestinaler *C. botulinum*-Besiedlung zurückzuführen ist, ist nicht bekannt.

Diese Wirts-Parasit-Beziehung kann wesentlich für die geographische Verbreitung von *C. botulinum* angesehen werden (OHISHI et al. 1979).

Das Krankheitsbild beim Vogel ist eine von hinten nach vorne fortschreitende schlaffe Lähmung zuerst der Beine, dann der Flügel und des Halses, was zu Unsicherheit beim Starten und Landen bis zum Verlust der Flugfähigkeit führt. Hals und Kopf können nur mit Mühe aufrecht gehalten werden („Limberneck“), zunehmend erschwerte Atmung führt zum Erstickungstod. Wassergeflügel, deren Kopf vornüber fällt, ertrinken (WESTPHAL 1991).

2.2.1.6 Botulismus beim Mensch

In der Vergangenheit war der menschliche Botulismus als Lebensmittelvergiftung mit dem Verzehr von ungenügend gereinigten, gesalzenen, geräuchertem oder getrocknetem Fisch und Fleisch assoziiert. Heutzutage geht das größte Risiko von unvollständig erhitzten bzw. hausgemachten Gewürzen, Gemüse und nicht sauren Früchten, Produkten der Hausschlachtungen (Schinken, Blut- und Leberwurst) und unsachgemäßer Zubereitung von Speisefischen und Meeresfrüchten („Volksseuche Japan“) aus (CRITCHLEY 1991; STAIGER-SANZENBACHER 1994; BÖHNEL 1995).

Die meisten Fälle von Lebensmittelvergiftungen werden beim Menschen durch die Typen A (60%), B (30 %) und E (10 %) verursacht (FERRARI u. WEISSE 1995).

Seit 1976 (PICKETT et al. 1976) werden vermehrt Fälle beschrieben, bei denen *C. botulinum* in Form einer Enterotoxämie zum Tode von Kleinkindern geführt haben soll (Säuglingsbotulismus).

Botulismus wird als eine der vielen Ursachen für den plötzlichen Kindstod (SID= Sudden Infant Death oder SIDS= Sudden Infant Death Syndrome) diskutiert. WIGGINTON und THILL (1993) haben in einem Übersichtsreferat bereits 51 Literaturangaben zitiert.

Die meisten Patienten sind im Alter zwischen 6 Wo und 9 Monaten betroffen (FERRARI u. WEISSE 1995). *C. botulinum*-Sporen werden mit kontaminierter Nahrung, hierbei vorzugsweise Honig (ARNON et al. 1979, 1981; FENICIA et al. 1993; SCHOCKEN-ITURINO 1999) aufgenommen, im Darm kommt es zur Vermehrung und Toxinbildung.

Das anscheinend immer häufigere Auftreten von Botulismus beim SID veranlaßte unser Institut zu einer Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Göttingen. Allein im Jahr 1995 erfolgte bei 12 eingesandten Proben 8 mal der Nachweis von *C. botulinum*, in 3 Fällen konnte BoNT/E, in einem Fall BoNT/D nachgewiesen werden (BEHRENS 1996; BEHRENS et al. 1998; BÖHNEL 1999).

Beim Erwachsenen wird ebenfalls über die intestinale Kolonisation mit anschließender Toxinbildung ähnlich dem Säuglingsbotulismus berichtet. In diesen Fällen fanden sich prädisponierend Läsionen des Gastrointestinaltrakts und/oder eine Antibiotika-Therapie. Es wird angenommen, daß diese Prozesse es *C. botulinum* erst ermöglichten, den Darm zu kolonisieren (MCCROSKEY u. HATHEWAY 1988).

Wundbotulismus ist die seltenste Form von Botulismus, durchschnittlich 2 Fälle werden jährlich in den USA gemeldet. Sie treten v. a. im Zusammenhang mit Unfällen und Frakturen auf (FERRARI u. WEISSE 1995) und stellen ebenfalls eine lebensbedrohliche Erkrankung dar.

Die Erkrankung wird ausgelöst, wenn *C. botulinum* allein oder mit anderen Mikroorganismen eine Wunde infiziert und Toxin produziert, das über das Blut resorbiert wird und andere Teile des Organismus erreicht (MECHEM u. WALTER 1994). Lebensmittel sind bei diesem Krankheitstyp nicht involviert.

Die neurologischen Ausfälle betreffen beim Menschen häufig zuerst die Hirnnerven mit ophthalmologischen Störungen (Doppelbilder, Akkomodationsstörungen und Ptose), Sprech- und Schluckstörungen. Mundtrockenheit, Harnverhaltung und Darmträgheit bis hin zum Ileus sind Zeichen der gehemmten cholinergen Übertragung. Viele Patienten leiden an Übelkeit und Erbrechen. Es kann zu symmetrischen Lähmungserscheinungen bis hin zur lebensbedrohlichen Atemlähmung kommen (STAIGER-SANZENBACHER 1994).

Der Botulismus des Menschen ist eine nach dem Bundesseuchengesetz meldepflichtige Erkrankung.

BoNT wird in der Humanmedizin auch zur Behandlung von Störungen der neuromuskulären Reizübertragung wie fokalem Strabismus, Dystonie, Blepharospasmus, Spasmus hemifacialis und Torticollis (SCOTT 1981; ELSTON 1988; BENECKE u. KESSLER 1995) therapeutisch eingesetzt. Durch lokale Injektionen geringer Toxinmengen wird eine Muskelschwäche induziert, die weitgehend auf den behandelten Muskel beschränkt bleibt. Die klinische Wirkung der BoNT-Injektion klingt nach ca. 3 Monaten ab und erfordert i.d.R. einen weiteren Behandlungszyklus (HAMBLETON et al. 1992).

Verschiedene Studien ergaben, daß diese wiederholten Injektionen bei vielen Patienten zur Bildung spezifischer Antikörper gegen das applizierte Toxin führten, wodurch die Wirksamkeit der Behandlungen mit der Zeit abnahm bzw. zum Versagen der Therapie führte (GREEN et al. 1994; JANKOVIC u. SCHWARTZ 1995; WOHLFARTH et al. 1996).

2.2.2 Therapie

Zwar ist in der Humanmedizin die Inzidenz dieser Erkrankung gering, die Mortalitätsrate ist jedoch hoch, sofern nicht unverzüglich geeignete Maßnahmen ergriffen werden. Die Therapie muß unverzüglich nach der klinischen Diagnose, nicht erst nach Erhalt der Ergebnisse der Labordiagnostik erfolgen (HATHEWAY 1995).

Die spezifische Therapie beinhaltet die Gabe multivalenter Antitoxine, die die Bindung des BoNT an die Nervenendigungen verhindern. Die Gabe des Antitoxins muß schnell erfolgen, denn es kann das Toxin, wenn es einmal an die Rezeptoren der Nervenendigungen gebunden hat, nicht mehr neutralisieren.

Über die CDC² kann trivalentes Antitoxin bezogen werden. Es enthält jeweils 10000 I.U. Antitoxin der Typen A, B und E (HATHEWAY 1995).

In der Tiermedizin stellt sich die Frage der Therapie meist nur bei erkrankten wertvollen Einzeltieren.

Für die spezifische Therapie des Botulismus sind für die Typen C und D in Südafrika, für Typ B bei Pferden in den U.S.A. therapeutische Antitoxine erhältlich, die in frühen Stadien der Erkrankung die Wirkung des Toxins aufheben können.

In Ermangelung einer kausalen Therapie werden in der Tiermedizin folgende symptomatische Maßnahmen eingesetzt: Flüssigkeits- und Elektrolytersatz, abführende Medikamente, Antibiotika und festliegergerechte Aufstallung (KEHLER u. SCHOLZ 1996).

Der Einsatz von Antibiotika wird in der Literatur kontrovers diskutiert: im Allgemeinen erscheint der Einsatz von Antibiotika nutzlos, da es sich um eine Intoxikation handelt. Bei Infektionen oder Toxikation können zwar die Bakterien gegebenenfalls antibiotisch beeinflusst werden, die bereits freigesetzten Toxine lassen sich aber davon nicht beeinflussen (BÖHNEL 1995). Beim Säuglingsbotulismus wird der systemische Antibiotikaeinsatz nicht empfohlen, weil freigesetztes Toxin während der Zellyse im Darm die Symptomatik verschlimmern könnte (ARNON 1992).

2.2.3 Prophylaxe

² Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 3033, U.S.A.

Weil ein einziges Protein für die klinischen Symptome verantwortlich ist, kann der Erkrankung durch toxinspezifische Antikörper vorgebeugt werden. Diese toxinneutralisierenden Antikörper können passiv durch Behandlung mit Antikörpern von immunisierten Spendern oder aktiv als ein Resultat der Immunisierung mit Toxoiden erworben werden (SCHIAVO u. MONTECUCCO 1997).

Die aktive Immunisierung gegen Botulismus wird v.a. durchgeführt, um Tiere wie Nerze, Rinder und Schafe in ständig gefährdeten Gebieten zu schützen.

In tropischen Gebieten wie Südafrika oder Australien werden mono- und bivalente Impfstoffe der Typen C und D in großer Zahl erfolgreich eingesetzt.

Der australische Impfstoff verleiht nach einmaliger Applikation bereits nach 2 Wochen eine gute Immunität, die 24 Monate anhält (BLOOD u. RADOSTITS 1989). Bei dem südafrikanischen Produkt wird eine jährliche Wiederholungsimpfung empfohlen (Herstellerangabe: VACCINE FACTORY ONDERSTEOORT 1995).

Eine genaue Beschreibung zur Herstellung und Evaluierung des Impfstoffes ist bei JANSEN et al. (1976) gegeben.

Neben den Immunisierungen gehören aber v.a. in der Nutztierhaltung entsprechende Managementmaßnahmen in Bezug auf Auffinden von Kadavern (Weide, Heuboden, Futterlager), Futterwerbung und Haltung großer Tierzahlen (einschließlich der unschädlichen Beseitigung der anfallenden Exkrememente) zur Prophylaxe. Bis zur Klärung der Herkunft des toxischen Agens sollten Weide- und/oder kompletter Futterwechsel vorgenommen werden (KEHLER u. SCHOLZ 1996).

Die durch Phosphormangel v.a. in tropischen Gebieten erzeugte Osteophagie bei Rindern kann durch Zufütterung von Phosphor verhindert werden (SEIFERT 1992, 1996).

Beim Menschen wird ein pentavalenter Toxoid-Impfstoff (zu beziehen über die CDC) in der Regel nur bei besonders gefährdetem Laborpersonal eingesetzt (KOZAKI et al. 1989 a).

2.3. Nachweismethoden von *C. botulinum* und seinen Toxinen

Der Nachweis von *C. botulinum* bzw. BoNT ist sowohl aus diagnostischer als auch forensischer Sicht erforderlich. Die Diagnostik ist notwendig, um im Falle von Botulismuserkrankungen bei Mensch und Tier geeignete Therapiemaßnahmen (spezifische Antiseren) ergreifen sowie Gefährdungspotentiale erkennen (Lebensmittel, Futtermittel) und beseitigen

zu können. Rechtliche Fragen, z. B. bzgl. Produkthaftung (Hersteller oder Lieferant der Lebens- bzw. Futtermittel, Hühnerdung etc.) oder Entschädigungszahlungen durch die Tierseuchenkasse sind ebenfalls nur nach genauer Ermittlung der Ursache der Erkrankungen/Todesfälle zu klären.

Sowohl der Nachweis als auch die Differenzierung BoNT-produzierender Bakterien auf der Basis bakteriologischer Charakteristika ist schwierig und klärt in der Regel nicht die oben angeführten Fragen, da es sich bei Botulismus um eine Intoxikation handelt. Somit ist der BoNT-Nachweis nötig. Dieser erfolgt in der Regel mit der gegenwärtig sensitivsten Standardmethode - dem Toxinnachweis in der Maus. Es wurden diverse *In vitro*-Methoden (Präzipitationstest, Hämagglutination, Komplementbindungsreaktion, Enzym-Immuno-Assay) entwickelt, aber nur wenige immunologische, chemische und biochemische Methoden für den Nachweis von *C. botulinum* und dessen Toxinen kommen der Empfindlichkeit und Spezifität der Mäusebestimmung nahe (BÄTZA 1983; NEAVES u. GIBBS 1983; NOTERMANS u. NAGEL 1989; FACH et al. 1995).

2.3.1. Erregernachweis

2.3.1.1 Gaschromatographie

Mittels gaschromatographischer Analysen können zum einen kurzkettige (flüchtige) Fettsäuren und Alkohole, zum anderen zelluläre (langkettige) Fettsäuren erfaßt werden. Kurzkettige Fettsäuren sind genetisch determinierte „Schlüssel-Charakteristika“ anaerober Bakterien (ALLEN et al. 1995).

GIERCKE-SYGUSCH (1987) konnte mittels Dampfraumchromatographie (Headspace-Technik) die proteolytischen *C. botulinum* A, B und F sowohl von *C. botulinum* G (zusammen mit *C. sporogenes*) als auch von *C. parabotulinum* abgrenzen. Durch Veresterung langkettiger Fettsäuren mit Methanol und zusätzliche Analyse der Gärungsprodukte ließen sich die Stämme einzelner Typen von *C. botulinum* nicht trennen (HEITEFUß 1991). Im Gegensatz dazu brachte ein Methylierungsverfahren mit Ätherextraktion mit einer kommerziellen Hard- und Software (Microbial Identification System, MIS) eine gute Zuordnung einzelner, aber nicht aller Stämme (GHANEM et al. 1991). 74-100 % der untersuchten *Clostridium spp.* wurden korrekt identifiziert. BoNT-produzierende Stämme von *C. baratii* und *C. butyricum* konnten von *C. botulinum* abgegrenzt werden, 17 % von *C. sporogenes* wurden jedoch fälschlicherweise als *C. botulinum* A bzw. B identifiziert.

2.3.1.2 Chemische und biochemische Methoden

Auf der Basis biochemischer Eigenschaften von *C. botulinum* erfolgte von SMITH und HOBBS (1974) die Einteilung der Spezies in vier metabolische Gruppen (I-IV), denen allerdings noch andere Clostridien zugeordnet werden. Einige StoffwechsellLeistungen sind bereits in Kap. 2.1.2 beschrieben, deshalb soll an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen werden.

Die Charakterisierung der Clostridien auf Basis der Kohlehydrat-Fermentation mit traditionellen biochemischen Tests („Bunte Reihe“) sind übliche Laborstandards.

Alternativ kann die Charakterisierung in „miniaturisierten“ Systemen (API-ZYM, API An-Ident, Minitek, ATB 32 A Anaerobes ID etc.) erfolgen. Diese Systeme verwenden eine Vielzahl chromogener Substrate, um Aminopeptidasen/Glucosidasen zu testen. Sie sind einfach im Gebrauch, bequem und schnell, zur alleinigen Identifizierung von *C. botulinum* sind diese Testsysteme nach LINDSTRÖM et al. (1999) nicht geeignet. Ohne weiterführende Unter-

suchungen beträgt die Erkennbarkeit/Sicherheit für *Clostridium spp.* nur 60-70 % (APPELBAUM et al. 1983; NICULESCO et al. 1985; ALLEN et al. 1995). Koloniemorphologie, Katalase, Lipase- und Lezithinase sowie Proteolyse auf Eigelbagar nach MCCLUNG und Nitratreduktion müssen als weitere Merkmale für eine exakte Identifizierung noch immer erfaßt werden (ALLEN et al. 1995; ONDERDONK u. ALLEN 1995).

OGUMA et al. (1986) klassifizierten 11 toxische und 10 atoxische Stämme von *C. botulinum* C und D aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften. Die Ergebnisse variierten beträchtlich, v. a. bei der Lipase- und Lezithinasebildung. Die Typen C und D gruppierten in alle 4 metabolische Gruppen ein.

Die durch verschiedene Untersucher beschriebenen unterschiedlichen Ergebnisse identischer Stämme von *C. botulinum* könnten nach OGUMA et al. (1986) auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden der verschiedenen Labors zurückzuführen sein.

Aber auch unter gleichen Untersuchungsbedingungen variieren die chemischen und biochemischen Eigenschaften verschiedener *C. botulinum*-Stämme erheblich. Eine Ausführliche Abhandlung darüber findet sich bei LOCH (1999).

Im Gegensatz zu anderen Clostridien ist die Differenzierung der einzelnen Typen von *C. botulinum* durch biochemische Methoden noch nicht befriedigend gelöst (BÖHNEL 1995).

2.3.1.3 Immunfluoreszenz

Es existieren 2 Immunfluoreszenz-Techniken, die direkte und die indirekte. Bei der direkten Technik werden Oberflächenantigene vegetativer Zellen oder Sporen durch spezifische, fluoreszierende Antikörper gebunden und mittels ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Bei der indirekten Technik bindet ein nicht markierter Antikörper an das Oberflächenantigen. Diese Bindung wird durch einen sekundären, markierten Antikörper nachgewiesen. Die indirekte Bindung hat eine höhere Sensitivität, da der spezifische Antikörper mehrere Epitope aufweist, an die die fluoreszierenden Antikörper binden können (NEAVES u. GIBBS 1983).

WALKER und BATTY (1964) gelang die Differenzierung proteolytischer und nicht proteolytischer Stämme von *C. botulinum* mittels Immunfluoreszenz. Kreuzreaktionen traten aber sowohl zwischen den Typen A, B und F, als auch zwischen den Typen C und D auf. RIEMANN (1967) konnte toxische vegetative Zellen von Typ E von atoxischen Stämmen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (Antitoxin vom Pferd) differenzieren. INUKAI und

RIEMANN (1968) verwendeten Anti-Pferd-IgG von Kaninchen und konnten mit dieser geänderten Technik toxische, atoxische und mindertoxische Stämme differenzieren. Der Nachweis fluoreszierender Zellen gelang ihnen z. B. in sehr jungen Kulturen (6 h), die in der Maus weniger als 100 MLD aufwiesen. Kreuzreaktionen mit anderen Toxintypen oder anderen *Clostridia spp.* wurden nicht beobachtet.

Vegetative Zellen toxischer *C. botulinum* Typ E-Kulturen wurden von AALVIK et al. (1973) mit Antitoxin gegen hochgereinigtes Toxin spezifisch gefärbt, Kreuzreaktionen wurden mit dieser direkten Immunfluoreszenztechnik nicht beobachtet.

2.3.1.4 PCR

Nachdem die Nukleotid-Sequenzen der strukturellen Gene der BoNT/A-F bekannt waren, war es möglich, die Toxin-Gene in diesen Organismen mittels PCR nachzuweisen.

FRANCIOSA et al. (1994) testeten 238 Stämme von *Clostridium spp.* auf die Anwesenheit von A, B und E-BoNT-Genen. Alle 79 untersuchten *C. botulinum* A-Stämme, 77 Typ B-Stämme und 51 Stämme, die BoNT E produzieren (incl. *C. butyricum*), waren positiv in der PCR. 8 Stämme, die BoNT/C, D, F und G produzieren, sowie 18 von 20 atoxischen Organismen waren gegenüber den drei untersuchten Toxin-Genen in der PCR negativ.

Nach Meinung der Autoren bietet die PCR eine hilfreiche Ergänzung, könne aber andere Methoden der Diagnostik des Botulismus nicht ersetzen.

Mittels PCR wiesen FACH et al. (1995) *C. botulinum* A, B, E, F und G-Gene in künstlich kontaminierten Lebensmitteln nach ($10 \cdot 10^3$ Bakterien/g). Die Korrelation der PCR-Ergebnisse mit dem Maus-Bioassay betrug bei 84 Lebensmitteln 95,6 %.

C. botulinum-Stämme der Typen A-E sowie nahe verwandter Stämme wurden von SZABO et al. (1993) untersucht. Neurotoxin-produzierende Stämme konnten ohne Auftreten von Kreuzreaktionen von genotypisch verwandten atoxischen Organismen und nicht verwandten Stämmen unterschieden werden. Die Sensitivität des Tests variierte abhängig vom Typ, erreichte aber teilweise 10 fg (Typen A, B und E), was annähernd 3 Clostridien-Zellen entspricht. TAKESHI et al. (1996) erreichten für den Nachweis der Neurotoxin-Gene-Typ A-F eine ähnliche Sensitivität.

Bei künstlich mit *C. botulinum* A, B und E kontaminierten Lebensmitteln, Bodenproben und Stuhlproben von Säuglingen (SZABO et al. 1994 a), sowie bei einem Fall von Botulismus beim Pferd (SZABO et al. 1994 b) wurde die PCR ebenfalls erfolgreich eingesetzt und bestätigte die Ergebnisse des Maus-Bioassays.

2.3.2 Toxinnachweis

2.3.2.1 *In-vivo*-Methoden

2.3.2.1.1 Maus-Bioassay

Zum Nachweis von BoNT ist die Maus das empfindlichste und spezifischste Versuchstier. Der Nachweisbereich für Botulinum-Neurotoxine (BoNT) liegt bei 5-10 pg/mL (DOELLGAST et al. 1993) bzw. 10-20 pg/mL (HALLIS et al. 1996). Abhängig von den verwendeten Mäusestämmen, Haltungsbedingungen und Durchführungstechniken können die Ergebnisse um das 5-10fache abweichen (SCHANTZ u. KAUTTER 1978). Die i.p. Applikation verdächtigen/toxinhaltigen Materials stellt wegen einfacher Durchführbarkeit und guter Reproduzierbarkeit die Methode der Wahl dar (NOTERMANS u. NAGEL 1989; HATHEWAY 1995).

Extrakte einer toxinhaltigen Probe bzw. Kulturüberstände werden mindestens 2 Mäusen i.p. injiziert, die bei Anwesenheit von BoNT unter typischen Zeichen („Wespentaille“, Cheyne-Stokes-Atmung) innerhalb von 96 h an Botulismus verenden.

Die anschließende erfolgreiche Neutralisation des Toxins in weiteren Tieren mit spezifischen Antitoxinen ist beweisend für die Anwesenheit von BoNT. Technische Einzelheiten zur Toxinneutralisation finden sich bei POPOFF (1989), NOTERMANS und NAGEL (1989) bzw. DIN 10102 (1988).

Im Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz §35 (1988) und in der entsprechenden DIN-Norm 10102 ist bei der Untersuchung von Lebensmitteln tierischer Herkunft die Toxinneutralisation zwingend vorgeschrieben, ebenso wie bei der Qualitätskontrolle von Impfstoffen zur Anwendung beim Menschen (Typ A, B, E) und von Antiseren zur Anwendung am Tier (Typ C, D) (DEUTSCHES ARZNEIBUCH 1998).

Die Toxinmenge wird quantifiziert durch entsprechende Toxin-Verdünnungen, wobei hier i.d.R. 5 Mäuse pro Verdünnungsstufe benötigt werden. Die Verdünnungsstufe, bei der 50% der Versuchstiere verenden (LD_{50}) wird nach der Methode von REED und MÜNCH (1938) ermittelt. Bei der ungenaueren MLD (Mäuse Letale Dosis) werden nur 2 Mäuse pro Toxinverdünnung eingesetzt (NEAVES u. GIBBS 1983).

Ein modifizierter Maus-Bioassay wurde von BOROFF und FLECK (1966) zur Titration von Typ A-Toxin beschrieben. Nach i.v. Applikation der Toxine an Mäuse war eine deutliche Beziehung zwischen Toxindosis und Todeszeitpunkt zu beobachten. Ähnliche Beobachtungen machten auch LAMANNA et al. (1970) für BoNT/A und MAYORGA et al. (1987) für BoNT/G.

Im Vergleich zu dem herkömmlichen Maus-Bioassay, bei dem die letale Wirkung des Toxins ermittelt wird, haben SESARDIC et al. (1996) den Bioassay „verfeinert“, in dem sie nicht die Letalität einer Probe, sondern den Grad der schlaffen Paralyse der Muskulatur nach s.c. Injektion in die inguicurale Region einer Maus ermitteln. Die in Relation zu präparierten Referenzen erhaltenen Ergebnisse der schlaffen Paralyse korrelierten mit denen des herkömmlichen Bioassays.

Der klassische Nachweis von BoNT durch Toxinneutralisation in der Maus hat viele Nachteile:

er ist zeitaufwendig und es ist eine große Anzahl von Versuchstieren nötig, die einem nicht unerheblichen Leidensdruck unterliegen. Selbst bei frischem Untersuchungsmaterial liefert der Test oft keine eindeutigen bzw. falsch negative oder falsch positive Ergebnisse. Der Maus-Bioassay ist nicht in der Lage, andere toxische Substanzen, die den unspezifischen Tod der Maus bewirken oder mit der Neutralisation interferieren, herauszufinden (DEZFULIAN u. BARTLETT 1984).

2.3.2.1.2 Andere Bioassays

Die Tauglichkeit der Wachtel zum Nachweis von BoNT/A und C wurde von MEHLER (1981) untersucht. Nach intraperitonealer Injektion erwies sich die Wachtel als 21,4 mal unempfindlicher gegenüber Typ A-Toxin, gegenüber Toxin Typ C wies sie hingegen eine 16 mal höhere Empfindlichkeit als die Maus auf. Bei Umrechnung auf das Körpergewicht ergab sich daraus eine 112 mal größere Empfindlichkeit (pro kg KM) der Wachtel gegenüber BoNT/C.

Nach i.m.-Applikation in den *M. gastrocnemius* der Wachtel durch MEHLER (1981) traten spätestens 12 h nach Applikation spezifische Muskellähmungen auf, die noch weit unter dem letalen Grenzbereich i.p. verabreichter Toxinverdünnungen feststellbar blieben (39 pg Protein = 1/5000 Maus i.p. LD₅₀). Gegenüber der i.p. LD₅₀ der Wachtel bedeutete dies für Typ C nochmals eine Steigerung um den Faktor 300.

2.3.2.2 *In-vitro*-Methoden

Zum Ersatz des Tierversuchs wurden verschiedene *In-vitro*-Methoden entwickelt, einige erreichten auch die Sensitivität des Maus-Bioassays (DOELLGAST et al. 1993, 1994 a; SHONE et al. 1985). Die Immunoassays messen jedoch im Gegensatz zu einem Versuchstier in der Regel nicht die biologische Aktivität des Neurotoxins. Außerdem können falsch negative Ergebnisse aufgrund der antigenetischen Variationen innerhalb der einzelnen BoNT-Typen auftreten (HALLIS et al. 1996).

2.3.2.2.1 Gel-Präzipitation-Techniken

Die Reaktion zwischen Toxin und typspezifischem Antitoxin wird durch das Auftreten von Präzipitationsbanden im Agargel sichtbar gemacht, wobei unterschiedlich modifizierte Techniken zur Anwendung kamen.

VERMILYEA et al. (1968) und SONNENSCHNEIN (1973) wiesen BoNT mittels Agargel-Doppeldiffusion nach. Nach Aufkonzentrierung mit Sephadex wiesen VERMILYEA et al. (1968) 370-557 MLD₅₀/mL der Toxintypen A, B und E nach. Als nachteilig erwiesen sich deutliche Kreuzreaktionen zwischen Typ A und B (VERMILYEA et al. 1968; SONNENSCHNEIN 1973; SAKAGUCHI et al. 1974), zwischen Typ B und C bzw. D, zwischen Typ C und D (SONNENSCHNEIN 1973), sowie zwischen Typ E und F und Typ A und F (SAKAGUCHI et al. 1974).

Eine von MESTRANDREA (1974) entwickelte Mikro-Kapillar-Version der Agargel-Diffusion erbrachte eine Nachweisgrenze von minimal 100 MLD/mL nicht trypsinisierten Toxins der Typen A, B und E. Kreuzreaktionen zwischen Typ E-Toxin und A- bzw. B-Antitoxin wurden nicht beobachtet.

Zur Eliminierung von Kreuzreaktionen setzten OGUMA et al. (1980) Antiseren gegen gereinigtes Typ C1-Toxin bzw. partiell gereinigtes D-Toxin ein, wobei aber dennoch Kreuzreaktionen auftraten. Diese Kreuzreaktionen führten die Autoren nicht nur darauf zurück, daß C- und D- Stämme sowohl C1- als auch D-Toxin produzieren, sondern daß C1- und D- Toxine viele Homologien aufweisen.

Eine Modifizierung der Ouchterlony Doppel-Diffusions-Methode ist die deutlich empfindlichere Überwanderungselektrophorese, mit der NUÑEZ et al. (1990) 100 LD₅₀ BoNT/A nachwies. Kreuzreaktionen wurden zwischen BoNT/A und Antitoxinen B und F gefunden, mit Antitoxinen E und G zeigten sich keine Kreuzreaktionen.

2.3.2.2.2 Hämagglutinations-Techniken

Mit Hilfe des passiven Hämagglutinationstests erreichten JOHNSON et al. (1967) eine Empfindlichkeit von weniger als 0,75 MLD₅₀ für Typ A-Toxin. FRANKE (1974) gelang mit Hilfe der passiven Hämagglutination eine Differenzierung der BoNT/A-E mit Nachweisgrenzen im mittleren pg-Bereich, Kreuzreaktionen traten mit Kulturfiltraten von *C. perfringens* Typ C und E, sowie mit *C. sporogenes* und *C. tetani* auf. Von einer Vielzahl von Kreuzreaktionen zwischen Antiseren und heterologen Antigenen wurde ebenfalls berichtet (JOHNSON et al. 1967). SAKAGUCHI et al. (1974) führten Kreuzreaktionen zwischen Toxin-Typ A und B, sowie zwischen Typ A und F im passiven Hämagglutinations-Hemm-Test auf gemeinsame antigenetische (nicht-toxische) Hämagglutinin-Komponenten zurück, während Typ E-F Kreuzreaktionen auf toxischen und nicht-toxischen Komponenten beruhten.

2.3.2.2.3 Komplementbindungsreaktion (KBR)

WEISS und WEISS (1988) setzten die Mikro-WärmeKomplementbindungsreaktion zum Nachweis *C. botulinum*-Toxinen ein. Der Toxinnachweis gelang aus bakterienfrei gefilterten *C. botulinum*-Bouillonkulturen, Organ- bzw. Lebensmittelextrakten oder Blutserum innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 6 Stunden. In einer Blutprobe, die einem Kaninchen 1 Stunde nach oraler Verabreichung eines Toxinfiltrates (ca. 5 MLD je g/KM) entnommen wurde, wiesen die Autoren mittels der KBR eine 0,025 MLD nach, d.h. sie erreichten eine ca. 40 mal größere Empfindlichkeit als in der Maus.

1990 berichteten WEISS et al. über den BoNT/C-Nachweis bei sechs Botulismus-Bestandsenzootien. In Pansensaft und Leber eines verendeten Rindes konnte BoNT/C nachgewiesen werden, während die Blutserum-Probe negativ in der KBR und im Tierversuch war. In einem weiteren Bestand erfolgte der Nachweis von BoNT/C in Serum und Pansensaft von 2 erkrankten Färsen am ersten Krankheitstag, am 4. bzw. 6. Krankheitstag war kein Toxinachweis mehr möglich.

DUTRA et al. (1993) untersuchten in Brasilien nach der von WEISS und WEISS (1988) beschriebenen Mikro-Wärmekomplementbindungsreaktion Blutserum-, Pansensaft- und Leberproben bei 23 akut, subakut bzw. chronisch an Botulismus erkrankten bzw. verendeten Rindern. Bei 36 untersuchten Proben wiesen die Autoren in 31 Fällen BoNT/C, D bzw. BoNT/CD-Komplex nach, alle genannte Proben waren im Tierversuch negativ.

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch ALMEIDA et al. (1997) mit dieser Methode und erreichten eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 57 % im Vergleich zum Mäuse-Neutralisationstest.

Am Institut für Tropentierhygiene, Göttingen wurde versucht, den Toxinachweis mittels KBR anhand des Arbeitsprotokolls von WEISS und WEISS (1988) nachzuvollziehen, die Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar (BEHRENS 1996).

Mittlerweile wird die Method von WEISS und WEISS in Heidelberg zum Toxinachweis nicht mehr durchgeführt (GESSLER³).

2.3.2.2.4 Radioimmunoassay (RIA)

Die Basis des von BOROFF und SHU-CHEN (1973) entwickelten RIA war die Konkurrenz um die Antikörper-Bindungsstelle zwischen radioaktiv-markiertem Toxin und einem nicht markierten („kalten“) Toxin. Nach erfolgter AG-AK-Reaktion wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen und mittels einer Standardkurve das Verhältnis gebundenes markiertes Toxin : ungebundenes markiertes Toxin gegen „kaltes“ Toxin ermittelt. Der Test war hoch spezifisch für BoNT/A, die Nachweisgrenze lag bei etwa 100 LD₅₀.

Eine Empfindlichkeit von 80 LD₅₀ (1ng BoNT/mL) erreichten ASHTON et al. (1985) im RIA mit ¹²⁵I-markierten Antikörpern. Obwohl BoNT/B und E viele gemeinsame antigene Determinaten aufweisen, zeigten sie nach Hitzeinaktivierung keine Kreuzreaktionen.

³ GESSLER, F., pers. Mitt. Göttingen, 18.6.1999

BETLEY und SUGIYAMA (1979) verwendeten eine modifizierte Methode des RIA zur Ermittlung von BoNT/A, in der an Antikörper gebundenes Antigen mittels Staphylokokken Protein A von ungebundenem Antigen separiert wurde. Sie fanden in frischen Kulturüberständen von Typ A ähnliche Titer von Antigenität und Toxizität, während bei mehrwöchiger Lagerung der Proben die Toxizität deutlich mehr als die Antigenität abnahm. Diese Ergebnisse veranlaßten die genannten Autoren zu der Schlußfolgerung, daß serologische Verfahren zum Nachweis von BoNT nicht immer für genaue Ermittlungen der Toxizität eingesetzt werden könnten.

2.3.2.2.5 Enzymimmunoassay (EIA)

NOTERMANS et al. (1978 b) beschrieben erstmals die von ihnen als ELISA-Double-Sandwich bezeichnete Technik zum Toxinnachweis von *C. botulinum* Typ A. Die Autoren setzten Meerrettich-Peroxidase als Konjugat ein und erreichten mit dieser Technik eine Empfindlichkeit von 50-100 MLD₅₀/mL. Sie fanden keine Kreuzreaktionen zu den Toxintypen B, C oder E und sahen diese Methode als gute Möglichkeit für das Screening von Kulturfiltraten anstelle des üblichen Bioassays an. Mit der gleichen Methode gelang KOZAKI et al. (1979) der Nachweis von BoNT/B (5000 MLD₅₀/mL) und NOTERMANS et al. (1979) der Nachweis von BoNT/E (80 MLD₅₀/mL). Bei beiden Methoden traten leichte Kreuzreaktionen mit A- bzw. B-Antikörpern auf, die KOZAKI et al. (1979) auf mangelnde Spezifität der verwendeten Immunglobuline oder immunologische Identität zwischen nicht-toxischen Komponenten zurückführte.

LEWIS et al. (1981) erreichten mit einem Double-Sandwich-ELISA mit alkalischer Phosphatase als Konjugat für BoNT/G eine Nachweisgrenze von <1 i.p. MLD₅₀/mL. Die hohe Empfindlichkeit führten die Autoren darauf zurück, daß im Gegensatz zum Mäuse-Bioassay, der die Gesamtoxizität in einer Probe erfaßt, mit dem ELISA auch bereits inaktiviertes Toxin gemessen wurde. Keine Kreuzreaktionen traten mit *C. botulinum* B, C, D, E und F und *C. sporogenes* auf, was LEWIS et al. (1981) darin begründeten, daß zur Stimulation der IgG-Produktion im Kaninchen gereinigtes Toxin verwendet worden war und daß das gewonnene IgG chromatographisch gereinigt worden war. Kulturüberstände von *C. botulinum* und *C. subterminale* ergaben teilweise falsch positive Resultate.

NOTERMANS et al. (1982) entwickelten einen Sandwich-ELISA, der zur Differenzierung von *C. botulinum* C1 bzw. D-Toxinen gegenüber anderen Toxintypen, aber nicht zur Unterscheidung von C1 und D eingesetzt werden konnte. Keine Korrelation sahen die Autoren

zwischen der Toxizität (Bioassay) der eingesetzten Kulturen und dem Ergebnissen des ELISA (Antigen-Menge). Wegen der antigenetischen Gemeinsamkeit von Toxinen der Stämme C und D erscheint die Differenzierung von C1- und D-Toxin mittels ELISA fraglich (OGUMA et al. 1980).

BÄTZA (1982, 1983) entwickelte einen von ihm als „indirekten Sandwich-Assay“ bezeichneten ELISA für Typ A- und C-Toxine mit einer sehr hohen Spezifität, aber stark schwankenden Sensitivitäten, die er auf die unterschiedlichen Reinheitsgrade und Proteingehalte der verschiedenen Toxinpräparationen zurückführte.

DEZFULIAN und BARTLETT (1984) modifizierten einen Doppel-Sandwich-ELISA und reduzierten die Kreuzreaktionen, indem sie Antikörper Typ A von immunotoleranten Tieren in ihrem ELISA einsetzen. Sie fanden Kreuzreaktionen mit BoNT/B, aber nicht mit anderen Typen oder anderen Clostridien-Kulturüberständen; die Sensitivität betrug <10 MLD₅₀/mL. Mit der beschriebenen Methode gelang DEZFULIAN et al. (1985) der Nachweis von BoNT/A und B in Stuhlproben von an Botulismus erkrankten Säuglingen mit einer Spezifität von 96 %. Mit der gleichen Methode gelang RODRIGUEZ und DEZFULIAN (1997) der Toxinnachweis in grünen Bohnen und Pilzen. Sie inokulierten die Lebensmittel mit *C. botulinum* A, zwei Tage später wiesen sie $10 \cdot 10^4$ LD₅₀ nach.

Trotz affinitätschromatographischer Reinigung der Antiseren konnten MICHALIK et al. (1986) bei ihrem Doppel-Antikörper-Sandwich-ELISA für A- und B-Toxin Kreuzreaktionen nicht eliminieren und erreichten eine Sensitivität von 100-300 DLM. HUHTANAN et al. (1992) erreichten ebenfalls nicht die von DEZFULIAN und BARTLETT (1984) beschriebene Empfindlichkeit mit einem Doppel-AK-ELISA, führten dies aber auf die einwöchige Lagerung der Proben im Kühlschrank und auf den Gebrauch eines weniger sensitiven polyvalenten Antikörpers zurück.

In Kulturüberständen, diversen Organextrakten und Serum verschiedener Tiere sowie in Lebensmitteln gelang THOMAS (1991) der Toxinnachweis mit einem direkten Sandwich-ELISA mit polyklonalen Antikörpern. Die Spezifität betrug 96%, die Sensitivität 70%. Bei homologen Kulturfiltraten wurde eine Nachweisempfindlichkeit von 10^{-2} - 10^2 MLD₅₀/mL erreicht.

Monoklonale Antikörper wurden erstmals von SHONE et al. (1985) in einem direkten ELISA für BoNT/A eingesetzt, der eine Empfindlichkeit von 5-10 MLD₅₀/mL aufwies. Kreuzreaktionen mit BoNT/B- und E bzw. *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. difficile* wurden nicht beobachtet.

RANSOM et al. (1993) modifizierten den von SHONE et al. (1985) entwickelten ELISA mit polyklonalen Antikörpern als Fang-Antikörper. Die Methode erwies sich als sehr sensitiv und spezifisch für den Nachweis von BoNT/A, formalinisiertes Toxoid A konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. GIBSON et al. (1987) verwendeten ebenfalls monoklonale Typ A-Antikörper in ihrer als „Amplified-ELISA“ bezeichneten Technik, bei der sie etwa die Empfindlichkeit des Mäuse-Bioassays erreichte. Kreuzreaktionen zu B- und F-Toxinen wurden nicht beobachtet.

POTTER et al. (1993) gelang der Nachweis von Botulinum-Toxin A, B und E mit Hilfe eines Doppel-Antikörper-Sandwich-ELISA. Dazu setzten sie trivalente kommerzielle Antiseren sowohl als Fang-Antikörper als auch biotinyliert als sekundären Antikörper ein. Der Toxin-nachweis gelang sowohl von gereinigtem Neurotoxin als auch von inokulierten Lebensmittelproben. Die Sensitivität betrug 100%, die Spezifität 70,6%.

