

Botulismus: eine altbekannte Erkrankung stellt uns vor neue Herausforderungen

Dr. Brigitte Dorner

Robert Koch Institut, Berlin



Die Anfänge der Botulismusforschung

**Justinus
Kerner**

1822:

Beschreibung der Erkrankung Botulismus, „Wurstvergiftung“ (lat. *botulus*, Wurst)

**Emil Pierre
van Ermengem**

1897:

Zeitschr. f. Hygiene. XXVI. 1-59

Ueber einen neuen anaëroben Bacillus
und seine Beziehungen zum Botulismus.

Von

Prof. Dr. **E. van Ermengem**
in Gent (Belgien).



Ellezelles, Belgien @ A.Pickett, Botulinum J., 1, 2008

Begräbnisfeier in Ellezelles, Belgien, 1895:
23 Botulismusfälle,
davon 10 schwere und 3 tödliche Fälle

Ursache: roher Schinken

**Analyse des Schinkens
sowie der Milz eines Verstorbenen**



Isolation des „*Bacillus botulinus*“

**nach heutiger Nomenklatur *C. botulinum*,
BoNT/B (nicht-proteolytisch)**



Botulismus: Erkrankungsformen und Auslöser

Zoonotische Quelle

z.B. Fleisch und
Wurstwaren,
Fisch und Fischprodukte,
Honig

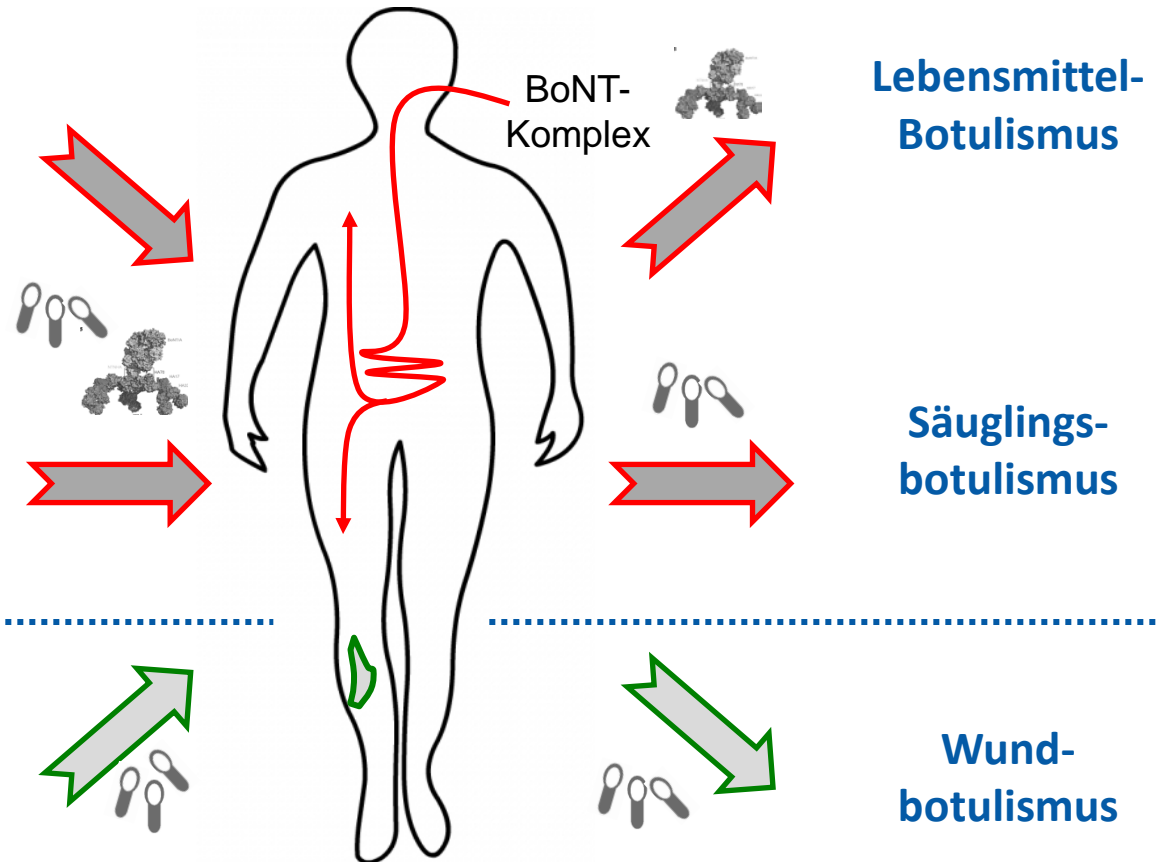
Pflanzliche Quelle

z.B. Gemüse

Umwelt als Quelle

z.B. Staub, Boden

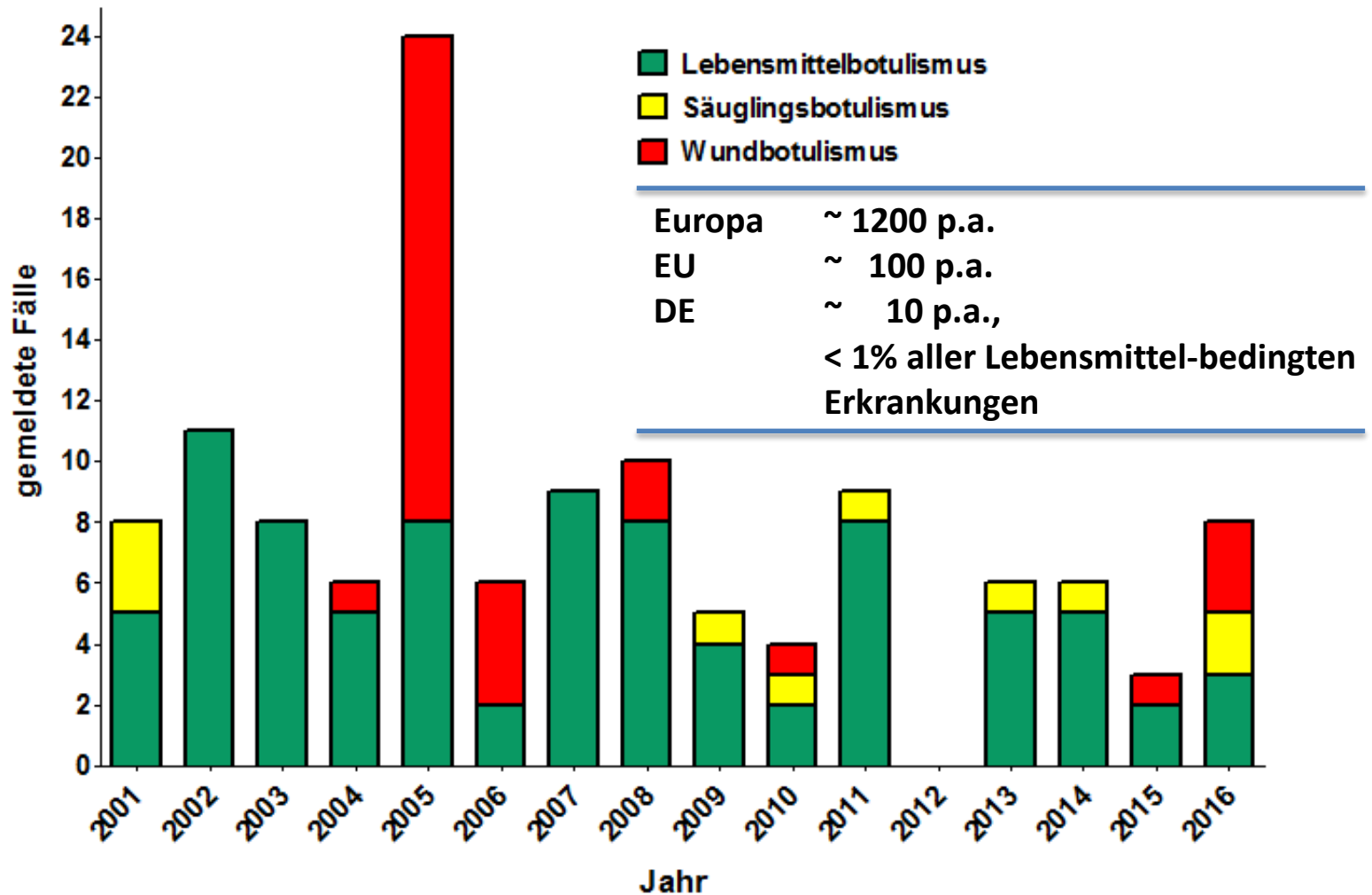
C. botulinum
C. baratii, C. butyricum



LD₅₀ (BoNT): 1 ng/kg



Botulismus in Deutschland



Infektionsepidemiologisches Jahrbuch / FG35, RKI



