



Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin in Rinderkot und Silage

Vorwort

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

Eine zuverlässige Diagnostik des Botulismus in Hinblick auf den Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin und *C. botulinum* Sporen oder lebenden Bakterien ist die Grundvoraussetzung für eine sachliche, fundierte Diskussion. Aus diesem Grund führte das Friedrich-Loeffler-Institut im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) eine Vergleichsuntersuchung zur Botulismusdiagnostik in Deutschland durch, an der sich verschiedene Laboreinrichtungen beteiligt haben. Die Ergebnisse fielen sehr unterschiedlich aus, sodass erheblicher Verbesserungsbedarf im Bereich der Qualität der Labordiagnostik festgestellt wurde. In der Folge des Projektes wurde die hier vorliegende Durchführungsempfehlung für den Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin mittels des Maus-Bioassays entwickelt. Ein entscheidender Schritt in der Botulismusdiagnostik ist zunächst die Untersuchung der Proben auf Toxizität im Maus-Bioassay. Werden hier Hinweise auf das Vorliegen von *C. botulinum* Neurotoxin erhalten, sollten sich weitere Untersuchungen zur Typisierung des Toxins mit entsprechenden Antiseren anschließen, da der eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit entsprechenden Antiseren im Maus-Bioassay erfordert. Die Neutralisation ist nicht Gegenstand dieser Empfehlung, da die durch die Vergleichsuntersuchung aufgedeckten diagnostischen Schwierigkeiten zunächst die Feststellung von Toxizität (durch *C. botulinum* Neurotoxin) im Maus-Bioassay betreffen.

Die unter 11. dieser Methodenempfehlung angegebenen Literaturstellen enthalten Protokolle zur Durchführung der Neutralisation.

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

1. Anwendungszweck

Die hier vorliegende Durchführungsempfehlung zum Maus-Bioassay dient der Untersuchung von Rinderkot und Silage auf das Vorliegen von *C. botulinum* Neurotoxin. Weiteres Probenmaterial war nicht Gegenstand der Vergleichsuntersuchung, veterinärmedizinisches Organmaterial wie Leber, Darminhalt oder Panseninhalt kann ggf. nach dieser Empfehlung untersucht werden. Der eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin erfordert die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay. Die Neutralisation ist nicht Gegenstand dieser Empfehlung. Die unter 11. angegebenen Literaturstellen enthalten Protokolle zur Durchführung der Neutralisation.

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

2. Grundlagen

Die Durchführungsempfehlung orientiert sich an Methode L 06.00-26 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch): „Untersuchung von Lebensmitteln, Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen, gleich lautend mit Norm DIN 10102 von Juni 1988“. Weitere Grundlage waren die Durchführungsanweisungen/ Protokolle zum Maus-Bioassay der teilnehmenden Labore sowie die angegebenen Literaturstellen.

3. Kurzbeschreibung des Verfahrens

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

4. Chemikalien

Gelatine-Phosphat-Pufferlösung (GPP)

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

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

Trypsinlösung

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

Andere Angaben: Das CDC Handbook (Centers for Disease Control and Prevention, 1998) beschreibt eine 0,5%ige Lösung (1.250 USP U/ml); die Konzentration im Probenextrakt (0,25 ml der Lösung zu 1 ml der Probe) entspricht 250 USP U/ml. Die Anleitung FDA/CFSAN - BAM * Chapter 17 - Clostridium botulinum (U.S. Food and Drug Administration, 2001) gibt eine 5%ige Lösung (12.500 USP U/ml) vor, die Konzentration im Probenextrakt (0,2 ml der Lösung zu 1,8 ml der Probe) entspricht 1.250 USP U/ml.

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

5. Geräte

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

Brutschrank 37°C

Kühlschrank 4-8°C

Zentrifuge mit einer Zentrifugalbeschleunigung von > 10.000 g, mit Kühleinrichtung und hermetisch verschließbarem (aerosoldichten) Rotorkessel

Zentrifugenröhrchen (hermetisch verschließbar, autoklavierbar)

Wasserbad 100°C

Sicherheitswerkbank der Klasse 2

Waage mit einem geeigneten Wägebereich z. B.: 0,02 g-400 g

Beutel-Walkmischgerät (z.B. Stomacher 400 Circulator)

Beutel für Beutelwalkmischgerät (steril, versch. Größen, mit/ ohne Filter)

Beutelständer

Pipetten unterschiedlichen Volumens (z.B.: 20-200 µl, 100-1000 µl, 0,5-5 ml)

Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 µm Materialempfehlung PES oder Porengröße 0,45 µm)

Die Geräte sind einer GLP konformen Wartung und Instandhaltung zu unterziehen, die z.B. durch Akkreditierung bzw. Zertifizierung nach aktuellen Normen garantiert werden kann.