EKONG et al. (1994) verglichen die von ihnen entwickelten single-site- und two-site (=Sandwich) -Immunoassays für den Toxinnachweis von Typ A. Der sensitivste Assay war der two-site-capture Assay, bei dem toxinspezifische Antikörper gegen das gebundene Toxin verwendet wurden und der Nachweis mittels affinitätsgereinigten Antikörpern und hochtitrigen Konjugaten erfolgte.

DOELLGAST et al. (1993, 1994 a, b) entwickelten einen ELISA-ELCA (Enzyme-Linked Coagulation Assay)-Test, der auf dem Nachweis von Komplexen durch einen Festphasen-Assay basiert. Diese Methode war sehr sensitiv für Toxine A, B und E mit Nachweisgrenzen im Bereich des Mäuse-Bioassays. Die komplizierte Natur dieses Testsystems beschränkt jedoch nach EKONG et al. (1995) seine generellen Anwendbarkeit.

Eine Doppel-AK-Version eines Chemilumineszenz Immunosorbent Assay (CLISA) stellen LIGIEZA et al. (1994) zum Nachweis löslicher Antigene von *C. botulinum* A vor. Spezifisches Anti-Pferd-IgG wurde an Polystyrene-Kügelchen gecoatet, das an IgG gebundene Toxin wurde nach Zugabe von ABEI (N-/4-aminobutyryl/N-ethyl-isoluminol)-konjugiertem Antitoxin-IgG durch Zählung emittierter Lichtimpulse nachgewiesen. Die Ergebnisse des CLISA verglichen die genannten Autoren mit Ergebnissen des von MICHALIK et al. (1986) entwickelten ELISA und einem passiven Hämagglutinationstest, wobei der CLISA eine 10 mal höhere Empfindlichkeit aufwies (10 LD₅₀ /mL) als die beiden anderen Methoden.

SEMLER-SCHNEIDER et al. (1988) charakterisierten *C. botulinum*-Toxine A-E mit der Western-Blot-Technik. Eine Typisierung der unterschiedlichen Rohtoxine auf der Basis ihrer Molekulargewichte im SDS-Gel war nur vergleichend möglich. Im Western-Blot mit

gereinigten Toxinen konnten die Typen eindeutig mit homologen Antiseren differenziert werden, Rohtoxine waren wegen der Fülle der auftretenden Banden nur bedingt zu differenzieren.

Mittels Kolonie-Immunoblot wiesen GOODNOUGH et al. (1993) BoNT in und um Kolonien von *C. botulinum* A, B und E nach. BoNT wurde auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antiseren detektiert. Bei zwei Stämmen von *C. butyricum* gelang ebenfalls der Nachweis von BoNT.

Der von OGERT et al. (1992) entwickelte Glasfaser-Biosensor zum Nachweis von BoNT ist vom Prinzip ein zwei-Stufen-Sandwich-Immunoassay. Auf der Oberfläche einer sich zum Ende verjüngenden optischen Faser wurden Toxin-spezifische Antikörper (IgG) immobilisiert. Haben in Lösung befindliche Toxine an diesen Antikörper gebunden, konnte über einen gegen die Epitope des Fang-Antikörpers gerichteten sekundären, Rhodamin-markierten Antikörper die Komplexbildung mittels Argon-Laser (514 nm) gemessen werden. Quantitative Ergebnisse lagen innerhalb weniger Minuten vor. Die Reaktionen waren bei einer Nachweisgrenze von 5 ng/mL BoNT/A hochspezifisch.

MENKING et al. (1994) verwendeten den Glasfaser-Biosensor sowohl als Einstufen- als auch als Zweistufen-Assay. Im Zweistufen-Assay wurde Toxoid nicht kovalent an eine Quarzfaser gebunden und in Antiserum inkubiert. Flossen FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) - markierte sekundäre Antikörper durch die beschichteten Fasern, wurde die AK-AG-Bindung optisch detektiert. Zugabe steigender Toxinkonzentrationen ergab eine dosisabhängige Abnahme der initialen Fluoreszenz. Im Einstufen-Assay wurde das Antitoxin an die Quarzfaser gebunden. Durch die Faser fließendes freies Toxin konkurrierte mit FITC-markiertem Toxin um die Bindungsstelle an dem Antitoxin, was ebenfalls zu einer Abnahme der initial zu messenden Signale führte. Die Nachweisgrenze der Toxine lag im nanomolaren Bereich (50 nM).

KUMAR et al. (1994) erreichten für BoNT-B mit der einstufigen Methode eine Empfindlichkeit im Nanogramm-Bereich.

HALLIS et al. (1996) entwickelten eine neue Generation von Assays, die im Gegensatz zu anderen immunologischen Methoden die biologische Aktivität von BoNT messen.

Das Testprinzip basierte auf dem Nachweis hochspezifischer zink-abhängiger Endopeptidase-Aktivitäten der Neurotoxine an den Rezeptorproteinen SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin.

Nach Peptidsynthese mittels Festphasen-Peptid-Synthesizer wurden in Meerschweinchen Antikörper gegen diese gereinigten Peptide produziert: Für einen BoNT/A-Assay gegen die

C- und N-terminale Enden der Schnittstellen SNAP-25, für den BoNT/B-Assay gegen die C-terminale Seite der Schnittstelle von Synaptobrevin.

Die an der Festphase immobilisierten Peptide wurden mit der toxischen Probe inkubiert. Mittels der aus den Meerschweinchen gewonnenen Antikörper, die spezifisch an das neu exponierte Ende des Peptids gebunden haben, wurden die Peptid-Schnittstellen nachgewiesen. Mit dem Endopeptidase-Assay erreichten die genannten Autoren eine Nachweisempfindlichkeit für gereinigtes BoNT/B von 0,17 +/- 0,06 ng/mL. Keine falsch positiven Ergebnisse lieferten BoNT/F und Tetanus-Toxin, die ebenfalls Synaptobrevin spalten können. Eine ähnliche Sensitivität wurde für den BoNT/A-Assay ermittelt, auch hier wurde keine Kreuzreaktion zu anderen Toxintypen beobachtet.

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch WICTOME et al. (1998) und SESARDIC et al. (1998) mit einem Endopeptidase-Assay für BoNT/A und BoNT/E.

Diese neue Technik bietet nach Meinung von HALLIS et al. (1996) den Komfort von konventionellen Immunoassays mit dem zusätzlichen Vorteil, daß die biologische Aktivität von BoNT gemessen und keine denaturierten Toxine nachgewiesen werden. Der Endopeptidase-Assay kommt somit dem Mäuse-Bioassay in der Aussagekraft näher als andere immunologische Nachweismethoden.

2.4. Nachweismethoden von *C. botulinum*-Antitoxinen

Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen BoNT dienen dem Nachweis der Wirksamkeit und Typisierung von Antiseren/-toxinen und der Ermittlung immunreaktiver Wirkungen nach Impfungen, nach „natürlicher“ Exposition mit dem Antigen, oder nach dem therapeutischen Einsatz der Neurotoxine.

Zum Nachweis von *C. botulinum*-Antitoxinen werden unter Verwendung bekannter und standardisierter Typ-Toxine in der Regel modifizierte Antigen-Nachweismethoden eingesetzt (BÄTZA 1982; HATHEWAY u. DANG 1994).

Die Standard-Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antikörpern gegen *C. botulinum* ist auch hier der Mäuse-Bioassay (HATHEWAY u. DANG 1994).

2.4.1 *In-vivo*-Methoden

Qualitativer Belastungsversuch („Challenge“)

Die sich nach einer Immunisierung mit Toxin oder Toxoidimpfstoffen entwickelte Immunität von Versuchstieren wird zu verschiedenen Zeitpunkten mit bestimmten Mengen Toxin belastet. Der Immunisierungserfolg wird mit unbehandelten Kontrollen verglichen (CARDELLA et al. 1958; FIOCK et al. 1962; HEIMSCH et al. 1970).

Diese qualitative Aussage über die AK-Bildung wird in Form von LD₅₀-Werten ausgedrückt, exakte Aussagen über die Höhe der Antitoxintiter sind mit dieser Methode nicht möglich. (BÄTZA 1982).

APPLETON und WHITE (1959) evaluierten eine (A,B,C)-Toxoid-Vakzine in Mäusen, Meerschweinchen und Frettchen. Nach den Impfungen wurde ein Challenge an Mäusen mit unterschiedlichen Toxinbelastungen durchgeführt. *C. botulinum* Typ D-Toxoide wurden in Meerschweinchen, Mäusen und Kaninchen auf ihre immunogenen Wirksamkeit überprüft (CARDELLA et al. 1960). Die Immunität von Mäusen nach Impfung mit 2 verschiedenen kommerziellen Botulismus-Vakzinen und einem eigenen Typ C-Toxoid-Impfstoff verglich SCHICHOWSKI (1980).

CLAYTON et al. (1995) immunisierten Mäuse mit einem rekombinanten Fragment von *C. botulinum* Typ A aus *E. coli* und bestimmten die Überlebensrate gegen einen Challenge mit Toxin.

Quantitativer Schutzversuch („Neutralisationstest“)

Die Standard-Methode zum Nachweis von Botulinum-Antitoxinen ist der Mäuseschutzversuch. Diese Methode mißt die Fähigkeit eines Serums, bei steigenden Verdünnungen die letale Wirkung des BoNT zu neutralisieren (HATHEWAY u. DANG 1994). Die Schutzwirkung des unbekanntes Serums wird dabei mit derjenigen eines genau definierten Standard-Antitoxins verglichen. Über die Todesrate und die Verdünnungsstufe können quantitative Aussagen über den Gehalt an Internationalen Einheiten (IE) des Serums gemacht werden (BOWMER 1963).

Es wird vorausgesetzt, daß die Ergebnisse mit dem Immunitätslevel korrelieren und das die Spezifität des Schutzes von dem im Test verwendeten Toxin definiert wird (HATHEWAY u. DANG 1994).

Für die Wirksamkeit von *C. botulinum*-Antitoxinen gemäß DAB (1998) und EAB (1997) wird ebenfalls o.g. Standard-Methode vorgeschrieben. Die Prüfung der Antitoxine erfordert eine in Internationalen Einheiten eingestellte Standardzubereitung jedes Botulismus-Antitoxin-Typs und geeignete Botulismus-Toxine als Testtoxine.

Standardisierte Präparationen von *C. botulinum* Antitoxinen A-E wurden von BOWMER (1963) beschrieben, der die Konzentration von Toxin und Antitoxin in Serien von Toxin-Antitoxin-Komplexen und die Beziehung dieser Konzentrationen zu einem Standardantitoxin als „Level des Tests“ (L+) ausdrückte.

Eine L+-Toxindosis ist diejenige Toxinmenge, die nach Mischen mit 1 mL Standard-Antitoxin bei 50 % der Versuchstiere (i.p.-Injektion) innerhalb 96 Stunden zum Tod führt. Eine L+/10-Dosis bewirkt mit 0,1 mL Antitoxin gemischt das gleiche, usw.

Indem konstante Toxinmengen mit variablen Antitoxinmengen eingesetzt wurden, konnte die Antitoxin-Potenz durch Mäuse-Bioassays ermittelt werden.

Bezüglich der Spezifität der präparierten Antitoxine zeigten die Antitoxin A und B keine Schutzwirkung gegenüber den anderen Toxinen, wohingegen Antitoxin C gegen die Toxine D und E, Antitoxin D gegen die Toxine C und E und Antitoxin E zusätzlich gegenüber Typ D-Toxin schützende Wirkung (Kreuzreaktionen) aufwies.

Das National Institute for Medical Research setzte die 5 von BOWMER (1963) präparierten Antitoxine als die Internationalen Standards für *C. botulinum* Antitoxine A-E ein.

1 IU Antitoxin wird üblicherweise als die Menge antitoxisches Serum angesehen, die 10^4 Mäuse-LD₅₀ der Toxintypen A-D und 10^3 Mäuse-LD₅₀ des Toxintyps E zu neutralisieren vermag (HATHEWAY u. DANG 1994).

Die internationalen Standards wurden vom Internationalen Labor für Biologische Standards, Statens Serum-Institut, Kopenhagen, Dänemark aufbewahrt und zugeteilt (BOWMER 1963). Nachdem das FAO-Zentrum in Kopenhagen seine Referenzpräparate jahrelang für diagnostische Zwecke abgegeben hat, stehen derzeit diese Referenzantitoxine nicht mehr zur Verfügung (BÖHNEL et al. 1996). Die Sammlung wurde mittlerweile vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), London übernommen.

FIOCK et al. (1962) versuchten in Meerschweinchen eine Korrelation zwischen Serum-Antitoxin-Titern und der Immunität in einem Challenge mit homologem Toxin zu ermitteln. 50 % der Meerschweinchen mit *C. botulinum* Typ A-Antitoxinen (bei 0,03 U/mL Serum) überlebten einen Challenge mit 1×10^6 LD₅₀. Bei 0,005 U/mL B-Antitoxin überlebten 50 % der Meerschweinchen einen Challenge mit 6×10^5 LD₅₀. Bezogen auf die Toxinneutralisation

bedeutete dies, daß eine Einheit Typ B-Antitoxin 4 mal so viel typspezifisches Toxin neutralisiert wie eine Typ A-Einheit. Auf diese Ergebnisse im Meerschweinchen basierend sahen FIOCK et al. (1962) 0,02 Typ A U/mL und 0,005 Typ B U/mL Serum als zufriedenstellenden Schutz für den Menschen an.

JANSEN et al. (1976) bestimmten den Impferfolg einer seit 1950 großflächig in Südafrika bei Rindern eingesetzten Lamsiekte-Vaccine im Belastungs- und Schutzversuch in der Maus. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß ein Rind gegen hohe orale Toxindosen geschützt ist, auch wenn sich sein Antitoxin-Titer auf einem relativ niedrigen Niveau (0,02 U/mL) befindet.

2.4.2 *In-vitro*-Methoden

Bei der Entwicklung von *In-vitro*-Methoden zum Nachweis von AK gegen Botulismus muß beachtet werden, daß die Antikörper, die gegen ein bestimmtes Antigen produziert wurden, gegen eine Vielzahl von Komponenten in der Antigen-Präparation gerichtet sein können, oder gegen verschiedene Epitope eines hochgereinigten einzelnen Proteins. Bezogen auf die Immunreaktion gegen ein Toxin sind jedoch nur die Antikörper, die effektiv die biologische Aktivität des Toxins neutralisieren, relevant (HATHEWAY u. DANG 1994).

2.4.2.1 Hämagglutinations-Techniken

Mit der Passiven Hämagglutination (PHA), bei der *C. botulinum* Typ E-Progenitor-Toxin an Schafererythrozyten gekoppelt wurde, wiesen SAKUGUCHI et al. (1974) Antikörper in Seren immunisierter Tiere verschiedener Spezies nach. Antikörper im Kaninchen wurden erstmals 9 Tage nach einmaliger Impfung mit Toxoid gefunden.

Die PHA-Titer waren proportional zu den neutralisierenden AK in den Seren, mit Ausnahme derer, deren Proben zu einem frühen Zeitpunkt nach Erstimpfung getestet wurden, wenn ein großer Anteil der AK zur IgM-Fraktion gehörten. Bei der Fraktionierung der Antikörper in IgG und IgM wurden im frühen Stadium nach der Immunisierung nur IgM gefunden, später IgM und IgG, zum Schluß bis zum Erreichen des Antikörper-Plateaus nur IgG. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 0,0002 IU/mL, der Test war ca. 50 mal sensitiver als der Test in der Maus und spezifisch für Typ E-Antitoxin.

OHISHI et al. (1979) testeten das natürliche Vorkommen von AK gegen *C. botulinum* bei aasfressenden Vögeln (Putengeier, Krähe) und Säugern (Kojote, Ratte) mittels der PHA und verifizierten die Ergebnisse anhand des Serum-Neutralisationstests. 90 % der Geier-Seren, 42 % der Seren von Krähen, 23% der Kojotenseren und 17 % der Rattenseren wiesen positive Reaktionen z. T. gegen alle 6 Toxintypen auf. Alle PHA-positiven Seren der Geier wiesen neutralisierende AK gegen die Typen C und D auf, wohingegen die Übereinstimmung beider Tests bei anderen Toxintypen bzw. bei den anderen Tierspezies zwischen 0 und 67 % schwankten.

2.4.2.2 Radioimmunoassay (RIA)

Mit zwei Fest-Phasen Radioimmunoassays - im ersten Assay erfolgte die Bindung des Antikörpers an Plastikröhrchen, im zweiten Assay kovalent an Bromacetylzellulose - wiesen HABERMANN und BERNÁTH (1975) Typ-A Antikörper in Humanseren nach. Beide Techniken, die auf der kompetitiven Verdrängung des markierten Toxins an den freien Bindungsstellen des festphasengebundenen Antikörpers basieren, hatten eine Empfindlichkeit von 0,08 IE/mL bzw. bei längerer Inkubationszeit von 0,04 IE/mL Serum und wiesen eine gute Übereinstimmung zu den Ergebnissen des Mäuse-Neutralisationstests auf.

KAMATA et al. (1986) verglichen den RIA und verschiedene ELISA-Techniken zum Nachweis eines monoklonalen Antikörpers (E 13) gegen *C. botulinum* E. Während beim ELISA der monoklonale Antikörper mit dem an der Festphase gebundenen Toxoid, jedoch nicht mit dem gebundenen Toxin reagierte, der RIA aber die direkte Bindung von E 13 an das Toxin demonstriert hatte, schien diese Methode nach Meinung der Autoren die geeignetste zur Titration monoklonaler Antikörper zu sein.

2.4.2.3 Enzymimmunoassay (EIA)

Durch direkte Adsorption eines Toxins (SHONE et al. 1986; SIEGEL 1988, 1989; ELLIS 1989; JUBB et al. 1993; GREGORY et al. 1996) oder Toxoids (BÄTZA 1982; RUBIN et al. 1982, ADAMI 1984) an der Festphase, oder durch „Vermittlung“ der Adsorption mittels spezifischer Antikörper an der Festphase der Mikrotiterplatte (KAMATA et al. 1986; DEZFULIAN et al. 1987; RANSOM et al. 1993) wurden Antikörper in einer Probe, die die

Epitope des Fang-Antigens erkannten, durch Enzym-konjugierte, sekundäre Antikörper nachgewiesen.

Einen ELISA mit grob gereinigten C- und D Toxoiden als Fang-Antigen entwickelte BÄTZA (1982, 1983). Ihm gelang der Nachweis von Antikörpern in Seren vakzinierter Kaninchen und Ziegen sowie in gepoolten Mäuseseren. Die Ergebnisse des ELISA erbrachten keinen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen des Mäuse-Bioassays.

Hinsichtlich der Spezifität, d. h. des Auftretens immunologischer Kreuzreaktionen mit anderen Typtoxinen wurden für Typ A keine Kreuzreaktionen mit den untersuchten B-, C-, E- und F-Toxinen festgestellt, während Typ C-Antiserum leichte Kreuzreaktionen mit Typ F-Toxin einging, deren Ursache ungeklärt blieb. Kreuzreaktivität mit Typ D-Toxin wurde nicht untersucht, wären nach BÄTZA (1982) jedoch zu erwarten gewesen.

RUBIN et al. (1982) testeten Serumproben von 2 Säuglingen mit Botulismus während intestinaler Kolonisation von *C. botulinum* auf Antikörper gegen Botulinumtoxin mit monovalenten A-, B- bzw. E-Toxoiden als Fang-Antigen. Sie fanden leicht erhöhte Titer 30 und 60 Tage nach Ausbruch der Krankheit. Kreuzreaktionen zwischen den Typen A und B führten die Autoren auf Reaktionen mit anderen Antigenen von *C. botulinum* bzw. gemeinsame antigenetische Bindungsstellen beider Toxine zurück.

HATHEWAY und DANG (1994) fanden ebenfalls bei Säuglingen mit Botulismus Antikörperentwicklung zu Rohtoxin-Präparationen im ELISA, aber nur eine der zehn Serumproben war im Mäuseschutzversuch positiv.

Mit Hilfe einer nicht publizierten Methode der CDC wiesen GRIFFIN et al. (1997) bei einem Patienten mit Crohn'scher Krankheit 19 Wochen nach intestinaler Kolonisation mit *C. botulinum* A endogen gebildete, neutralisierende Antikörper mittels ELISA nach.

ADAMI (1984) gelang der Nachweis von Antikörpern in Serum, Milch und Kolostrum immunisierter Ziegen mittels eines ELISA, in dem er die zur Immunisierung verwendete Lamsiekte-Vaccine auch als Fang-Antigen einsetzte. Eine direkte Korrelation zwischen der Höhe des im IgG-Peroxidase-ELISA gemessenen Antitoxingehaltes und der im Mäuseversuch ermittelten Schutzwirkung konnte nicht festgestellt werden. Ursache dafür war nach Meinung des Autors, daß in der Maus nur neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden, der POD-ELISA daneben noch Antikörper gegen andere in der Vakzine enthaltenen Antigene erfaßt.

ADAMI (1984) wies außerdem in Seren von 7 Jungziegen, deren Müttern immunisiert wurden, ausschließlich kolostral übertragene Antikörper bis zur 12. Lebenswoche nach, die der Subklasse IgG₁ angehörten.

HERBST et al. (1987) modifizierten den von ADAMI (1984) beschriebenen ELISA und wiesen neutralisierende Antikörper in zwei mit Lamsiekte Vaccine geimpften Hühnern nach.

SHONE et al. (1986) verwendeten gereinigte Typ A- bzw. Typ B-Toxine als Fang-Antigen und fanden in Seren geimpfter Personen nur eine begrenzte Korrelation von ELISA-Ergebnissen zu dem Mäuseschutzversuch, niedrig-titrige ELISA-Messungen waren unzuverlässig, da die Proben nur knapp über dem cut-off-Wert lagen.

Zur Titration monoklonaler Antikörper gegen Typ E wurden verschiedene ELISA-Techniken und der RIA von KAMATA et al. (1986) eingesetzt. Als Antigene wurden sowohl Toxine als auch Toxoide eingesetzt. Im direkten ELISA reagierte der Antikörper mit dem an der Festphase gebundenen Toxoid, aber nicht mit einem an der Festphase gebundenen Toxin. Der RIA hingegen demonstrierte auch die direkte Bindung des monoklonalen Antikörpers E13 (der im Mäuseschutzversuch eine ebenso starke neutralisierende Aktivität wie polyklonale Antikörper aufwies) an das Toxin.

Dieses „verblüffende“ Ergebnis veranlaßte KAMATA et al. (1986) zu folgender Arbeitshypothese: E13 bindet an das Toxinmolekül nur in Lösung. Die Bindungsstelle, an der E13 an das Toxinmolekül bindet, ist durch die Bindung an die Plattenoberfläche maskiert, und exponiert durch Formalinisierung. Die Behandlung des Toxins mit Formalin verändert die dreidimensionale Konformation des Toxinmoleküls und exponiert die Epitope gegenüber E13.

Die oben aufgeführten Ergebnisse veranlaßten KAMATA et al. (1986) vor dem Einsatz „konventioneller“ ELISA-Techniken, bei denen das Antigen direkt an die Festphase gebunden wird, abzuraten, weil positive Reaktionen häufig nicht detektiert werden könnten. Beim Einsatz eines Sandwich-ELISA durch die o.g. Autoren, bei dem an die Festphase gebundene polyklonale Kaninchen-Antikörper die Antigene immobilisieren, gelang der Nachweis des monoklonalen Antikörpers E13 in gleicher Weise mit Toxin und Toxoid als Fang-Antigen.

DEZFULIAN et al. (1987) verbesserte durch Beschichtung der Festphase mit einem spezifischen Antitoxin anstelle eines Toxoids die Spezifität seines Doppel-Sandwich-ELISA. Er machte eine kinetische Studie über die AK-Antwort eines mit A-E-Toxoid geimpften Probanden. Der *C. botulinum* Typ A Antikörper-Nachweis gelang bereits 4 Wochen nach Erstimpfung (2 Wo. nach Boosterung), 15 Wochen bevor neutralisierende Antikörper im Mäuse-Bioassay nachgewiesen werden konnten. Die Empfindlichkeit betrug 0,125 IU/mL.

RANSOM et al. (1993) modifizierten den von SHONE et al. (1985) entwickelten ELISA zum Nachweis von BoNT, der wiederum modifiziert, auch zum Nachweis von Antiseren eingesetzt wurde. Eine definierte Menge Fang-AK wurde mit einer definierten Menge BoNT versetzt, darauf wurde das AK-haltige Serum titriert. Die Änderung der Absorption war direkt proportional zu den Titern des Maus-Bioassays. Die Entwicklung eines solchen Assays scheiterte nach RANSOM et al. (1993) jedoch in der Regel an der Verfügbarkeit BoNT-spezifischer Antiseren als Fang-AK.

Um den Immunstatus von Probanden, die mit pentavalentem an Aluminium-Phosphat adsorbiertem *C. botulinum*-Toxoid geimpft wurden, zu bestimmen, etablierte SIEGEL (1988) einen ELISA zum Nachweis von A- und B-Antikörpern. Die Ergebnisse des ELISA mit gereinigtem Typ A- bzw. Typ B-Toxin als Fang-Antigen wurden im Neutralisationstest evaluiert. Statistisch waren die Korrelationskoeffizienten beider Ergebnisse hoch ($r=0,69$ bei Typ A bzw. $r=0,77$ bei Typ B, $P<0,0001$), es gab jedoch große Streuungen der AK-Level innerhalb der Gruppen mit dem gleichen Impfstatus, so daß die ELISA-Ergebnisse nach Meinung des Autors zur Vorhersage der Höhe von neutralisierenden AK nicht herangezogen werden sollten.

1989 untersuchte SIEGEL o.g. Seren weiterhin auf neutralisierende AK gegen die Toxintypen A (5,7-51,6 IU/mL), B (0,75-18 IU/mL) und E (0,61-10 IU/mL) in der Maus. Auch hier fand er keine Korrelation zwischen der Höhe der neutralisierenden AK-Titer der verschiedenen Toxintypen und erklärte, daß der Titer eines Toxin-Typs nicht zur Vorhersage des Titers eines anderen Toxintyps herangezogen werden könnte.

Einen von ELLIS (1989) entwickelten ELISA zum AK-Nachweis gegen Typ C- und D-Toxin und seine Anwendung bei einer vermeintlichen Botulismus-Intoxikation in einer Rinderherde in Nord-West-Australien beschrieben JUBB et al. (1993). Sie untersuchten Seren von 7 erkrankten und 27 gesunden Rindern; 6 der erkrankten Rinder wiesen Antikörper gegen *C. botulinum* C auf, während nur 8 der 27 gesunden Tiere Antikörper aufwiesen. Durch diesen Antikörper-Nachweis wurde die Diagnose Botulismus als Krankheits- und Todesursache von ca. 100 Rindern einer nord-australischen Herde erhärtet. Seren und Panseninhalt der 7 erkrankten und später verendeten Rinder waren im Mäusetoxizitätstest negativ (JUBB et al. 1993).

ELLIS (1989) konnte bereits nachweisen, daß unvakzinierte Rinder in Botulismus-Endemiegebieten Antikörper gegen diese Toxine aufwiesen. Der Nachweis von Antikörpern bei gesunden Tieren in der Studie von JUBB et al. (1993) ließ vermuten, daß subklinische Expositionen stattgefunden hatten bzw. kranke Tiere wieder genesen waren. Eine

Inkubationszeit von 3-7 Tagen und ein 2-3tägiger Krankheitsverlauf sollte nach Meinung der Autoren ausreichend Zeit für eine natürliche Antikörperbildung sein.

Da bei dem entwickelten ELISA in Meerschweinchenseren deutliche Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern gegen C- und D-Antigenen auftraten, die auf gemeinsame Epitope der schweren Kette von C- und D-Neurotoxinen zurückzuführen waren, versuchten ELLIS et al. (1998) polyklonale Antikörper gegen die leichte Kette der BoNT/C bzw. -D zu präparieren, um zwischen C- und D-Antikörpern unterscheiden zu können. Es stellte sich jedoch heraus, daß selbst bei der Verwendung isolierter leichter Ketten als Antigen Kreuzreaktionen der Antikörper gegenüber BoNT/C bzw. D auftraten (ELLIS et al. 1999).

GREGORY et al. (1996) entwickelten einen ELISA mit partiell gereinigten Typ C- und D-Toxinen als Antigen. Die Evaluierung des Tests erfolgte anhand von 333 Serumproben nicht exponierter Rinder, und in 41 Herden mit geimpften Tieren bzw. in Herden in denen Botulismus endemisch auftrat. Sie konnten bei 66 von 68 jährlich mit C- und D-Toxoid geimpften Rindern Antikörper gegen C- und D-Toxine nachweisen. 87,5 % der sublethal erkrankten Rinder wiesen 25 Tage nach Intoxikation Antikörper auf. I.d.R. war ein Abfall der ELISA-Aktivität zum 45. Tag zu beobachten, so daß angenommen wurde, daß die natürlichen Antikörper relativ kurzlebig waren. In Seren exponierter, ungeimpfter Rinder waren die ELISA-Aktivitäten deutlich höher als bei Kontrollseren. 4 von 11 im ELISA positive Proben wiesen im Tierversuch neutralisierende Antikörper auf. Die mittlere ELISA-Aktivität der Seren von Herden mit vermuteten aber nicht nachgewiesenen Erkrankungen war signifikant höher als in negativen Vergleichsherden.

Mit der von GREGORY et al. (1996) beschriebenen Methode untersuchten MAIN und GREGORY (1996) Blutproben erkrankter und gesunder, ungeimpfter Rinder.

5 von 8 trockenstehenden und 4 von 11 laktierenden Kühen sowie 1 von 7 Färsen wiesen Antikörper gegen *C. botulinum* C auf. 9 von 19 klinisch gesunden Tieren wiesen ebenfalls Antikörper auf. Diese Befunde deckten sich mit den Beobachtungen von GREGORY et al. (1996), daß subklinische Toxinbelastungen immunogen wirkten.

DOELLGAST et al. (1994 b) modifizierten den ELISA-ELCA (Enzyme-Linked-Coagulation-Assay) für die Toxine A, B und E zur Messung von Antikörpern. Dabei formten Hühner-Antikörper und RVV (Russel's Viper Venom)-XA-markierte Pferde-Antikörper mit Neurotoxin einen Komplex, der an der Capture-Platte an Anti-Hühner Immunglobulin G (IgG) gebunden wurde. Wurden nun Patientenseren mit spezifischen Antikörpern (unmarkiert) hinzugefügt, konkurrierten diese mit den o.g. markierten Antikörpern. Die zu

messende Anzahl der an die Capture-Platte gebundenen Komplexe wurde geringer. Kreuzreaktionen von A-, B- und E -Antikörpern konnten nicht beobachtet werden.

SIATKOWSKI et al. (1993) untersuchten 65 Seren von 42 erwachsenen Patienten, bei denen Botulinum-Toxin A zur Behandlung von Blepharospasmus und Torticollis eingesetzt wurde, auf Anwesenheit von Antikörpern gegen *C. botulinum* mit der SLISA-Technik (Sphere-linked immunosorbent assay). Antigen wurde an die Mikrokügelchen kovalent gebunden. Mittels Elektronenmikroskopie erfolgte die Auszählung der gebundenen goldmarkierten sekundären Antikörper als Indikator für die Serum-Antikörper-Bindung.

57 % der Patienten wiesen Antikörper gegen Botulinum-Toxin A auf. Zwischen dem Antikörpertiter und der kumulativen Toxindosis, Anzahl von Injektionen oder Behandlungsdauer konnten keine signifikanten Beziehungen beobachtet werden.

Zur Aktivitätsmessung therapeutisch eingesetzter Antitoxine entwickelten MARTIN und SESARDIC (1998) ein auf der Basis hochspezifischer zink-abhängiger Endopeptidaseaktivitäten basierendes Testprinzip. Nachdem die genannten Autoren beim BoNT/A-Toxin nachweis demonstriert hatten, daß die Endopeptidaseaktivität durch spezifische Typ-A-Antitoxine inhibiert wurde, setzten sie den Test zum Nachweis toxinneutralisierender Antikörper ein. Im Vergleich zu einer Standardantitoxinpräparation erreichten die genannten Autoren den Nachweis von 0,001 U/mL Antitoxin, was einer 10fach höheren Empfindlichkeit als dem Maus-Bioassay entsprach.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei dem Versuch, mittels *In-vitro*-Methoden Antikörper nachzuweisen, die die biologische Aktivität von BoNT neutralisieren, die Probleme schwieriger sind als beim Toxinnachweis. Die Antikörper, die in einer Serumprobe von Interesse sind, sind unvermeidlich polyklonal. Um in Serumproben den Immunstatus einer Person oder eines Tieres ermitteln zu können, ist es notwendig, die Epitope des Toxinantigens auf nur diejenigen, die von neutralisierenden Antikörpern wiedererkannt werden, zu beschränken (HATHEWAY u. DANG 1994).

Für Verlaufsuntersuchungen während Immunisierungen (BÄTZA 1982, ADAMI 1984), zur Evaluierung neuer Vakzinen (SIEGEL 1988), als vororientierende Methode zur Titration von Antitoxinen (KOZAKI et al. 1989 a; EKONG et al. 1995) sowie für epidemiologische Untersuchungen (GREGORY et al. 1996) scheint der ELISA eine durchaus geeignete Methode zum Antikörpernachweis zu sein. Aussagen über die Höhe neutralisierender Antikörper können jedoch nur in der Maus gemacht werden (ADAMI 1984; KOZAKI et al. 1989 a).

Dort, wo die Verdachtsdiagnose Botulismus durch Toxinnachweis nicht immer erfolgreich erbracht werden kann, können serologische Tests zum Antikörper-Nachweis nützliche

Hinweise zur Diagnosefindung geben (JUBB et al. 1993). Durch Kenntnis des Immunstatus einzelner Tiere, der Herde bzw. der Region können frühzeitig veterinärmedizinische Maßnahmen (z.B. Impfungen) veranlaßt werden (GREGORY et al. 1996).

3. Material und Methoden

3.1 Anzucht und Differenzierung der Clostridien-Stämme

3.1.1 Bakterienstämme

Tab. 6. Verwendete Clostridienstämme

Stamm- Nummer	Bezeichnung	Toxin-Typ	Herkunft	Herkunfts- bezeichnung
1028	<i>C. botulinum</i> ¹	A	National Collections of Type Cultures, London	NCTC 7272
1029	<i>C. botulinum</i> ¹	B	National Collections of Type Cultures, London	NCTC 7273
1030	<i>C. botulinum</i>	C α	National Collections of Type Cultures, London	NCTC 8264
2145	<i>C. botulinum</i>	C	Nationales Referenzzentrum für Clostridien, Erfurt	REB 1455
2142	<i>C. botulinum</i>	D (D+C β)	Institut Pasteur, Paris	1873 D
2146	<i>C. botulinum</i>	D	Nationales Referenzzentrum für Clostridien, Erfurt	REB 1073
1032	<i>C. botulinum</i> ²	E	National Collections of Type Cultures, London	NCTC 8266
1033	<i>C. botulinum</i> ¹	F	National Collections of Type Cultures, London	NCTC 10281 Langeland
1034	<i>C. butyricum</i>		National Collections of Type Cultures, London	NCTC 7423
1084	<i>C. baratii</i>		American Type Culture Collection, Rockville	ATCC 25782
1085	<i>C. parabotulinum</i>		American Type Culture Collection, Rockville	ATCC 17863
1089	<i>C. tetani</i>		American Type Culture Collection, Rockville	ATCC 10779
1272	<i>C. sordelli</i>		American Type Culture Collection, Rockville	ATCC 233

¹ proteolytisch

² saccharolytisch

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme von *C. botulinum* und verwandter *Clostridium spp.* aus der Stammsammlung des Instituts für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Göttingen sind mit ihren Original-Herkunftsbezeichnungen in Tab. 6 aufgeführt.

Die für die Anzucht und Differenzierung verwendeten Medien und Reagenzien sind im Anhang 8.1.1 aufgeführt.

Sämtliche Stämme, die bei -80 °C in RCM (Reinforced Clostridial Medium) in der Stammsammlung gelagert werden, wurden zu Beginn der Versuchsreihen in RCM überimpft und 24 h/37 °C in einem Anaerobenbrutschrank (VT 5042 EK; HERAEUS) bei einem Vakuum von 40 kPa angezogen. Kontaminationskontrollen wurden auf Blutagar- und DST (Disc Sensitivity Test)-Platten durchgeführt (48 h/37 °C).

3.1.2 Kolonie- und Zellmorphologie

Zur Beurteilung der Morphologie und des Hämolyse-Verhaltens wurden die Stämme zur Erzielung von Einzelkolonien aus RCM auf Blutagar-Platten fraktioniert ausgestrichen. Die Platten wurden anaerob 24 h/37 °C bebrütet.

Zur Beschreibung der Mikromorphologie wurden aus Einzelkolonien Objektträgerausstriche angefertigt und sowohl nach Gram gefärbt als auch nativ im sog. „hängenden Tropfen“ beurteilt.

3.1.3 Gaschromatographische Fettsäureanalyse

Die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Bakterienzellwand stellt ein stabiles Erkennungsmerkmal eines Bakterienstammes dar. Der spezifische Anteil längerkettiger Fettsäuren, die bei gram-positiven Bakterien vor allem in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, wurde mit Hilfe gaschromatographischer Untersuchungen nach der Methode von HEITEFUSS (1991) bestimmt.

Die Rezepte der Lösungen für die gaschromatographischen Fettsäureanalysen sind im Anhang 8.1.2 aufgeführt.

Die Stämme wurden 48 h in RCM angezogen. Je 20 mL Zellsuspension/-kultur jeder Probe wurden auf 2 Pyrex-Röhrchen verteilt und 15 min bei 3500 g zentrifugiert (Varifuge, HERAEUS-CHRIST). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet jeweils in 5 mL physiologischer NaCl-Lösung gewaschen.

Die abzentrifugierten Zellen wurden mit 1 mL Verseifungsreagenz resuspendiert, gründlich gemischt und im Wasserbad 30 min/100 °C inkubiert (nach 5 min Inkubation erfolgte nochmals gründliches Durchmischen).

Nach Abkühlung der Röhrchen im Eisbad wurde 2 mL Methylierungsreagenz zugegeben und 10 min/80 °C inkubiert.

Nach erneuter Kühlung des Röhrcheninhaltes im Eisbad wurde zur Extraktion der Fettsäure-Methylester 1,25 mL Extraktionslösung zugesetzt und die Röhrchen 10 min auf einem Rotationsschüttler (GBL) gedreht.

Zur Trennung der wäßrigen von der organischen Phase wurde erneut zentrifugiert, danach konnte die untere, wäßrige Phase mit einer Pasteurpipette abgezogen werden.

Die verbleibende organische Phase wurde mit 3 mL Waschreagenz 5 min gedreht, danach nochmals zentrifugiert und dann bei -20 °C aufbewahrt, so daß sich die wäßrige Phase verfestigte. So konnte aus der organischen oberen Phase Probenmaterial entnommen werden, ohne es mit Substanzen aus der wäßrigen Phase zu kontaminieren.

Das Probenmaterial wurde im Gaschromatographen (Sigma 2000, PERKIN-ELMER) mit Flammenionisationsdetektor über eine 5 %ige Phenyl-Vinyl-Methyl-Silica-Kapillarsäule-54 (0121405, PERKIN-ELMER) (Länge 25 m, Innendurchmesser 0,2 mm, Filmdicke 0,32 µm) als stationäre Phase und ultrareinem Stickstoff als Trägergas analysiert.

1 µL des Probenmaterials wurde mit einer Hamiltonspritze manuell in die Säule injiziert und mit nachfolgend aufgeführtem Temperaturprogramm aufgetrennt.

Anfangstemperatur:	100 °C
1. Heizrate:	4 °C/min
1. Endtemperatur:	220 °C
2. Heizrate:	30 °C/min
2. Endtemperatur:	280 °C
Injektortemperatur:	350 °C
Detektortemperatur	350 °C
Gesamtdauer der Analyse	35 min.