Klinische Symptomatik

Allgemein

- Inkubationszeit 12-72 h (2 h – 10 d)
- absteigende symmetrische, fieberfreie, flache Lähmung
- Doppelbilder (Diplopie), Ptosis (hängendes Oberlid), verschwommene Sicht
- Schluckstörung (Dysphagie), Sprechstörung (Dysarthrie), Dysphonie
- Hypotonie, Schwäche (Hals u. Arme), Atemmuskulatur
- vegetative Symptome (Herz-Kreislauf, Magen-Darm-Trakt, Harnorgane)

Lebensmittel-bedingter Botulismus

- gastrointestinale Symptomatik (Obstipation, Diarrhö)
- Bulbärparalyse (Sprach-/Schluckstörungen)

Differentialdiagnose:

- Guillain-Barré-Syndrom, Miller-Fisher-Syndrom, Lambert-Eaton-Syndrom, Schlaganfall (asymmetrisch), Myasthenia gravis, Lyme-Borreliose, Magnesium-Intoxikationen



Klinische Symptomatik

Säuglingsbotulismus:

- **gastrointestinale Symptomatik**
- **Bulbärparalyse (Sprach-/Schluckstörungen)**

Differentialdiagnose:

- **Dehydrierung, Tetanus**

Wundbotulismus:

- **ggf. Fieber**

Differentialdiagnose:

- **andere Abszess-Ursachen, Tetanus**



Falldefinition für Meldung nach IfSG

Kriterien für die Übermittlung von Meldedaten vom Gesundheitsamt an die zuständige Landesbehörde und von dort an das RKI

- **Klinisches Bild (Lebensmittel- o. Wundbotulismus):**
 - Hirnnervenstörung (z.B. Ptosis, Bulbärparalysen, Schluckstörungen)