6. Versuchstiere

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

7. Durchführung

7.1. Vorbemerkung

Clostridium botulinum Neurotoxine sind außerordentlich giftig. Alle verdächtigen Proben und Kulturen sind daher nur von erfahrenem Personal in entsprechend zugelassenen Laboratorien zu handhaben. Äußerste Vorsicht ist vor allem beim Hantieren mit Spritzen und Kanülen sowie bei Verfahren geboten, bei denen die Gefahr einer Aerosolbildung besteht (z.B. Zentrifugieren). Derartige Verfahrensschritte sind, soweit sie nicht überhaupt vermeidbar, in Sicherheitswerkbänken mit Personen- und Objektschutz nach DIN 12 950 Teil 1 bzw. in hermetisch abgeschlossenen sterilisierbaren Rotoren durchzuführen. Verschüttetes Botulinum-Toxin lässt sich mit starkem Alkali (Sodalösung oder Natronlauge c (NaOH) = 0,1 mol/l) inaktivieren. Gesetzliche Regelungen und Empfehlungen für den Umgang mit pathogenen Mikroorganismen und die im Umgang mit ihnen auftretenden Gefahren sind strikt zu beachten. Der Toxinnachweis beinhaltet Tierversuche im Sinne des § 7 Tierschutz-Gesetz. Nach § 8 Absatz 7 Nr. 2 dieses Gesetzes bedürfen die Versuche keiner Genehmigung. Sie unterliegen aber der Anzeigepflicht nach § 8a Tierschutz-Gesetz. Die Anzeige hat unter Angabe der in § 8a Absatz 2 enthaltenen Erfordernisse und nach Maßgabe der zuständigen jeweiligen Landesveterinärbehörde bei dieser zu erfolgen. Die Tierversuche sind im Interesse des öffentlichen Gesundheitsschutzes vorerst noch unerlässlich. Sobald alternative Verfahren verfügbar sind, werden sie den Tierversuch ersetzen (siehe auch Methode L 06.00-26, 7).

7.2. Herstellung des Probenextraktes mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung

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

- Der Extrakt wird in einem sterilen verschließbaren Röhrchen (Volumen 15-50 ml, je nach gewonnenem Extrakt-Volumen) bis zur Testung im Maus-Bioassay gelagert.
- Die Lagerung erfolgt bis zu 5 Tage bei 4-8°C in einem Kühlschrank, darüber hinaus bei -20°C in einer Gefriertruhe.

7.3. Vorbehandlung von Probenextrakten (Trypsinierung, Erhitzung)

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

7.4. Injektion der Probenextrakte

- Intraperitoneale Injektion in Mäuse
Pro Extrakt werden 2 Mäuse benötigt. Jedem Tier werden 0,5 ml oder 1,0 ml Extrakt intraperitoneal injiziert. Anmerkung: Durch die Vergleichsuntersuchung ergab sich der Hinweis, dass die Sensitivität durch die Injektion von 1 ml Extrakt verbessert werden kann.
- Extraktkonzentrationen
Folgende Konzentrationen der Extrakte werden den Mäusen verabreicht:

Tier 1 und 2	unbehandelter Extrakt, 1:2 verdünnt
Tier 3 und 4	trypsinbehandelter Extrakt, 1 auf 1,8 verdünnt
Tier 5 und 6	erhitzter Extrakt, unverdünnt oder in geringster Verdünnung

 Alle Verdünnungen erfolgen mit Gelatine-Phosphat-Pufferlösung.

8. Ergebnis und Kontrolle

Die Mäuse sollen für die Dauer von bis zu 4 Tagen (96 h) beobachtet werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion sollen die Mäuse möglichst alle 4 Stunden, später mindestens zweimal täglich inspiziert werden. War im Extrakt *Clostridium botulinum* Neurotoxin vorhanden, wird das Versuchstier unter typischen Symptomen, konzentrationsabhängig meist innerhalb weniger Stunden bis zu 3 Tage nach der Injektion verenden. Ein typisches Symptom für eine Botulismus-Erkrankung ist die Ausbildung einer „Wespentaille“. Hierbei handelt es sich um eine Einziehung der Flanken des Tiers durch eine vermehrte Nutzung der Bauchmuskulatur zur Unterstützung der Atmung. Weitere Symptome

sind eine angestrengte Atmung sowie Lähmungserscheinungen in der Gliedmaßen-Muskulatur. Das Tier verendet schließlich.

9. Auswertung

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

10. Weiteres Vorgehen

Kann durch das Ergebnis des Maus-Bioassays auf das Vorhandensein von *Clostridium botulinum* Neurotoxin geschlossen werden, sollte die Typisierung (Neutralisation) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay durchgeführt werden. Der eindeutige Nachweis von *C. botulinum* Neurotoxin erfordert die Neutralisation (Typisierung) der festgestellten Toxizität mit *C. botulinum* Neurotoxin Antiseren im Maus-Bioassay. Die unter 11. angegebenen Literaturstellen enthalten Protokolle zur Durchführung der Neutralisation.

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

11. Literatur

Centers for Disease Control and Prevention: Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention, 1998.

Methode L 06.00-26 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch): Untersuchung von Lebensmitteln, Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen

U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Edition/1998, Chapter 14. Methods for the Detection of *Clostridium botulinum* Toxins in Meat and Poultry Products, Authors L. Victor Cook, Wei Hwa Lee, Charles P. Lattuada and Gerri M. Ransom, <http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/MIgchp14.pdf>

U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. Chapter 17, *Clostridium botulinum*, Authors: Haim M. Solomon and Timothy Lilly, Jr. January 2001

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>