Anhand eines Standards (4-7080, SUPELCO) mit 28 Fettsäuremethylestern wurden der GC und der Integrator (LCI-100, PERKIN-ELMER), der die Signale des Gaschromatographen aufnimmt, kalibriert, d.h. jedem Peak mit seiner spezifischen Retentionszeit wurde auf dem

Chromatogramm der entsprechende Fettsäuremethylester des Standards zugeordnet. Die im Standard enthaltenen Fettsäure-Methylester sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7. Fettsäure-Methylester des Eichstandards

Kodierung	Systematischer Name, Trivialname	Kurzbezeichnung
1	Nonansäure	9:0
2	Decansäure	10:0
3	Undecansäure	11:0
4	2-Hydroxydecansäure	2-OH-10:0
5	Dodecansäure	12:0
6	Tridecansäure	13:0
7	2-Hydroxydodecansäure	2-OH-12:0
8	3-Hydroxydodecansäure	3-OH-12:0
9	Tetradecansäure	14:0
10	13-Methyltetradecansäure	i-15:0
11	12-Methyltetradecansäure	a-15:0
12	Pentadecansäure	15:0
13	2-Hydroxytetradecansäure	2-OH-14:0
14	3-Hydroxytetradecansäure	3-OH-14:0
15	14-Methylpentadecansäure	i-16:0
16	cis-9-Hexadecensäure	16:1 ⁹
17	Hexadecansäure	16:0
18	15-Methylhexadecansäure	i-17:0
19	cis-9,10-Methylenhexadecansäure	17:0 cyc
20	Heptadecansäure	17:0
21	2-Hydroxyhexadecansäure	2-OH-16:0
22	cis-9,12-Octadecadiensäure	18:2 ^{9,12}
23	cis-9-Octadecensäure	18:1 ⁹
24	trans-9-Octadecensäure	18:1 ⁹
25	Octadecansäure	18:0
26	cis-9,10-Methylenoctadecansäure	19:0 cyc
27	Nonadecansäure	19:0
28	Eicosansäure	20:0

i = iso

a = antiiso

n: = Anzahl der Kohlenstoffatome

:n = Anzahl der ungesättigten Kohlenstoffatome

Unbekannte Fettsäuremethylester wurden aus den Retentionszeiten bekannter Standardkomponenten über die „Equivalent Chain Length“ nach folgender Gleichung berechnet:

$$ECL_x = \frac{RT_x - RT_n}{RT_{n+1} - RT_n} + n$$

ECL_x = Equivalent chain length („Äquivalente Kettenlänge“)

RT_x = Retentionszeit der unbekanntes Komponente

RT_n = Retentionszeit $C_{n:0}$ (Methylester vor unbekannter Komponente)

RT_{n+1} = Retentionszeit $C_{(n+1):0}$ (Methylester nach unbekannter Komponente)

n = Anzahl der C-Atome

Die Analysendaten wurden aus dem Integrator auf einen PC übertragen und mit einem speziell für diese Anwendung im Göttinger Institut für Tropentierhygiene entwickelten Softwareprogramm „BIS“ (Bacterial Identification System) verrechnet.

Als statistische Methode wurde die Berechnung der linearen Korrelation der einzelnen Fettsäure-Methylester-Profile über den Bravais-Pearson-Koeffizienten gewählt:

$$r = \frac{[N \cdot \sum xy - (\sum x) \cdot (\sum y)]}{\sqrt{[N \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [N \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

x, y = Variable, d.h. die Flächen einander entsprechender Peaks

N = Anzahl der Komponenten

Die lineare Korrelation mit dem Wert $r = +1$ bedeutet eine vollständige Übereinstimmung zweier Profile, $r = 0$ dahingegen keine Korrelation.

3.1.4 Biochemische Stoffwechsellleistungen

- Lezithinase- und Lipasenachweis

12 h-Kulturen aus RCM wurden auf Eigelb-Agar ausgestrichen und 48 h/37 °C anaerob bebrütet.

Lezithinase (Phospholipase C) spaltet Lezithin in Phosphorylcholin und wasserunlösliches Diglycerid, dadurch entsteht ein opaker, präzipitierter Hof um die Kolonie. Die Lipase spaltet Fettsäuren aus dem Lezithin, sie ist an einem perlmuttartig schillernden Glanz in der Randzone der Kolonie zu erkennen.

- Phosphatase

Von einer bewachsenen Blutagar-Platte wurde mit einer Öse Clostridienmaterial abgetragen und auf ein Filterpapier in einer Petrischale ausgestrichen. Zwei Tropfen Phosphatase-Reagenz (α -Naphthyl-1-phosphat und Diazonium-o-dianisidin) wurden auf die ausgestrichenen Kolonien getropft. Durch die bakterielle Phosphatase wird die Phosphatgruppe des α -Naphthyl-1-phosphats abgespalten. Nach 1-3 Minuten verfärbt sich phosphatase-positives Koloniematerial dunkelviolett, da sich das freie α -Naphthyl mit dem Diazonium-o-dianisidin zu einem Azofarbstoff verbindet.

- Indoltest

Manche Mikroorganismen vermögen Tryptophan zu Brenztraubensäure, Ammoniak und Indol zu spalten. Amylalkohol extrahiert Indol selektiv. Indol reagiert mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd zu einem dunkelroten Farbstoff.

Der zu prüfende Stamm wurde 48 h in RCM, dem 0,5g/L Tryptophan zugegeben wurde, angezogen. Danach wurde das Medium ca. 0,5 cm hoch mit Kovasc-Reagenz überschichtet. Nach wenigen Minuten trat bei Anwesenheit von freiem Indol eine kirschrote Verfärbung der Reagenzschicht auf.

- Das Rapid ID 32 A-System wurde nach Vorschrift der Fa. BIO MÉRIEUX, Frankreich, angewandt.

48 h auf Blutagar anaerob gewachsene Kulturen wurden in Suspensionsmedium überführt, gut gemischt und auf die vorgegebene Trübung McFarland 4 eingestellt. In die Vertiefungen der Teststreifen wurden 55 μ L der Suspension manuell pipettiert. Nach aerober Inkubation (4 h/37 °C) erfolgte die Zugabe von Nitrat-, James- bzw. Fast Blue-Reagenz in die entsprechenden Vertiefungen der Teststreifen. Nach 5 Minuten wurden alle Reaktionen mit Hilfe der Ablesetabelle visuell abgelesen und auf dem Ergebnisblatt protokolliert.

Die binären Informationen (+/-) wurden auf dem Ergebnisblatt in ein numerisches Profil umgewandelt und das Ergebnis im ATB 32 A-Analytischen Profilindex (BIO MÉRIEUX 1989) nachgeschlagen.

3.2 Toxine, Toxoide und Impfstoffe

3.2.1 Toxinproduktion

Ausführliche Angaben zu den Medien und Pufferlösungen sind im Anhang 8.1.1 aufgeführt. Die entsprechenden Genehmigungen zum Arbeiten mit pathogenen Clostridien, zur Zucht und Haltung von Versuchstieren sowie zur Durchführung von Tierversuchen liegen vor.

In Medienversuchen wurde zunächst ermittelt, welches Nährmedium für die maximale Toxin- ausbeute der untersuchten *C. botulinum*-Stämme am geeignetsten erscheint.

RCM, TGY und MCM wurden auf ihre Eignung als Medium zur Toxinproduktion der *C. botulinum*-Stämme getestet. In Anlehnung an Angaben von DUFF et al. (1957) und KOZAKI et al. (1974) wurden einheitliche Inkubationsbedingungen von 5 d/35 °C gewählt. Zunächst wurden in 500-mL-Schraubdeckelflaschen je 250 mL RCM, TGY bzw. MCM - Medium gefüllt und autoklaviert. Diese Medien wurden jeweils mit 25 mL 24 h in RCM anaerob bebrüteter Vorkulturen der Clostridien-Stämme beimpft und 5 d/35 °C bebrütet.

Zur Quantifizierung wurden 0,5 mL Kulturüberstand bei steigenden Verdünnungen mit Gelatine-Phosphat-Puffer (HATHEWAY u. DANG 1994; POPOFF 1989) jeweils 2 Mäusen⁴ i.p. appliziert. Auf eine umfangreiche Titration nach REED und MUENCH (1938) wurde hierbei aus ethischen Gründen verzichtet, das Ergebnis einer einfachen Zehnerverdünnungsreihe zur Ermittlung der MLD (Mäuse Letale Dosis) war für die Medienauswahl hinreichend aussagekräftig.

Nachdem die Medienauswahl für jeden Stamm getroffen war, wurden 4 Kulturflaschen mit jeweils 250 mL des geeignetsten Mediums mit 25 mL Inoculum beimpft und 5 d/35 °C inkubiert.

Die 4 bewachsenen Flaschen eines jeden Stammes wurden gepoolt, in Reagenzröhrchen umgefüllt und in einer Kühlzentrifuge (Cryofuge 6-6, HERAEUS) 30 min bei 20800 g zentrifugiert. Die so erhaltenen zellfreien Kulturüberstände wurden jeweils in 50 Einfrier- röhrchen à 2 mL portioniert, der Rest wurde in 100-mL-Glasflaschen abgefüllt und bis zu weiteren Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

⁴ NMRI-Mäuse aus der institutseigenen Zucht; 22-25 g KM , Fütterung mit Pellets (Erhaltungsfutter, SNIFF); Wasser aus Selbsttränken *ad libitum*.

3.2.2 Toxintypisierung

Zur Ermittlung der MLD wurden 0,5 mL Kulturüberstand bei steigenden Verdünnungen mit Gelatine-Phosphat-Puffer jeweils 3 Mäusen i.p. appliziert.

Die Spezifität der hergestellten Typtoxine wurde über den Neutralisationstest geprüft. Dazu wurden kommerzielle Antiseren eingesetzt, die im Abschnitt 3.3.1 näher beschrieben sind. Jeweils 2 mL Kulturüberstand wurden mit 100µL der typspezifischen und der heterologen Antitoxine versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. 2 Mäusen wurden jeweils 0,5 mL i.p. injiziert, der anschließende Beobachtungszeitraum betrug 5 Tage.

3.2.3 Toxoidierung

Die in Kap. 3.2.1 beschriebenen zellfreien Kulturüberstände der verschiedenen Typen von *C. botulinum* wurden mit 0,5 % Formalin (v/v) versetzt und 5 d /37 °C unter Rühren gelagert. Es folgte eine Kontrolle der Formalinkonzentration mit dem Formaldehyd-Test (10036, MERCK) und ggf. nachträgliche Einstellung der Formalin-Endkonzentration auf 0,5 % (v/v). Nach erneuter dreitägiger Inkubation wurde zur Überprüfung der Unschädlichkeit jeweils 3 Mäusen 1 mL der Toxoide i.p. injiziert und die Mäuse 10 Tage beobachtet.

3.2.3.1 Toxoidimpfstoffe eigener Herstellung

Nachdem die Unschädlichkeit der in Kap. 3.2.3 beschriebenen Toxoide in Mäusen getestet worden war, wurden den 8 verschiedenen Toxoiden in einem Mischungsverhältnis von 6:14 ein Adjuvans (Montanide®-763⁵) unter kräftigem Rühren auf dem Magnetrührer zugesetzt. Die Lagerung der Impfstoffe erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

3.2.3.2 Kommerzieller Toxoid-Impfstoff

Als kommerzieller Impfstoff wurde Botulinus (Lamsiekte)-Vaccine⁶ eingesetzt.

⁵ SEPPIC; 75, Quai d'Orsay, 75321 Paris, Frankreich

⁶ ONDERSTEPOORT VACCINE FACTORY; Private Bag X07, Onderstepoort 0100, Südafrika

Dabei handelt es sich um einen, nach der Methode von STERNE und WENTZEL (1959 zit. von JANSEN et al. 1976) hergestellten formalinisierten, an Aluminiumhydroxyd-adsorbierten Toxoidimpfstoff von *C. botulinum* Typ C und D zur Immunisierung von Rindern, Pferden, Schafen und Ziegen gegen Botulismus.

Der Impfstoff enthält je nach Charge 1-2,5 flocculation Units (Lf =Trübungseinheiten) von C1 und 10-20 Lf von D-Toxoid. Die Lf ist definiert als das Äquivalent von 1000 LD₅₀ für jedes der zwei Toxine.

In Kulturfiltraten, die zur Impfstoffproduktion eingesetzt werden, kann C2-Toxoid nach der Toxidierung nicht gefunden werden und keine der experimentell geimpften Tiere weisen Antikörper gegenüber C2 auf (JANSEN et al. 1976).

Die Onderstepoort-Vaccine hat sehr zufriedenstellende Resultate während großflächiger Feldstudien in Südafrika gebracht (JANSEN et al. 1976). Ebenfalls gute Resultate erzielte sie bei Feldstudien in Australien 1962 und 1963 (TAMMEMAGI u. GRANT 1967).

3.2.4 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der zellfreien Kulturüberstände der *C. botulinum*-Stämme, sowie der kommerziellen Botulismus-Vaccine wurde mit der von LOWRY et al. (1951) entwickelten Methode durchgeführt. (Lösungen im Anhang 8.1.3)

Ausgehend von einer Stammlösung von Albumin (2 mg/mL) wurde eine Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichkurve hergestellt.

Die Proben wurden 1:10 bzw. 1:50 vorverdünnt, so daß ihre Meßwerte im Bereich der Eichkurve zu erwarten waren.

Die Proben und die Albuminverdünnungen wurden alle in gleicher Weise behandelt:

100 µL Probe wurde mit 350 µL Aqua dest. gemischt, 300 µL 2 N NaOH wurden zugegeben. 540 µL der Lösung 1 wurde zugegeben, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach erfolgte die Zugabe von 60 µL Lösung 2 und 20minütiges Stehenlassen bei Raumtemperatur. 1800 µL Folinlösung (Lösung 3) wurde unter Rühren zu den Proben zugegeben, 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach erfolgte die photometrische Messung (Ultraspec 2000, PHARMACIA BIOTECH) bei 546 nm.

Die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit Hilfe der Extinktionsmessungen der Albumin-Eichgeraden.

3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Protein-Profile der Kulturüberstände, Lyophilisate und der Botulinus-Vaccine wurden in einer Mini-Protean-Elektrophoresekammer (BIORAD) mittels SDS-PAGE-Technik (LÄMMLI 1970) angefertigt. (Puffer- und Lösungen im Anhang 8.1.4)

Unmittelbar vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proben 1:1 mit Probenpuffer (Anhang 8.1.4) verdünnt, gemischt und 3 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht.

Nachdem die SDS-Gele auspolymerisiert waren, wurden sie in die Kammer eingespannt und Laufpuffer in die Kammer gefüllt. Danach wurden jeweils 18 µL des Probengemisches in die Geltaschen gefüllt, vom Standard (High Molecular Weight-SDS Calibration Kit, PHARMACIA) wurde 1 µl aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100V/5 min - 200V/40 min - 100V/5 min.

Bei der herkömmlichen SDS-Elektrophorese (Tris-Glycin-HCl) ist die Auflösung für niedermolekulare Peptide (< 14 kDa) ungenügend.

Um kleinere Proteine (100 bis 1 kDa) elektrophoretisch auftrennen zu können, führten SCHÄGGER und JAGOW (1987) ein zusätzliches Spacer-Gel ein, erhöhten die Molarität der Puffer und setzten anstelle von Glycin Tricin als Folge-Ion ein.

Die Tricin-Gele wurden entsprechend Anhang 8.1.4 hergestellt, die Kammer wurde mit Kathodenpuffer (innen) und Anodenpuffer (außen) gefüllt.

Wie oben beschrieben wurden die Probengemische und der Standard (SDS-6H, SIGMA) in die Geltaschen gefüllt. Es erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 30 V/60 min - 104V/1,5 h.

3.2.6 Färbung, Dokumentation und Archivierung der Gele

Wegen der hohen Nachweisempfindlichkeit wurden die aufgetrennten Proteine mit der Silberfärbung (Nachweisbereich 2-5 ng Protein/Bande) dargestellt. (Lösungen im Anhang 8.1.4)

Die Färbung der SDS-Gele erfolgte bei Raumtemperatur in flachen Schalen unter gleichmäßig schwenkender Bewegung auf einer Gelwippe (3013, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) nach folgendem Schema:

Fixierung	30 min
Waschen	3x5 min
Inkubation	30 min
Waschen	3x10 min
Silber-Reaktion	20 min
Waschen	2x1 min
Entwicklung	2-5 min
Stoppen	10 min
Waschen	3x5 min
Präservieren	> 30 min.

Nach der Färbung wurden die Gele in einem Videosystem photographiert (Gelprint 2000i, MWG BIOTECH), auf Filterpapier übertragen und in einem Gelrockner (Hydrotech, BIORAD) konserviert.

Die digitalen Bilddateien wurden über eine kommerzielle Software (RFLPscan, SCANALYTICS) ausgewertet.

3.3 Antitoxine

3.3.1 Kommerzielle Antitoxine

Seit 1994 sind keine anerkannten, internationalen Referenzseren für diagnostische Zwecke auf dem europäischen Markt erhältlich.

Das Statens Seruminstitut, Copenhagen (WHO International Laboratory for Biological Standards) hatte nur noch über Antitoxine der Typen B und E, die nur in besonderen Fällen abgegeben wurden, verfügt (BÖHNEL⁷). Diese Seren wurden mittlerweile an das National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), London übergeben und werden nur als Referenzpräparate an Laboratorien, die therapeutische Antitoxine herstellen, abgegeben (GESSLER⁸).

⁷ BÖHNEL, H.: schriftl. Anfrage 1994

⁸ GESSLER, F.: pers. Mitt. 1999

Das Institut Pasteur, Paris hat ebenfalls die Produktion der Antitoxine eingestellt.

In Tab. 8 sind die in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stehenden Antitoxine dargestellt.

Tab. 8. Kommerzielle Antitoxine gegen verschiedene Typen von *C. botulinum*

Antitoxin-Typ	Herkunft
A	Diagnostics Pasteur; Paris
A	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
B	Diagnostics Pasteur; Paris
B	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
C	Onderstepoort Biological Products, Onderstepoort
C	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
C ₁	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
C ₂	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
D	Onderstepoort Biological Products, Onderstepoort
D	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
E	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
F	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad
G	Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad

Es handelt sich zum einen um Restbestände der nicht mehr im Handel befindlichen Antitoxine A und B vom Institut Pasteur, zum anderen um standardisierte Referenzseren vom Institut for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, Niederlande.

Bei den Antitoxinen aus Onderstepoort⁹ handelt es sich um therapeutische Antiseren der Typen C und D für die Behandlung von Pferden, Rindern, Schafen und Vögeln/Geflügel in frühen Fällen von Botulismus.

3.3.2. Eigene Antitoxine

3.3.2.1 Immunisierung von Kaninchen

⁹ Herrn Dr. H. Jäger, ONDERSTEPSOORT VACCINE FACTORY, sei für die freundliche Hilfe bei der Beschaffung gedankt.

10 Kaninchen¹⁰ wurden zur Gewinnung von Antiseren mit den im Abschnitt 3.2.3 aufgeführten Toxoidimpfstoffen immunisiert.

2 Kaninchen erhielten 3 mal im Abstand von 3 Wochen jeweils 0,5 mL kommerzieller Botulinus-Vaccine s.c., 8 Kaninchen wurden mit jeweils 1 mL der in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen, selbst hergestellten Impfstoffe s.c., ebenfalls 3 mal im Abstand von jeweils 3 Wochen immunisiert. Blutentnahmen (s. u.) erfolgten bis zu einer Versuchsdauer von ca. 30 Wochen.

3.3.2.2 Gewinnung der Antiseren von Kaninchen

Zur Gewinnung von Antiseren wurde bei den immunisierten Kaninchen Blut aus der Ohrtrandvene (*V. auricularis*) (GORDON 1981) bzw. aus der lateralen Hautvene (*V. saphena lat.*) (HOLTZMANN 1994) entnommen. Die Punktionsstelle war zuvor mit 70 %igem Äthanol desinfiziert worden.

Die erste Blutprobe wurde vor der ersten Impfung entnommen (= Null-Serum), weitere 10 Blutentnahmen folgten ab der sechsten Woche im Abstand von 2 bis 4 Wochen.

Nach einer Versuchsdauer von ca. 30 Wochen wurden den Kaninchen in Sedation (Ketamin 25 mg/kg + Xylazin 3 mg/kg) durch Herzpunktion 100-150 mL Blut entnommen. Unmittelbar danach wurden sie euthanasiert (Pentobarbital 200 mg/kg).

Die Blutproben wurden in Glasröhrchen aufgefangen, ca. 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sich der Blutkuchen abgesetzt hatte und danach 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die erhaltene Kaninchenserum wurden in Portionen von 500 µL bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4 Versuchsbetriebe / Bestandsuntersuchungen

Im Kreis Kassel traten seit Sommer 1991 mehrere hundert Todesfälle bei Rindern auf, die den klinischen Verdacht Botulismus zuließen. Im Juni/Juli 1993, bei erneutem Auftreten von Erkrankungs- und Todesfällen gelang erstmals der Nachweis von *C. botulinum*-Toxin in den Untersuchungsmaterialien, so daß die Diagnose Botulismus als gesichert angesehen werden konnte.

¹⁰ Weiße Riesen aus Privatzucht, 2-3 kg KM, Haltung in Einzelkäfigen, Fütterung mit Pellets (Erhaltungsfutter, SNIFF) und Heu *ad libitum*, Wasser aus Selbsttränken *ad libitum*.

Wegen das regional gehäufte Auftretens von Botulismus entschied man sich 1994, im Rahmen eines Feldversuchs Botulinus-Toxoid-Impfstoff (Lamsiekte-Vaccine, ONDERSTEPOORT VACCINE FACTORY) nach entsprechender Ausnahmegenehmigung nach § 17 Tierseuchengesetz¹¹ zu importieren und in den betroffenen Herden in Hessen einzusetzen.

Alle Rinder mit einem Alter über 6 Monate wurden mit 2 mL s.c. vakziniert, eine Boosterung sollte nach 4-6 Wochen erfolgen, danach folgten jährliche Revakzinationen.

Die Vakzinationen/Boosterungen wurden ohne lokale oder allgemeine Reaktionen sehr gut vertragen. In den geimpften Herden traten keine neuen Fälle von Botulismus auf.

Die in Tab. 9 aufgeführten nordhessischen Betriebe A-D haben ohne Unterbrechung an dem Feldversuch seit Herbst 1994 teilgenommen. Die Serumproben adulter Tiere dieser Herden repräsentieren Bestände mit mehrjähriger Revakzination. Außerdem wurden Serumproben 2-8 d alter Kälber der Bestände A und C in die immunserologischen Untersuchungen mit einbezogen, um Aufschluß über die Möglichkeit der Übertragung maternalen Antikörper zu gewinnen.

Die beiden südhessischen Betriebe E und F wurden erstmals im Februar 1997 geimpft, die Boosterung erfolgte im März 1997.

Der Betrieb G aus dem Bereich Wesermarsch, Friesland wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, da dort im Sommer 1996 46 von 60 Milchkühen mit typischen Symptomen an Botulismus verendeten (ALTMANN 1998). Hier erfolgte eine 3tägige Verlaufsuntersuchung bei 5 Tieren, die seit 1 Woche Krankheitssymptome gezeigt hatten. In diesem Betrieb wurde nicht geimpft.

3.4.1 Betriebsdaten

Daten über Herdengrößen, Haltung, Fütterung, Botulismus-Erkrankungen und -Impfungen der einzelnen Rinderbestände sind in Tab. 9 aufgeführt.

¹¹ §17 c Abs. 4 Nr. 2a des Tierseuchengesetzes in der Fassung vom 29.01.1993 (BGBl. I S. 116)

3.4.2 Probenentnahme in den Betrieben

In den in Tab. 9 aufgeführten Beständen erfolgte die Blutentnahme bei Rindern durch Punktion der Schwanzvene (*V. coccygea media*), bei Kälbern durch Punktion der Drosselvene (*V. jugularis*)¹².

Die Serumproben wurden routinemäßig bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

¹² Herrn Dr. W. Becker, Staatl. Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Kassel (Betriebe A-D), Herrn F. Jacob, Staatl. Amt für Lebensmittelüberwachung, -Tierschutz und Veterinärwesen Gelnhausen (Betriebe E, F), sowie Herrn Dr. A. Erichsen, prakt. Tierarzt, Nordenham und Herrn Dr. J. Altmann, Amt für Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung, Brake (Betrieb G) sei für die Überlassung der Blutproben gedankt.

Tab. 9. Betriebsdaten verschiedener Rinderbestände

3.5 Untersuchungen zum Antikörper-Nachweis

Methodisch gliederten sich die immunserologischen Untersuchungen in die Komplement-bindungsreaktion (KBR) und den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

In Tab. 10 sind die Antigene aufgeführt, die in beiden Testsystemen eingesetzt wurden: Es sind die aus der eigenen Toxinproduktion gewonnenen zellfreien Kulturüberstände der 8 verschiedenen *C. botulinum*-Stämme und 5 nahe verwandter Clostridien-Stämme (im Folgenden „Kulturüberstände“ bezeichnet), sowie die kommerzielle Botulinus-Vaccine aus Onderstepoort, ein Toxoidimpfstoff der Typen C und D. Zusätzlich standen aus Südafrika die für die Impfstoffproduktion eingesetzten, einzelnen untoxoidierten Lyophilisate der Toxintypen C und D zur Verfügung¹³.

Tab. 10. Übersicht über die bei der KBR und dem ELISA eingesetzten Antigene

Stamm-Nummer	Bezeichnung	Toxin-Typ	Herkunftsbezeichnung
1028	<i>C. botulinum</i>	A	NCTC 7272
1029	<i>C. botulinum</i>	B	NCTC 7273
1030	<i>C. botulinum</i>	C α	NCTC 8264
2145	<i>C. botulinum</i>	C	REB 1455, Erfurt
2142	<i>C. botulinum</i>	D (D+C β)	1873 D, INST. PASTEUR
2146	<i>C. botulinum</i>	D	REB 1073, Erfurt
1032	<i>C. botulinum</i>	E	NCTC 8266
1033	<i>C. botulinum</i>	F	NCTC 10281; Langeland
1034	<i>C. butyricum</i>		NCTC 7423
1084	<i>C. baratii</i>		ATCC 25782
1085	<i>C. parabotulinum</i>		ATCC 17863
1089	<i>C. tetani</i>		ATCC 10779
1272	<i>C. sordelli</i>		ATCC 233
Botulinus-Vaccine	<i>C. botulinum</i>	C/D-Toxoid	ONDERSTEPOORT Vaccine Factory
Lyophilisat	<i>C. botulinum</i>	C	ONDERSTEPOORT Vaccine Factory
Lyophilisat	<i>C. botulinum</i>	D	ONDERSTEPOORT Vaccine Factory

¹³ Herrn Dr. H. Jäger, ONDERSTEPOORT VACCINE FACTORY, sei für die freundliche Hilfe bei der Beschaffung gedankt.

Die Lyophilisate wurden einzeln in 1 mL sterilem Wasser resuspendiert und in Portionen zu 100 µL bei -80 °C eingefroren (im Folgenden als „Lyophilisate“ bezeichnet).

Als Antitoxine dienten diverse kommerzielle Referenzseren (Tab. 11), sowie die eigenen, aus geimpften Kaninchen gewonnenen Antiseren (Tab. 12).

Tab. 11. Übersicht über die bei der KBR und dem ELISA eingesetzten kommerziellen Referenzseren

Antitoxin-Typ	Herkunft	Tierart	Einheiten (lt. Herstellerangaben)
A	Diagnostics Pasteur ¹⁾	Pferd	> 5000 A.E./mL ⁴⁾
A	ID-DLO ²⁾	Schaf	13.400 Anti MLD ₅₀
B	Diagnostics Pasteur ¹⁾	Pferd	500 A.E./mL
B	ID-DLO ²⁾	Schaf	25.600 Anti LD ₅₀ /mL
C	ONDERSTEPOORT ³⁾	Pferd	> 1000 Units/mL
C	ID-DLO ²⁾	Ziege	4.418 Anti LD ₅₀ /mL
C ₁	ID-DLO ²⁾	Kaninchen	unbekannt
C ₂	ID-DLO ²⁾	Kaninchen	unbekannt
D	ONDERSTEPOORT ³⁾	Pferd	> 1000 Units/mL
D	ID-DLO ²⁾	Schaf	17.100 Anti LD ₅₀ /mL
E	ID-DLO ²⁾	Schaf	25.600 Anti LD ₅₀ /mL
F	ID-DLO ²⁾	Kaninchen	20.060 Anti LD ₅₀ /mL
G	ID-DLO ²⁾	Schaf	unbekannt

¹⁾ Institut Pasteur; Rue du Dr Roux, 72724 Paris, Frankreich

²⁾ Institut for Animal Science and Health (ID-DLO); P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, Niederlande

³⁾ ONDERSTEPOORT Biological Products, Private Bag X07, Onderstepoort 0110, Südafrika

⁴⁾ A.E./mL = Antitoxische Einheiten/mL

Tab. 12. Übersicht über die bei der KBR und dem ELISA eingesetzten Antiseren hyperimmunisierter Kaninchen

Antiserum	hyperimmunisiert mit	Herkunft	Tierart
A	1028	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
B	1029	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
C	1030	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
C	2145	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
D	2142	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
D	2146	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
C/D	Botulinus-Vaccine, ONDERSTEPOORT	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
E	1032	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen
F	1033	Tropentierhygiene; Göttingen	Kaninchen

In der Tabelle 12 sind die in der KBR und im ELISA eingesetzten, aus Kaninchen gewonnenen Antiseren (A-F) dargestellt. Die Kaninchen wurden mit den selbst hergestellten Botulinus-Toxoid-Vakzinen (Abschnitt 3.2.3.1) bzw. einer kommerziellen Botulinus-Toxoid-Vaccine (Abschnitt 3.2.3.2) nach dem im Abschnitt 3.3.2.1 beschriebenen Schema geimpft. Die Gewinnung der Antiseren erfolgte gemäß Abschnitt 3.3.2.2.

Die immunserologischen Untersuchungen gliederten sich in drei Bereiche:

- Ermittlung des Antikörper-Titerverlaufs immunisierter Kaninchen
- Ermittlung möglicher Kreuzreaktionen der untersuchten Stämme bzw. Antiseren
- Ermittlung von Antikörpern in Rinderseren

a) Ermittlung des AK-Titerverlaufes immunisierter Kaninchen

Zur quantitativen Ermittlung des AK-Titerverlaufes wurden die in einem Zeitraum von ca. 30 Wochen erhaltenen Kaninchenserum (Kapitel 3.3.2.2) gegen die Kulturüberstände (Tab. 10) der als Antigen applizierten Stämme titriert.

b) Ermittlung von AK-Kreuzreaktionen

Zur Ermittlung kreuzreaktiven Verhaltens wurden die in Tab. 11 aufgeführten 13 Referenzseren, sowie die nach Immunisierung der Kaninchen gewonnenen 10 verschiedenen Antiseren

(Tab. 12) aller Typen von *C. botulinum* gegen die Kulturüberstände aller in Tab. 10 erwähnten *C. botulinum*-Stämme sowie nahe verwandter Clostridien-Stämme titriert.

c) Ermittlung von *C. botulinum*-AK in Rinderseren

Seren ungeimpfter Rinder, nach erstmaliger Boosterung, nach mehrjähriger Revakzinierung, sowie Kälberseren von geimpften Mutterkühen (Kapitel 3.4.2) wurden zur Ermittlung des Impferfolges durch kommerzielle Botulinus-Vaccine untersucht.

Aus einer niedersächsischen Herde standen zusätzlich Serumproben klinisch an Botulismus erkrankter Rinder zur Verfügung (Tab. 9).

Zur Ermittlung der Antikörpertiter bzw. des Impferfolges wurden diese Seren gegen die südafrikanischen Lyophilisate sowie gegen Kulturüberstände von Referenzstämmen der Typen C (1030) und D (2142) titriert (Tab. 10).

3.5.1 Komplementbindungsreaktion

Die KBR ist ein indirektes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern, welches letztlich auf zwei isoliert voneinander ablaufenden Reaktionen beruht: Die Primär- und die Sekundärreaktion.

Bei der KBR wird die Tatsache ausgenutzt, daß das Komplementsystem durch Komplexe aus Antigenen und Antikörpern in einem komplizierten, kaskadenartigen Reaktionsprozeß aktiviert wird (Primärreaktion, unsichtbar). Das „Komplementdefizit“ als Folge einer Komplementbindung wird in der KBR durch das hämolytische Indikatorsystem sichtbar gemacht (Sekundärreaktion).

Trotz einer Vielzahl von Modifikationen, die die einzelnen Reaktionsschritte des Tests betreffen, ist das Grundprinzip der „klassischen“ KBR immer das gleiche. So werden für jede KBR mindestens 5 Komponenten benötigt: Antigen, Serum, Komplement, Erythrozyten und Ambozeptor (alte Bezeichnung für einen komplementbindenden Antikörper gegen Schaferythrozyten).

Zunächst wird das probeneigene Komplement durch Wärmebehandlung inaktiviert. Wenn in der Primärreaktion Antigen und Antikörper miteinander reagieren, wird in definierter Menge zugesetztes heterologes Komplement durch die Immunkomplexe verbraucht. Zur Sichtbarmachung dieser Reaktion dient in der Sekundärreaktion ein Indikatorsystem, das

hämolytische System, welches aus Schaferythrozyten und dem Ambozeptor besteht. Da der Ambozeptor zur Auflösung der Erythrozyten ebenfalls Komplement benötigt, kann man nach erfolgter Reaktion aufgrund einer eingetretenen oder ausgebliebener Hämolyse feststellen, welche der beiden hintereinander ablaufenden Reaktionen Komplement verbraucht hat.

Diese theoretische Vorbetrachtung zeigt, daß zur exakten Versuchsdurchführung eine genau auf das System abgestimmte Menge Komplement erforderlich ist, die gerade ausreicht, eine vollständige Hämolyse der Schaferythrozyten zu bewirken. Bei Komplementmangel würden negative AG-AK-Reaktionen falsch positiv erscheinen, da die Komplementmenge noch nicht einmal für die vollständige Hämolyse des Indikatorsystems ausreichen würde. Bei Komplementüberschuß würden positive AG-AK-Reaktionen durch „Übersättigung“ des hämolytischen Systems zumindest teilweise falsch negativ erscheinen.

Vor jedem Versuch wurde deshalb in einem Vorversuch die geringste Komplementkonzentration ermittelt, die in Anwesenheit des Testantigens eine vollständige Hämolyse des Indikatorsystems bewirkt.

Die im folgenden beschriebene Methodik der Vor- und Hauptversuche wurde in Anlehnung an ANTONIADIS (1971) und die von WEISS und WEISS (1988) beschriebene Methode zum Toxinnachweis in Mikrotiter-Technik für den Antikörpernachweis modifiziert.

3.5.1.1 Materialien

Erythrozytensuspension, Komplement, Ambozeptor und Pufferlösung wurden über die Fa. VIRION, Würzburg bezogen. (Anhang 8.1.5)

Antigene

Als Antigene dienten die in Abschnitt 3.5 Tab. 10 aufgeführten Kulturüberstände, Lyophilisate bzw. die Botulinus-Vaccine aus Südafrika.

Die Gebrauchsverdünnungen der Testantigene wurden in Vorversuchen nach Abschnitt 3.5.1.2.3 ermittelt.

Seren

Die bereits in Abschnitt 3.5 erwähnten Kaninchen- und Rinderseren sowie kommerzielle Antitoxine wurden für die KBR eingesetzt. Vor ihrem Einsatz für die KBR wurden sie alle in gleicher Weise vorbehandelt (s. u.)

Vorbehandlung der Antiseren, Testseren

Um den Komplementverbrauch einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion genau erfassen zu können, ist es erforderlich, das in jedem Säugetierserum enthaltene Komplement zu inaktivieren. Da einzelne Komplementfaktoren thermolabil sind, genügt eine Erwärmung des Serums über einen bestimmten Zeitraum (Inaktivierung), i. d. R. 30 min/56 °C.

Da jedoch leichte Speziesunterschiede bezüglich der Komplementinaktivierung bestehen, wurden nach LENNETTE und SCHMIDT (1977) die in Tab. 13 aufgeführten Inaktivierungsbedingungen gewählt.

Die Inaktivierung der Seren erfolgte in einem Wasserbad mit 1:5 bzw. 1:10 in Veronalpuffer vorverdünnten Seren, um eine Hitzekoagulation zu vermeiden.

Tab. 13. Inaktivierungsbedingungen für Seren bei der KBR (mod. nach LENNETTE u. SCHMIDT 1977)

Spezies	Inaktivierungsbedingungen	
	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Kaninchen	56	30
Rind	56	30
Schaf	56	15
Pferd	62	30

Serumausgangsverdünnungen von 1:16 sind sicher bewertbar, Verdünnungsstufen von 1:8 sind gut auszuwerten. Titerstufen von 1:2 sind nicht zu wählen, da niedrige Serumverdünnungen eher unspezifische antikomplementäre Wirkungen aufweisen können. (LENNETTE u. SCHMIDT 1977).

Wenn Serum in Gegenwart von Komplement dessen Wirkung herabsetzt oder aufhebt, spricht man von einer antikomplementären Wirkung bzw. „Eigenhemmung“ des Serums. Ursachen der „Eigenhemmung“ sind z.B. ein Überschuß von Globulin, aggregierte Immunglobuline durch wiederholtes Tauen und Gefrieren, hämolytisches Serum, bakterielle Kontaminationen

und pathophysiologische Faktoren wie z.B. zirkulierende Immunkomplexe oder bestimmte Pharmaka.

Durch die Erwärmung des Serums können neben dem Komplement häufig auch anti-komplementäre Eigenschaften inaktiviert werden.

Zur Kontrolle der antikomplementären Serumeigenschaften *in vitro* diene die bei jedem Testsystem mitgeführte Serumkontrolle (ohne Antigenzugabe). Das Phänomen der Eigenhemmung stellte sich dabei als positive KBR-Reaktion dar.

3.5.1.1.1 Standardisierung der Erythrozytensuspension

Für alle Versuche (Vor- und Hauptversuche) der KBR wurden Schaferythrozyten auf eine definierte Volumenkonzentration von 1 % v/v nach DIN 58 969 Teil 10 mit dem Cyanhämiglobin-Verfahren eingestellt.

Zur Herstellung dieser 1%igen Erythrozytensuspension wurde die für den Versuch benötigte Menge des konservierten Hammelblutes 10 min bei 1000 g zentrifugiert und das Sediment dreimal mit der zehnfachen Menge Veronalpuffer gewaschen, wobei jeweils wie oben zentrifugiert wurde, bis der Überstand klar war. Nach dem dritten Waschen wurde das Sediment in Veronalpuffer aufgenommen, so daß eine ca. 1%ige Lösung entstand.

Ein Parallelansatz aus:

0,5 mL Erythrozytensuspension plus 3 mL Transformationslösung (Anhang 8.1.5) wurde gut geschüttelt und mindestens 20 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach folgte 10minütiges Zentrifugieren bei 1000 g.

Die Konzentration von Cyanhämiglobin im Überstand wurde in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke (67741, SARSTEDT) bei 546 nm gegen die Transformationslösung in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, PHARMACIA BIOTECH) gemessen.

Eine Extinktion von 0,2 entsprach einer 1-% (v/v) -Suspension von Schaferythrozyten in der Ausgangslösung.

Eine Korrektur der Erythrozyten-Ausgangssuspension erfolgte nach der Gleichung

$$\left(\frac{E_x}{E_y} \cdot V \right) - V = X$$

E_x = gemessene Extinktion

E_y = die für die gewünschte Erythrozytenkonzentration bekannte Sollextinktion, hier $E_y = 0,2$

V = Volumen der Erythrozyten-Suspension in mL

X = Menge des Veronalpuffers (mL), der dem Ansatz zugegeben werden muß, um den Sollwert zu erreichen

Die Korrektur nach o.g. Formel ist nur bei Ausgangssuspensionen mit Extinktionswerten bis 1,0 möglich.

Da die 1%ige Erythrozytensuspension bei 4 °C nur begrenzt haltbar ist, wurde sie max. 4 Tage für die Versuche eingesetzt, solange der Überstand klar war.

3.5.1.1.2 Ambozeptor

Der kommerzielle Ambozeptor (Anhang 8.1.5) sollte nach Herstellerangaben mit Veronalpuffer auf eine Gebrauchsverdünnung von 1:2500 für jeden Versuchsansatz frisch verdünnt werden.

In einem Ambozeptor-Vorversuch (Abschnitt 3.5.1.2.1) wurde geprüft, ob sich diese Verdünnung als optimale Dosis zur Sensibilisierung der Erythrozyten auch für den Einsatz in der hier vorgestellten Methodik eignet.