 - Dyspnoe (Atemstörung)
 - innerhalb weniger Tage fortschreitende, symetrische, absteigende schlaffe Lähmung
- **Klinisches Bild (Säuglingsbotulismus)**
 - allgemeine Muskelschwäche
 - Dyspnoe (Atemstörung)
 - Obstipation (Verstopfung)
 - schlaffe Lähmung
 - Schluckstörung
 - Trinkschwäche, Gedeihstörung
- **Oder: ärztliche Diagnose eines Botulismus**
- **Oder: Krankheitsbedingter Tod**

**mindestens eines
der aufgeführten Kriterien und...**



Falldefinition für Meldung nach IfSG

- **Labordiagnostischer Nachweis (mindestens eines der drei folgenden):**
 - direkter Erregerisolierung – kulturell – aus Stuhl (Lebensmittel- oder Säuglingsbotulismus) oder Wundmaterial (Wundbotulismus)
 - Nachweis des Botulinum Neurotoxins (z.B. ELISA, Massenspektrometrie, Maus Bioassay) nur aus Blut, Stuhl, Mageninhalt, Erbrochenem oder Wundmaterial
 - Nukleinsäurenachweis (z.B. PCR) eines Botulinum Neurotoxin-Gens aus Stuhl oder Wundmaterial
- **Epidemiologische Bestätigung (mindestens eines der folgenden):**
 - Verzehr eines Lebensmittels in dem Botulinum Neurotoxin oder bei Säuglingsbotulismus Sporen (z.B. Honig) labordiagnostisch nachgewiesen wurden
 - epidemiologischer Zusammenhang (gemeinsame Expositionsquelle, z.B. Lebensmittel, Heroin)