3.5.1.1.3 Herstellung des hämolytische Systems

Die auf 1 % eingestellte Erythrozytensuspension wurde zu gleichen Teilen mit der im Vorversuch (Abschnitt 3.5.1.2.1) ermittelten Ambozeptor-Gebrauchsverdünnung für jeden Versuchsansatz frisch gemischt.

Zur Sensibilisierung der Erythrozyten wurde das hämolytische System 15 min bei 37 °C unter vorsichtigem Rühren inkubiert.

3.5.1.2 Vorversuche zur Methodik

3.5.1.2.1 Ambozeptor-Vorversuch

Die Ambozeptor-Auswertung erfolgte in der Weise, daß fallende Mengen des hämolytischen Ambozeptors in Gegenwart von konstanten Mengen des Komplements, des Veronalpuffers (als Ersatz für Antigen und Serum) und der Erythrozyten getestet wurden. Es wurde zunächst eine Ambozeptor-Vorverdünnung von 1:100 in Veronalpuffer (VP) hergestellt. Mit dieser Vorverdünnung erfolgten in 10-mL-Glasröhrchen die weiteren Ambozeptor-Verdünnungen von 1:2000 bis 1:6500, wie in Abb. 5 dargestellt. Von diesen Gebrauchsverdünnungen wurden jeweils 25 µL in einem Parallelansatz in die Vertiefungen einer 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte (82.1582, SARSTEDT) pipettiert. Jeweils 25 µL einer 1%igen Erythrozytensuspension, Veronalpuffer und Komplement (Anhang 8.1.5) (lt. Herstellerangaben in einer Verdünnung von 1:40) wurden ebenfalls zu den Ambozeptor-Verdünnungen hinzupipettiert.

Die Mikrotiterplatte wurde auf einem Plattenschüttler (541303, HEIDOLPH) gut geschüttelt, abgedeckt und 30 min/37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation (Varifuge, HERAEUS) der Platte 5 min bei 350 g und die visuelle Auswertung der Ergebnisse.

Eine hämolytische Einheit ist die höchste Ambozeptor-Verdünnung, die noch eine komplette Hämolyse bewirkt. In den weiteren Vorversuchen sowie in den Hauptversuchen wurde mit 2 hämolytischen Einheiten gearbeitet.

Ambozeptor (1:100 in VP verdünnt)	mL	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Veronalpuffer	mL	1,9	2,4	2,9	3,4	3,9	4,4	4,9	5,4	5,9	6,4
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	µL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%ige Erythrozyten- Suspension	µL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Veronalpuffer	µL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Komplement-Verd.	µL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Abb. 5. Ambozeptor-Titration

In der Abbildung 5 ist der Ambozeptor-Vorversuch dargestellt. 1:100 in Veronalpuffer (VP) vorverdünnter Ambozeptor (Anhang 8.1.5) wurde entsprechend Abschnitt 3.5.1.2.1 in 10 mL Glasröhrchen mit VP auf Gebrauchsverdünnungen von 1:2000-1:6500 weiter verdünnt. Jeweils 20 µL dieser Gebrauchsverdünnung wurden in Rundboden-Mikrotiterplatten pipettiert. Hinzugefügt wurden jeweils

25 µL Erythrozytensuspension (Abschnitt 3.5.1.1.1), VP und 1:40 in VP verdünntes Komplement (Komplement-Verd.). Nach gründlichem durchmischen, inkubieren (30 min/37°C) und zentrifugieren (5 min bei 350 g) erfolgte die Auswertung der Ergebnisse visuell.

In dem Ambozeptor-Vorversuch wurden weiterhin drei in der Abb. 5 nicht dargestellte Erythrozyten-Kontrollen mit angesetzt:

- 100 µL Veronalpuffer + 25 µL 1%ige Erythrozytensuspension
- 75 µL Veronalpuffer + 25 µL Ambozeptor ^{*)} + 25 µL 1%ige Erythrozytensuspension
- 75 µL Veronalpuffer + 25 µL Komplement + 25 µL 1%ige Erythrozytensuspension

^{*)} i.d. Verdünnung 1:1000

Sämtliche Kontrollen durften keine Hämolyse zeigen.

3.5.1.2.2 Komplement-Vorversuch

Der Komplement-Vorversuch dient der Feststellung der Komplement-Gebrauchsdosis und muß daher in Gegenwart der im Hauptversuch verwendeten Antigene erfolgen.

Es wurden zunächst Komplement-Vorverdünnungen von 1:35, 1:40, 1:45 und 1:50 in Veronalpuffer (VP) hergestellt. Die so im Makrosystem (Röhrchen) hergestellten Komplementverdünnungen wurden zusammen mit verschiedenen Antigenverdünnungen im Abschnitt 3.5.1.2.3 zur Ermittlung der optimalen Antigen-Gebrauchsverdünnung eingesetzt.

Die korrekte Einstellung der Komplement-Gebrauchsverdünnung wurde mit abgestuften Komplement-Kontrollen, die 2, 1, 0,5 bzw. 0,25 Einheiten Komplement enthielten, geprüft.

Die Komplementverdünnung, die noch eine vollständige Lyse ergibt, wird als 1 Komplement-Einheit bezeichnet.

3.5.1.2.3 Antigen-Vorversuch

Von besonderer Bedeutung für die KBR ist die Art und Weise der Antigeneinstellung. Die entscheidende Einschätzung des Antigens beruht auf Ermittlung seiner direkt komplement-verbrauchenden als auch seiner spezifisch antigenen Eigenschaften. Beides ist in Abhängigkeit des Komplements zu sehen.

Für die Antigeneinstellung wurde die sog. Schachbrett-Titration herangezogen, wonach steigende Antigenverdünnungen gegen steigende Verdünnungen der homologen¹⁴ Kaninchenserum getestet wurden. Dies ermöglichte die Feststellung des optimalen Verhältnisses zwischen Antigen und Serum, d.h. die höchste Antigenverdünnung, die gerade noch in der Lage war, die kleinste meßbare Antikörpermenge zu binden.

Die Titrierung der eingesetzten Antigene (Tab. 10) erfolgte mit 7 unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Dafür wurden zuerst die Antigene im Makrosystem (Röhrchen) in Veronalpuffer verdünnt (Tab. 14).

Tab. 14. Antigen-Verdünnungsstufen zur Ermittlung der Antigen-Gebrauchsverdünnungen

Verdünnungsstufe	Kulturüberstände	Lyophilisate	Botulinus-Vaccine
1	1:10	1:10	pur
2	1:20	1:100	1:5
3	1:40	1:500	1:10
4	1:80	1:1000	1:50
5	1:160	1:2500	1:100
6	1:320	1:5000	1:1000
7	1:640	1:10000	1:10000

Nachdem die in Tab. 14 aufgeführten AG-Gebrauchsverdünnungen hergestellt wurden, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte in 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatten.

Pro Antigen wurden 4 Mikrotiterplatten nach dem in Abb. 6 aufgezeichneten Schema identisch beschickt.

25 µL Veronalpuffer (VP) wurden in die Vertiefungen der Spalten 2-7 vorgelegt.

25µL 1:5 vorverdünntes homologes Serum wurde in die Vertiefungen der Spalten 1 und 2 pipettiert. Ab Spalte 2 erfolgte eine Serumtitration bis Spalte 7 mit 25 µL, so daß Serumverdünnungen von 1:5 (Spalte 1) bis 1:320 (Spalte 7) entstanden.

¹⁴ Hierbei sind - und dies soll auch im Folgenden beibehalten werden - unter „homologen Seren“ die Kaninchenserum zu verstehen, die gegen die zur Vakzinierung eingesetzten Antigene titriert wurden.

25 µL der in Tab. 14 beschriebenen Antigenverdünnungsstufen (1-7) wurden in die Kavitäten 1-7 der Reihen A-G pipettiert, in Reihe H wurde nur Veronalpuffer zu den Serumverdünnungen zugegeben.

Jeweils eine der im Abschnitt 3.5.1.2.2 (Komplement-Vorversuch) beschriebenen 4 Komplementverdünnungen (1:35-1:50) wurde auf einer der 4 zuvor identisch beschickten Mikrotiterplatten eingesetzt.

Dabei wurden 25 µL der Komplement-Vorverdünnung in alle Kavitäten der Spalten 1-7 pipettiert.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AG-Verdünnung	je 25 µL Serumverdünnung							AG-Kontrolle	Komplement-Einheiten			
	g												
	je 25 µL	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		2	1	1/2	1/4
A	1												
B	2												
C	3												
D	4												
E	5												
F	6												
G	7												
H	VP												

Abb. 6. Arbeitsschema für Antigen-Vorversuch

Abbildung 6 zeigt die Plattenbelegung für den Antigen-Vorversuch. Die Reihen A-G waren mit den in Tab. 14 aufgeführten Antigenverdünnungen belegt, Reihe H diente der Serumkontrolle und war ohne AG-Zusatz. In den Spalten 1-7 erfolgte die Serumtitration (Seren sh. Tab. 12): 25 µL 1:5 vorverdünnte Seren (Spalte 1) wurden in einer geometrischen Verdünnung in Veronalpuffer (VP) bis zu einer Verdünnung von 1:320 (Spalte 7) titriert. Spalte 8 diente der Antigenkontrolle, der Serumanteil wurde durch VP ersetzt. 25 µL der in Abschnitt 3.5.1.2.2 ermittelten Komplementverdünnung wurde in alle Kavitäten der Spalten 1-8 zugefügt. Spalten 9-12 dienten der Komplementkontrolle. Dort erfolgte eine Komplement-Titration in VP, so daß 2, 1, 1/2 und 1/4 Komplement-Einheiten (sh. 3.5.1.2.2) vorgelegt worden waren.

1 Komplementeinheit ist definiert als die Komplement-Verdünnung, die noch eine vollständige Hämolyse des Indikatorsystems bewirkt. Nach der Komplementtitration in den Spalten 9-12 wurden

jeweils 25 μL Antigenverdünnung und VP zugegeben. Die weitere Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte gemäß Abschnitt 3.5.1.2.3.

In Spalte 8 wurden eventuelle direkt komplementverbrauchende bzw. hämolytische Eigenschaften des Antigens ermittelt. Der Serumanteil wurde hierbei durch Veronalpuffer ersetzt. Die Kavitäten enthielten 25 μL Veronalpuffer, 25 μL der jeweiligen Antigenverdünnung und 25 μL Komplementverdünnung.

Die Spalten 9-12 dienten der Komplement-Kontrolle: 25 μL Veronalpuffer wurde in die Spalten 10-12 vorgelegt und 25 μL Komplementverdünnung in die Spalten 9 und 10 pipettiert. Nun erfolgte eine Komplement-Titration mit 25 μL von Spalte 10-12. Danach wurden jeweils 25 μL der jeweiligen Antigenverdünnung und 25 μL VP zu den Spalten 9-12 pipettiert.

Aus dieser Komplement-Titration ergab sich in Spalte 9 die im Testsystem eingesetzte Komplementkonzentration (2 Komplement-Einheiten), Spalte 10 enthielt die Hälfte (1 Komplement-Einheit), Spalten 11 und 12 enthielten jeweils $\frac{1}{2}$ bzw. $\frac{1}{4}$ Komplement-Einheit.

Die Mikrotiter-Platten wurden auf dem Plattenschüttler gründlich geschüttelt, mit einem Mikrotiterplatten-Deckel verschlossen und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Herstellung des hämolytischen Systems. Dieses wurde ebenso wie die Mikrotiterplatten des Vortages 15 min bei 37 °C inkubiert.

50 μL des hämolytischen Systems wurden in alle Kavitäten (mit Ausnahme der Spalte 8) der Mikrotiterplatten pipettiert. In die Spalte 8 wurden 50 μL eines Gemisches aus gleichen Teilen VP und 1%iger Erythrozytensuspension (ohne Ambozeptor) pipettiert.

Die Mikrotiterplatten wurden gründlich geschüttelt, mit einem Deckel verschlossen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation 5 min bei 350 g und sofortige Ablesung der Ergebnisse mit bloßem Auge.

Die Ergebnisse der Vorversuche wurden nach folgendem Schema bewertet (Prozentsatz der vorhandenen nicht hämolysierten Erythrozyten):

- 0 = 0 % vollständige Hämolyse, rote transparente Flüssigkeit ohne Bodensatz.
- 1 = 25 % roter, transparenter Überstand, geringe Mengen Erythrozyten am Boden.
- 2 = 50 % rötlicher, transparenter Überstand, deutlicher Bodensatz aus Erythrozyten.
- 3 = 75 % leicht rot-gelb getönter Überstand, starker Bodensatz aus Erythrozyten.
- 4 = 100% keine Hämolyse, klarer Überstand, starker Bodensatz aus Erythrozyten (Knopf)

Die höchste Antigen-Verdünnung, die mit der höchsten Serumverdünnung eine vollständige Hemmung der Hämolyse anzeigt, wird als 1 Antigen-Einheit bezeichnet. Im Hauptversuch wurde mit 2 Antigen-Einheiten gearbeitet.

Diejenige Komplement-Verdünnung, die noch eine vollständige Lyse ergibt, wird als 1 Komplement-Einheit bezeichnet. Im Hauptversuch wurden 2 Komplement-Einheiten eingesetzt, so daß eine 100%ige Reserve bestand.

3.5.1.3 Nachweis von *C. botulinum*-Antikörpern

Der Nachweis von Antikörpern in den verschiedenen Seren erfolgte quantitativ, d.h. in Probenverdünnungsreihen.

Die für den Hauptversuch benötigten Reagenzien, Materialien und Geräte wurden bereits in 3.5.1 dargestellt.

Die Kaninchenserum wurden 1:10 in Veronalpuffer, die Rinderseren und die kommerziellen Antiseren 1:5 in Veronalpuffer vorverdünnt und inaktiviert.

Die Antigene und das Komplement wurden in den durch die AG-Vorversuche (Abschnitt 3.5.1.2.3) ermittelten Gebrauchsverdünnungen eingesetzt.

In jedem Hauptversuch wurden folgende Kontrollen mitgeführt:

- Serumkontrolle: (Spalte 1); die Serumprobe darf in der niedrigsten Verdünnung keine Komplementinaktivierung auslösen.
- Negativ-Serum: am Versuchsende muß vollständige Hämolyse eingetreten sein.
- Positiv-Serum: am Versuchsende muß bei einer bestimmten Serumverdünnung eine vollständige Hemmung der Hämolyse sichtbar sein.
- Komplement-Kontrolle: Am Versuchsende muß die Komplement-Gebrauchsverdünnung (2 Komplement-Einheiten) und die Hälfte der Komplement-Gebrauchsverdünnung (1 Komplement-Einheit) eine vollständige Hämolyse aufweisen, der Hämolysegrad der $\frac{1}{2}$ bzw. $\frac{1}{4}$ Komplement-Einheit soll idealerweise 50 % betragen.
- Antigen-Kontrolle: Das Antigen darf keine direkt komplementverbrauchenden bzw. hämolytischen Eigenschaften aufweisen.

Testansatz 1. Tag:

Puffervorlage: In 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatten wurden 25 μ L Veronalpuffer (VP) in die Vertiefungen der Spalten 2-12 vorgelegt.

Im Parallelansatz wurden 25 μ L des vorverdünnten Serums in die Spalten 1, 2 und 3 pipettiert.

Serum-Titration: Ab der dritten Spalte erfolgte die Serum-Titration mit jeweils 25 μ L bis zur Spalte 12, die letzten 25 μ L der Serumverdünnung wurden verworfen.

Antigenzugabe: 25 μ L der Antigen-Gebrauchsverdünnung wurden in alle Vertiefungen der Spalten 2-12 pipettiert.

Komplementzugabe: 25 µL der Komplement-Gebrauchsverdünnungen wurde in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatten hinzugegeben.

Auf der letzten Mikrotiterplatte eines Versuchsansatzes befanden sich die Komplementkontrolle und die Antigenkontrolle in der Reihe G.

Komplementkontrolle: 25 µL VP wurden in die Vertiefungen G9-G12 pipettiert. 25 µL der Komplementgebrauchsverdünnung wurden in G9 und G10 pipettiert, beginnend mit G10 erfolgte eine Komplement-Titration bis G12. Jeweils 25 µL Antigen-Gebrauchsverdünnung und VP (statt Serum) wurden den Vertiefungen G9-G12 hinzugefügt.

Antigenkontrolle: Die Antigenkontrolle befand sich in den Vertiefungen G1/G2. Jeweils 25 µL VP, Antigen-Gebrauchsverdünnung und Komplement-Verdünnung wurden in die Vertiefungen pipettiert.

Die Platten wurden gründlich auf einem Plattenschüttler geschüttelt, mit dem Deckel verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Testansatz 2. Tag:

Zugabe des hämolytischen Systems: Das frisch zubereitete hämolytische System (3.5.1.1.3) und die Mikrotiterplatten mit den Ansätzen des Vortages wurden 15 min/37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µL des hämolytischen Systems in alle Vertiefungen (Serumtitration und Komplementtitration) der Mikrotiterplatten.

Nur bei der Antigenkontrolle wurden jeweils 25 µL der 1%igen Erythrozytensuspension und VP (anstelle von Ambozeptor) in die Kavitäten pipettiert.

Inkubation: Die Mikrotiterplatten wurden unmittelbar nach dem Beschicken für 25-30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation war beendet, wenn die Komplementkontrolle bei 2- und 1 Komplement-Einheiten 100 % Hämolyse aufwies.

Zentrifugation und Auswertung: Die Platten wurden 5 min bei 350 g zentrifugiert und die Ergebnisse gemäß 3.5.1.3.1 ausgewertet.

3.5.1.3.1 Photometrische Bestimmung der 50%-Hämolyse und Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte photometrisch (Digiscan, ASYS HITECH) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Zu diesem Zweck mußten die Überstände aus den Rundboden-Mikrotiterplatten in Flachboden-Mikrotiterplatten (475094, NUNC) überpipettiert werden.

Mengen von 80 µL konnten, ohne daß man Gefahr lief, sedimentierte Erythrozyten aufzuschwemmen, problemlos aus den Vertiefungen der Rundbodenplatten entnommen werden und in neue Flachbodenplatten überpipettiert werden, in die zuvor 80 µL VP in jede Vertiefung pipettiert worden waren. Durch die Verdünnung des Überstandes zu gleichen Teilen mit Veronalpuffer war eine genauere photometrische Messung dieser kleinen Volumina möglich.

Die höchste Verdünnung der Serumprobe, die zu einer 50%igen Lyse des hämolytischen Systems geführt hat, wurde photometrisch anhand einer Hämolyse-Eichkurve bestimmt (s.u.). Die Ermittlung der 50%igen Lyse des hämolytischen Systems erfolgte ebenfalls photometrisch anhand einer Eichgeraden.

Parallel zum Hauptversuch wurde dazu im Makrosystem an jedem Versuchstag jeweils 1 Röhrchen mit 100 % Lyse und 1 Röhrchen mit 0 % Lyse des hämolytischen System hergestellt.

Für 100 % Hämolyse wurden die Reaktionskomponenten der Komplementkontrolle mit 2 Komplement-Einheiten eingesetzt, d.h.

1 mL Komplement
 + 1 mL Antigen-Gebrauchsverdünnung
 + 1 mL VP

Für 0 % Hämolyse wurde das Komplement durch VP ersetzt, d.h.

2 mL VP
 + 1 mL Antigen-Gebrauchverdünnung

Mit den Röhrchen wurde in gleicher Weise verfahren wie mit den Mikrotiterplatten im Hauptversuch, d. h. sie wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert, am nächsten Tag wurde hämolytisches System, in diesem Fall 2 mL hinzugefügt. Parallel zu den Mikrotiterplatten wurden die Röhrchen 25-30 min/37 °C inkubiert und dann 5 min bei 1000 g zentrifugiert.

Nun erfolgte die Mischung der beiden Röhrchen in Zehnerschritten nach folgendem Schema:

100 % Hämolyse	0 % Hämolyse		
0 Teile	+ 10 Teile	=	0 % Hämolyse
1 Teil	+ 9 Teile	=	10 % Hämolyse

9 Teile	+	1 Teil	=	90 % Hämolyse
10 Teile	+	0 Teile	=	100 % Hämolyse

Von dieser Hämolyse-Verdünnungsreihe wurden jeweils 80 µL der Verdünnungen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte pipettiert, in die, wie bei den Serumtitrationen auch, 80 µL VP vorgelegt worden waren.

Gemeinsam mit den Mikrotiterplatten der Serumproben erfolgte die Ablesung der Ergebnisse photometrisch.

Mit den gemessenen Extinktionen der Hämolyseverdünnungen wurde eine Eichgerade erstellt, auf der die Extinktion für 50%-Hämolyse ermittelt werden konnte.

Der Titer (positives Testergebnis) ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnung der Serumprobe, die zu einer 50%igen Lyse der Erythrozyten geführt hat.

Für die Ermittlung der Antikörper-Titer wurden zunächst die Mittelwerte der Extinktionen der im Doppelansatz gemessenen Serumproben berechnet. Danach konnte durch logarithmische Interpolation dieser Mittelwerte die Serumverdünnung ermittelt werden, die dem Wert der 50%- Hämolyse der Eichgeraden entsprach.

3.5.1.3.2 AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen

Zur quantitativen Ermittlung des AK-Titerverlaufes wurden Seren von Kaninchen (Tab. 12) untersucht, die gegen verschiedene Typen von *C. botulinum* hyperimmunisiert worden waren. Die Serumproben der zwei mit der kommerziellen Botulinus-Vaccine immunisierten Kaninchen wurden gegen die Lyophilisate der Typen C und D titriert, die Serumproben der 8 anderen immunisierten Kaninchen wurden gegen die Kulturüberstände der als Antigen applizierten Stämme titriert.

Als Negativ-Seren dienten die vor der Impfung erhaltenen Null-Seren der Kaninchen.

Vor der Titration wurden alle Kaninchenserum 1:10 in Veronalpuffer verdünnt und inaktiviert.

Die Vorgehensweisen der Serumtitration und Auswertung der Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.5.1.3. bzw. 3.5.1.3.1 dargestellt.

3.5.1.3.3 Nachweis von AK-Kreuzreaktionen

Zur quantitativen Ermittlung kreuzreaktiven Verhaltens wurden die Kaninchenseren und *C. botulinum*-Referenzseren (Tab. 11 und Tab. 12, Abschnitt 3.5) in die Untersuchungen mit einbezogen.

Von den Kaninchenseren wurden jeweils die erste und die letzte Serumprobe 1:10 in VP verdünnt und in dem Test eingesetzt, die Vorverdünnungen der kommerziellen Referenzseren betragen 1:5.

Als Antigene dienten die in Tab. 10 Abschnitt 3.5 aufgeführten Kulturüberstände aller *C. botulinum*-Typen und nahe verwandter Stämme sowie die Lyophilisate von *C. botulinum* Typ C und D.

Die Vorgehensweisen der Serumtitration und Auswertung der Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.5.1.3. bzw. 3.5.1.3.1 dargestellt.

3.5.1.3.4 AK-Nachweis in Rinderseren

Die in Abschnitt 3.5 aufgeführten Rinderseren wurden 1:5 in Veronalpuffer vorverdünnt und inaktiviert.

Als Antigene wurden die Lyophilisate von *C. botulinum* C und D sowie die Kulturüberstände der Referenzstämme C (1030) und D (2142) eingesetzt (Tab. 10).

Die Vorgehensweisen der Serumtitration und Auswertung der Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.5.1.3. bzw. 3.5.1.3.1 dargestellt.

3.5.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein erstmals von ENGVALL und PERLMAN (1971) beschriebenes immunologisches Nachweisverfahren mit breitem Anwendungsspektrum im Gesamtbereich der Naturwissenschaften. Zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. botulinum* wurde das Verfahren von RUBIN et al. (1982) eingeführt.

Der ELISA ist ein Testsystem, bei dem ein Antigen (oder AG-Gemisch) bzw. ein Antikörper (oder AK-Gemisch) an eine feste Phase gebunden wird. Im weiteren Testablauf dient er dem

Nachweis der korrespondierenden Antikörper bzw. Antigene. Die Antigen- bzw. Antikörper-Reaktion wird direkt oder über Folgereaktionen mit enzymmarkiertem Antikörper, Antigen oder sonstigen enzymmarkierten Reaktionspartnern nachgewiesen.

Es finden somit zwei Reaktionen statt: die immunologische und die enzymatische; die Konzentration des Analyten wird über die Aktivitätsmessung eines Markerenzym ermittelt.

Unter dem Begriff ELISA werden viele verschiedenartig aufgebaute Testsysteme zusammengefaßt; in der vorliegenden Arbeit wurde die Technik des indirekten ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. botulinum* angewendet, das Grundprinzip ist in Abb. 7 dargestellt.

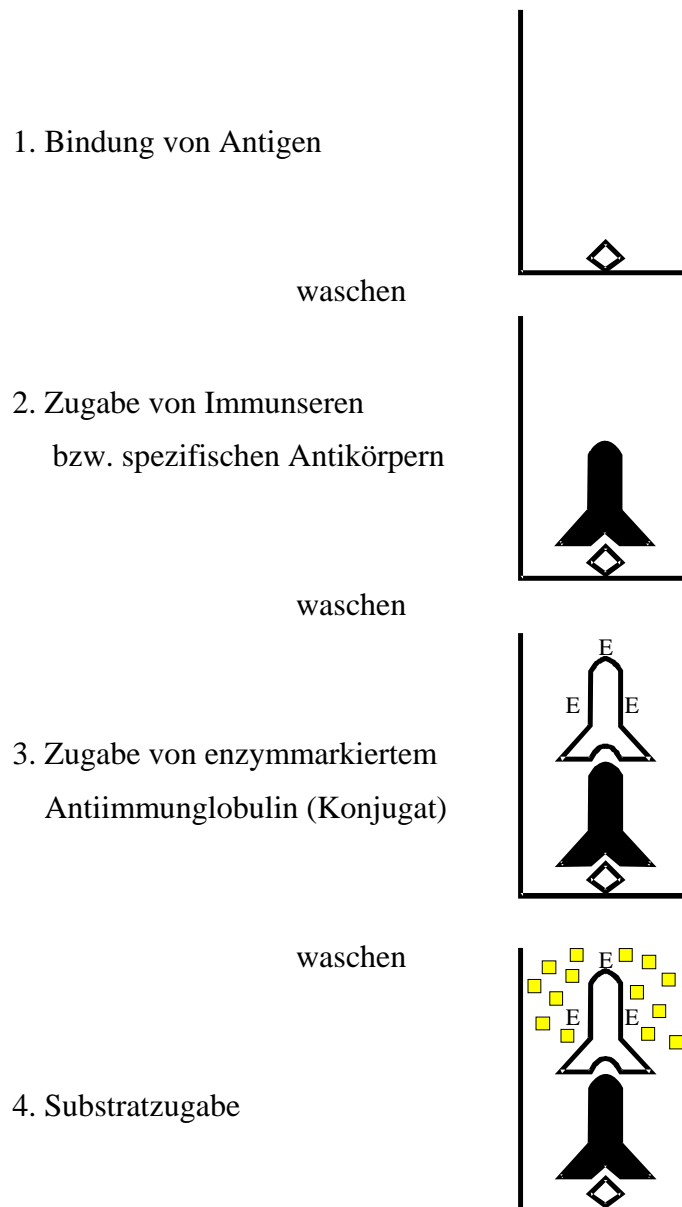


Abb. 7. Indirekter ELISA

Im sog. indirekten ELISA wird das Antigen an die Festphase gebunden. Die Reaktion vorhandener Antikörper einer Probe gegen dieses Antigen wird mit einem markierten, gegen den gebundenen Antikörper gerichteten Antiimmunglobulin nachgewiesen. Die Enzymaktivität nach Substratzugabe zeigt die Menge der gebundenen und damit vorhandenen Antikörper an.

3.5.2.1 Materialien

Die Auswahl der Puffer geschah in Anlehnung an die von KEMENY (1994) beschriebene Methode. Angaben über die verwendeten Materialien, Pufferlösungen und Reagenzien siehe Anhang 8.1.6.

Verdünnungsmedium:	PBS-Puffer
Beschichtungspuffer:	Bicarbonat-Beschichtungspuffer
Waschflüssigkeit:	zur Entfernung aller nicht immunologisch gebundener Reaktionspartner
Blockierungspuffer:	Substanzen, die die freien Bindungsstellen an der festen Phase für die folgenden spezifischen Reaktionspartner unzugänglich machen ohne an den immunologischen Reaktionen teilzunehmen
Enzymmarkierter Antikörper:	Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiert
Substratpuffer und Substrat:	Indikatorsystem des Tests, liefert ein photometrisch meßbares Signal
Stopplösung:	NaOH; zur irreversiblen Beendigung der Reaktion nach einer bestimmten Zeit.

Antigene

Als Antigene wurden die in Abschnitt 3.5 Tab. 10 aufgeführten Kulturüberstände, Lyophilisate bzw. die südafrikanische Botulinus-Vaccine eingesetzt.

Die Gebrauchsverdünnungen der Testantigene wurden im Vorversuch nach Abschnitt 3.5.2.2.2 ermittelt.

Seren

Die verwendeten Kaninchen- und Rinderseren, sowie die kommerziellen Antiseren sind in Abschnitt 3.5 aufgeführt.

3.5.2.1.1 Allgemeines Testprinzip

Alle Pipettierschritte erfolgten mit einer 8-Kanal Pipettierhilfe (Matrix Impact, INTEGRA).

Die Mikrotiterplatten wurden während der einzelnen Inkubationsschritte mit Folie (Sealing Tape 236269, NUNC) abgeklebt.

Angaben über die verwendeten Materialien, Pufferlösungen und Reagenzien siehe Anhang 8.1.6.

Beschichtungsantigen in Carbonatpuffer verdünnen und 100 µL der Verdünnung in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren.

lagern: Platten abdecken und über Nacht (ca. 18h) bei +4 °C inkubieren.

waschen: Platten 3x mit 200 µL Waschpuffer/Kavität manuell waschen, ausschlagen.

blockieren: 100 µL Blockierungspuffer in jede Kavität der Mikrotiterplatten pipettieren; 2 h /37 °C auf Wippe blockieren.

waschen: Platten 3x mit 200 µL Waschpuffer/Kavität manuell waschen, ausschlagen.

Seren: Zur Serum-Titration Testseren 1:10 in Probenverdünnungspuffer vorverdünnen.

100 µL Probenverdünnungspuffer/Kavität in die Reihen 2-12 vorlegen.

100 µL vorverdünnte Serumproben in Kavitäten der Reihen 1 und 2 pipettieren.

Serumtitration mit 100 µL ab Reihe 2 bis 12, die letzten 100 µL verwerfen.

inkubieren: 1 h/37 °C auf Wippe (3013, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel).

waschen: Platten 3x mit 200 µL Waschpuffer/Kavität manuell waschen, ausschlagen.

Konjugat: AP-markierte Antikörper in PBS-Puffer (entsprechend der versch. Angaben) vorverdünnen und 100 µL/Kavität hinzufügen.

inkubieren: 1 h/37 °C auf Wippe (s.o.).

waschen: Platten 3x mit 200 µL Waschpuffer/Kavität manuell waschen, ausschlagen.

Substrat: 100 µL Substrat/Kavität zugeben.

inkubieren 1 h/37 °C auf Wippe (s.o.).

stoppen: Zugabe von 50 µL 3M NaOH/Kavität.

messen: Photometrische Messung der Platten bei 405 nm gegen 490 nm (Digiscan, ASYS HITECH).

3.5.2.2 Vorversuche zur Methodik

3.5.2.2.1 Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten

Die Adsorption des löslichen Antigens an die Festphase der Mikrotiterplatten ist ein bestimmender Faktor für die Sensitivität und Präzision des ELISA. Polystyrene ist häufig das geeignetste und am weitesten verbreitete Material für die Antigenadsorption.

Polysorp®- und Maxisorp®-Immuno-Platten (NUNC, Wiesbaden), beides Polystyrene-Immuno-Platten, sollten für den hier vorgestellten ELISA untersucht werden.

Während die Polysorp®- Oberfläche überwiegend hydrophobe Bindungsstellen aufweist, hat die Maxisorp®-Oberfläche außerdem noch hydrophile Gruppen, so daß ein feines Maschenwerk hydrophiler und hydrophober Bindungsstellen entsteht. Somit haben die Maxisorp®-Platten eine hohe Affinität zu hydrophilen, polaren Gruppen, während Moleküle mit hydrophoben Charakter eine höhere Affinität zu der Polysorp®-Oberfläche haben.

Zunächst wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Eignung der Maxisorp®-Immuno-Rundboden-Platten (469914, NUNC) untersucht, da sie in dem hiesigen Institut für einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. septicum* eingesetzt werden (ROTH¹⁵). Polysorp®-Platten, sowohl mit Rundboden (475434, NUNC) als auch mit Flachboden (475094, NUNC), wurden in die Untersuchungen mit einbezogen.

Alle 3 Platten-Typen wurden mit einem positiven Kaninchenserum bzw. Rinderserum auf unspezifische Bindungen untersucht.

Die Reihen A-C wurden mit 100µL 1:20 in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünntem Kulturüberstand von *C. botulinum* Typ D (2142) (Tab. 10) beschichtet. Die Reihe D diente als Serumkontrolle, um mögliche unspezifische Reaktionen des Serums mit der Polystyrene-Oberfläche darstellen zu können und wurde daher nicht mit Antigen gefüllt. Die erste Spalte diente als Leerwertkontrolle („Blank“) und wurde weder mit Antigen noch mit Serum gefüllt, sondern enthielt nur Probenpuffer (s.u.).

Nach dem Beschichten, Blockieren und Waschen der Platten wurden 100µL Probenpuffer in die Spalten 1 und 3-12 vorgelegt und 100 µL der 1:10 vorverdünnten Seren in die Spalten 2 und 3 pipettiert. Ab Spalte 3 erfolgte die Titration von jeweils 100 µL Serum bis zur Spalte 12.

¹⁵ ROTH, F.: pers. Mitt., Göttingen 1997

Nach Inkubation, Waschen, Zugabe von Konjugat, erneutem Waschen und Substratzugabe erfolgte die photometrische Auswertung der Ergebnisse (Digiscan, ASYS HITECH; DigiWin-Programm V2.0).

Die Polysorp®- Oberfläche erwies sich nach den Vorversuchen als am besten geeignet zum Nachweis von *C. botulinum*-AK und wurde somit in den folgenden Versuchen (s.u.) eingesetzt.

3.5.2.2.2 Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung

Die optimale Antigenkonzentration in einem ELISA liegt normalerweise im Bereich von 1µg-10µg/mL Protein (KEMENY 1994); es werden jedoch auch höhere Konzentrationen eingesetzt. Idealerweise sollten alle Bindungsstellen der festen Phase während des beschichtens mit Antigen-Molekülen besetzt sein. Von Nachteil ist ein „overcoaten“ mit Antigen, denn der angestrebte Antigen-Monolayer kann dadurch nicht aufrechterhalten werden und sich während des Tests lösende Antigene können die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des ELISA reduzieren.

Für jeden Versuchsansatz wurde eine „Schachbrettitation“ durchgeführt, um die zur Adsorption an die feste Phase optimalen Antigenverdünnung zu ermitteln und optimale Verhältnisse zwischen Antigen und Serum festzustellen.

Die zu ermittelnde Antigenkonzentration ist gewöhnlich die Menge, über der keine oder nur eine geringfügige Erhöhung der Antikörperbindung zu beobachten ist, keine unspezifischen Extinktionen bei negativen Kontrollseren auftreten und sich negative und positive Seren deutlich abgrenzen lassen.

C. botulinum-Kulturüberstände, die südafrikanische Botulinus-Vaccine, sowie die Lyophilisate der Toxintypen C und D wurden auf ihre optimale Beschichtungs-Verdünnung im ELISA entsprechend der in Tab. 15 aufgeführten Verdünnungsstufen untersucht.

100µL dieser in Beschichtungspuffer vorverdünnten Antigene wurden in jede Kavität der Polysorp®-Platten pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen, danach die Kavitäten der Spalten 2-12 mit 100 µL Probenverdünnungspuffer gefüllt. Nach Zugabe von 100 µL der 1:10 vorverdünnten, positiven und negativen Rinder- und Kaninchenseren in die Spalten 1 und 2, erfolgte eine Titration bis zur Spalte 12 der Mikrotiterplatten.

Nach Inkubation, Waschen, Zugabe von Konjugat, erneutem Waschen und Substratzugabe erfolgte die Auswertung der Platten mit dem Photometer.

Tab. 15. Verdünnungsstufen der unterschiedlichen Antigene im ELISA

Verdünnungsstufe	Kulturüberstände	Lyophilisate	Botulinus-Vaccine
1	1:10	1:25	pur
2	1:20	1:50	1:5
3	1:40	1:100	1:10
4	1:80	1:200	1:50
5	1:320	1:400	1:100
6	1:640	1:1600	1:1000
7	1:1280	1:3200	1:10000
8	1:2560	1:6400	1:100000

Dargestellt sind die zum Beschichten der ELISA-Polysorp®-Platten eingesetzten unterschiedlichen Verdünnungen der als Antigen eingesetzten *C. botulinum*-Kulturüberstände, der südafrikanischen Botulinus-Vaccine, sowie die Lyophilisate der Toxintypen C und D (Tab. 10). Die Antigene wurden in Beschichtungspuffer (8.1.6) entsprechend den Angaben der Tab. 15 verdünnt, um die für das jeweilige Antigen optimale Antigenverdünnung gemäß 3.5.2.2.2 ermitteln zu können.

3.5.2.2.3 Bestimmung des Cut-off-Wertes für den ELISA

Der Cut-off-Wert ist die Unterscheidungsgrenze zwischen negativen und positiven Proben, bei der ein Minimum an falsch-positiven und/oder falsch-negativen Ergebnissen erzielt wird.

Der Cut-off-Wert ist der arithmetische Mittelwert der Kontroll-/Normalseren plus der dreifachen Standardabweichung.

Der Schwellenwert berechnet sich aus dem arithmetischen Mittelwert der Kontroll-/Normalseren plus der einfachen Standardabweichung. Zwischen diesen liegende Werte/Extinktionen werden als zweifelhaft beurteilt (JARK 1996).

Zur Bestimmung der Cut-off-Werte und der Schwellenwerte wurden 20 Kaninchen- und 100 Rinder-Normalseren in einer Vorverdünnung von 1:40 gegen den Kulturüberstand des Referenzstammes Typ D (2142) (Tab. 10) im ELISA untersucht.

3.5.2.3 Nachweis von *C. botulinum*-Antikörpern

Der Nachweis der Antikörper in den verschiedenen Seren erfolgte quantitativ, d.h. durch Probenverdünnungsreihen.

Die für den Hauptversuch benötigten Reagenzien und Materialien wurden bereits im Kapitel 3.5.2 dargestellt und sind im Anhang 8.1.6 beschrieben.

Die Antigene wurden in den durch die Vorversuche (3.5.2.2.2) ermittelten Gebrauchsverdünnungen eingesetzt.

Kaninchen-, Rinder- und kommerzielle Antiseren wurden 1:10 in Probenverdünnungspuffer (8.1.6) vorverdünnt.

Allgemeine Durchführung:

In die Kavitäten von 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten wurden 100µL der entsprechend in Beschichtungspuffer vorverdünnten Antigene/Botulinum-Toxine einpipettiert. Die Platten wurden mit Folie abgedeckt und über Nacht (16-18h) bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Platten dreimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen.

100 µL des Blockierungspuffers wurde in jede Kavität einpipettiert und 2 h bei 37 °C auf der Wippe blockiert. Nach dem Blockieren folgte erneut dreimaliges Waschen.

Die blockierten und gewaschenen Platten wurden für die Ermittlung der Antikörpertiter geimpfter Rinder bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert, während die Platten zur Ermittlung der Antikörpertiter geimpfter Kaninchen und zur Ermittlung der Kreuzreaktionen zum sofortigen Gebrauch beschichtet wurden.