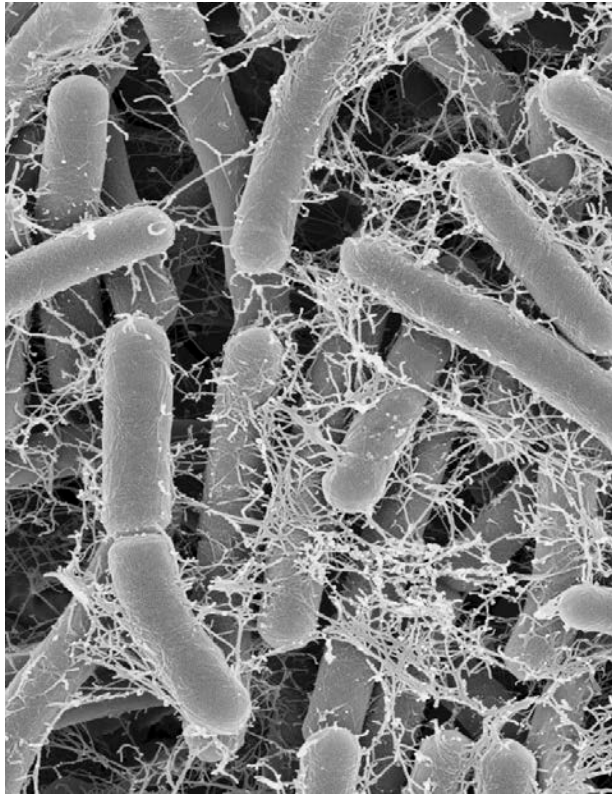
Meldekategorien

- a) Klinisch diagnostizierte Erkrankung
- b) Klinisch-epidemiologische bestätigte Erkrankung
- c) Klinisch-labordiagnostisch bestätigte Erkrankung
- d) Labordiagnostisch nachgewiesener Fall bei nicht erfülltem klinischen Bild
- e) Labordiagnostisch nachgewiesener Fall bei unbekanntem klinischen Bild

Amtl. Statistik:
nur Kategorien
b + c

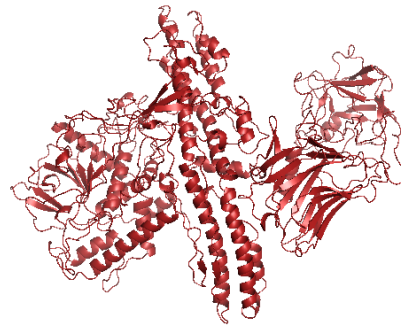
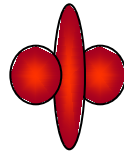