Die Testseren wurden mit Probenverdünnungspuffer 1:10 vorverdünnt. 100µL Probenverdünnungspuffer wurde in die Kavitäten A-H der Spalten 2-12 vorgelegt und 100µL der vorverdünnten Testseren in die Reihen 1 und 2 pipettiert. Ausgehend von der zweiten Spalte wurde durch Überführen von jeweils 100 µL in die folgende Spalte eine geometrische Verdünnungsreihe bis in die Reihe 12 (Serumverdünnung 1:20480) erstellt. Wichtig war hierbei die gründliche Durchmischung der kleinen Volumina und die restlose Entleerung der Pipettenspitzen bei jedem Schritt. Alle Serumproben wurden in zweifachen Ansätzen titriert.

Als Kontrollen wurden Seren ungeimpfter (negativ) und geimpfter Tiere (positiv) eingesetzt, mit denen analog zu den Testseren verfahren wurde. Eine Antigenkontrolle (ohne Serum) lief bei jedem Versuchsansatz in der letzten Reihe einer Mikrotiterplatte mit.

Die Platten wurden erneut mit Folie abgedeckt und auf der Wippe bei 37 °C inkubiert.

Nach einer Stunde wurden die nicht gebundenen Bestandteile durch dreimaliges Waschen mit 200 μ L Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe von 100 μ L in PBS nach Herstellerangaben vorverdünntem, alkalische-phosphatase-konjugiertem, speziesspezifischem Anti-Immunglobulin-Konjugat in jede Kavität der Mikrotiterplatte wurden die Platten abermals mit Folie verschlossen und 1 h/37 °C auf der Wippe inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch erneutes dreimaliges Waschen aus den Kavitäten entfernt. Nach Zugabe von 100 μ L Substrat - gelöst in Substratpuffer - in jede Kavität wurden die Platten erneut abgedeckt und bei 37 °C inkubiert.

Die Enzymreaktion wurde nach 1 h Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 50 μ L 3M NaOH gestoppt.

Die Messung der Farbreaktion erfolgte bei 405 nm gegen 490 nm.

3.5.2.3.1 AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen

Zur quantitativen Ermittlung des Antikörper-Titerverlaufs wurden Seren von Kaninchen untersucht, die gegen verschiedene Typen von *C. botulinum* hyperimmunisiert worden waren (Abschnitt 3.3.2.1).

Die Serumproben der mit der kommerziellen Botulinus-Vaccine geimpften Kaninchen wurden gegen die Lyophilisate der Typen C und D titriert, die Serumproben der 8 anderen geimpften Kaninchen wurden gegen die Kulturüberstände der als Antigen applizierten Stämme titriert (Tab.10).

In der Regel wurden die Kaninchenserumproben 1:10 in Probenpuffer vorverdünnt, in Einzelfällen, bei denen die Antikörpertiter deutlich oberhalb der Serumverdünnungen von 1:20480 lagen, wurde der Versuch mit Serumvorverdünnungen von 1:20 bzw. 1:40 wiederholt.

Als Negativ-Seren dienten die vor der Impfung erhaltenen Serum-Proben der Kaninchen. Diese wurden in gleicher Weise wie die Testseren 1:10 in Probenpuffer verdünnt und analog zu den Testseren titriert.

Die allgemeine Durchführung der Serumtitration ist in Abschnitt 3.5.2.3 aufgeführt, die Auswertung der Ergebnisse erfolgt gemäß Abschnitt 3.5.2.4.

3.5.2.3.2 Nachweis von AK-Kreuzreaktionen

Zur quantitativen Ermittlung kreuzreaktiven Verhaltens wurden die Seren hyperimmunisierter Kaninchen (jeweils die erste und die letzte Serumprobe) und *C. botulinum*-Antitoxine in die Untersuchungen mit einbezogen.

Alle eingesetzten Testseren wurden 1:10 mit Probenverdünnungspuffer vorverdünnt.

Als Antigene dienten die in Tab. 10 Abschnitt 3.5 aufgeführten Kulturüberstände aller *C. botulinum*-Typen und nahe verwandter Stämme, sowie die Lyophilisate von *C. botulinum* Typ C und D.

Die allgemeine Durchführung der Serumtitration ist in Abschnitt 3.5.2.3 aufgeführt, die Auswertung der Ergebnisse erfolgt gemäß Abschnitt 3.5.2.4.

3.5.2.3.3 AK-Nachweis in Rinderseren

Die in Abschnitt 3.5 aufgeführten Rinderseren wurden 1:10 in Probenpuffer vorverdünnt.

Als Antigene wurden Lyophilisate von *C. botulinum* Typ C und D eingesetzt, sowie Kulturüberstände der Referenzstämme C (1030) und D (2142).

Die allgemeine Durchführung der Serumtitration ist in Abschnitt 3.5.2.3 aufgeführt, die Auswertung der Ergebnisse erfolgt gemäß Abschnitt 3.5.2.4.

3.5.2.4 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung aller Mikrotiterplatten erfolgte photometrisch.

Aus den gemessenen Extinktionen der in zweifachen Ansätzen titrierten Serumproben in den Hauptversuchen der Abschnitte 3.5.2.3.1 bis 3.5.2.3.3 wurden die Mittelwerte bestimmt. Durch logarithmische Interpolation der Extinktionen der Serumverdünnungen erfolgte die Berechnung der höchsten Serumverdünnung, bei der die Extinktion über dem Cut-off-Wert bzw. über dem Schwellenwert lag¹⁶.

Der Antikörpertiter der Testseren entspricht dem Reziprokwert dieser Serumverdünnungen. Serumverdünnungen, deren Extinktionen über dem Schwellenwert und unter dem Cut-off-

¹⁶ Herrn F. Hame, Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung, Göttingen (GwdG), sei für die freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Reader-Daten gedankt.

Wert lagen, wurden nach JARK (1996) als zweifelhaft bewertet. Serumverdünnungen mit Extinktionen unter dem Schwellenwert waren negativ.

3.5.2.5 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISA

Intra-Assay-Variation

Zur Ermittlung der Intra-Assay-Variation wurde eine Mikrotiterplatte exemplarisch mit dem Antigen Typ D (2142) (Tab. 10) wie in dem Hauptversuch (3.5.2.3) in einer Verdünnung von 1:80 beschichtet. Ein positives Rinderserum aus dem Bestand C (Tab. 9) wurde 1:40 in Probenpuffer vorverdünnt. 100 μ L dieses vorverdünnten Serums wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und methodisch wie in Abschnitt 3.5.2.3 weiter behandelt. Das arithmetische Mittel, die Standardabweichung (S) und der rel. Variationskoeffizient (V_r) der Extinktionen wurden ermittelt.

Inter-Assay-Variation

Um die Wiederholbarkeit der serologischen Ergebnisse darzustellen, wurden bei gleicher Plattenbelegung an 5 verschiedenen Tagen 8 Rinderseren (7 positive, 1 negatives) gegen das Antigen Typ D (2142) (Tab. 10) methodisch wie in Abschnitt 3.5.2.3. titriert. Das arithmetische Mittel, die Standardabweichung (S) und der rel. Variationskoeffizient (V_r) der Antikörper-Titer wurden ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Differenzierung der Clostridien-Stämme

4.1.1 Kolonie- und Zellmorphologie

Die Kolonie- und Zellmorphologie der untersuchten Clostridien-Stämme ist in Tab. 16 dargestellt.

Die Kolonien der untersuchten Clostridien-Stämme waren alle klein bis mittelgroß und zeigten häufig einen unregelmäßig gewellten Rand. Die Koloniefärbung variierte zwischen hellbeige bis hellgrau. Alle untersuchten Clostridien-Stämme verursachten eine vollständige Hämolyse auf der Oberfläche der Blutagar-Platten.

In der Gramfärbung verhielten sich die Clostridienstämme gram-positiv, *C. tetani* (1089) verhielt sich bereits nach 24 h gramlabil. Sporenbildung trat bei allen Clostridien-Stämmen auf. In der Regel waren die Zellaufreibungen subterminal zu beobachten, bei *C. tetani* (1989) neben subterminal auch terminal. Bis auf *C. baratii* und *C. tetani* waren alle untersuchten Clostridien-Stämme beweglich.

Die umseitig stehende Tabelle 16 zeigt die Kolonie- und Zellmorphologie der untersuchten Stämme von *C. botulinum* und *C. spp.* mit den im Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Göttingen vergebenen Stamm-Nummern. Ihre Original-Herkunftsbezeichnungen sind der Tab. 6 zu entnehmen. Alle Stämme, die fraktioniert auf Blutagar-Platten ausgestrichen wurden, wurden in ihrer Makromorphologie beurteilt und verursachten eine vollständige Hämolyse (+) auf der Oberfläche der Blutagar-Platten. In der Gramfärbung verhielten sich die Clostridien gram-positiv (+) bzw. gramlabil (+/-). Sporenbildung war bei allen untersuchten Stämmen zu beobachten, die Zellaufreibungen waren i.d.R. subterminal (ST) zu beobachten, aber auch terminal (T), zentral (Z) oder polymorph (P). Bis auf die unbeweglichen (-) Stämme *C. baratii* und *C. tetani* waren alle anderen im sog. „hängenden Tropfen“ untersuchten Stämme beweglich (+).

Tab. 16. Kolonie- und Zellmorphologie der untersuchten Clostridien-Stämme

4.1.2 Gaschromatographische Fettsäureanalyse

Die Fettsäureverteilung der untersuchten Stämme, wie sie vom Integrator aufgrund der Retentionszeit und des Fettsäurestandards bestimmt wurde, ist in den Abb. 8 - Abb. 15 für die Referenzstämme von *C. botulinum* dargestellt.

Nicht als Diagramm dargestellt sind die Fettsäureprofile der untersuchten *C. spp.* Diese können bei GIERCKE-SYGUSCH (1987), HEITEFUSS (1991) bzw. im Atlas „Gas Chromatography - Bacteria Identification System“ (PERKIN-ELMER) eingesehen werden.

Die Typen von *C. botulinum* (C.b.) wurden mittels computergestützter Auswertung der Chromatogramme differenziert. Die lineare Korrelation der gaschromatographisch bestimmten Fettsäuremuster ist in Tab. 17 angegeben. Die statistische Auswertung gibt Hinweise auf die taxonomische Stellung der Typen zueinander.

Die umseitig dargestellten Abbildungen 8-15 zeigen die Fettsäureverteilung der untersuchten *C. botulinum*-Referenzstämme (3.1.1), wie sie vom Integrator aufgrund der Retentionszeit und des Fettsäurestandards (Tab. 7) nach der Methode von HEITEFUSS (1991) gemäß Abschnitt 3.1.3 bestimmt wurde.

Abb. 8. Fettsäuremuster *C. botulinum* A (1028) — Legende sh. Seite 105

Abb. 9. Fettsäuremuster *C. botulinum* B (1029) — Legende sh. Seite 105

Abb. 10. Fettsäuremuster *C. botulinum* C (1030) — Legende sh. Seite 105

Abb. 11. Fettsäuremuster *C. botulinum* C (2145) — Legende sh. Seite 105

Abb. 12. Fettsäuremuster *C. botulinum* D (2142) — Legende sh. Seite 105

Abb. 13. Fettsäuremuster *C. botulinum* D (2146) — Legende sh. Seite 105

Abb. 14. Fettsäuremuster *C. botulinum* E (1032) — Legende sh. Seite 105

Abb. 15. Fettsäuremuster *C. botulinum* F (1033) — Legende sh. Seite 105

Tab. 17. Übereinstimmung der Fettsäuremuster der verschiedenen Clostridien-Stämme

C.b. F (1033), *C. tetani* (1089) und *C. parobotulinum* (1085) wiesen die größten Übereinstimmungen der Fettsäuremuster zu C. b. A (1028) auf, während z.B. C.b. B (1029) und C.b. E (1032) deutlich geringere Übereinstimmungen zeigten.

Mit C.b. B (1029) korrelierten vor allem C.b. C (1030), C.b. D (2142) und C.b. A, eine deutlich geringere Korrelation war zu den anderen *C. spp.* zu beobachten.

Die nächste Verwandtschaft -bezogen auf die Fettsäuremuster- zu C.b. C (1030) wiesen C.b. B (1029), C.b. F (1033) und *C. tetani* (1089) auf, der zweite C.b. C-Stamm (2145) lag mit $r = 0,927$ noch hinter C.b. A (1028) und C.b. D (2142).

Bei C.b.C (2145), bestand die größte Übereinstimmung der Fettsäuremuster mit *C. parobotulinum* (1085), *C. tetani* (1089) und C.b. A (1028), gefolgt von den beiden Stämmen C.b. D (2142, 2146).

Die beiden Stämme von C.b. C (2145, 1030) wiesen die größte Korrelation zu C.b. D (2142) auf, gefolgt von C.b. B (1029), C.b. D (2126) und C.b. F (1033), eine deutlich geringere Korrelation bestand zu den anderen *C. spp.*

C.b. C (2145) und C.b. D (2142) zeigten die höchste Korrelation zu C.b. D (2146), gefolgt von C.b. F (1033), *C. tetani* (1089) und *C. parobotulinum* (1085).

C.b. E (1032) wies gegenüber allen verrechneten Referenzstämmen nur eine geringe Korrelation ($r = <0,8$) auf.

Mit C.b. F (1033) wiesen *C. tetani* (1089), C.b. A (1028) und die beiden C.b. C (2145, 1030) die größte Übereinstimmung der Fettsäuremuster auf.

Zu *C. parobotulinum* (1085) wiesen v.a. C.b. C (2145), C.b. A (1028) und *C. tetani* (1089) hohe Korrelationskoeffizienten auf.

C.b. F (1033), C.b. A (1028) und beide C.b. C-Stämme (2145, 1030) korrelierten in ihrer Fettsäurezusammensetzung deutlich mit *C. tetani* (1089).

Zu *C. butyricum* (1034) und *C. sordelli* (1272) zeigten sich allgemein nur leichte Korrelationen von C.b. B (1029) und C.b. C (1030), zu *C. baratii* (1084) war eine leichte Korrelation von *C. sordelli* (1272) zu beobachten, Korrelationen mit *C. botulinum* waren gering.

4.1.3 Biochemische StoffwechsellLeistungen

In Tab. 18 sind die Differenzierungsmerkmale der untersuchten Clostridien-Stämme aufgeführt, die im „Makrosystem“ ermittelt wurden. Alle Stämme wuchsen strikt anaerob und waren phosphatase-negativ. Lipase bildeten alle *C. botulinum*-Stämme, Lecithinase dagegen nicht. Von den Botulinum-Stämmen bildete nur *C. botulinum* Typ C (1030) Indol.

Tab. 18. StoffwechsellLeistungen der untersuchten Clostridien-Stämme

Stamm- Nummer	aerob	anaerob	Phosphatase	Lipase	Lecithinase	Indol
1028	–	+	–	+	–	–
1029	–	+	–	+	–	–
1030	–	+	–	+	–	+
2145	–	+	–	+	–	–
2142	–	+	–	+	–	–
2146	–	+	–	+	–	–
1032	–	+	–	+	–	–
1033	–	+	–	+	–	–
1034	–	+	–	–	–	–
1084	–	+	–	–	+	–
1085	–	+	–	–		
1089	–	+	–	–	–	+
1272	–	+	–	–	+	+

+ positiv

– negativ

Die Ergebnisse der miniaturisierten enzymatischen Reaktionen des Rapid ID 32 A-Identifizierungssystems für Anaerobier sind in Tab. 19 dargestellt.

Anhand der numerischen Profile konnten die Stämme *C. botulinum* Typ A (1028), Typ B (1029) und Typ D (2146) mit Hilfe des ATB 32 A-Analytischen Profilindex (BIO MÉRIEUX, 1989) gemäß der Beschreibungen in Abschnitt 3.1.4 als *C. botulinum* 2 identifiziert werden. Die Stämme *C. botulinum* Typ C (1030) und Typ D (2142) reagierten nur bei Indol positiv. Die Auswertung dieses numerischen Profils ergab entweder die Zuordnung zu *C. tetani* oder *C. bifermentans*.

Tab. 19. Ergebnisse des Rapid ID 32 A

StoffwechsellLeistungen		1028	1029	1030	2145	2142	2146	1032	1033
Ure	UREase	-	-	-	-	-	-	+/-	-
ADH	Arginin-DiHydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
α Gal	α -GALactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
β Gal	β -GALactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
β Gp	β -Galactosidase 6-Phosphat	-	-	-	-	-	-	-	-
α Glu	α -GLUcosidase	+	+	-	-	-	+	+	+
β Glu	β -GLUcosidase	-	-	-	-	-	-	-	+
α Ara	α -ARAbinosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
β Gur	β -GlucURonidase	-	-	-	-	-	-	-	-
β Nag	β -N-Acety-Glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-
MNE	MaNnosE Fermentation	-	-	-	-	-	-	+	-
RAF	RAFFinose Fermentation	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GDC	Glutaminsäure-DeCarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
α FUC	α -FUCosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	NITratproduktion	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	INDolproduktion	-	-	+	-	+	-	-	-
PAL	ALkalische Phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-
ArgA	Arginin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
ProA	Prolin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
LGA	LeucylGlycin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
PheA	Phenylalanin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
LeuA	Leucin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
PyrA	Pyroglutaminsäure Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
TyrA	Tyrosin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
AlaA	Alanin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
GlyA	Glycin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
HisA	Histidin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
GGA	Glutamyl Glutamat Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-
SerA	Serin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-

Dargestellt sind die nach der Methode von Abschnitt 3.1.4 erhaltenen Ergebnisse der miniaturisierten enzymatischen Reaktionen des Rapid ID 32 A-Identifizierungssystems (BIO MÉRIEUX) für die

untersuchten Referenzstämme von *C. botulinum* (Abschnitt 3.1.1; Tab. 6). Die Ergebnisse wurden mit + (positiv), +/- (zweifelhaft) und - (negativ) auf dem Ergebnisblatt protokolliert.

C. botulinum Typ C (2145) reagierte bei der Raffinose-Reaktion zweifelhaft, jedoch war anhand des Profil-Index weder mit positiver noch mit negativer Raffinose-Reaktion eine Auswertung möglich. Weder *C. botulinum* E (1032) noch *C. botulinum* F (1033) lieferten auswertbare Ergebnisse mit den Rapid ID 32 A.

Für die Stämme 1030 und 2142 (*C. botulinum* C bzw. D) ergab sich nach den Ergebnissen des Rapid ID 32 A und der im „Makrosystem“ erhaltenen Information keine Lezithinase zu bilden die Zuordnung zu *C. tetani*.

4.2 Toxine und Toxoidimpfstoffe

4.2.1 Toxinproduktion und -typisierung

Die Pathogenität der untersuchten Clostridien-Stämme ist in Tab. 20 mit den für die Toxinproduktion geeignetsten Medien wiedergegeben. Zur Vervollständigung der Aufstellung sind die Lyophilisate der Toxintypen C und D mit aufgeführt, obwohl sie nicht an den Medienversuchen beteiligt waren.

Die Toxinausbeute war bei allen untersuchten Stämmen von *C. botulinum* in MCM (modifiziertes Kochfleischmedium) deutlich geringer als bei den anderen in Abschnitt 3.2.1 eingesetzten Medien. Der *C. botulinum* C-Stamm (1030) war in RCM (Reinforced Clostridial Medium) und MCM atoxisch, wies jedoch noch eine geringe Toxizität in TGY (Trypticase-Glucose-Yeast)-Medium auf. *C. butyricum*, *C. baratii* und *C. parobotulinum* bildeten keine nachweisbaren Neurotoxine.

Mit Ausnahme eines Stammes konnten alle zellfreien Kulturüberstände mit den typspezifischen Antiseren (Abschnitt 3.3.1, Tab. 8) neutralisiert werden, Antiseren der anderen Typen waren dahingegen in der Toxinneutralisation negativ.

Das BoNT von *C. botulinum* D (2146) ließ sich weder mit Typ D Antiseren aus Lelystad noch Onderstepoort neutralisieren. Nur Antiseren von Typ A neutralisierten das Toxin.

Nach den Ergebnissen der Toxinneutralisation muß somit der Stamm 2146 als *C. botulinum* A definiert werden. Bei allen anderen Stämmen konnte die Typzugehörigkeit durch Toxinneutralisation bestätigt werden.

Tab. 20. Medien, Pathogenität und Toxintypisierung

Stamm/Typ		Medium	Pathogenität	MLD/mL	Toxinneutralisation							
					A ¹	A ²	B ¹	C ³	D ²	D ³	E ²	F ²
1028	C. b. A	TGY	tox.	2 x 10 ²	+	*	-	-	*	-	-	*
1029	C. b. B	TGY	tox.	2 x 10 ²	-	*	+	-	*	-	-	*
1030	C. b. C	RCM	tox.	2 x 10 ⁰	-	*	-	+	*	-	-	*
2145	C. b. C	RCM	tox.	2 x 10 ³	-	*	-	+	*	-	-	*
	C. b. C	Lyophilis.	tox.	> 2 x 10 ⁵	-	*	-	+	*	-	-	*
2142	C. b. D	TGY	tox.	2 x 10 ⁴	-	*	-	-	+	+	-	*
2146	C. b. D	RCM	tox.	2 x 10 ³	+	+	-	-	-	-	-	*
	C. b. D	Lyophilis.	tox.	> 2 x 10 ⁵	-	*	-	-	*	+	-	*
1032	C. b. E	TGY	tox.	2 x 10 ²	-	*	-	-	*	-	+	*
1033	C. b. F	TGY	tox.	2 x 10 ¹	*	*	*	*	*	*	*	+
1034	C. butyric.	RCM	atox.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1084	C. baratii	RCM	atox.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1085	C. parobot.	RCM	atox.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1089	C. tetani	RCM	tox.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1272	C. sordelli	RCM	tox.	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Dargestellt sind die nach den Versuchen von Abschnitt 3.2.1 für die Toxinbildung der untersuchten Clostridienstämme (Tab. 6) geeignetsten Medien RCM (Reinforced Clostridial Medium) und TGY (Trypticase-Glucose-Yeast). In die Pathogenitätsprüfungen mit einbezogen wurden die resuspendierten Lyophilisate (Lyophilis.) der Toxintypen C und D (Abschnitt 3.5, Tab. 10). Dabei erwiesen sich die Kulturüberstände aller Typen von *C. botulinum* sowie *C. tetani* und *C. sordelli* als toxisch (tox.) in der Maus, *C. butyricum*, *C. baratii* und *C. parobotulinum* waren atoxisch (atox.). Die Ermittlung der MLD (Mäuse Letale Dosis) und die Toxinneutralisation erfolgte gemäß 3.2.2, wobei die in Abschnitt 3.3.1 aufgeführten kommerziellen Antitoxine von

- ¹ Institut PASTEUR
- ² ID-DLO, Lelystad
- ³ ONDERSTEEPOORT

eingesetzt wurden.

Eine erfolgreiche Toxinneutralisation ist mit „+“ gekennzeichnet, „-“ bezeichnet eine nicht erfolgreiche Toxinneutralisation durch die eingesetzten Antitoxine.

Nicht ermittelte MLD bzw. Toxinneutralisationen sind mit „*“ gekennzeichnet.

4.2.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Ergebnisse der Gesamtproteinbestimmung nach LOWRY (1951) sind in Tab. 21 dargestellt.

Tab. 21. Quantitative Proteinbestimmung

Antigen	Proteingehalt (mg/mL)
1028	14,17
1029	14,06
1030	12,37
2145	11,62
2142	35,10
2146	9,86
1032	29,35
1033	16,29
1034	11,22
1084	12,30
1085	10,03
1089	11,12
1272	9,21
Lyophilisat Typ C	35,25
Lyophilisat Typ D	31,34
Botulinus-Vaccine	0,85
Überstand	0,42
Bodensatz	1,29

Dargestellt ist der nach LOWRY et al. (1951) ermittelte Proteingehalt der in Tab. 10 aufgeführten Kulturüberstände der *C. botulinum*-Stämme, sowie der kommerziellen Botulinus-Vaccine.

Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Extinktionsmessungen einer Albumin-Eichgeraden (Lösungen im Anhang 8.1.3) gemäß Abschnitt 3.2.4.

4.2.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE Protein-Profile der Kulturüberstände und Lyophilisate nach der Silberfärbung sind in den Abb. 16 und Abb. 17 grafisch dargestellt. Molekulargewicht-Standards liefen in den äußeren Lanes mit, die Größen (kDa) der Markerbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Position des BoNT ist durch eine gestrichelte Linie bei 150 kDa markiert.

In der elektrophoretischen Auftrennung zeigten die Kulturüberstände und Lyophilisate eine Vielzahl von Variationen in ihren Proteinstereinstern. Dennoch war es möglich, eine gewisse „Gruppeneinteilung“ vorzunehmen: die Kulturüberstände von *C. botulinum* C und D zeigten untereinander deutlich weniger Variationen als zu den anderen Typen von *C. botulinum*. Im elektrophoretischen Proteinstereinstern von *C. botulinum* „D“ (2146) war mit bloßem Auge erkennbar, daß er sich deutlich von den anderen Typen C und D unterscheidet und mehr Gemeinsamkeiten zu den Proteinstereinstern der Typen A, B und F aufwies.

Weder mit Glycin, noch mit Tricin als Trägersubstanz konnten in der Botulinus-Vaccine aus Onderstepoort lösliche Proteine nachgewiesen werden.

Die umseitig dargestellten Abbildungen 16 und 17 zeigen die gemäß Abschnitt 3.2.5 angefertigten SDS-PAGE Protein-Profile der Kulturüberstände von *C. botulinum* und verwandten *C. spp.*, sowie der Lyophilisate C und D und der kommerziellen Botulinus-Vaccine aus Onderstepoort (Tab. 10) nach der Silberfärbung (Puffer und Lösungen im Anhang 8.1.4). Molekulargewicht-Standards (8.1.4) liefen in

den äußeren Lanes mit, die Größen (kDa) der Markerbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Position des BoNT ist bei 150 kDa durch eine gestrichelte Linie markiert.

Abb. 16. SDS-PAGE Protein-Profile von *C. botulinum* A, B, E und F sowie *C. spp.* nach Silberfärbung — Legende sh. Seite 117

Abb. 17. SDS-PAGE Protein-Profile von *C. botulinum* C und D sowie der C/D-Botulinus-Vaccine nach Silberfärbung — Legende sh. Seite 117

4.3 Serologische Untersuchungen zum Nachweis von AK gegen *C. botulinum*

4.3.1 Komplementbindungsreaktion (KBR)

4.3.1.1 Vorversuche zur Methodik

4.3.1.1.1 Ambozeptor-Vorversuch

In Ambozeptor-Verdünnungsreihen von 1:2000 bis 1:6500 war bei einer Verdünnung von 1:5000 gerade noch eine vollständige Hämolyse erkennbar, bei einer Ambozeptor-Verdünnung von 1:5500 bildete sich am Boden der Mikrotiterplatte nach Zentrifugation bereits ein kleiner Bodensatz aus Erythrozyten.

Die Erythrozytenkontrollen zeigten keinerlei Hämolyse.

Eine hämolytische Einheit ist die höchste Ambozeptor-Verdünnung, die noch eine komplette Hämolyse bewirkt, in diesem Falle 1:5000. In den weiteren Testansätzen wurde mit 2 hämolytischen Einheiten gearbeitet, das heißt es wurden Ambozeptor-Gebrauchsverdünnungen von 1:2500 eingesetzt.

4.3.1.1.2 Komplement- und Antigen-Vorversuch

Die Ergebnisse der Antigen- und Komplement-Titration werden exemplarisch an der Titration des Kulturüberstandes von *C. botulinum* Typ C (1030) in Tab. 22 dargestellt, bei der eine Komplement-Konzentration von 1:40 eingesetzt wurde.

In den Spalten 1-7 sind die Serumtitrationen gegen fallende Antigenkonzentrationen der Reihen A-G dargestellt.

Die höchste Antigen-Verdünnung, die mit der höchsten Serumverdünnung keine Hämolyse der Erythrozyten anzeigt, wird als eine Antigen-Einheit bezeichnet. In dem dargestellten Beispiel war dies bei einer Antigenverdünnung von 1:160 mit einer Serumverdünnung von 1:160 der Fall. Im Hauptversuch wurde mit zwei Antigen-Einheiten gearbeitet, d.h. mit einer Antigenverdünnung von 1:80.

Die Komplementkontrolle zeigte, daß die im Testsystem eingesetzte Menge Komplement (zwei Komplementeinheiten) eine 100%ige Hämolyse des Indikatorsystems bewirkte und eine 100%ige Reserve aufwies, da eine Komplement-Einheit ebenfalls zur vollständigen Hämolyse der Erythrozyten geführt hatte.

In der Serumkontrolle (Reihe H) war eine 100%ige Hämolyse der Erythrozyten erkennbar, die Komplementkontrolle dieser Reihe verhielt sich genau so wie in den Reihen mit verschiedenen Antigenkonzentrationen.

Hämolytische bzw. antikomplementäre Eigenschaften des Antigens waren nicht zu beobachten (Spalte 8).

Tab. 22. Ergebnis der Antigen- und Komplementtitration am Beispiel des Kulturüberstandes von *C. botulinum* C (1030)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AG-Verd.	Serumverdünnung							AG-Kontr	Komplementeinheiten			
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	.	2	1	1/2	1/4
A	1:10	4	4	4	3	2	0	0	4	0	1	2	4
B	1:20	4	4	4	4	3	0	0	4	0	0	2	4
C	1:40	4	4	4	4	4	3	2	4	0	0	2	4
D	1:80	4	4	4	4	4	4	3	4	0	0	2	4
E	1:160	4	4	4	4	4	4	3	4	0	0	2	4
F	1:320	4	4	4	4	4	3	2	4	0	0	2	4
G	1:640	4	4	4	4	4	3	1	4	0	0	2	4
H	VP	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	4

- 0 = 0 % vollständige Hämolyse, rote transparente Flüssigkeit ohne Bodensatz.
- 1 = 25 % roter, transparenter Überstand, geringe Mengen Erythrozyten am Boden.
- 2 = 50 % rötlicher, transparenter Überstand, deutlicher Bodensatz aus Erythrozyten.
- 3 = 75 % leicht rot-gelb getönter Überstand, starker Bodensatz aus Erythrozyten.
- 4 = 100 % keine Hämolyse, klarer Überstand, starker Bodensatz aus Erythrozyten.
- VP = Veronalpuffer

Tabelle 22 zeigt die Plattenbelegung der Schachbrett-Titration des Antigen-Vorversuchs gemäß Abschnitt 3.5.1.2.3. Die Reihen A-G waren mit den in Tab. 14 aufgeführten Antigenverdünnungen belegt, Reihe H diente der Serumkontrolle und war ohne Antigen-Zusatz. In den Spalten 1-7 erfolgte die Serumentitration (Seren sh. Tab. 12). Spalte 8 diente der Antigenkontrolle (AG-Kontr.), der Serumanteil wurde durch VP ersetzt. 25 µL der in Abschnitt 3.5.1.2.2 ermittelten Komplementverdünnung wurde in alle Kavitäten der Spalten 1-8 zugefügt. Spalten 9-12 dienten der Komplementkontrolle. Dort erfolgte eine Komplement-Titration in VP, so daß 2, 1, 1/2 und 1/4 Komplement-Einheiten (3.5.1.1.2) vorgelegt worden waren. Nach der Komplementtitration in den

Spalten 9-12 wurden jeweils 25 µL Antigenverdünnung und VP zugegeben. Die weitere Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte gemäß Abschnitt 3.5.1.2.3.

Zusammenfassend aus den Vorversuchen ergaben sich die in Tab. 23 aufgeführten Antigen- und Komplementkonzentrationen für den Einsatz in den folgenden Hauptversuchen:

Tab. 23. Antigen- und Komplementverdünnungen für den Hauptversuch

Antigene		AG- Verdünnung	Komplement- Verdünnung
Kulturüberstan- d	1028	1:80	1:45
	1029	1:80	1:45
	1030	1:80	1:40
	2145	1:80	1:45
	2142	1:80	1:40
	2146	1:80	1:45
	1032	1:80	1:40
	1033	1:80	1:40
	1034	1:80	1:40
	1084	1:80	1:40
	1085	1:80	1:40
	1089	1:80	1:45
	1272	1:80	1:40
Lyophilisat	Typ C	1:1000	1:40
	Typ D	1:1000	1:40

Dargestellt sind die aus den Ergebnissen der Tab. 22 bzw. Abschnitt 3.5.1.2.3 ermittelten Antigen- und Komplementverdünnungen, die bei den unterschiedlichen in den folgenden Hauptversuchen eingesetzten Antigenen (Kulturüberstände von *C. botulinum* und Lyophilisate der Typen C und D) zum Einsatz kamen.

Die kommerzielle Botulinus-Vaccine aus Südafrika wurde in den Vorversuchen der KBR sowohl pur, als auch in Verdünnungen bis 1:10000 eingesetzt.

In den Konzentrationen bis zu einer Verdünnung 1:100 zeigte sich sowohl in der Antigen-Kontrolle als auch bei den Serumtitrationen eine Agglutination der Erythrozyten am Plattenboden zusammen mit einem trüb-rötlichen Überstand in den Vertiefungen der Platten. Die Komplementkontrollen waren nicht auswertbar.

Auch eine Antigenverdünnung von 1:1000 bewirkte in der Antigen-Kontrolle und den Serumverdünnungen eine Agglutination der Erythrozyten. Bei verschiedenen Komplement-Verdünnungen war keine Hämolysehemmung erkennbar.

Erst bei einer Verdünnung des Antigens von 1:10000 wurde das Phänomen der Agglutination der Erythrozyten nicht mehr sichtbar, jedoch zeigte sich sowohl bei der Antigenkontrolle als auch bei den Serumtitrationen und der Komplementkontrolle eine 100%ige Hämolyse der Erythrozyten.

Nach den Ergebnissen der Vorversuche mit der kommerziellen Botulinus-Vaccine wurde der Impfstoff als ungeeignet für den Einsatz als Antigen in der KBR eingestuft.

4.3.1.2 Nachweis von *C. botulinum*-Antikörpern

4.3.1.2.1 AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen

Zur quantitativen Ermittlung des AK-Titerverlaufs immunisierter Kaninchen wurden jeweils 10 in einem Zeitraum von ca. 30 Wochen erhaltene Serumproben gegen die Kulturüberstände der als Antigen applizierten Typen von *C. botulinum* titriert.

Die Serumproben der mit Botulinus-Vaccine (Onderstepoort) geimpften Kaninchen (Nr. 1 u. 2) wurden gegen die Lyophilisate C und D titriert.

Die Ergebnisse der AK-Titrationen sind in der Tab. 37 (Anhang 8.2) aufgeführt, in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf der Blutentnahmen sind die AK-Titer in den Abb. 18 a-c grafisch dargestellt.

Zur besseren Übersicht bei der Vielzahl der Antiseren erfolgte eine „Gruppeneinteilung“ in die eigenen Impfstoff-Typen A, B, E, F (a), eigenen Impfstoff-Typen C und D (b) und die kommerzielle C/D-Vaccine (c).

Diese Einteilung soll auch im Folgenden bei anderen Abbildungen beibehalten werden.

Alle geimpften Kaninchen zeigten eine in der KBR meßbare Immunreaktion auf die applizierten Impfstoffe. Keine nachweisbaren Antikörper enthielten die vor der Immunisierung genommenen Serumproben (= Null-Seren), alle im Testsystem mitgeführten Kontrollen reagierten fehlerfrei.

Bei den mit eigener Vakzine geimpften Kaninchen bewegten sich zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme etwa um den fünfzigsten Versuchstag die AK-Titer zwischen 106 (bei *C. botulinum* „D“/2146) und 2776 (für *C. botulinum* D/2142).

Im Vergleich zu den Stämmen A (1028), B (1029), „D“ (2146), E (1032) und F (1033) waren die AK-Titer beider Typen C (1030, 2145) durchschnittlich um 1, Typ D (2142) sogar ca. 5 geometrische Verdünnungsstufen höher. Diese Diskrepanz in der AK-Titerhöhe setzte sich in etwa bis zum Versuchsende fort.

Unabhängig von der Titerhöhe konnte bei allen geimpften Tieren etwa um den 100sten Versuchstag (ca. 5. Blutentnahme) ein deutlicher und kontinuierlicher Abfall der AK-Titer beobachtet werden. Ausgehend von den höchsten AK-Titern ca. 4 Wochen nach der Grundimmunisierung sind die AK-Titer bis zum Versuchsende (ca. 210 d) um 3-4 Verdünnungsstufen ihrer ursprünglichen Höhe abgesunken.

Die AK-Titer der mit kommerzieller Botulinus-Vaccine geimpften Kaninchen waren während der gesamten Versuchsdurchführung deutlich geringer (15-62) als bei den oben genannten, befanden sich aber während des gesamten Verlaufs auf relativ gleichbleibendem Niveau. Signifikante Unterschiede in der AK-Höhe gegenüber Toxin-Typ C zum einen und D zum anderen waren bei beiden Kaninchen nicht zu beobachten.

Die auf den folgenden 3 Seiten dargestellten Abbildungen 18 a - 18 c zeigen die Kinetik des Antikörpertiterverlaufs immunisierter Kaninchen. Es wurden jeweils 10 in einem Zeitraum von ca. 30 Wochen erhaltene Serumproben (sh. Abschnitt 3.3.2.1) gegen die Kulturüberstände der als Antigen

applizierten Typen von *C. botulinum* titriert. Die Serumproben der mit einer kommerziellen Botulinus-Vaccine (3.2.3.2) geimpften Kaninchen (Kan. 1 und Kan. 2) wurden gegen die Lyophilisate C und D titriert (Abb. 18 c).

Abb. 18 a. AK-Titerverlauf (KBR) nach Immunisierung mit eigenen *C. botulinum* A-, B- und F-Toxoiden — Legende sh. Seite 123

Abb. 18 b. AK-Titerverlauf (KBR) nach Immunisierung mit eigenen *C. botulinum* C- und D-Toxoiden — Legende sh. Seite 123

Abb. 18 c. AK-Titerverlauf (KBR) nach Immunisierung mit südafrikanischer C/D-Toxoid-Vaccine — Legende sh. Seite 123

4.3.1.2.2 Nachweis von AK-Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen diverser kommerzieller und selbst gewonnener Antiseren gegen verschiedene Typen von *C. botulinum* und *C. spp.* sind in der Tab. 38 (Anhang 8.2) aufgeführt, in den Abb. 19 a-d sind sie grafisch dargestellt.

Von den Kaninchenserum wurden jeweils die erste (1) und die letzte (10) Serumprobe in die Untersuchungen mit einbezogen, alle reagierten entsprechend mit ihren homologen - zur Vakzinierung eingesetzten Antigenen.

Auch bei diesem Versuchsansatz zeigte sich, daß die Höhe der AK-Titer zu einem frühen Zeitpunkt der Blutabnahme bei allen Tieren um ein vielfaches höher ist als zum Versuchsende (sh. Tab. 38, Anhang 8.2).

Zur übersichtlicheren Darstellung sind in den Abb. 19 a-d jeweils nur die AK-Titer der ersten Serumproben berücksichtigt.

Typ A-Antiserum (1028) reagierte mit Typ B (1029) in etwa gleicher Intensität wie mit dem homologen (d.h. zur Vakzinierung eingesetzten) Antigen. Kreuzreaktionen waren zu beobachten mit „D“ (2146) und Typ F (1033). Mit allen eingesetzten *C. spp.* gab es leichte Kreuzreaktionen.

Typ B (1029) reagierte etwas mit Typ A (1028) und „D“ (2146), ggr. über der Nachweisgrenze mit dem Lyophilisat C und den nahe verwandten Clostridien-Stämmen.

Deutliche Reaktionen zeigten beide Typ C-Antiseren (1030 und 2145) sowohl mit den Vertretern des gleichen Typs (incl. Lyophilisat C) als auch zu Typ D (2142 und Lyophilisat D).

Während Antiserum C (2145) mit weiteren Typen von *C. botulinum* keine Kreuzreaktionen aufwies, ging Typ C-Antiserum (1030) mit Typ E- (1032) und F- (1033) Stämmen und mit den verwandten Clostridien-Stämmen Kreuzreaktionen ein.

Typ D (2142) reagierte sowohl mit seinem homologen Antigen als auch mit dem Typ D-Lyophilisat. Es reagierte nicht mit dem „vermeintlich“ anderen Typ „D“ (2146).

Das andere Antitoxin „D“ (2146) ging außer mit dem homologen AG keine weiteren Reaktionen mit C- oder D-Typen ein. Deutliche Kreuzreaktionen ergaben sich aber zu Typ A (1028) und B (1029) - mit fast der gleichen Titerhöhe wie zu dem homologen Antigen.