Komplexität der Botulinum Neurotoxine



Neurotoxin

150 kDa

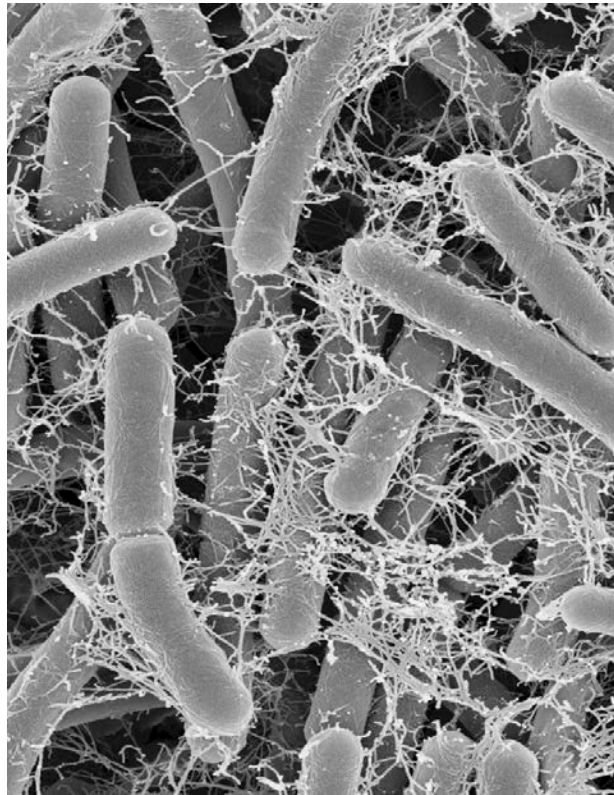


**Grampositive,
sporebildende,
obligat anaerobe Stäbchen**

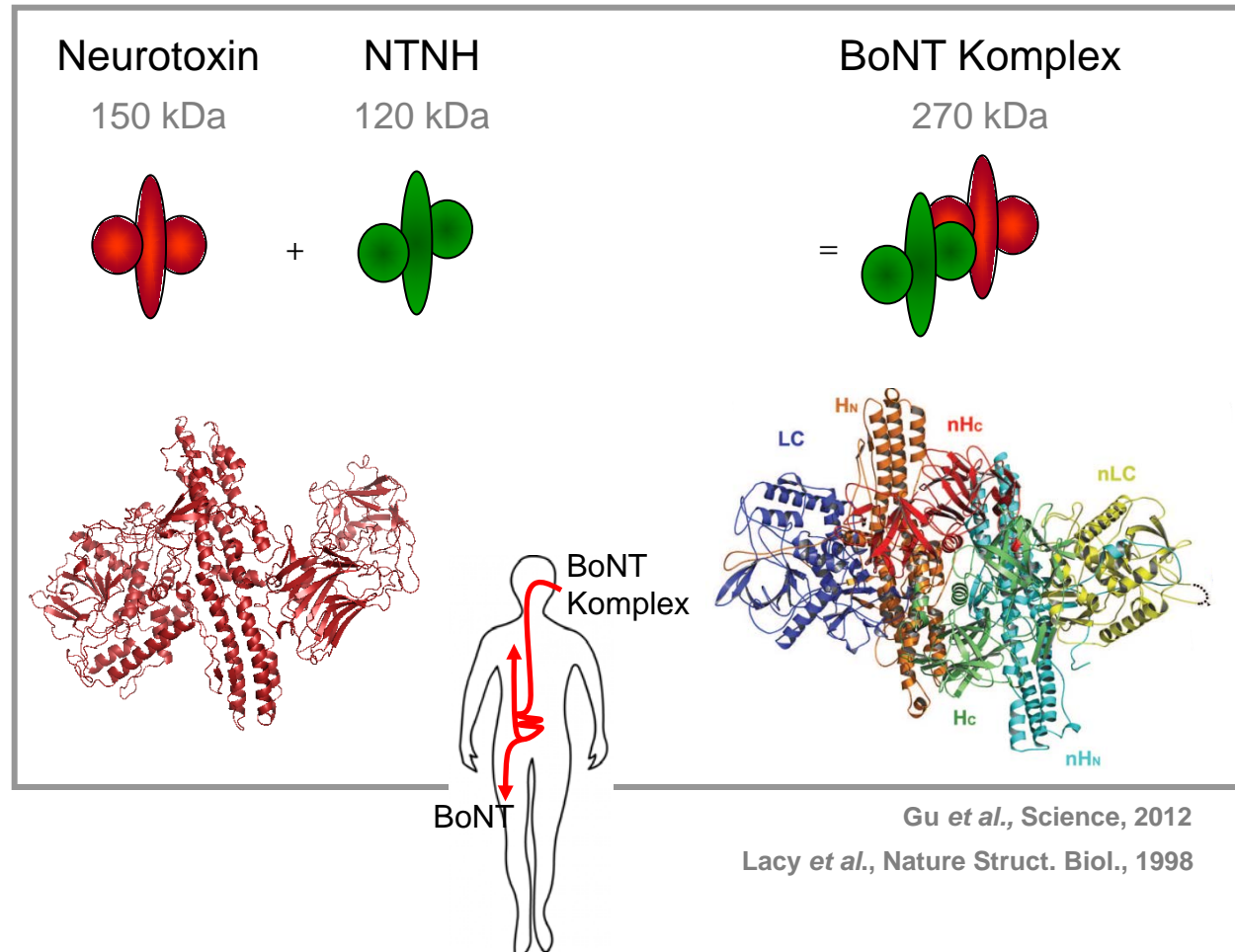
Lacy *et al.*, Nature Struct. Biol., 1998