Keine Kreuzreaktionen zeigte Typ E (1032) mit *C. botulinum* A, B, D und -F. Nur leichte Reaktionen waren mit dem Lyophilisat C und mit den verwandten Clostridien-Stämmen zu beobachten.

Typ F (1033) wies deutliche Kreuzreaktionen mit A (1028) und B (1029) auf, ebenso hohe Titer waren auch bei *C. parobotulinum* nachweisbar, die anderen verwandten Stämme zeigten nur leichte Reaktionen.

Die Antiseren der mit der kommerziellen Vaccine geimpften Kaninchen reagierten nur mit ihren homologen Antigenen, knapp über der Nachweisgrenze mit *C. tetani* und *C. sordelli*.

Die kommerziellen Antiseren A, B, D, E und G zeigten in der KBR keine Reaktionen - noch nicht einmal zu den typspezifischen Antigenen.

Das C1-Antiserum (Lelystad) reagierte knapp über der Nachweigrenze mit Typ C (2145 und Lyophilisat C), C2 reagierte nur mit Lyophilisat C.

Mit dem homologen Typ F (1033) reagierte das kommerzielle Antiserum F in gleicher Intensität wie mit Typ B, (1029), „D“ (2146) und *C. parobotulinum*.

Die auf den folgenden 4 Seiten dargestellten Abbildungen 19 a - 19 d zeigen Kreuzreaktionen diverser kommerzieller (Tab. 11) und selbst gewonnener Antiseren (Tab. 12) gegen verschiedene Typen von *C. botulinum* und *C. spp.* (Tab. 10), die gemäß der Beschreibungen in Abschnitt 3.5.1.3.3 ermittelt wurden. Von den Kaninchenseren ist jeweils die erste nach Vakzinierung entnommene Serumprobe in den Abbildungen grafisch dargestellt.

Abb. 19 a. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren mit *C. botulinum* A, B, E und F
— Legende sh. Seite 128

Abb. 19 b. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren mit *C. botulinum* C
— Legende sh. Seite 128

Abb. 19 c. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren mit *C. botulinum* D
— Legende sh. Seite 128

Abb. 19 d. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren mit diversen *C. spp.*-Stämmen
— Legende sh. Seite 128

4.3.1.2.3 AK-Nachweis in Rinderseren

Die in Abschnitt 3.5 aufgeführten Rinderseren wurden gegen die Lyophilisate C und D sowie gegen die Kulturüberstände von *C. botulinum* C (1030) und D (2142) titriert.

Bei keinem der aufgeführten Rinderseren konnten in der KBR Antikörpertiter ermittelt werden. Alle in den Testsystemen mitgeführten Kontrollen reagierten fehlerfrei.

4.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.3.2.1 Vorversuche zur Methodik

4.3.2.1.1 Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatten

Die Eignung der Maxisorp®-Rundboden-Platte, Polysorp®-Rundboden- und Flachboden-Platten zum Nachweis von *C. botulinum*-Antikörpern in einem indirekten ELISA sollte untersucht werden.

Die Ergebnisse der photometrischen Messungen (405nm gegen 490nm) aller 3 Platten sind in den Tab. 31 und Tab. 32 (Anhang 8.2) wiedergegeben.

Alle 3 Platten-Typen wurden mit einem positiven Kaninchenserum bzw. Rinderserum auf unspezifische Bindungen untersucht.

Die Extinktionen der Serumkontrollen (jeweils Reihe D der Tab. 31 und Tab. 32) waren sowohl bei den Kaninchen- als auch bei den Rinderseren bei Verwendung der Maxisorp®-Platten um ein etwa 8faches höher als die der Leerwertkontrollen (Spalte 1), die nur Probenpuffer (8.1.6) enthielten. Die Serumkontrollen gingen mit der Maxisorp®-Oberfläche unspezifische Bindungen ein.

Bei Verwendung der Polysorp®-Platten zeigten sich bei den Serumkontrollen bei Verdünnungen von 1:10 nur geringgradige unspezifische Reaktionen mit der Oberfläche der Mikrotiterplatte. Bei Serumverdünnungen ab ca. 1:160 wurden mit den Serumkontrollen von Kaninchen und Rindern die Extinktionen der Leerwertkontrollen erreicht.

Bei Maxisorp®-Platten war die Extinktion der positiven Kaninchenserum (Reihen A-C) im Vergleich zu der Serumkontrolle (Reihe D) 2-4fach höher, bei Polysorp®-Platten erreichten sie teilweise die 10fache Höhe. Bei Verwendung von positiven Rinderserum wurde der Unterschied noch deutlicher, dort wurde mit Polysorp®-Platten teilweise die 30fache Höhe im Vergleich zur Serumkontrolle erreicht.

Bei Rundbodenplatten mit positiven Kaninchenserum wurden trotz bichromatischer Messung bei steigenden Serumverdünnungen (teilweise bis 1:320) steigende Extinktionen beobachtet, die erst bei hohen Serumverdünnungen langsam abfielen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche mit den Polysorp®-Flachbodenplatten durchgeführt.

4.3.2.1.2 Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung

Die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Kulturüberstände, die Botulinus-Vaccine aus Südafrika, sowie die für die südafrikanische Impfstoffproduktion eingesetzten untoxoidierten Lyophilisate der Toxintypen C und D wurden auf ihre optimale Coating-Verdünnung untersucht.

Die Antigenauswertung erfolgte unter Einbeziehung positiver (+) und negativer (-) Kaninchen- und Rinderserum und ist exemplarisch am Beispiel von *C. botulinum* Typ-D-Kulturüberstand (2142) und Lyophilisat C in den Tab. 33- Tab. 36 (Anhang 8.2) dargestellt.

In allen Antigenauswertungen war die Diskriminierung der negativen im Vergleich zu den positiven Kaninchen- und Rinderserum gegeben. Bei Antigenkonzentrationen >1:40 wurden die Unterschiede zwischen den Extinktionen der positiven und negativen Kaninchenserum am deutlichsten. Ab Antigenkonzentrationen >1:80 (bei Antigen 2142) bzw. >1:200 (bei Lyophilisat) war ein deutlicher Abfall der Extinktionen bei positiven Kaninchenserum zu erkennen, so daß als sichere Gebrauchsverdünnung eine Antigenverdünnung von 1:80 in Coating-Puffer in Betracht kam.

Die Extinktionen positiver Rinderserum wiesen ebenfalls ab Antigenkonzentrationen >1:40 deutliche Unterschiede im Vergleich zu negativen Serum auf. Bei Antigenverdünnungen >1:320 bzw. >1:400 war ein deutlicher Abfall der Extinktionen zu beobachten, so daß als sichere Gebrauchsverdünnung eine Antigenverdünnung von 1:200 in den Tests für Rinderserum zum Einsatz kam.

Vergleichsuntersuchungen mit den anderen in Tab. 10 Abschnitt 3.5 aufgeführten Kulturüberständen bzw. mit dem Lyophilisat Typ D zeigten das gleiche Verhalten wie die exemplarisch aufgeführten Antigene, so daß zusammenfassend die in den weiteren Versuchsansätzen verwendeten Antigen-Gebrauchsverdünnungen in der Tab. 24 aufgeführt sind.

Tab. 24. Für den ELISA eingesetzte Antigen-Gebrauchsverdünnungen

Seren	Kaninchenser und kommerzielle <i>C. botulinum</i> -Antiseren	Rinderseren
Antigene		
<i>C. botulinum</i> -Kulturüberstände aller Toxintypen	1:80	1:200
Kulturüberstände nahe verwandter Clostridien	1:80	-
<i>C. botulinum</i> -Lyophilisate C und D der südafrikanischen Impfstoffproduktion	1:80	1:200
Botulinus-Vaccine (Onderstepoort)	ungeeignet	ungeeignet

Trotz der verschiedensten Verdünnungen (pur bis 1:100000) der südafrikanischen Botulinus-Vaccine, konnten weder bei Kaninchen- noch Rinderseren Unterschiede der Extinktionen zwischen negativen und positiven Seren gemessen werden, so daß der Einsatz der kommerziellen Vaccine zum Nachweis von *C. botulinum*-AK für den ELISA nicht möglich war.

4.3.2.1.3 Bestimmung der Cut-off-Werte für den ELISA

Mittelwert und Standardabweichung der Extinktionen von 20 Kaninchen- und 100 Rinder-Normalseren wurden zur Bestimmung der Cut-off-Werte gemäß Abschnitt 3.5.2.2.3 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 25 aufgeführt.

Tab. 25. Bestimmung der Cut-off- und der Schwellenwerte für den ELISA

neg. Seren	Mittelwert	Standardabw. (S)	cut-off	Schwellenwert
Kaninchen	0,074	0,010	0,10	0,08
Rind	0,066	0,026	0,14	0,09

4.3.2.2 Nachweis von *C. botulinum*-AK

4.3.2.2.1 AK-Nachweis in Seren immunisierter Kaninchen

Zur quantitativen Ermittlung des AK-Titerverlaufs immunisierter Kaninchen wurden jeweils 10 in einem Zeitraum von ca. 30 Wochen erhaltene Serumproben gegen die Kulturüberstände der als Antigen applizierten Typen von *C. botulinum* titriert. Die Serumproben der mit Botulinus-Vaccine (Onderstepoort) geimpften Kaninchen (Nr. 1 und 2) wurden gegen die Lyophilisate C und D titriert. Die Ergebnisse der AK-Titrationen sind in Tab. 39 (Anhang 8.2) aufgeführt, in den Abb. 20 a-c in Abhängigkeit zu dem zeitlichen Verlauf der Blutabnahme grafisch dargestellt.

Alle geimpften Kaninchen zeigten im ELISA meßbare Immunreaktionen auf die applizierten Impfstoffe. Die Null-Serumproben wiesen in den Verdünnungen von 1:10 bis 1:20480 keine nachweisbaren Antikörper auf.

Zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme dominierte bei den mit eigener Vakzine geimpften Kaninchen Typ B (1029) mit einem AK-Titer von 53809. Eine geometrische Verdünnungsstufe darunter lagen die Typen C (1030) und D (2142), bis zu 5 Verdünnungsstufen darunter die restlichen Antiseren mit dem niedrigsten AK-Titer von 1393.

Mit Ausnahme von Typ E (1032) zeigten alle Tiere bis etwa zum Zeitpunkt der fünften Blutentnahme einen Anstieg der AK-Titer-Höhe. Danach folgte ein deutlicher Abfall bis etwa zur 7. Blutentnahme, bei der etwa wieder die Höhe der Ausgangstiter erreicht wurde.

Ab der 7. Blutabnahme sanken die AK-Titer bis zum Versuchsende deutlich unter ihre ursprüngliche Höhe.

Nur bei Typ E (1032) konnte über die gesamte Versuchsdauer ein von der ersten Blutabnahme stetig fallender AK-Titer beobachtet werden.

Die Höhe der AK-Titer bei den mit kommerzieller Botulinus-Vaccine immunisierten Kaninchen war während der gesamten Versuchsdurchführung z. T. bis 7 Verdünnungsstufen geringer als z. B. bei Typ B (1029). Auch hier war zu beobachten, daß sich der höchste AK-Titer zwischen der 3. und 5. Blutabnahme befand, danach fielen die AK-Titer bis zum Versuchsende deutlich unter die Titer der ersten Blutabnahme ab.

Die auf den folgenden 3 Seiten dargestellten Abbildungen 20 a - 20 c zeigen die Kinetik des Antikörpertiterverlaufs immunisierter Kaninchen. Es wurden jeweils 10 in einem Zeitraum von ca. 30 Wochen erhaltene Serumproben (sh. Abschnitt 3.3.2.1) gegen die Kulturüberstände der als Antigen applizierten Typen von *C. botulinum* titriert. Die Serumproben der mit einer kommerziellen Botulinus-Vaccine (3.2.3.2) geimpften Kaninchen (Kan. 1 und Kan. 2) wurden gegen die Lyophilisate C und D titriert (Abb. 20 c).

Abb. 20 a. AK-Titerverlauf (ELISA) nach Immunisierung mit *C. botulinum* A-, B-, E- und F-Toxoiden — Legende sh. Seite 137

Abb. 20 b. AK-Titerverlauf (ELISA) nach Immunisierung mit *C. botulinum* C- und D-Toxoiden — Legende sh. Seite 137

Abb. 20 c. AK-Titerverlauf (ELISA) nach Immunisierung mit südafrikanischer C/D-Toxoid-Vaccine — Legende sh. Seite 137

4.3.2.2.2 Nachweis von AK-Kreuzreaktionen

Kreuzreaktionen diverser kommerzieller und selbst gewonnener Antiseren gegen verschiedene Typen von *C. botulinum* und *C. spp.* sind in der Tab. 40 (Anhang 8.2) aufgeführt, in den Abb. 21 a-d sind sie grafisch dargestellt.

Jeweils die erste (1) und letzte (10) Serumprobe der Kaninchen wurde in dem Test eingesetzt. Alle Seren reagierten entsprechend deutlich mit ihren homologen - zur Vakzinierung eingesetzten Antigenen (Tab. 40).

Zur übersichtlicheren Darstellung sind in den Abb. 21 a-d jeweils nur die AK-Titer der ersten Serumproben berücksichtigt.

Typ A-Antiserum (1028) zeigte deutliche Kreuzreaktionen zu Typ B (1029) und leichte zu Typ F (1033). Zu dem vermeintlichen Typ „D“ (2146) waren die AK-Titer sogar höher als zu dem homologen Antigen.

Typ B zeigte deutliche Kreuzreaktionen zu Typ A (1028) und Typ „D“ (2146), mäßige zu Typ F (1033) und geringe zu den anderen Typen von *C. botulinum*.

Beide Typ C-Antiseren (1030, 2145) reagierten deutlich mit anderen Stämmen des gleichen Toxintyps, leichte Kreuzreaktionen waren auch mit Typ D und anderen Toxintypen nachzuweisen.

Typ D (2142) zeigte Kreuzreaktionen zu allen Typ-C-Antigenen, die AK-Titer lagen teilweise noch oberhalb der homologen AK-Titer-Höhe. Zu den beiden anderen D-Typen (2146, Lyophilisat) und Typ B zeigten sich mäßige, zu Typ A und F leichte Kreuzreaktionen. Keine Kreuzreaktionen zeigten beide D-Typen zu *C. botulinum* E (1032).

Deutliche Kreuzreaktionen zeigte Typ „D“ zu den Stämmen A (1028) und B (1029), leichte Reaktionen zu Typ C und -F.

Nur sehr geringe Kreuzreaktionen zeigte Typ E (1032) mit A, B, C und F-Stämmen.

Typ F wies deutliche AK-Titer zu A (1028), B (1029) und „D“ (2146) auf. Leichte Kreuzreaktionen bestanden ebenfalls zu den anderen Typen von *C. botulinum*.

Die kommerziellen Antitoxine A und B (Lelystad und Pasteur) verhielten sich nahezu gleich. Sie gingen deutliche Kreuzreaktionen zu A- bzw. B-Stämmen und Typ „D“ (2146) ein, zeigten aber auch zu den anderen Stämmen von *C. botulinum* leichte Kreuzreaktionen.

Die kommerziellen Typ C Antitoxine verhielten sich relativ spezifisch zu C-Antigenen, wiesen aber ebenfalls leichte Kreuzreaktionen auf.

Deutliche Kreuzreaktionen zu Typ C-Stämmen zeigten die kommerziellen Typ D-Antitoxine. AK-Titer oberhalb der homologen Antigene ergaben sich für *C. botulinum* Typ E (1032).

Antitoxin-Typ E (Lelystad) ging leichte Kreuzreaktionen zu allen eingesetzten Antigenen ein.

Typ F-Antitoxin (Lelystad) wies mittelgradige Kreuzreaktionen gegenüber A, B und „D“ (2146) auf, Typ G reagierte etwas mit allen *C. botulinum*-Stämmen, besonders mit Typ E (1032).

Zu den verwandten Clostridien-Stämmen zeigten alle „eigenen Antiseren“, und mit Ausnahme von C1 (Lelystad) alle kommerziellen Antiseren mehr oder weniger starke Kreuzreaktionen.

Zu *C. parobotulinum* wiesen v.a. die Antiseren A (1028, Lelystad und Pasteur) und B (1029, Lelystad und Pasteur) sehr deutliche Kreuzreaktionen auf. Nur leichte bis keine Kreuzreaktionen waren von allen Antiseren gegenüber *C. baratii* zu beobachten.

Die auf den folgenden 4 Seiten dargestellten Abbildungen 21 a - 21 d zeigen Kreuzreaktionen diverser kommerzieller (Tab. 11) und selbst gewonnener Antiseren (Tab. 12) gegen verschiedene Typen von *C. botulinum* und *C. spp.* (Tab. 10), die gemäß der Beschreibungen in Abschnitt 3.5.2.3.2 ermittelt wurden. Von den Kaninchenseren ist jeweils die erste nach Vakzinierung entnommene Serumprobe in den Abbildungen grafisch dargestellt.

Abb. 21 a. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren mit *C. botulinum* A, B, E und F — Legende sh. Seite 142

Abb. 21 b. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren mit diversen Stämmen von *C. botulinum* C — Legende sh. Seite 142

Abb. 21 c. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren mit diversen Stämmen von *C. botulinum* D — Legende sh. Seite 142

Abb. 21 d. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren mit diversen *C. spp.*-Stämmen
— Legende sh. Seite 142

4.3.2.2.3 AK-Nachweis in Rinderseren

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf Antikörper in Rinderseren (sh. Tab. 9) mittels ELISA sind in den Tab. 26-Tab. 28 dargestellt.

Tab. 26 umfaßt die an dem Feldversuch teilgenommenen Betriebe A-F mit Serumproben ungeimpfter, 1-, 2- und 3-fach geimpfter Rinder.

In

Tab. 27 sind Serumproben von Kälbern der Betriebe A und C aufgeführt, deren Mutterkühe an dem Impfprogramm teilgenommen haben.

Serumproben klinisch an Botulismus erkrankter Rinder aus dem Bestand G sind in Tab. 28 dargestellt.

In den Beständen, die an dem Feldversuch teilnahmen, waren die Unterschiede ungeimpfte/geimpfte Tiere deutlich:

11 der 14 nicht grundimmunisierten Rinder wiesen überhaupt keine nachweisbaren AK gegenüber *C. botulinum* C und D auf, die 3 anderen hatten je nach verwendetem Antigen keine, vereinzelt zweifelhafte oder knapp über der Nachweisgrenze liegende AK-Titer.

Im ersten Jahr wiesen nach der Grundimmunisierung 8 der geimpften Rinder (n=13) eine deutlich nachweisbare AK-Bildung auf, 3 der Rinder zeigten - je nach verwendetem Antigen keine oder nur zweifelhafte AK-Bildung.

Alle Rinder, die im 2. bzw. 3. Jahr geimpft wurden, hatten je nach verwendetem Antigen in der Regel eine deutlich meßbare Antikörperbildung gegenüber *C. botulinum* C bzw. D.

6 der 8 untersuchten Kälberseren hatten Antikörper gegenüber *C. botulinum* C bzw. D, in 2 Proben konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

Bei den erkrankter Rindern konnten zwischen dem 7. und 9. Krankheitstag keine Antikörper gegenüber dem Kulturüberstand C (1030) nachgewiesen werden. Negative bzw. zweifelhafte Ergebnisse ergaben sich gegenüber Lyophilisat C und dem Kulturüberstand D (2142). Nur vereinzelt traten leicht positive Ergebnisse mit Lyophilisat D auf.

Tab. 26. AK-Titer (ELISA) in Rinderseren nach Vakzinierung mit Botulinus-Vaccine aus Onderstepoort

Lfd.- Nr.	Betrieb	Alter d. Rinder) (Jahre)	jährliche Vakzinierung			verwendete Antigene			
						1030 (C)	Lyophil. C	2142 (D)	Lyophil. D
						Titer	Titer	Titer	Titer
1	A	4 1/2	x	x	x	154	273	73	122
2		8 1/4	x	x	x	zweifelh.	zweifelh.	95	256
3		2 3/4	x	x		260	460	97	259
4		3	x	x		149	249	57	334
5		6 1/2	x	x	x	19	41	zweifelh.	279
6		2 3/4	x	x		23	zweifelh.	zweifelh.	38
7		2 1/2	-	-	-	zweifelh.	zweifelh.	0	zweifelh.
8		8 1/2	x	x	x	65	232	33	544
9		5	x	x	x	25	61	zweifelh.	527
10		6 1/4	x	x	x	37	17	11	197
11	B	8 1/2	x	x	x	0	12	0	66
12		5 1/2	x	x	x	157	184	63	50
13		4 1/2	x	x	x	428	630	237	430
14		6 1/4	x	x	x	147	164	32	145
15		4	x	x	x	76	106	39	210
16		4	x	x	x	20	100	11	480
17	C	4 1/2	x	x	x	109	23	24	89
18		11	x	x	x	147	144	37	345
19		5 1/4	x	x	x	519	381	54	116
20		14 1/2	x	x	x	388	267	71	699
21		16	x	x	x	106	27	zweifelh.	89
22		9	x	x	x	163	98	49	181
23		8 1/2	x	x	x	238	105	52	208
24		9 3/4	x	x	x	181	zweifelh.	zweifelh.	zweifelh.
25	D	4	x	x	x	128	304	78	656
26		3/4	- ?	-	-	zweifelh.	30	0	zweifelh.
27		9 1/2	x	x	x	170	138	65	309
28		4 1/2	x	x	x	95	83	22	398
29		6 1/2	x	x	x	225	254	98	213
30		5	x	x	x	175	195	71	200
31		11	x	x	x	41	72	zweifelh.	zweifelh.

32		7 1/4	x	x	x	134	197	60	144
----	--	-------	---	---	---	-----	-----	----	-----

Tab. 26 Forts. AK-Titer (ELISA) in Rinderseren nach Vakzinierung mit Botulinus-Vaccine aus Onderstepoort

Lfd.- Nr.	Betrieb	Alter d. Rinder) (Jahre)	jährliche Vakzinierung			verwendete Antigene			
						1030 (C)	Lyophil. C	2142 (D)	Lyophil. D
						Titer	Titer	Titer	Titer
33	D	4 1/2	x	x	x	62	36	22	zweifelh.
34		5 1/4	x	x	x	200	110	29	206
35		5	x	x	x	163	24	zweifelh.	104
36		6 1/2	x	x	x	99	39	zweifelh.	159
37		6 1/2	x	x	x	141	116	52	484
38		1/2	-	-	-	0	0	0	0
39		1/2	-	-	-	0	0	0	0
40		3/4	-	-	-	0	0	0	0
41		3/4	-	-	-	0	0	0	0
42		1/12	-	-	-	0	0	0	0
43	E	1 3/4	x	-	-	35	27	11	28
44		1 3/4	x	-	-	20	16	zweifelh.	33
45		1 3/4	x	-	-	19	38	13	63
46		1 3/4	x	-	-	34	73	34	175
47		1 3/4	x	-	-	zweifelh.	29	0	zweifelh.
48		1 3/4	x	-	-	19	69	zweifelh.	64
49		1/2	-	-	-	0	0	0	0
50		1/2	-	-	-	0	0	0	zweifelh.
51		1/2	-	-	-	0	0	0	0
52		1/2	-	-	-	0	0	0	0
53	F	5	x	-	-	45	93	11	65
54		4	x	-	-	11	70	zweifelh.	315
55		5	x	-	-	0	zweifelh.	zweifelh.	0
56		6	x	-	-	0	0	0	24
57		5	x	-	-	42	27	11	88
58		5	x	-	-	19	40	14	15
59		8	x	-	-	0	0	zweifelh.	0
60		1/2	-	-	-	0	0	0	0
61		1/2	-	-	-	0	0	0	0
62		1/2	-	-	-	0	0	0	0

— Legende siehe Seite 150

In der Tabelle 26 auf Seite 148/149 sind die Serum-AK-Titer ungeimpfter (-) und geimpfter (x) Rinder aus den Beständen A-F (Tab. 9) dargestellt, die gemäß Abschnitt 3.5.2.3.3 gegen die Kulturüberstände von *C. botulinum* C (1030) und D (2142), sowie die Lyophilisate C und D ermittelt wurden.

Serumverdünnungen, deren Extinktionen über dem Schwellenwert und unter dem Cut-off-Wert lagen, wurden als zweifelhaft (zweifelh.) bewertet (3.5.2.4).

*) z. Zt. der Blutabnahme

Tab. 27. AK-Titer (ELISA) ungeimpfter Kälber

Lfd.-Nr.	Betrieb	Alter d. Rinder *) (Tage)	verwendete Antigene			
			1030 (C) Titer	Lyophil. C Titer	2142 (D) Titer	Lyophil. D Titer
63	A	2	30	39	0	26
64		8	0	0	0	0
65		3	35	40	zweifelh.	36
66		4	96	114	21	48
67		8	279	690	48	89
68	C	7	0	0	0	0
69		4	138	150	27	865
70		5	278	141	26	75

Dargestellt sind die Serum-AK-Titer von Kälbern aus den Betrieben A und C (sh. Tab. 9), die gemäß Abschnitt 3.5.2.3.3 gegen die Kulturüberstände von *C. botulinum* C (1030) und D (2142), sowie die Lyophilisate C und D ermittelt wurden. Serumverdünnungen, deren Extinktionen über dem Schwellenwert und unter dem Cut-off-Wert lagen, wurden als zweifelhaft bewertet (3.5.2.4).

*) z. Zt. der Blutabnahme

Tab. 28. AK-Titer (ELISA) in Seren klinisch an Botulismus erkrankter Rinder

Lfd.-Nr.	Betrieb	Rinder-Nr.	Tag der Erkrankung	verwendete Antigene			
				1030 (C) Titer	Lyophil. C Titer	2142 (D) Titer	Lyophil. D Titer
71	G	1	7.	0	zweifelh.	0	13
72		2	7.	0	0	0	zweifelh.
73		3	7.	0	zweifelh.	zweifelh.	73
74		4	7.	0	0	0	zweifelh.
75		5	7.	0	0	0	zweifelh.
76		6	7.	0	0	0	0
77		2	8.	0	0	0	0
78		3	8.	0	zweifelh.	zweifelh.	102
79		4	8.	0	0	0	zweifelh.
80		5	8.	0	zweifelh.	0	13
81		2	9.	0	0	0	0
82		3	9.	0	0	0	41
83		5	9.	0	zweifelh.	0	11

Dargestellt sind die Serum-AK-Titer von 6 klinisch an Botulismus erkrankten Rindern aus dem Bestand G (sh. Tab. 9) am 7., 8. und 9. Krankheitstag. Die AK-Titer wurden gemäß Abschnitt 3.5.2.3.3 gegen die Kulturüberstände von *C. botulinum* C (1030) und D (2142), sowie die Lyophilisate C und D ermittelt. Serumverdünnungen, deren Extinktionen über dem Schwellenwert und unter dem Cut-off-Wert lagen, wurden als zweifelhaft bewertet (3.5.2.4).

Die AK-Titer ungeimpfter und geimpfter Rinder, sowie der Kälberseren sind vergleichend bezogen auf die in ELISA verwendeten Antigene in den Abb. 22-Abb. 25 dargestellt.

In die Darstellungen bzw. statistischen Auswertungen gingen sog. zweifelhafte Titer mit einem „angenommenen Antikörpertiter“ von 5 ein.

Die Werte, die sehr weit von einem Verteilungsmuster entfernt waren, wurden als Ausreißer und Extremwerte bezeichnet, wenn sie die nachfolgend aufgeführten Bedingungen erfüllten:

Ausreißer = Datenpunktwert $> 1,5 \cdot H + OBW$

Extreme = Datenpunktwert $> 3 \cdot H + OBW$,

wobei H die Höhe der Box

und OBW den oberen Wert für die Box = das 75-%-Perzentil darstellt.

Abb. 22. Darstellung der AK-Titer bezogen auf *C. botulinum* C (1030) — Legende sh. S. 154

Abb. 23. Darstellung der AK-Titer bezogen auf Lyophilisat Typ C — Legende sh. S. 154

Abb. 24. Darstellung der AK-Titer bezogen auf *C. botulinum* D (2142) — Legende sh. S. 154

Abb. 25. Darstellung der AK-Titer bezogen auf Lyophilisat Typ D — Legende sh. S. 154

In den Abbildungen 22-25 auf den Seiten 152/153 sind die Serum-Antikörpertiter ungeimpfter, 1-, 2- und 3fach geimpfter Rinder der Betriebe A-F vergleichend bezogen auf die verwendeten Antigene (Kulturüberstände von *C. botulinum* C (1030) und D (2142), sowie die *C. botulinum*-Lyophilisate C und D) dargestellt. In die statistischen Berechnungen gingen die sog. zweifelhaften AK-Titer mit einem „angenommenen Titer“ von 5 ein. Sehr weit von dem Verteilungsmuster entfernt liegende Werte wurden als Ausreißer (Datenpunktwert > 1,5*H + OBW) und Extremwerte (Datenpunktwert > 3*H + OBW) bezeichnet, dabei stellt H die Höhe der Box und OBW den oberen Wert für die Box = das 75-%-Perzentil dar (sh. Abschnitt 4.3.2.2.3).

4.3.2.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Ergebnisse ist in Tab. 29 dargestellt.

Tab. 29. Intra-Assay-Variation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,124	0,118	0,091	0,093	0,084	0,088	0,086	0,101	0,940	0,135	0,134	0,128
B	0,125	0,108	0,101	0,088	0,103	0,093	0,103	0,096	0,100	0,125	0,141	0,127
C	0,137	0,108	0,100	0,090	0,096	0,099	0,095	0,086	0,098	0,109	0,131	0,130
D	0,134	0,108	0,105	0,083	0,095	0,103	0,088	0,093	0,094	0,103	0,103	0,123
E	0,147	0,121	0,102	0,091	0,102	0,085	0,087	0,087	0,111	0,127	0,136	0,103
F	0,140	0,115	0,111	0,090	0,100	0,089	0,099	0,081	0,092	0,084	0,131	0,127
G	0,120	0,109	0,100	0,096	0,101	0,090	0,090	0,107	0,091	0,106	0,127	0,126
H	0,130	0,117	0,094	0,093	0,088	0,088	0,087	0,114	0,092	0,102	0,103	0,119

Zur Ermittlung der Intra-Assay-Variation sind in Tabelle 29 exemplarisch die Extinktionen (405 nm gegen 490 nm) eines 1:40 in Probenpuffer vorverdünnten positiven Rinderserums (Bestand D, Tab. 9) dargestellt, das in alle Kavitäten (Reihen A-H, Spalten 1-12) der mit dem Antigen *C. botulinum* D (2142) beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert wurde.

Für einen 96fachen Ansatz wurden folgende Werte ermittelt:

- arithmetisches Mittel: 0,114
- Standardabweichung (S): 0,09
- rel. Variationskoeffizient (Vr): 7,73 %

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISA ist in Tab. 30 dargestellt.

Tab. 30. Inter-Assay-Variationen

Serum Nr.	AK-Titer					Mittel- wert	S	Vr (%)
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5			
1	113,71	126,03	138,39	103,46	123,84	121,09	13,20	4,9
2	246,02	241,47	227,88	126,28	136,93	195,71	59,02	13,5
3	213,57	103,99	232,39	166,38	154,43	174,15	50,79	13,0
4	404,08	412,23	382,69	284,15	270,53	350,74	68,04	8,7
5	63,20	57,10	66,38	38,69	42,85	53,65	12,31	10,3
6	238,35	144,92	226,27	103,28	149,19	172,40	57,72	15,0
7	136,43	144,13	179,11	114,96	131,87	141,30	23,69	7,5
8	0	0	0	0	0			

Um die Wiederholbarkeit serologischer Ergebnisse darzustellen, sind in Tabelle 30 die Antikörper (AK)-Titer dargestellt, die bei gleicher Plattenbelegung an 5 verschiedenen Tagen mit 7 positiven (Nr. 1-7) und 1 negativen (Nr. 8) Rinderserum gegen das Antigen Typ D (2142) titriert wurden. Der Mittelwert, die Standardabweichung (S) und der rel. Variationskoeffizient (Vr) der AK-Titer wurden ermittelt.

Die Antikörper-Titer der 7 positiven Rinderseren wiesen eine durchschnittliche Abweichung von 10,4 % auf.

8.2 Tabellenanhang

Tab. 31. Vergleich der Mikrotiterplatten mit positiven Kaninchenseren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U-Platte Maxisorp®												
A	0,049	0,838	0,999	1,316	1,488	1,567	1,590	1,484	1,250	1,074	0,751	0,442
B	0,051	0,762	0,994	1,298	1,433	1,526	1,525	1,409	1,220	1,042	0,659	0,419
C	0,048	0,847	0,983	1,295	1,475	1,527	1,536	1,363	1,240	1,010	0,538	0,344
D	0,049	0,418	0,235	0,154	0,103	0,079	0,065	0,058	0,050	0,052	0,05	0,051
F-Platte Polysorp®												
A	0,036	0,494	0,522	0,520	0,516	0,486	0,403	0,327	0,263	0,212	0,139	0,098
B	0,034	0,516	0,553	0,552	0,505	0,486	0,408	0,355	0,267	0,203	0,143	0,099
C	0,037	0,529	0,550	0,544	0,520	0,484	0,421	0,362	0,285	0,202	0,145	0,091
D	0,035	0,051	0,045	0,040	0,038	0,037	0,038	0,037	0,036	0,035	0,036	0,035
U-Platte Polysorp®												
A	0,050	0,888	0,994	1,078	1,124	1,145	1,129	1,006	0,902	0,747	0,532	0,360
B	0,048	0,928	0,968	1,099	1,125	1,105	1,094	1,045	0,955	0,792	0,549	0,376
C	0,051	0,847	1,013	1,104	1,139	1,158	1,156	1,081	0,978	0,771	0,615	0,424
D	0,050	0,079	0,076	0,067	0,061	0,060	0,055	0,054	0,051	0,056	0,053	0,053

In der Tabelle 31 sind die in den ELISA-Vorversuchen ermittelten Extinktionen (405 nm gegen 490 nm) von 3 verschiedenen Mikrotiterplatten (3.5.2.2.1) dargestellt. Alle 3 Platten-Typen wurden mit einem positiven Kaninchenserum auf unspezifische Bindungen untersucht. Die Reihen A-C wurden mit 100µL 1:20 in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünntem Kulturüberstand von *C. botulinum* Typ D (2142) (Tab. 10) beschichtet. Die Reihe D diente als Serumkontrolle, um mögliche unspezifische Reaktionen des Serums mit der Polystyrene-Oberfläche darstellen zu können und wurde daher nicht mit Antigen gefüllt. Die erste Spalte diente als Leerwertkontrolle („Blank“) und enthielt nur Probenpuffer.

Nach dem Beschichten, Blockieren und Waschen der Platten erfolgte eine Serumtitration in den Reihen A-D von Spalte 2 (Serumverdünnung 1:10) bis zur Spalte 12 (Serumverdünnung 1:10240). Nach Inkubation, Waschen, Zugabe von Konjugat, erneutem Waschen und Substratzugabe erfolgte die photometrische Messung der Extinktionen (Digiscan, ASYS HITECH; DigiWin-Programm V2.0).

Tab. 32. Vergleich der Mikrotiterplatten mit positiven Rinderseren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U-Platte Maxisorp®												
A	0,051	2,834	2,900	2,647	2,015	1,322	0,741	0,376	0,225	0,153	0,119	0,099
B	0,050	2,917	2,736	2,554	1,799	1,298	0,719	0,395	0,234	0,145	0,111	0,102
C	0,052	2,636	2,527	2,355	1,711	1,104	0,641	0,364	0,221	0,151	0,118	0,100
D	0,049	0,400	0,270	0,210	0,100	0,068	0,061	0,057	0,064	0,056	0,059	0,056
F-Platte Polysorp®												
A	0,037	1,039	0,93	0,614	0,422	0,222	0,159	0,103	0,075	0,057	0,050	0,043
B	0,034	1,198	0,976	0,588	0,384	0,229	0,142	0,100	0,071	0,055	0,050	0,046
C	0,034	1,160	0,920	0,592	0,386	0,246	0,157	0,096	0,065	0,054	0,046	0,044
D	0,036	0,047	0,041	0,035	0,036	0,033	0,035	0,032	0,033	0,033	0,033	0,033
U-Platte Polysorp®												
A	0,048	2,840	2,460	2,095	1,590	1,051	0,637	0,397	0,236	0,175	0,159	0,149
B	0,050	2,700	2,460	2,087	1,501	0,937	0,523	0,308	0,228	0,157	0,138	0,124
C	0,049	2,543	2,251	1,989	1,429	0,987	0,605	0,346	0,217	0,169	0,153	0,135
D	0,048	0,063	0,060	0,055	0,051	0,050	0,050	0,046	0,047	0,049	0,047	0,048

In der Tabelle 32 sind die in den ELISA-Vorversuchen ermittelten Extinktionen (405 nm gegen 490 nm) von 3 verschiedenen Mikrotiterplatten (3.5.2.2.1) dargestellt. Alle 3 Platten-Typen wurden mit einem positiven Rinderserum (3.5) auf unspezifische Bindungen untersucht. Die Reihen A-C wurden mit 100µL 1:20 in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünntem Kulturüberstand von *C. botulinum* Typ D (2142) (Tab. 10) beschichtet. Die Reihe D diente als Serumkontrolle, um mögliche unspezifische Reaktionen des Serums mit der Polystyrene-Oberfläche darstellen zu können und wurde daher nicht mit Antigen gefüllt. Die erste Spalte diente als Leerwertkontrolle („Blank“) und enthielt nur Probenpuffer.

Nach dem Beschichten, Blockieren und Waschen der Platten erfolgte eine Serumtitration in den Reihen A-D von Spalte 2 (Serumverdünnung 1:10) bis zur Spalte 12 (Serumverdünnung 1:10240).

Nach Inkubation, Waschen, Zugabe von Konjugat, erneutem Waschen und Substratzugabe erfolgte die photometrische Messung der Extinktionen (Digiscan, ASYS HITECH; DigiWin-Programm V2.0).

Tab. 33. Ergebnisse der Antigenauswertung von *C. botulinum* D (2142) mit positiven und negativen Kaninchenserum

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AG-Verdünnung 1:10												
-	0,104	0,087	0,076	0,067	0,063	0,054	0,049	0,041	0,040	0,036	0,034	0,032
+	0,290	0,280	0,260	0,220	0,169	0,150	0,126	0,111	0,080	0,068	0,047	0,040
AG-Verdünnung 1:20												
-	0,095	0,089	0,071	0,063	0,060	0,051	0,051	0,039	0,040	0,031	0,032	0,029
+	0,320	0,298	0,273	0,235	0,190	0,155	0,138	0,115	0,099	0,073	0,051	0,036
AG-Verdünnung 1:40												
-	0,118	0,098	0,076	0,056	0,053	0,048	0,042	0,039	0,036	0,032	0,026	0,022
+	0,520	0,516	0,510	0,493	0,457	0,415	0,364	0,286	0,213	0,101	0,062	0,045
AG-Verdünnung 1:80												
-	0,100	0,078	0,067	0,057	0,054	0,046	0,040	0,039	0,034	0,029	0,026	0,024
+	0,500	0,492	0,486	0,480	0,460	0,434	0,393	0,332	0,242	0,160	0,094	0,063
AG-Verdünnung 1:160												
-	0,100	0,08	0,068	0,060	0,052	0,045	0,040	0,034	0,033	0,030	0,031	0,024
+	0,463	0,466	0,458	0,453	0,432	0,409	0,360	0,300	0,223	0,136	0,080	0,057
AG-Verdünnung 1:320												
-	0,109	0,085	0,072	0,060	0,060	0,042	0,040	0,040	0,034	0,034	0,030	0,025
+	0,460	0,453	0,440	0,415	0,411	0,394	0,352	0,292	0,212	0,120	0,064	0,036
AG-Verdünnung 1:1280												
-	0,105	0,081	0,057	0,048	0,035	0,034	0,032	0,032	0,030	0,026	0,027	0,025
+	0,446	0,453	0,456	0,434	0,420	0,368	0,283	0,220	0,160	0,104	0,068	0,050
AG-Verdünnung 1:2560												
-	0,102	0,08	0,054	0,05	0,039	0,035	0,034	0,032	0,029	0,028	0,028	0,025
+	0,420	0,420	0,411	0,406	0,373	0,320	0,253	0,200	0,160	0,106	0,067	0,047

Dargestellt sind die Extinktionen aus den ELISA-Vorversuchen (3.5.2.2.2) zur Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung zur Beschichtung der Mikrotiterplatten. In die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde der in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünnte Kulturüberstand von *C. botulinum* D (2142) entsprechend den dargestellten AG-Verdünnungen (sh. auch Tab. 15) vorgelegt. Auf den beschichteten Platten erfolgte eine Serumtitration (Serumverdünnung 1:10 in Spalte 1 bis 1:20480 in Spalte 12) mit einem positiven (+) und einem negativen (-) Kaninchenserum.

Tab. 34. Ergebnisse der Antigenauswertung von *C. botulinum* D (2142) mit positiven und negativen Rinderseren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AG-Verdünnung 1:10												
–	0,095	0,091	0,073	0,055	0,053	0,049	0,045	0,039	0,035	0,037	0,033	0,030
+	0,320	0,252	0,200	0,143	0,109	0,095	0,067	0,050	0,050	0,040	0,035	0,034
AG-Verdünnung 1:20												
–	0,093	0,089	0,071	0,055	0,055	0,050	0,044	0,039	0,034	0,038	0,033	0,029
+	0,349	0,280	0,209	0,156	0,119	0,095	0,076	0,055	0,052	0,047	0,036	0,035
AG-Verdünnung 1:40												
–	0,121	0,099	0,073	0,060	0,050	0,046	0,041	0,036	0,035	0,032	0,026	0,022
+	0,806	0,628	0,403	0,261	0,175	0,122	0,089	0,062	0,053	0,048	0,037	0,032
AG-Verdünnung 1:80												
–	0,104	0,079	0,066	0,057	0,044	0,047	0,041	0,038	0,036	0,034	0,032	0,021
+	0,894	0,682	0,473	0,311	0,207	0,146	0,103	0,070	0,058	0,047	0,038	0,037
AG-Verdünnung 1:320												
–	0,110	0,08	0,073	0,055	0,040	0,044	0,041	0,039	0,034	0,031	0,032	0,021
+	0,877	0,667	0,466	0,320	0,215	0,155	0,102	0,060	0,054	0,041	0,034	0,035
AG-Verdünnung 1:640												
–	0,101	0,078	0,069	0,062	0,055	0,040	0,041	0,038	0,037	0,030	0,028	0,029
+	0,834	0,655	0,480	0,290	0,205	0,115	0,098	0,069	0,048	0,040	0,030	0,028
AG-Verdünnung 1:1280												
–	0,120	0,081	0,055	0,048	0,035	0,034	0,032	0,032	0,030	0,026	0,027	0,025
+	0,744	0,554	0,374	0,237	0,150	0,097	0,072	0,053	0,046	0,039	0,039	0,039
AG-Verdünnung 1:2560												
–	0,121	0,08	0,053	0,047	0,037	0,034	0,033	0,032	0,031	0,025	0,026	0,024
+	0,706	0,513	0,328	0,218	0,143	0,109	0,071	0,054	0,040	0,040	0,037	0,036

Dargestellt sind die Extinktionen aus den ELISA-Vorversuchen (3.5.2.2.2) zur Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung zur Beschichtung der Mikrotiterplatten. In die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde der in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünnte Kulturüberstand von *C. botulinum* D (2142) entsprechend den dargestellten AG-Verdünnungen (sh. auch Tab. 15) vorgelegt. Auf den beschichteten Platten erfolgte eine Serumtitration (Serumverdünnung 1:10 in Spalte 1 bis 1:20480 in Spalte 12) mit einem positiven (+) und einem negativen (–) Rinderserum.

Tab. 35. Ergebnisse der Antigenauswertung (Lyophilisat C) mit negativen und positiven Kaninchenseren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AG-Verdünnung 1:25												
-	0,097	0,092	0,068	0,058	0,052	0,040	0,039	0,035	0,034	0,032	0,030	0,027
+	0,398	0,391	0,394	0,388	0,373	0,342	0,290	0,214	0,140	0,083	0,036	0,038
AG-Verdünnung 1:50												
-	0,100	0,093	0,074	0,060	0,057	0,043	0,037	0,036	0,035	0,036	0,032	0,029
+	0,408	0,404	0,400	0,395	0,368	0,327	0,264	0,188	0,117	0,076	0,036	0,038
AG-Verdünnung 1:100												
-	0,096	0,095	0,090	0,064	0,050	0,046	0,039	0,043	0,034	0,035	0,029	0,025
+	0,429	0,434	0,426	0,423	0,418	0,400	0,302	0,213	0,112	0,060	0,037	0,034
AG-Verdünnung 1:200												
-	0,098	0,096	0,089	0,070	0,060	0,049	0,044	0,039	0,040	0,036	0,032	0,028
+	0,427	0,425	0,421	0,421	0,416	0,397	0,321	0,236	0,124	0,071	0,035	0,038
AG-Verdünnung 1:400												
-	0,101	0,104	0,095	0,078	0,069	0,054	0,050	0,042	0,039	0,035	0,032	0,026
+	0,388	0,384	0,382	0,375	0,350	0,326	0,286	0,203	0,135	0,069	0,046	0,032
AG-Verdünnung 1:1600												
-	0,089	0,086	0,085	0,075	0,064	0,053	0,046	0,040	0,036	0,035	0,032	0,027
+	0,340	0,335	0,327	0,317	0,310	0,276	0,240	0,162	0,089	0,071	0,040	0,037
AG-Verdünnung 1:3200												
-	0,087	0,082	0,084	0,072	0,061	0,050	0,044	0,034	0,035	0,034	0,029	0,025
+	0,295	0,284	0,268	0,243	0,207	0,186	0,145	0,122	0,084	0,058	0,037	0,037
AG-Verdünnung 1:6400												
-	0,089	0,083	0,081	0,067	0,055	0,047	0,042	0,036	0,032	0,036	0,03	0,027
+	0,280	0,260	0,240	0,218	0,180	0,143	0,108	0,080	0,060	0,053	0,040	0,032

Dargestellt sind die Extinktionen aus den ELISA-Vorversuchen (3.5.2.2.2) zur Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung zur Beschichtung der Mikrotiterplatten. In die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde das in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünnte *C. botulinum* Typ C-Lyophilisat entsprechend den dargestellten AG-Verdünnungen (sh. auch Tab. 15) vorgelegt. Auf den beschichteten Platten erfolgte eine Serumtitration (Serumverdünnung 1:10 in Spalte 1 bis 1:20480 in Spalte 12) mit einem positiven (+) und einem negativen (-) Kaninchenserum.

Tab. 36. Ergebnisse der Antigenauswertung (Lyophilisat C) mit negativen und positiven Rinderseren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AG-Verdünnung 1:25												
–	0,097	0,094	0,068	0,056	0,054	0,042	0,039	0,036	0,034	0,032	0,029	0,026
+	0,565	0,487	0,300	0,210	0,135	0,075	0,057	0,046	0,043	0,040	0,043	0,037
AG-Verdünnung 1:50												
–	0,100	0,093	0,074	0,060	0,057	0,043	0,037	0,033	0,035	0,036	0,032	0,029
+	0,580	0,507	0,308	0,197	0,131	0,083	0,062	0,044	0,045	0,041	0,041	0,037
AG-Verdünnung 1:100												
–	0,102	0,095	0,090	0,064	0,050	0,046	0,039	0,043	0,034	0,036	0,028	0,025
+	0,662	0,527	0,331	0,204	0,126	0,083	0,061	0,049	0,046	0,045	0,039	0,037
AG-Verdünnung 1:200												
–	0,090	0,106	0,084	0,069	0,059	0,043	0,044	0,035	0,036	0,038	0,027	0,028
+	0,628	0,498	0,306	0,215	0,122	0,078	0,062	0,049	0,047	0,043	0,038	0,035
AG-Verdünnung 1:400												
–	0,11	0,106	0,093	0,080	0,071	0,056	0,050	0,042	0,042	0,035	0,041	0,026
+	0,618	0,502	0,319	0,210	0,135	0,089	0,063	0,049	0,047	0,041	0,043	0,036
AG-Verdünnung 1:1600												
–	0,085	0,086	0,099	0,078	0,064	0,053	0,046	0,037	0,035	0,037	0,029	0,028
+	0,468	0,410	0,293	0,199	0,137	0,084	0,064	0,053	0,047	0,042	0,040	0,038
AG-Verdünnung 1:3200												
–	0,083	0,082	0,084	0,072	0,061	0,05	0,044	0,033	0,036	0,034	0,031	0,025
+	0,444	0,373	0,266	0,180	0,124	0,078	0,057	0,050	0,046	0,041	0,041	0,036
AG-Verdünnung 1:6400												
–	0,082	0,084	0,088	0,074	0,059	0,051	0,045	0,036	0,032	0,036	0,028	0,027
+	0,360	0,313	0,231	0,163	0,117	0,071	0,049	0,047	0,041	0,040	0,039	0,037

Dargestellt sind die Extinktionen aus den ELISA-Vorversuchen (3.5.2.2.2) zur Ermittlung der optimalen Antigenverdünnung zur Beschichtung der Mikrotiterplatten. In die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde das in Beschichtungspuffer (8.1.6) vorverdünnte *C. botulinum* Typ C-Lyophilisat entsprechend den dargestellten AG-Verdünnungen (sh. auch Tab. 15) vorgelegt. Auf den beschichteten Platten erfolgte eine Serumtitration (Serumverdünnung 1:10 in Spalte 1 bis 1:20480 in Spalte 12) mit einem positiven (+) und einem negativen (–) Rinderserum.

Tab. 37. AK-Nachweis (KBR) in Seren immunisierter Kaninchen

Tab. 38 Forts. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren gegenüber verschiedenen Clostridien-Stämmen/Antigenen (homolog = eingekästelt)

Antigene Antiseren	<i>C. botulinum</i>		<i>C.</i>				
	E 1032	F 1033	<i>butyricum</i> 1034	<i>baratii</i> 1084	<i>parabotul.</i> 1085	<i>tetani</i> 1089	<i>sordelli</i> 1272
Kan 1028 1	0	221	13	14	277	16	26
Kan 1028 10	11	22	–	–	–	–	–
Kan 1029 1	0	195	18	0	195	12	28
Kan 1029 10	13	30	–	–	–	–	–
Kan 1030 1	27	11	181	301	205	206	141
Kan 1030 10	0	0	–	–	–	–	–
Kan 2145 1	0	0	14	11	10	0	13
Kan 2145 10	0	0	–	–	–	–	–
Kan. 1 *) 1	0	0	0	0	0	23	14
Kan. 1 *) 10	0	0	–	–	–	–	–
Kan. 2 *) 1	0	0	0	0	0	0	0
Kan. 2 *) 10	0	0	–	–	–	–	–
Kan 2142 1	16	0	15	0	0	11	0
Kan 2142 10	16	0	–	–	–	–	–
Kan 2146 1	0	97	0	0	152	0	0
Kan 2146 10	0	0	–	–	–	–	–
Kan 1032 2	193	0	26	18	36	25	27
Kan 1032 10	12	0	–	–	–	–	–
Kan 1033 1	0	414	11	11	209	13	13
Kan 1033 10	0	23	–	–	–	–	–
Lelystad A	0	0	0	0	0	0	0
Pasteur A	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad B	0	0	0	0	0	0	0
Pasteur B	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad C1	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad C2	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad C	0	0	0	0	0	0	0
Onderst. C	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad D	0	0	0	0	0	0	0
Onderst. D	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad E	0	0	0	0	0	0	0
Lelystad F	0	23	0	0	38	0	0
Lelystad G	0	0	0	0	0	0	0

*) geimpft mit C/D-Botulinus-Vaccine

– nicht untersucht

Tab. 39. AK-Nachweis (ELISA) in Seren immunisierter Kaninchen

Tab. 40. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren gegenüber verschiedenen Clostridien-Stämmen/Antigenen (homolog = eingekästelt)

Antiseren	Antigene			<i>C. botulinum</i>				
	A (1028)	B (1029)	C (1030)	C (2145)	C Lyophil.	D (2142)	D (2146)	D Lyophil.
Kan 1028 1	1791	1997	101	0	0	10	3778	0
Kan 1028 10	2217	1454	157	0	0	zweifelh	2708	zweifelh
Kan 1029 1	5859	>20480	10	13	30	zweifelh	>20480	21
Kan 1029 10	1804	9058	0	0	zweifelh	0	6451	0
Kan 1030 1	44	49	14792	406	10760	1258	59	39
Kan 1030 10	zweifelh	zweifelh	2827	193	1474	316	zweifelh	zweifelh
Kan 2145 1	28	18	3697	2646	16821	38	65	93
Kan 2145 10	0	0	1776	1567	3508	22	11	32
Kan. 1 *) 1	0	zweifelh	90	15	328	0	0	164
Kan. 1 *) 10	0	14	49	zweifelh	56	0	zweifelh	61
Kan. 2 *) 1	0	0	181	58	483	0	0	124
Kan. 2 *) 10	0	0	16	0	26	0	0	17
Kan 2142 1	36	140	>20480	214	>20480	5800	53	113
Kan 2142 10	zweifelh	339	9058	17	>20480	1350	23	39
Kan 2146 1	46	18	24	0	13	0	>20480	0
Kan 2146 10	68	637	0	0	0	0	1921	0
Kan 1032 2	12	13	zweifelh	11	28	zweifelh	16	0
Kan 1032 10	zweifelh	0	0	0	15	0	0	0
Kan 1033 1	>20480	>20480	23	17	23	26	>20480	0
Kan 1033 10	1097	1673	0	0	12	11	1667	0
Lelystad A	14032	11347	814	170	327	141	15884	387
Pasteur A	1929	>20480	>20480	0	0	23	>20480	0
Lelystad B	11392	>20480	248	70	203	112	>20480	133
Pasteur B	1413	>20480	>20480	0	0	10	>20480	0
Lelystad C1	zweifelh	14	327	474	292	88	0	22
Lelystad C2	0	11	207	100	96	153	0	18
Lelystad C	158	293	>20480	6057	>20480	4658	291	4188
Onderst. C	0	1294	>20480	0	zweifelh	4561	1437	5385
Lelystad D	973	1257	6373	410	4378	1871	1201	932
Onderst. D	0	44	>20480	0	8063	60	18	2599
Lelystad E	649	600	674	240	594	223	952	433
Lelystad F	125	735	0	0	0	0	817	zweifelh
Lelystad G	850	1031	2058	376	598	313	1723	394

Tab. 40 Forts. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren gegenüber verschiedenen Clostridien-Stämmen/Antigenen (homolog = eingekästelt)

Antigene Antiseren	<i>C. botulinum</i>		<i>butyricum</i> 1034	<i>baratii</i> 1084	<i>C.</i>		
	E 1032	F 1033			<i>parabotul.</i> 1085	<i>tetani</i> 1089	<i>sordelli</i> 1272
Kan 1028 1	22	620	–	86	1731	534	76
Kan 1028 10	19	1320	–	477	1173	1493	107
Kan 1029 1	85	6234	1269	38	14220	9740	2098
Kan 1029 10	37	2274	1048	zweifelh.	3620	2714	830
Kan 1030 1	66	46	147	125	74	120	114
Kan 1030 10	29	0	111	13	0	14	772
Kan 2145 1	40	26	175	47	23	47	75
Kan 2145 10	28	0	101	12	0	16	25
Kan. 1 *) 1	zweifelh	0	47	54	0	0	0
Kan. 1 *) 10	zweifelh	0	35	40	0	0	0
Kan. 2 *) 1	zweifelh	0	15	12	0	0	0
Kan. 2 *) 10	0	0	19	12	0	0	0
Kan 2142 1	85	32	74	61	65	64	67
Kan 2142 10	68	14	51	22	zweifelh.	30	33
Kan 2146 1	13	259	17	zweifelh.	249	18	zweifelh.
Kan 2146 10	24	106	24	0	146	65	0
Kan 1032 2	6756	13	83	18	11	19	121
Kan 1032 10	578	0	18	zweifelh.	0	0	163
Kan 1033 1	26	0	16831	58	0	>20480	97
Kan 1033 10	zweifelh	5823	884	zweifelh.	2195	1151	31
Lelystad A	125	2351	1831	167	>20480	4878	1396
Pasteur A	>20480	6891	>20480	0	4655	>20480	13
Lelystad B	515	4921	6304	226	>20480	9123	1848
Pasteur B	>20480	1037	>20480	0	4793	>20480	0
Lelystad C1	527	65	10	0	0	zweifelh.	0
Lelystad C2	77	0	zweifelh.	0	0	zweifelh.	0
Lelystad C	631	77	312	132	627	457	224
Onderst. C	>20480	0	>20480	0	957	>20480	0
Lelystad D	>20480	298	876	284	1417	1664	3186
Onderst. D	>20480	0	>20480	0	0	>20480	13
Lelystad E	>20480	290	984	414	1508	735	4873
Lelystad F	0	3465	21	zweifelh.	541	774	0
Lelystad G	>20480	403	632	600	1033	753	1613

*) geimpft mit C/D-Botulinus-Vaccine

– nicht untersucht

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1.	Eigenschaften von Organismen mit der Fähigkeit BoNT zu bilden	15
Tab. 2.	Tödliche Dosis von <i>C. botulinum</i> -Toxinen (mod. nach GILL 1982)	16
Tab. 3.	Nachweis der verschiedenen Typen von <i>C. botulinum</i>	18
Tab. 4.	Bildung von Neurotoxin (Botulinumtoxin) durch <i>Clostridium spp.</i> (mod. nach BÖHNEL 1995).....	20
Tab. 5.	Molekulargewichte der Progenitortoxine von <i>C. botulinum</i> A-F	22
Tab. 6.	Verwendete Clostridienstämme	59
Tab. 7.	Fettsäure-Methylester des Eichstandards.....	62
Tab. 8.	Kommerzielle Antitoxine gegen verschiedene Typen von <i>C. botulinum</i>	70
Tab. 9.	Betriebsdaten verschiedener Rinderbestände.....	74
Tab. 10.	Übersicht über die bei der KBR und dem ELISA eingesetzten Antigene	75
Tab. 11.	Übersicht über die bei der KBR und dem ELISA eingesetzten kommerziellen Referenzseren	76
Tab. 12.	Übersicht über die bei der KBR und dem ELISA eingesetzten Antiseren hyperimmunisierter Kaninchen	77
Tab. 13.	Inaktivierungsbedingungen für Seren bei der KBR (mod. nach LENNETTE.....	80
Tab. 14.	Antigen-Verdünnungsstufen zur Ermittlung der Antigen-Gebrauchsverdünnungen	85
Tab. 15.	Verdünnungsstufen der unterschiedlichen Antigene im ELISA.....	100
Tab. 16.	Kolonie- und Zellmorphologie der untersuchten Clostridien-Stämme.....	106
Tab. 17.	Übereinstimmung der Fettsäuremuster der verschiedenen Clostridien-Stämme ..	112
Tab. 18.	Stoffwechselleistungen der untersuchten Clostridien-Stämme.....	114
Tab. 19.	Ergebnisse des Rapid ID 32 A	115
Tab. 20.	Medien, Pathogenität und Toxintypisierung.....	117
Tab. 21.	Quantitative Proteinbestimmung.....	118
Tab. 22.	Ergebnis der Antigen- und Komplementtitration am Beispiel des Kulturüberstandes von <i>C. botulinum</i> C (1030).....	123
Tab. 23.	Antigen- und Komplementverdünnungen für den Hauptversuch	124
Tab. 24.	Für den ELISA eingesetzte Antigen-Gebrauchsverdünnungen	140
Tab. 25.	Bestimmung der Cut-off- und der Schwellenwerte für den ELISA.....	141
Tab. 26.	AK-Titer (ELISA) in Rinderseren nach Vakzinierung mit Botulinus-Vaccine aus Onderstepoort	153
Tab. 27.	AK-Titer (ELISA) ungeimpfter Kälber.....	157
Tab. 28.	AK-Titer (ELISA) in Seren klinisch an Botulismus erkrankter Rinder.....	158
Tab. 29.	Intra-Assay-Variation.....	161
Tab. 30.	Inter-Assay-Variationen	162
Tab. 31.	Vergleich der Mikrotiterplatten mit positiven Kaninchenseren.....	XII
Tab. 32.	Vergleich der Mikrotiterplatten mit positiven Rinderseren	XIII
Tab. 33.	Ergebnisse der Antigenauswertung (2142) mit positiven und negativen Kaninchenseren	XIV
Tab. 34.	Ergebnisse der Antigenauswertung (2142) mit positiven und negativen Rinderseren.....	XVI
Tab. 35.	Ergebnisse der Antigenauswertung (Lyophilisat C) mit negativen und positiven Kaninchenseren	XVII
Tab. 36.	Ergebnisse der Antigenauswertung (Lyophilisat C) mit negativen und positiven Rinderseren.....	XVIII

Tab. 37. AK-Nachweis (KBR) in Seren immunisierter Kaninchen.....	XIX
Tab. 38. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren gegenüber verschiedenen Clostridien-Stämmen/Antigenen (homolog = eingekästelt).....	XX
Tab. 39. AK-Nachweis (ELISA) in Seren immunisierter Kaninchen.....	XXII
Tab. 40. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren gegenüber verschiedenen Clostridien-Stämmen/Antigenen (homolog = eingekästelt).....	XXIII

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1. Schematische Struktur von <i>C. botulinum</i> Progenitor-Toxinen (OGUMA et al. 1995)	23
Abb. 2. Struktur und Aktivierungsmechanismus von Botulinum-Neurotoxinen (mod. nach SCHIAVO u. MONTECUCCO 1997)	25
Abb. 3. Ziel-Proteine von BoNT (OGUMA et al. 1995).	25
Abb. 4. Grundzüge der Epizootiologie des Botulismus bei Tieren (mod. nach BÖHNEL 1995)	28
Abb. 5. Ambozeptor-Titration	83
Abb. 6. Arbeitsschema für Antigen-Vorversuch	86
Abb. 7. Indirekter Sandwich-ELISA.....	95
Abb. 8. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> A (1028).....	108
Abb. 9. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> B (1029).....	108
Abb. 10. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> C (1030).....	109
Abb. 11. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> C (2145).....	109
Abb. 12. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> D (2142).....	110
Abb. 13. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> D (2146).....	110
Abb. 14. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> E (1032).....	111
Abb. 15. Fettsäuremuster <i>C. botulinum</i> F (1033)	111
Abb. 16. SDS-PAGE Protein-Profile von <i>C. botulinum</i> A, B, E und F sowie <i>C. spp.</i> nach Silberfärbung	121
Abb. 17. SDS-PAGE Protein-Profile von <i>C. botulinum</i> C und D sowie der C/D-Botulinus-Vaccine nach Silberfärbung.....	121
Abb. 18 a. AK-Titerverlauf (KBR) nach Immunisierung mit eigenen <i>C. botulinum</i> A-, B- und F-Toxoiden	128
Abb. 19 a. Kreuzreaktionen (KBR) verschiedener Antiseren mit <i>C. botulinum</i> A, B, E und F	134
Abb. 20 a. AK-Titerverlauf (ELISA) nach Immunisierung mit <i>C. botulinum</i> A-, B-, E- und F-Toxoiden.....	143
Abb. 21 a. Kreuzreaktionen (ELISA) verschiedener Antiseren mit <i>C. botulinum</i> A, B, E und F	148
Abb. 22. Vergleichende Darstellung der AK-Titer bezogen auf <i>C. botulinum</i> C (1030)	159
Abb. 23. Vergleichende Darstellung der AK-Titer bezogen auf <i>C. botulinum</i> C (Lyophilisat)	159
Abb. 24. Vergleichende Darstellung der AK-Titer bezogen auf <i>C. botulinum</i> D (2142)....	160

Abb. 25. Vergleichende Darstellung der AK-Titer bezogen auf *C. botulinum* D
(Lyophilisat) 160

7 Literaturverzeichnis

AALVIK, B., G. SAKAGUCHI u. H. RIEMANN (1973):

Detection of type E botulinal toxin in cultures by Fluorescent-Antibody Microscopy.
Appl. Microbiol. 25, 153-154

ABBITT, B., M.J. MURPHY, A.C. RAY, J.C. REAGOR, A.K. EUGSTER, L.G. GAYLE,
H.W. WHITFORD, R.J. SUTHERLAND, R.A. FISKE u. J. PUSOK (1984):

Catastrophic death losses in a dairy herd attributed to type D botulism.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 798-801

ADAMI, M. (1984):

Untersuchungen zum Nachweis von *Clostridium botulinum* - Antitoxin in Kolostrum,
Milch und Serum immunisierter Ziegen.
Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachber. Veterinärmedizin, Diss.

AKTORIES, K., U. WELLER u. G.S. CHHATWAL (1987):

Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from
botulinum C2 toxin.
FEBS Letters 212, 109-113

ALLEN, S.S., J.A. SIDERS u. L.M. MARLER (1995):

Current issues and problems in dealing with anaerobes in the clinical laboratory.
Clinics in Laboratory Medicine, 15, Saunders, 333-364

ALMEIDA, A.C., V.L.ABREU u. F.C. LOBATO (1997):

Sensibilidade e especificidade do teste de microfixação de complemento com
aquecimento em relação à soroneutralização em comundongos para diagnóstico do
botulismo bovino.
Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 49, 151-157

ALTMANN, J. (1998):

An exceptional serious case of botulism in the Wesermarsch, Northwest Germany in
summer 1996.
Poster auf der European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on
Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of
Clostridiosis.
Teistungen, 4.-7.10 1998

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG
(1988):

Untersuchung von Lebensmitteln. Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum
Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Übernahme der gleichlautenden DIN 10102).

Bundesgesundheitsamt, Berlin

ANTONIADIS, G. (1971):

Beschreibung einer Mikromethode zur Durchführung der Komplementbindungsreaktion für die Virusserologie.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 216, 544-561

APPELBAUM, P.C., C.S. KAUFMANN, J.C. KEIFER u. H.J. VENBRUX (1983):

Comparison of three methods for anaerobe identification.

J. clin. Microbiol. 18, 614-621

APPLETON, G.S. u. P.G. WHITE (1959):

Laboratory evaluation of a trivalent toxoid for botulism.

Am. J. Vet. Res. 1, 170-172

APPLEYARD, W.T. u. A. MOLLISON (1985):

Suspected bovine botulism associated with broiler litter waste.

Vet. Rec. 116, 522

ARNON, S.S. (1997):

Human tetanus and human botulism

in: ROOD, J.I., B.A. MCCLANE, J.G. SONGER u. R.W. TITBALL (Eds.): The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis.

Academic Press, San Diego S. 95-115

ARNON, S.S. (1992):

Infant botulism

in: REIGEN, R.D. u. J.D. CHERRY (Eds.): Textbook of pediatric infectious diseases.

3. Aufl. Verlag Saunders, Philadelphia

ARNON, S.S., K. DAMUS u. J. CHIN (1981):

Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome.

Epidem.Rev. 3, 45-66

ARNON, S.S., T.F. MIDURA, K. DAMUS, B. THOMPSON, R.M. WOOD u. J. CHIN (1979):

Honey and other environmental risk factors for infant botulism.

J. Pediatr. 94, 331-336

ASHTON, A.C., J.S. CROWTHER u. J.O. DOLLY (1985):

A sensitive and useful radioimmunoassay for neurotoxin and its haemagglutinin complex from *Clostridium botulinum*.

Toxicon 23, 235-246

AURELI, P., L. FENICIA, B. PASOLINI, M. GIANFRANCESCHI, L.M. MCCROSKEY u. C.L. HATHEWAY (1986):

Two cases of Type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy.

J. Inf. Dis. 154, 207-211

BARSANTI, J.A., M. WALSER, C.L. HATHEWAY, J.M. BOWEN u. W. CROWELL (1978):

Type C botulism in American foxhounds.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 172, 809-813

BÄTZA, H.-J. (1982):

Untersuchungen zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Antitoxin und Toxin mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachber. Veterinärmedizin, Diss.

BÄTZA, H.-J. (1983):

Nachweis von *Clostridium Botulinum* Toxinen im ELISA

15. Kongreßbericht.

Verlag Parey, Berlin, Hamburg

Fortschritte der Veterinärmedizin 37, 110-114

BEHRENS, S. (1996):

Botulismus, eine "emerging disease"

in: SEIFERT, H.S.H., P.L. VLEK u. H.-J. WEIDELT (Hrsg.):Göttinger Beiträge zur Land- und Forstwirtschaft in den Tropen und Subtropen, Bd. 107

25 Jahre Forschungstätigkeit des Instituts für Tropentierhygiene und Vorstellung der Zwischenergebnisse des BMBF-Forschungsvorhaben „Ersatz von Tierversuchen bei der Wirksamkeitsprüfung von Clostridienimmunpräparaten“. Symposium 13.10.1995, Göttingen.

Verlag Goltze, Göttingen S. 66-76

BEHRENS, S. u. H. BÖHNEL (1995):

Botulismus, eine Krankheit von Mensch und Tier mit unterschätzter Bedeutung.

Poster Tropentag 14.-15.12.1995, Göttingen.

BEHRENS, S., U. SUKOP, K.-S. SATERNUS u. H. BÖHNEL (1998):

SID und Botulismus. Läßt sich ein Zusammenhang nachweisen?

Res. Leg. Med. 18; 121-126

BEIERS, P.R. u. G.C. SIMMONS (1967):

Botulism in pigs.
Aust. vet. J. 43, 270-271

BENECKE, R. u. K.R. KESSLER (1995):

Botulinumtoxin A.
Akt. Neurol. 5, 209-213

BENGTSON, I. (1922):

Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*.
Publ. Hlth. Rep. 37, 164-170

BENNETTS, H.W. u. H.T. HALL (1938):

Botulism of sheep and cattle in Western Australia: its cause and its prevention by immunization.
Aust. vet. J. 14, 105-118

BERNARD, W., T.J. DIVERS, R.H. WHITLOCK, J. MESSICK u. E. TULLENERS (1987):

Botulism as a sequel to open castration in a horse.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 191, 73-74

BETLEY, M.J. u. H. SUGIYAMA (1979):

Noncorrelation between mouse toxicity and serologically assayed toxin in *Clostridium botulinum* type A culture fluids.
Appl. Env. Microbiol. 38, 297-300

BINZ, T., H. KURAZONO, M. POPOFF, M. EKLUND, G. SAKAGUCHI, S. KOZAKI, K. KRIEGLSTEIN, A. HENSCHEN, D. GILL u. H. NIEMANN (1990 a):

Nucleotide sequence of the gene encoding for *Clostridium botulinum* neurotoxin type D.
Nucleic Acids Res. 18, 5556

BINZ, T., H. KURAZONO, M. WILLE, J. FREVERT, K. WERNARS u. H. NIEMANN (1990 b):

The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins.
J. biol. Chem. 265, 9153-9158

BIO MÉRIEUX SA, Marcy-l'Etoile (1989):

ATB 32 A-Analytischer Profilindex.
Bio Mérieux SA, Marcy-l'Etoile

BLACK, J.D. u. J.O. DOLLY (1986 a):

Interaction of 125 I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I.

Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for type A and B on motor nerves.

J. Cell Biol. 103, 521-532

BLACK, J.D. u. J.O. DOLLY (1986 b):

Interaction of 125 I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis.

J. Cell Biol. 103, 535-544

BLAKEMORE, W.F., E.T. REES-EVANS u. P.E.G. WHEELER (1977):

Botulism in foxhounds.

Vet. Rec. 1, 57-58

BLOOD, D.C. u. O.M. RADOSTITS (1989):

Diseases caused by bacteria. Kap. 17: Botulism
in: BLOOD, D.C. u. O.M. RADOSTITS (Eds.): Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 7. Aufl.

Bailliere Tindall London, Philadelphia S. 600-603

BÖHNEL, H. (1995):

Botulismus.

in: BLOBEL, H. u. T. SCHLIEßER (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II, Teil 4: Clostridiosen. 2. Aufl.

Verlag Fischer, Jena S. 89-153

BÖHNEL, H. (1999):

Botulismus-eine vergessene Erkrankung?

Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 112, 139-145

BÖHNEL, H., S. BEHRENS, P. LOCH, K. LUBE, K.-S. SATERNUS u. F. GESSLER (1999):

Infant Botulism and Sudden Infant Death. Bacteriological diagnosis in the years 1995-1998

(im Druck).

BÖHNEL, H., F. GESSLER u. S. BEHRENS (1996):

Botulismus - Schwierigkeiten bei der Diagnose

Tagung der Fachgruppe Bakteriologie vom 12.-14.6.1996 auf Schloß Rauschholzhausen.

Herausgegeben von der DVG S. 380-399

BOM, I.J., J.P.P.M. SMELT, K. KERSTERS u. C.T. VERRIPS (1986):

Identification and grouping of *Clostridium botulinum* strains by numerical analysis of

their electrophoretic protein patterns.

J. Appl. Bacteriol. 60, 483-490

BONGERS, J.H., C.P. DAMEN, N.W. GRIMME u. L.A. TINNEMANS (1988):

Sterfte bij runderen ten gevolge van *Clostridium botulinum* type D veroorzaakt door het gebruik van kuikenmest als ligboxenstrooisel.

Tijdschr. Diergeneesk. 113, 691-692

BOROFF, D.A. u. U. FLECK (1966):

Statistical analysis of a rapid in vivo method for the titration of the toxin of *Clostridium botulinum*.

J. Bacteriol. 92, 1580-1581

BOROFF, D.A. u. G. SHU-CHEN (1973):

Radioimmunoassay for type A toxin of *Clostridium botulinum*.

Appl. Microbiol. 25, 545-549

BOROFF, D., R. TOWNSEND, U. FLECK u. B. DASGUPTA (1966):

Ultracentrifugal analysis of the crystalline toxin and isolated fractions of *Clostridium botulinum* type A.

J. biol. Chem. 241, 5165-5167

BOTIJA, C.S. (1954):

Le botulisme de équides en Espagne.

Bull. Off. Int. Epizoot. 42, 759-764

BOWMER, E.J. (1963):

Preparation and assay of the international standards for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E Antitoxins.

Bull. Org. mond. Sant./ Bull. Wld. Hlth. Org. 29, 701-709

BRENTROP, H. (1996):

Von Bakterien vergiftet.

Landw. Wblatt 16, 31-32

CARDELLA, M.A., J.T. DUFF, C.G. GOTTFRIED u. J.S. BEGEL (1958):

Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*; IV. Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid.

J. Bacteriol. 75, 360-365

CARDELLA, M.A., J.T. DUFF, B.H. WINGFIELD u. C. GOTTFRIED (1960):

Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*; VI. Purification and

detoxification of type D toxin and the immunological response to toxoid.
J. Bacteriol. 79, 372-378

CATO, E., W. GEORGE u. S. FINEGOLD (1986):

Section 13, Genus *Clostridium*

in: SNEATH, P., N. MAIR, M. SHARPE u. J. HOLT (Eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, 9. Aufl.

Williams & Wilkins, Baltimore S.1141-1200

CLAYTON, M.A., J.M. CLAYTON, D.R. BROWN u. J.L. MIDDLEBROOK (1995):

Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 63, 2738-2742

COOKE, A. (1993):

Kap. 9.1, Regulation of the immune response

in: ROITT, I., J. BROSTOFF, u. D. MALE (Eds.): Immunology. 3. Auflage.

Verlag Mosby, London

CRITCHLEY, E.M. (1991):

A comparison of human and animal botulism: a review.

J. Roy. Soc. Med. 84, 295-298

DASGUPTA, B.R. u. J. FOLEY JR. (1989):

C. botulinum neurotoxins types A and E: isolated light chain breaks down into two fragments. Comparison of their amino acid sequences with tetanus neurotoxin.

Biochimie 71, 1193-1200

DASGUPTA, B.R. u. S. RASMUSSEN (1983):

Amino acid composition of *Clostridium botulinum* type F neurotoxin.

Toxicon 21, 566-569

DASGUPTA, B.R. u. M.A. WOODY (1984):

Amino acid composition of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin.

Toxicon 22, 312-315

DEUTSCHES ARZNEIBUCH 1998 (1998):

Amtliche Ausgabe, Fortsetzungswerk.

Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart

DEZFULIAN, M. u. J.G. BARTLETT (1984):

Detection of *Clostridium botulinum* type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunologically tolerant animals.

J. clin. Microbiol. 19, 645-648

DEZFULIAN, M., R.A. BITAR u. J.G. BARTLETT (1987):

Kinetics study of immunological response to *Clostridium botulinum* toxin.

J. clin. Microbiol. 25, 1336-1337

DEZFULIAN, M., C.L. HATHEWAY, R.H. YOLKEN u. J.G. BARTLETT (1985):

Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* type A and type B toxins in stool samples of infants with botulism.

J. clin. Microbiol. 20, 379-383

DIN 10102 (1988):

Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum Toxin.

Verlag Beuth, Berlin

DIN 58969 (1989):

Teil 10. Medizinische Mikrobiologie. Serodiagnostik von Infektionskrankheiten; Komplementbindungsreaktion (KBR). S. 319-327

Verlag Beuth, Berlin

DINTER, Z. u. K.-E. KULL (1954):

Über einen Ausbruch des Botulismus bei Fasanenküken.

Nord. vet. Med. 6, 866-872

DINTER, Z. u. K.-E. KULL (1955 a):

Einiges über den Botulismus beim Nerz.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 62, 53-55

DINTER, Z. u. K.-E. KULL (1955 b):

Über die Empfänglichkeit des Nerzes für die Botulinus-Toxine A und C.

Nord. vet. Med. 7, 549-563

DIVERS, T.J., R.C. BARTHOLOMEW, J.B. MESSICK, R.H. WHITLOCK u. R.W. SWEENEY (1986):

Clostridium botulinum type B toxicosis in a herd of cattle and a group of mules.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 188, 382-386

DODDS, K.L. (1994):

Clostridium botulinum

in: HUI, Y.H. (Ed.): Foodborne disease Handbook Vol. 1: Diseases caused by bacteria.

Verlag Dekker, New York S. 97-131

- DOELLGAST, G.J., G.A. BEARD, J.D. BOTTOMS, T. CHENG, B.H. ROH, M.G. ROMAN, P.A. HALL u. M.X. TRISCOTT (1994 a):
Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked coagulation assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E and solution phase complexes with dual-label antibodies.
J. clin. Microbiol. 32, 105-111
- DOELLGAST, G.J., M.X. TRISCOTT, G.A. BEARD u. J.D. BOTTOMS (1994 b):
Enzyme-linked immunosorbent assay-enzyme-linked coagulation assay for detection of antibodies to *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes.
J. clin. Microbiol. 32, 851-853
- DOELLGAST, G.J., M.X. TRISCOTT, G.A. BEARD, J.D. BOTTOMS, T. CHENG, B.H. ROH, M.G. ROMAN, P.A. HALL u. J.E. BROWN (1993):
Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay.
J. clin. Microbiol. 31, 2402-2409
- DOLMAN, C. u. L. MURAKAMI (1961):
Clostridium botulinum type F with recent observations on other types.
J. Inf. Dis. 109, 107-128
- DOWELL, V.R. (1984):
Botulism and Tetanus: Selected epidemiologic and microbiologic aspects.
Rev. Inf. Dis. 6, Supplement 1, 202-207
- DUFF, J.T., J. KLERER, R.H. BIBLER, D.E. MOORE, C. GOTTFRIED u. G.G. WRIGHT (1957):
Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*; II. Production and purification of type B toxin for toxoid.
J. Bacteriol. 73, 597-601
- DUTRA, I., H.-E. WEISS, H. WEISS u. J. DÖBEREINER (1993):
Diagnóstico do botulismo em bovinos no brasil pela técnica de microfixação de complemento.
Pesq. Vet. Bras. 13, 83-86
- EGYED, M.N., A. SHLOSBERG, U. KLOPFER, T.A. NOBEL u. U.E. MAYER (1978):
Mass outbreaks of botulism in ruminants associated with ingestion of feed containing poultry waste. 1. Clinical and laboratory investigations.
Refu. Vet. 35, 93-99

- EKLUND, M., F. POYSKY, S. REED u. C. SMITH (1971):
Bacteriophages and toxigenicity of *Clostridium botulinum* Type C.
Science (Washington D.C.) 172, 480-482
- EKLUND, M.F. POYSKY, L. MSEITIF u. M. STROM (1988):
Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G.
Appl. Env. Microbiol. 54, 1405-1408
- EKLUND, M., F. POYSKY u. W. HABIG (1989):
Bacteriophages and Plasmids in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* and their relationship to production of toxins
in: SIMPSON, L.L. (Ed.): Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin.
Academic Press, San Diego, New York S. 25-51
- EKONG, T., K. MCLELLAN u. D. SESARDIC (1995):
Immunological detection of *Clostridium botulinum* toxin type A in therapeutic preparations.
J. Imm. Meth. 180, 181-191
- EKONG, T., C.C. SHONE u. D. SESARDIC (1994):
Sensitive enzyme-based immunoassay for detection of *Clostridium botulinum* toxin type A.
In Vitro Toxicol. 7, 186
- ELLIS, T.M. (1989):
Botulism in pastoral cattle.
Final Report for the Cattle Industry Compensation Act-Research Advisory Committee;
Dept. of Agriculture Western Australia, Perth
- ELLIS, C.E., M. HAMMANN, R. DE BRUIN u. H. HARRIS (1998):
In vitro evaluation methods for *Clostridium botulinum* type C and D vaccines.
Poster auf der European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis.
Teistungen, 4.-7.10 1998
- ELLIS, C.E., M. HAMMANN, H. HARRIS u. R. DE BRUIN (1999):
In vitro evaluation methods for *Clostridium botulinum* type C and D vaccines
in: VAN ALPHEN, A.J., H. BÖHNEL, u. F. GESSLER (Eds.): Clostridia and clostridiosis.
FEMS Immunol. Med. Microbiol 24, 369-372
Elsevier Science, Amsterdam, Lausanne
- ELSTON, J.S. (1988):

Botulinum toxin treatment of blepharospasm.
Adv. Neurol. 50, 579-581

ENGVALL, E. u. P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874

EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH (1997):

Amtliche deutsche Ausgabe, 3. Ausg.
Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart

FACH, P., M. GIBERT, R. GRIFFAIS, J.P. GUILLOU u. M.R. POPOFF (1995):

PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium spp.* and evaluation in food samples.
Appl. Env. Microbiol. 61, 389-392.

FENICIA, L., A.M. FERRINI, P. AURELI u. M. POCECCO (1993):

A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy.
Eur. J. Epidemiol. 9, 671-673

FERRARI, N.D. u. M.E. WEISSE (1995):

Botulism.
Adv. Pediatric. Inf. Dis. 10, 81-91

FIOCK, M.A., L.F. DEVINE, N.F. GEARINGER, J.T. DUFF, G.G. WRIGHT u. P.J. KADULL (1962):

Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. VIII: Immunological response of man to purified bivalent AB botulinum toxoid.
J. Immunol. 88, 277-283

FRANCIOSA, G., J.L. FERREIRA u. C.L. HATHEWAY (1994):

Detection of type A,B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium species* by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms.
J. clin. Microbiol. 32, 1911-1917

FRANKE, F. (1974):

Untersuchungen zum Nachweis von *Clostridium-botulinum*-Toxinen mit Hilfe der passiven Hämagglutination.
Zentralbl. Veterinärmed. B. 21, 660-676

GHANEM, F.M., A.C. RIDPATH, W.E.C. MOORE u. L.V.H. MOORE (1991):

Identification of *Clostridium botulinum*, *Clostridium argentinense*, and related organisms by cellular fatty acid analysis.

J. clin. Microbiol. 29, 1114-1124

GIBSON, A.M., N.K. MODI, T.A. ROBERTS, P. HAMBLETON u. J. MELLING (1987):
Evaluation of a monoclonal antibody-based immunoassay for detecting type B
Clostridium botulinum toxin produced in pure cultura and an inoculated model cured
meat system.
J. Appl. Bacteriol. 64, 285-291

GIERCKE-SYGUSCH, S. (1987):
Untersuchungen zur Erstellung eines Atlas anaerober Bakterien
in: ACHTNICHT, W. u. H. LAMPRECHT (Hrsg.): Göttinger Beiträge zur Land- und
Forstwirtschaft in den Tropen und Subtropen.
Göttingen, Georg-August-Universität, Inst. für Pflanzenbau und Tierhygiene in den
Tropen und Subtropen, Fachber. Agrarwissenschaften, Diss.
Verlag Margraf, Gaimersheim

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

GIMÉNEZ, D.F. (1984):
Clostridium botulinum subtype Ba.
Zentralbl. Bakteriologie. Abt. 1. 257, 68-72

GIMÉNEZ, D.F. u. A. CICCARELLI (1970 a):
Another type of *Clostridium botulinum*.
Zentralbl. Bakteriologie. Abt. 1. 215, 215

GIMÉNEZ, D.F. u. A. CICCARELLI (1970 b):
Studies on strain 84 of *Clostridium botulinum*.
Zentralbl. Bakteriologie. Abt. 1. 215, 212-220

GIMÉNEZ, D.F. u. J. GIMÉNEZ (1993):
Serological subtypes of botulinum neurotoxins
in: DASGUPTA, B.R. (Ed.): Botulinum and Tetanus Neurotoxins.
Plenum Press, New York, London S.421-432

GIMÉNEZ, J.A. u. H. SUGIYAMA (1988):
Comparison of toxins of *Clostridium butyricum* and *Clostridium botulinum* type E.

Infect. Immun. 56, 926-929

GOODNOUGH, M.C., B. HAMMER, H. SUGIYAMA u. E.A. JOHNSON (1993):

Colony immunoblot assay of botulinum toxin.

Appl. Env. Microbiol. 59, 2339-2342

GORDON, L.K. (1981):

A reliable method for repetitively bleeding rabbits from the central artery of the ear.

J. Imm. Meth. 44, 241-245

GREEN, P., S. FAHN u. B. DIAMOND (1994):

Development of resistance to botulinum toxin A in patients with torticollis.

Movement Disorders 9, 213-217

GREGORY, A.R., T.M. ELLIS, T.F. JUBB, R.J. NICKELS u. D.V. COUSINS (1996):

Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle.

Aust. vet. J. 73, 55-61

GRIFFIN, P.M., C.L. HATHEWAY, R.B. ROSENBAUM u. R. SOKOLOW (1997):

Endogenous antibody production to botulinum toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Crohn's Disease.

J. Inf. Dis. 175, 633-637

GUNNISON, J., J. CUMMINGS, u. K. MEYER (1936):

Clostridium botulinum type E.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 35, 278-280

GUTTERIDGE, C.S., MACKEY, B.M. u. J.R. NORRIS (1980):

A pyrolysis gas-liquid chromatography study of *Clostridium botulinum* and related organisms.

Appl. Env. Microbiol. 49, 165-173

HAAGSMA, J. (1987):

Laboratory investigation of botulism in wild birds

in: EKLUND, M.W. and V.R. DOWELL (Eds.): Avian botulism. An international perspective.

Verlag Thomas, Springfield S. 283-293

HAAGSMA, J. (1991):

Botulismus bij runderen, een overzicht.

Tijdschr. Diergeneesk. 116, 663-669

HABERMANN, E. u. S. BERNÁTH (1975):

Two solid-phase Radioimmunoassays for the quantitative determination of *Clostridium botulinum* type-A antibodies.

Acta Vet. Acad. Scient. Hung. 25, 377-382

HALL, J.D., L.M. MCCROSKEY, B.J. PINCOMB u. C.L. HATHEWAY (1985):

Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism.

J. clin. Microbiol. 21, 654-655

HALLIS, B., B.A. JAMES u. C.C. SHONE (1996):

Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities.

J. clin. Microbiol. 34, 1934-1938

HAMBLETON, P., H.E. COHEN, B.J. PALMER u. J. MELLING (1992):

Antitoxins and botulinum toxin treatment.

Br. med. J. 304, 959-960

HARTIGAN, P.J. (1985):

Botulism in horses.

Irish Vet. J. 39, 194-197

HATHEWAY, C.L. (1989):

Bacterial sources of Clostridial Neurotoxins

in: SIMPSON, L.L. (Ed.): Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin.

Academic Press, San Diego, New York S. 3-24

HATHEWAY, C.L. (1993):

Clostridium botulinum and other *Clostridia* that produce botulinum neurotoxin.

Food Sci. Tech. 25, 3-20

HATHEWAY, C.L. (1995):

Botulism: the present status of the disease.

Current Topics in Microbiology and Immunology 195, 55-75

HATHEWAY, C.L. u. C. DANG (1994):

Immunogenicity of the neurotoxins of *Clostridium botulinum*

in: JANCOVIC, J. u. M. HALLET (Eds.): Neurological disease and therapy. 25. Aufl.

Marcel Dekker, New York S. 93-107

HAUSCHILD, A.H.W. (1990):

Clostridium botulinum toxins.

Int. J. Food. Microbiol. 10, 113-124

HAUSER, D., M. EKLUND, H. KURAZONO, T. BINZ, H. NIEMANN, D. GILL, P. BOQUET u. M. POPOFF (1990):

Nucleotide sequence of *Clostridium botulinum* C1 neurotoxin.
Nucleic Acids Res. 18, 4924

HEIMSCH, R.C., L.A. CHAMPION u. H. SUGIYAMA (1970):

Botulinal Toxin and Toxoid as Antigens.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 151-154

HEITEFUß, S. (1991):

Untersuchungen zur Identifizierung von aeroben, anaerobem und fakultativ anaeroben Bakterien mit gaschromatographischen Methoden

in: SEIFERT, H.S.H, P.L. VLEK u. H.-J. WEIDELT (Hrsg.): Göttinger Beiträge zur Land- und Forstwirtschaft in den Tropen und Subtropen.

Göttingen, Georg-August-Universität, Inst. für Pflanzenbau und Tierhygiene in den Tropen und Subtropen, Fachber. Agrarwissenschaften, Diss.
Verlag Goltze, Göttingen

HENDERSON, I., T. DAVIS, M. ELMORE u. N.P. MINTON (1997):

The genetic basis of toxin production in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*
in: ROOD, J.I., B.A. MCCLANE, J. G. SONGER u. R.W. TITBALL (Eds.): The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis.
Academic Press, San Diego S. 261-294

HERBST, W., M. ADAMI u. T. SCHLIESSER (1987):

Zur aktiven Immunisierung von Geflügel gegen Botulismus.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 100, 268-269

HOGG, R.A., V.J. WHITE u. G.R. SMITH (1990):

Suspected botulism in cattle associated with poultry litter.
Vet. Rec. 126, 476-479

HOLTZMANN, M. (1994):

Die Punktion der *Vena saphena lateralis* zur Blutentnahme und intravenösen Injektion bei Kaninchen.

Kleintierpraxis 39, 37-40

HUHTANAN, C.N., R.C. WHITING, A.J. MILLER u. J.E. CALL (1992):

Qualitative correlation of the mouse neurotoxin and enzyme-linked immunoassay for determining *Clostridium botulinum* types A und B toxins.

J. Food Safety 12, 119-127

HUTSON, R., M. COLLINS, A. EAST u. D. THOMPSON (1994):

Nucleotide sequence of the gene coding for non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B neurotoxin: comparison with other clostridial neurotoxins.

Curr. Microbiol. 28, 101-110

HUTSON, R., Y. ZHOU, M. COLLINS, E. JOHNSON, C. HATHEWAY u. H. SUGIYAMA (1996):

Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequences.

J. biol. Chem. 271, 10786-10792

INOUE, K. u. H. IIDA (1968):

Bacteriophages of *Clostridium botulinum*.

J. Virol. 2, 537-540

INUKAI, Y. u. H. RIEMANN (1968):

Detection of intracellular botulinum A toxin by fluorescent antibody technique.

Jap. J. vet. Res. 16, 39-43

IWASAKI, M. u. G. SAKAGUCHI (1978):

Acid precipitation of *Clostridium botulinum* type C and D toxins from whole culture by addition of ribonucleic acid as a precipitation aid.

Infect. Immun. 19, 749-751

JANKOVIC, J. u. K. SCHWARTZ (1995):

Response and immunoresistance to botulinum toxin injections.

Neurology 45, 1743-1746

JANSEN, B.C. (1971):

The toxic antigenetic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D.

Onderstepoort J. Vet. Res. 38, 93-98

JANSEN, B.C., P.C. KNOETZE u. F. VISSER (1976):

The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids.

Onderstepoort J. Vet. Res. 43, 165-174

JARK, U. (1996):

Etablierung eines ELISA zur Erkennung subklinischer Paratuberkulose-Infektionen beim Rind.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Inst. f. Mikrobiologie und Tierseuchen, Diss.

JENSEN, W.I. u. R.M. DUNCAN (1980):

The susceptibility of the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) to *Clostridium botulinum* type C2 toxin.

Jap. J. med. Sci. Biol. 33, 81-86

JOHNSON, E.A. (1997):

Extrachromosomal virulence determinants in the *Clostridia*

In: ROOD, J.I., B.A. MCCLANE, J. G. SONGER u. R.W. TITBALL (Eds.): The *Clostridia*: Molecular Biology and Pathogenesis.

Academic Press, San Diego S. 35-48

JOHNSON, H.M., B.G. SMITH, H.E. HALL u. K.H. LEWIS (1967):

Serological specificity of types A and B botulinic toxins and antitoxins.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 856-861

JUBB, T.F., T.M. ELLIS u. A.R. GREGORY (1993):

Diagnosis of botulism in cattle using ELISA to detect antibody to botulinic toxins.

Aust. vet. J. 70, 226-227

KAMATA, Y., S. KOZAKI, T. NAGAI, J. OGASAWARA u. G. SAKAGUCHI (1986):

Evaluation of ELISA techniques for titration of monoclonal antibodies against botulinic toxin.

Jap. J. vet. Sci. 48, 909-914

KEHLER, W. u. H. SCHOLZ (1996):

Botulismus des Rindes.

Übersichten zur Tierernährung 24, 83-91

KELLY, A.P., R.T. JONES, J.C. GILLICK u. L.D. SIMS (1984):

Outbreak of botulism in horses.

Equine vet. J. 16, 519-521

KEMENY, D.M. (1994):

ELISA - Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor.

Verlag Fischer, Stuttgart, Jena

KINDE, H., R.L. BETTEY, A. ARDANS, F.D. GALEY, B.M. DAFT, R.L. WALKER, M.W. EKLUND u. J.W. BYRD (1991):

Clostridium botulinum type-C intoxication associated with consumption of processed

alfalfa hay cubes in horses.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 742-746

KITAMURA, M. S. SAKAGUCHI u. G. SAKAGUCHI (1968):

Purification and some properties of *Clostridium botulinum* type E toxin.

Biochim. biophys. Acta 168, 207-217

KOZAKI, S., J. DUFRENNE, A.M. HAGENAARS u. S. NOTERMANS (1979):

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Clostridium botulinum* type B toxin.

Jap. J. med. Sci. Biol. 32, 199-205

KOZAKI, S., Y. KAMATA, M. TAKAHASHI, T. SHIMIZU u. G. SAKAGUCHI (1989 a):

Antibodies against Botulinum Neurotoxin

in: SIMPSON, L.L. (Ed.): Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin.

Academic Press, San Diego, New York S. 302-318

KOZAKI, S., A. MIKI, Y. KAMATA, J. OGASAWARA u. G. SAKAGUCHI (1989 b):

Immunological characterization of papain-induced fragments of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synaptosomes.

Infect. Immun. 57, 2634-2639

KOZAKI, S., S. SAKAGUCHI u. G. SAKAGUCHI (1974):

Purification and some properties of progenitor toxins of *Clostridium botulinum* type B.

Infect. Immun. 10, 750-756

KRIEK, N.P.J. u. M.W. ODENDAAL (1994):

Botulism

in: COETZER, J.A.W., G.R. THOMSON u. R.C. TUSTIN (Eds.): Infectious diseases of livestock; 1. Aufl.

Oxford University Press, Oxford, New York S. 1354-1371

KUMAR, P., J.T. COLSTON u. J.P. CHAMBERS (1994):

Detection of botulinum toxin using an evanescent wave immunosensor.

Biosensors and Bioelectronics 9, 57-63

LACY, D.B., W. TEPP, A.C. COHEN, B.R. DASGUPTA u. R.C. STEVENS (1998):

Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity.

Nature structural biology 5, 898-902

LAMANNA, C., L. SPERO u. E.J. SCHANTZ (1970):

Dependence of time to death on molecular size of botulinum toxin.
Infect. Immun. 1, 423-424

LÄMMLI, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

LANDMANN, G. (1904):

Über die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung.
Hyg. Rundschau 10, 449-452

LEE, W.H. u. H. RIEMANN (1970):

Correlation of toxic and non-toxic strains of *Clostridium botulinum* by DNA composition and homology.
J. gen. Microbiol. 60, 117-123

LENNETTE u. SCHMIDT (1977):

Komplementbindungsreaktion
in: MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK u. G. WITTMANN (Hrsg.):
Virologische Arbeitsmethoden Bd. 2.
Verlag Fischer, Jena S. 333-455

LEWIS, JR. G.E., S.S. KULINSKI, D.W. REICHARD u. J.F. METZGER (1981):

Detection of *Clostridium botulinum* type G toxin by enzyme-linked immunosorbent assay.
Appl. Env. Microbiol. 42, 1018-1022

LIGIEZA, J., J. REISS u. M. MICHALIK (1994):

Chemiluminescence immunosorbent assay (CLISA) and a possibility of the specific detection of soluble antigens of *Clostridium botulinum* type A.
Arch. Imm. Ther. Exp. 42, 129-133

LINIAL, M. (1995):

Bacterial neurotoxins - a thousand years later.
Isr. J. Med. Sci. 31, 591-595

LINDSTRÖM, M., H. JANKOLA, S. HIELM, E. HYYTIÄ u. H. KORKEALA (1998):

Identification of *Clostridium botulinum* type E strains with the API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II System.
European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis.
Teistungen, 4.-7.10 1998

LINDSTRÖM, M., H. JANKOLA, S. HIELM, E. HYYTIÄ u. H. KORKEALA (1999):

Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II

in: VAN ALPHEN, A.J., H. BÖHNEL, u. F. GESSLER (Eds.): Clostridia and clostridioses.
FEMS Immunol. Med. Microbiol 24, 267-274
Elsevier Science, Amsterdam, Lausanne

LMBG (1988):

Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch- und Fleischerzeugnissen. LMBG §35

LOCH, P. (1998):

Evaluation of RAPID ID 32 A and API 20 A for the identification of *Clostridium botulinum* types A-G.
Poster auf der European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis.
Teistungen, 4.-7.10 1998

LOCH, P. (1999):

Kulturell-biochemische und molekularbiologische Untersuchungen sowie Pathogenitätsprüfung von *C. botulinum*-Stämmen - ein Beitrag zur Taxonomie.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss. (eingereicht)

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 265-275

MAIN, D.C. u. A.R. GREGORY (1996):

Serological diagnosis of botulism in dairy cattle.
Aust. vet. J. 73, 77-78

MARTIN, H.C. u. D. SESARDIC (1998):

Testing of neutralising antibodies to botulinum A toxin: implications for potency testing of therapeutic antitoxins.
European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis.
Teistungen, 4.-7.10 1998

MASON, J. u. E. ROBINSON (1935):

The antigenic components of the toxins of *Clostridium botulinum* types C und D.
Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 5, 65-75

MATHEWS, A.G. (1976):

Antitoxin response to *Clostridium botulinum* vaccines types C and D in guinea pigs.
Dev. biol. Standard. 32, 193-201

- MAYORGA, L.S., O.P. DE CENTORBI, C.C. DE MILAN u. D.F. GIMÉNEZ (1987):
Rapid In Vivo assay method for type G botulinal toxin.
Zentralbl. Bakteriolog. Abt. 1. 264, 78-83
- MCCROSKEY, L.M. u. C.L. HATHEWAY (1988):
Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract.
J. clin. Microbiol. 23, 1052-1054
- MCCROSKEY, L.M., C.L. HATHEWAY, L. FENICIA, B. PASOLINI u. P. AURELI (1986):
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. 23, 201-202
- MCCROSKEY, L.M., C.L. HATHEWAY, B.A. WOODRUFF, J.A. GREENBERG u. P. JURGENSON (1991):
Type F botulism due to neurotoxigenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult.
J. clin. Microbiol. 29, 2618-2620
- MCLOUGHLIN, M.F., S.G. MCILROY u. S.D. NEILL (1988):
A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter.
Vet. Rec. 122, 579-581
- MECHEM, C.C. u. F.G. WALTER (1994):
Wound botulism.
Vet. Human. Toxicol. 36, 233-237
- MEHLER, M. (1981):
Untersuchungen über die Empfindlichkeit japanischer Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) gegenüber *Clostridium botulinum* Toxinen.
Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachber. Veterinärmedizin, Diss.
- MENKING, D.E., J.M. HEITZ, N.A. ANIS u. R.G. THOMPSON (1994):
Antibody-based bacterial toxin detection.
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.; Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors
2068, 145-150
- MESTRANDREA, L.W. (1974):
Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxin by capillary tube diffusion.

Appl. Microbiol. 27, 1017-1022

MEYER, K.F. u. J. GUNNISON (1929):

European strains of *Cl. botulinum* XXXVI.

J. Inf. Dis. 45, 96-105

MICHALIK, M., J. GRZYBOWSKI, J. LIGIEZA u. J. REISS (1986):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and differentiation of *Clostridium botulinum* toxins type A and B.

J. Imm. Meth. 93, 225-230

MIYAZAKI, S., M. IWASAKI u. G. SAKAGUCHI (1977):

Clostridium botulinum type D toxin: purification, molecular structure, and some immunological properties.

Infect. Immun. 17, 95-401

MØLLER, V. u. I. SCHEIBEL (1960):

Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Clostridium botulinum*.

Acta Path. Microbiol. Scand. 48, 80

MONTECUCCO, C. u. G. SCHIAVO (1994):

Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins.

Molecular Microbiol. 13, 1-8

MORIISHI, K., B. SYUTO, N. YUKOSAWA, K. OGUMA u. M. SAITO (1991):

Purification and characterization of ADP-ribosyltransferases (exoenzyme C3) of *Clostridium botulinum* type C and D strains.

J. Bacteriol. 173, 6025-6029

NEAVES, P. u. P.A. GIBBS (1983):

Alternatives to the mouse toxicity test for detection of *Clostridium botulinum* and its toxins.

Scientific and Technical Surveys 138

The British Food Manufacturing Industries Research Assoc. S. 1-17

NEILL, S.D., M.F. MCLOUGHLIN u. S.G. MCILROY (1989):

Type C botulism in cattle being fed ensiled poultry litter.

Vet. Rec. 124, 558-560

NICULESCU, E.-R., G. KOTTENHOFF u. R. MALOTTKE (1985):

Beitrag zur Differenzierung von Clostridien.

Zentralbl. Bakteriol. Abt. 1. 259, 307-316

NOTERMANS, S., H.J. BREUKINK, T.H. WENSING u. G. WEGENAAR (1978 a):

Voorkomen van *Clostridium botulinum* in pensinhound en faeces van runderen gevoerd met bostel welke natuurlijk besmet was met *Clostridium botulinum*.
Tijdschr. Diergeneesk. 103, 1327-1333

NOTERMANS, S., J. DUFRENNE u. M. VAN SCHOTHORST (1978 b):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* toxin type A.
Jap. J. med. Sci. Biol. 31, 81-85

NOTERMANS, S., J. DUFRENNE u. M. VAN SCHOTHORST (1979):

Recovery of *Clostridium botulinum* from mud samples incubated at different temperatures.
Eur. J. Appl. microbiol. Biotechnol. 6, 403-407

NOTERMANS, S., J. DUFRENNE u. S. KOZAKI (1982):

The relation between toxicity and toxin-related-antigen contents of *Clostridium botulinum* types C and D cultures as determined by mouse bioassay and ELISA.
Jap. J. med. Sci. Biol. 35, 203-211

NOTERMANS, S. u. J. NAGEL (1989):

Assays for Botulinum and Tetanus Toxins
in: SIMPSON, L.L. (Ed.): Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin.
Academic Press San Diego, New York S. 319-334

NUÑEZ, L., E.A. DE LAGARDE u. M. D'AQUINO (1990):

Botulinic toxin detection by counterimmunoelectrophoresis.
Zbl. Bakt. 272, 290-293

OCHANDA, J.O., B. SYUTO, K. OGUMA, H. IIDA u. S. KUBO (1984):

Comparison of antigenicity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains.
Appl. Env. Microbiol. 47, 1319-1322

OGERT, R.A., J.E. BROWN, B.R. SINGH, L.C. SHRIVER-LAKE u. F.S. LIGLER (1992):

Detecton of *Clostridium botulinum* toxin A using a fiber optic-based biosensor.
Anal. Biochem. 205, 306-312

OGUMA, K. (1976):

The stability of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D.
J. gen. Microbiol. 92, 76-75

OGUMA, K., Y. FUJINAGA u. K. INOUE (1995):

Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins.

Microbiol. Immunol. 39, 161-168

OGUMA, K.S., B. SYUTO, H. IIDA u. S. KUBO (1980):

Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains.

Infect. Immun. 30, 656-660

OGUMA, K., T. YAMAGUCHI, K. SUDOU, N. YUKOSAWA u. Y. FUJIKAWA (1986):

Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxic derivatives.

Appl. Env. Microbiol. 51, 256-260

OHISHI, I. u. G. SAKAGUCHI (1975):

Molecular construction of *Clostridium botulinum* type F progenitor toxin.

Appl. Microbiol. Molec. 29, 444-447

OHISHI, I., G. SAKAGUCHI, H. RIEMANN, D. BEHYMER u. B. HURVELL (1979):

Antibodies to *Clostridium botulinum* toxins in free-living birds and mammals.

J. Wildlife Disease 15, 3-9

ONDERDONK, A.B. u. S.D. ALLEN (1995):

Clostridium

in: MURRAY, P.R. (Eds.): Manual of Clinical Microbiology. 6. Aufl.

ASM Press, Washington D.C. S. 574-586

PERKIN-ELMER:

Gas Chromatography. Bacteria Identification System.

Perkin-Elmer GmbH, Überlingen

PICKETT, J., B. BERG, E. CHAPLIN u. M.-A. BRUNSTETTER-SHAFFER (1976):

Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study.

New England J. Med. 295, 770-772

POPOFF, M.R. (1989):

Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles.

Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz. 8, 129-145

POTTER, M.D., J. MENG and P. KIMSEY (1993):

An ELISA for detection of botulinal toxin types A, B and E in inoculated food samples.

J. Food Prot. 56, 856-861

POULET, S., D. HAUSER, M. QUANZ, H. NIEMANN u. M.R. POPOFF (1992):

Sequences of the botulinal neurotoxin E derived from *Clostridium botulinum* type E (strain Beluga) and *Clostridium butyricum* (strains ATCC 43181 and ATCC 43755).

Biochem. biophys. Res. Comm. 183, 107-113

PRÉVOT, A. (1953):

Rapport d'introduction du President du Sous-Comité Clostridium pour l'unification de la nomenclature des types toxigeniques de *C. botulinum*.

Int. Bull. Bacteriol. Nomenclature 3, 120

RANSOM, G.M., W.H. LEE, E.L. ELLIOT u. C.P. LATTUADA (1993):

Enzyme-linked Immunosorbent assays (ELISAs) to detect botulinum toxins using high titer rabbit antisera

in: DASGUPTA, B.R. (Ed.): Botulinum and Tetanus Neurotoxins.

Plenum Press New York, London S. 449-462

REED, L.J. u. H. MÜNCH (1938):

A simple method for estimating fifty per cent endpoints.

Am. J. Hyg. 27, 493-497

RICHMOND, R.N., C.L. HATHEWAY u. A.F. KAUFMANN (1978):

Type C botulism in a dog.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 173, 202-203

RICKETTS, S.W., T.R.C. GREET, P.J. GLYN, C.D.R. GINNETT, E.P. MCALLISTER, J. MCCAIG, P.H. SKINNER, P.M. WEBBON, D.L.FRAPE, G.R. SMITH u. L.G. MURRAY (1984):

Thirteen cases of botulism in horses fed big bale silage.

Equine vet. J. 16, 515-518

RIEMANN, H. (1967):

Demonstration of toxins in foodstuffs by means of immunofluorescence.

Nord. vet. Med. 19, 188-191

RODRIGUEZ, A. u. M. DEZFULIAN (1997):

Rapid identification of *Clostridium botulinum* and botulinal toxin in food.

Folia Microbiol. 42, 149-151

ROSENBERGER, G. (1970):

Botulismus

in: Krankheiten des Rindes.

Verlag Parey, Berlin, Hamburg S. 816-820

RUBIN, L.G., M. DEZFULIAN u. R.H. YOLKEN (1982):

Serum antibody response to *Clostridium botulinum* toxin in infant botulism.

J. clin. Microbiol. 16, 770-771

SAKAGUCHI, G. (1986):

Kap. 23: *Clostridium botulinum* toxins

International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.

Pergamon Press, Oxford S. 519-548

SAKAGUCHI, G. u. S. SAKAGUCHI (1973):

Development of antibody to each component of *Clostridium botulinum* type E progenitor toxin.

Jap. J. med. Sci. Biol. 26, 187-198

SAKAGUCHI, G., S. SAKAGUCHI, S. KOZAKI, S. SUGII u. I. OHISHI (1974):

Cross reaction in reversed passive hemagglutination between *Clostridium botulinum* type A and B toxins and its avoidance by the use of antitoxic component immunoglobulin isolated by affinity chromatography.

Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 161-172

SCHÄGGER, H u. G. VON JAGOW (1987):

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa.

Anal. Biochem. 166, 368-379

SCHANTZ, E.J. u. D.A. KAUTTER (1978):

Standardized assay for *Clostridium botulinum* toxins.

J. of the AOAC International 61, 96-99

SCHIAVO, G. u. C. MONTECUCCO (1997):

The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxins

in: ROOD, J.I., B.A. MCCLANE, J. G. SONGER u. R.W. TITBALL (Eds.): The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis.

Academic Press, San Diego S. 295-310

SCHICHOWSKI, H.-D. (1980):

Immunisierungsversuche mit Botulinus Typ C-Toxoid-Impfstoffen.

Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachber. Veterinärmedizin, Diss.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., M.C. CARNEIRO, E.C. KATO, J.O. SORBARA, O.D. ROSSI u. L.E. GERBASI (1999):

Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil

in: VAN ALPHEN, A.J., H. BÖHNEL, u. F. GESSLER (Eds.): Clostridia and clostridiosis.

FEMS Immunol. Med. Microbiol 24, 379-382
Elsevier Science, Amsterdam, Lausanne

SCOTT, A.B. (1981):
Botulinum toxin injections of eye muscle to correct strabism.
Am. Ophthalmol. Soc. 79, 734-770

SEDDON, H. (1922):
Bulbar paralysis in cattle due to the action of a toxicogenic bacillus, with a discussion of
the relationship of the condition to forage poisoning (Botulism).
J. Comp. Pathol. Ther. 35, 147-190

SEIFERT, H.S.H. (1992):
Tropentierhygiene.
Verlag Fischer, Stuttgart S. 263-266

SEIFERT, H.S.H (1996):
Tropical Animal Health.
Verlag Kluwer, Dordrecht S. 311-317

SEMLER-SCHNEIDER, B., B.M. POLTEN u. T. SCHLIEßER (1988):
Characterisierung von *Clostridium-Botulinum*-Toxinen Typ A, B, C, D und E mit der
Western-Blot-Technik.
DVG, S. 21-25

SESARDIC, D., K. MCLELLAN, T.A. EKONG u. R.G. DAS (1996):
Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic
botulinum type A toxin.
Pharmacol. Toxicol. 78, 283-288

SESARDIC, D., K. MCLELLAN, H.C. MARTIN u. T.A. EKONG (1998):
Characterisation of a microtitre based endopeptidase assay for botulinum neurotoxin A
and E utilising synthetic SNAP-25.
European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on Identification
and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis.
Teistungen, 4.-7.10 1998

SHONE, C.C., P. WILTON-SMITH, N. APPLETON, P. HAMBLETON, N. MODI, S.
GATLEY u. J. MELLING (1985):
Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is
comparable to the mouse bioassay.
Appl. Env. Microbiol. 50, 63-67

SHONE, C.C., N. APPLETON, P. WILTON-SMITH, P. HAMBLETON, N. MODI, S.

- GATLEY u. J. MELLING (1986):
In Vitro assays for botulinum toxin and antitoxins.
Dev. Biol. Standard 64, 141-145
Verlag Karger, Basel
- SIATKOWSKI, R.M., A. TYUTYUNIKOV, A.W. BIGLAN, D. SCALISE, C.
GENOVESE, R.B. RAIKOW, J.S. KENNERDELL u. W.J. FEUER (1993):
Serum antibody production to botulinum A toxin.
Ophthalmol. 100, 1861-1866
- SIEGEL, L.S. (1988):
Human immune response to botulinum pentavalent (ABCDE) toxoid determined by a
neutralization test and by an enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Clin. Microbiol. 26, 2351-2356
- SIEGEL, L.S. (1989):
Evaluation of neutralizing antibodies to type A, B, E, and F botulinum toxins in sera
from human recipients of botulinum pentavalent (ABCDE) toxoid.
J. Clin. Microbiol. 27, 1906-1908
- SIMPSON, L.L. (1982):
A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C1 and
C2 toxins.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 223, 695-701
- SMART, J.L., T.O. JONES, F.G. CLEGG u. M.J. MCMURTRY (1987):
Poultry waste associated type C botulism in cattle.
Epidem. Inf. 98, 73-79
- SMITH, G.R. u. C.Y. MORYSON (1975):
Clostridium botulinum in the lakes and waterways of London.
J. Hyg. Camb. 75, 371-379
- SMITH, G.R. u. L.G. MURRAY (1984):
Laboratory confirmation of equine botulism.
Vet. Rec. 114, 75
- SMITH, L.D. (1957):
Clostridial diseases of animals
in: BRANDLY, C.A. and E.L. JUNGHERR (Eds.): Advances in Veterinary Science.
3. Aufl.
Academic Press, New York S. 463-525
- SMITH, L.D. (1977):
Botulism. The organism, its toxins, the disease.

Verlag Thomas, Springfield, Illinois

SMITH, L.D. u. G. HOBBS (1974):

Genus III. *Clostridium*

in: BUCHANAN, R.E. u. N.E. GIBBONS (Eds.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8. Aufl.

Williams & Wilkins, Baltimore S. 551-572

SMITH, L.D. u. L.V. HOLDEMAN (1968):

The pathogenic anaerobic bacteria.

Verlag Thomas, Springfield, Illinois

SMITH, L.D., J.W. DAVIS u. K.G. LIBKE (1971):

Experimentally induced botulism in weanling pigs.

Am. J. Vet. Res. 32, 1327-1330

SONNABEND, W.F., U.P. SONNABEND u. T. KRECH (1987):

Isolation of *Clostridium botulinum* type G from swiss soil specimens by using sequential steps in an identification scheme.

Appl. Env. Microbiol. 53, 1880-1884

SONNENSCHN, B. (1973):

Der Nachweis von *Clostridium-botulinum*-Toxinen mit Hilfe der Agargelpräzipitationsreaktion.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

STAIGER-SANZENBACHER (1994):

Verlauf und Therapie von 40 Botulismusintoxikationen.

München, Fakultät für Medizin der Technischen Universität München, Diss.

SUEN, J.C., C.L. HATHEWAY, A.G. STEIGERWALT u. D.J. BRENNER (1988):

Genetic confirmation of identities of neurotoxicogenic *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* implicated as agents of infant botulism.

J. clin. Microbiol. 26, 2191-2192

SUGII, S. u. G. SAKAGUCHI (1976):

Molecular construction of *Clostridium botulinum* type A toxins.

Infect. Immun. 12, 1262-1270

SWERCZEK, T.W. (1980 a):

Toxicoinfectious botulism in foals and adult horses.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 176, 217-220

SWERCZEK, T.W. (1980 b):

Experimentally induced toxicoinfectious botulism in horses and foals.

Am. J. Vet. Res. 41, 348-350

SZABO, E.A., J.M. PEMBERTON u. P.M. DESMARCHELIER (1993):

Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction.

Appl. Env. Microbiol. 59, 3011-3020

SZABO, E.A., J.M. PEMBERTON, A.M. GIBSON, M.J. EYLES u. P.M.

DESMARCHELIER (1994 a):

Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B and E in food, soil and infant faeces.

J. Appl. Bacteriol. 76, 539-545

SZABO, E.A., J.M. PEMBERTON, A.M. GIBSON, R.J. THOMAS, R.R. PASCOE u. P.M. DESMARCHELIER (1994 b):

Application of PCR to a clinical and environmental investigation of a case of equine botulism.

J. clin. Microbiol. 32, 1986-1991

TAKESHI, K., Y. FUJINAGA, K. INOUE, H. NAKAJIMA, K. OGUMA, T. UENO, H. SUNAGAWA u. T. OHYAMA (1996):

Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction.

Microbiol. Immunol. 49, 5-11

TAMMEMAGI, L. u. K. GRANT (1967):

Vaccination in the control of bovine botulism in Queensland.

Aust. Vet. J. 43, 368-373

THEILER, A., P. VILJOEN, H. GREEN, P. DU TOIT, H. MEIER u. E. ROBINSON (1927):

Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa.

in: Union of S. Africa, Dept. of Agric., 13th and 14th rept. of the Director of vet. (Ed.) S. 821-1361

THOMAS, R.J. (1991):

Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA.

Aust. vet. J. 68, 111-113

THOMPSON, D.E., J.K. BREHM, J.D. OULTRAM, T.-J. SWINFIELD, C.C. SHONE, T. ATKINSON, J. MELLING u. P. MINTON (1990):

The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene.

Eur. J. Biochem. 189, 73-81

VAN DE LUGT, J.J., S.C. DEWET, S.S. BASTIANELLO, T.S. KELLERMAN u. L.P. VAN JAARVELD (1995):

Two outbreaks of type C and D botulism in sheep and goats in South Africa.

Tydskr. S. Afr. Vet. Ver. 66, 77-82

VAN ERMENGEM, E. (1897):

Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus.

Z. Hyg. Infektionskr. 26, 1-56

VERMILYEA, B.L., H.W. WALKER u. J.C. AYRES (1968):

Detection of botulinal toxins by immunodiffusion.

Appl. Microbiol. 16, 21-24

WALKER, P.D. u. I. BATTY (1964):

Fluorescent studies in the genus *Clostridium*. II. A rapid method for differentiating *Clostridium botulinum* types A, B and F, types C and D and type E.

J. Appl. Bact. 27, 140-142

WEISS, H.-E. u. H. WEISS (1988):

Nachweis von *Clostridium-botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärmekomplementbindungs-reaktion.

Tierärztl. Umsch. 43, 117-126

WEISS, H.-E., G. RADEMACHER, K. DOLL u. G. DIRKSEN (1990):

Schnelldiagnose des Botulismus beim Rind mittels Mikro-Wärmekomplementbindungs-reaktion.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 97, 398-400

WESTPHAL, U. (1991):

Botulismus bei Vögeln.

Herausgegeben von dem Verein der Freunde und Förderer der Inselstation der Vogelwarte Helgoland e.V. und dem Naturschutzbund Deutschland, Landesverband Hamburg e.V.

AULA-Verlag, Wiesbaden

WICHTEL, J.J. u. R.H. WHITLOCK (1991):

Botulism associated with feeding alfalfa hay to horses.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 471-472

WICTOME, M., K. NEWTON, K. JAMESON, K. FOSTER u. C.C. SHONE (1998):

The development of novel assays for the detection of botulinum toxins.

European Clostridia Conference 1998. 1st International Conference on Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis.

Teistungen, 4.-7.10 1998

WIGGINTON, J.M. u. P. THILL (1993):

Infant botulism: a review of the literature.

Clinical Pediatrics 32, 669-674

WILSON, R.B., M.T. BOLEY u. B. CORWIN (1995):

Presumptive botulism in cattle associated with plastic-packaged hay.

J. Vet. Diagn. Invest. 7, 167-195

WOHLFARTH, K., H. GÖSCHEL, H. BIGALKE u. R. DENGLER (1996):

Welche Rolle spielen spezifische Antikörper beim Therapieversagen nach Behandlung mit Botulinumtoxin A?

Poster auf dem 69. Deutscher Neurologenkongreß mit Fortbildungsakademie, Göttingen 25.-28.9.1996.

Aktuelle Neurologie Sonderheft 1; 23, 57