Komplexität der Botulinum Neurotoxine

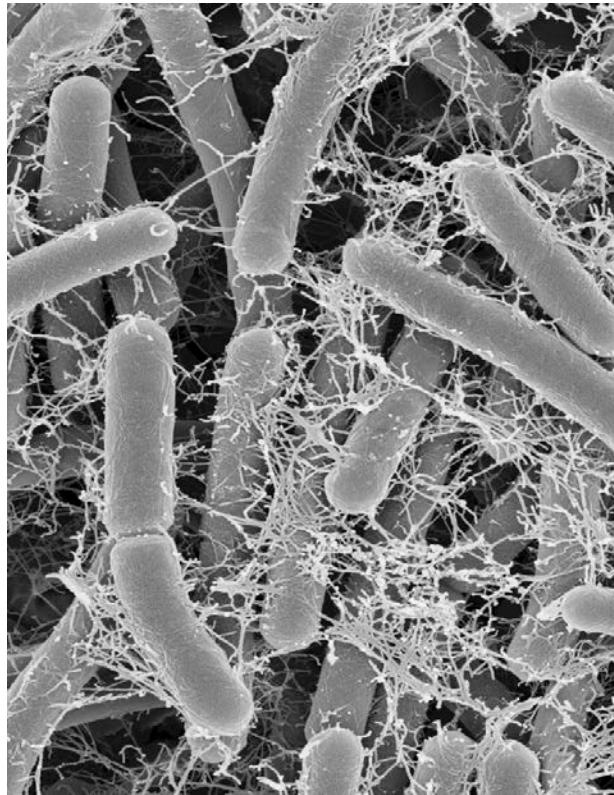


**Grampositive,
sporenbildende,
obligat anaerobe Stäbchen**

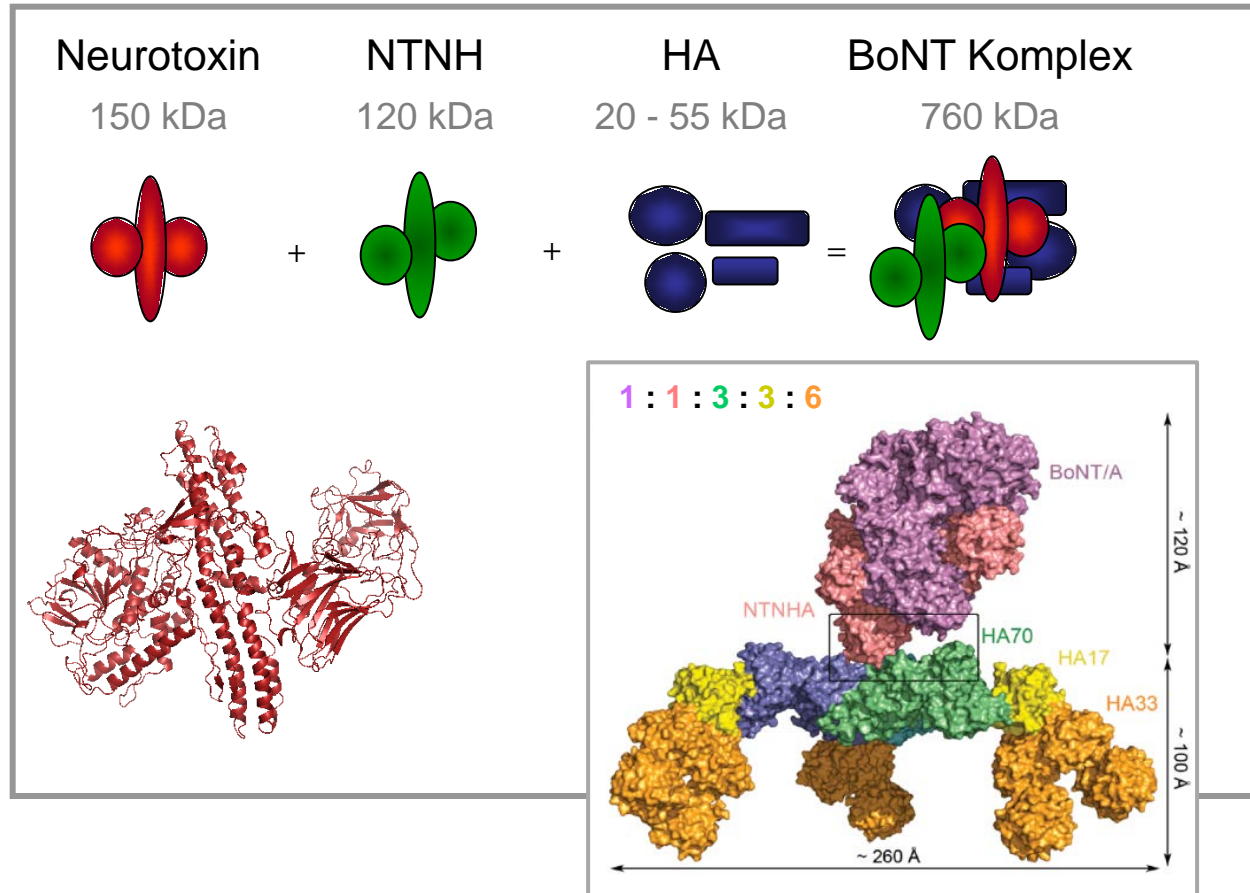




Komplexität der Botulinum Neurotoxine



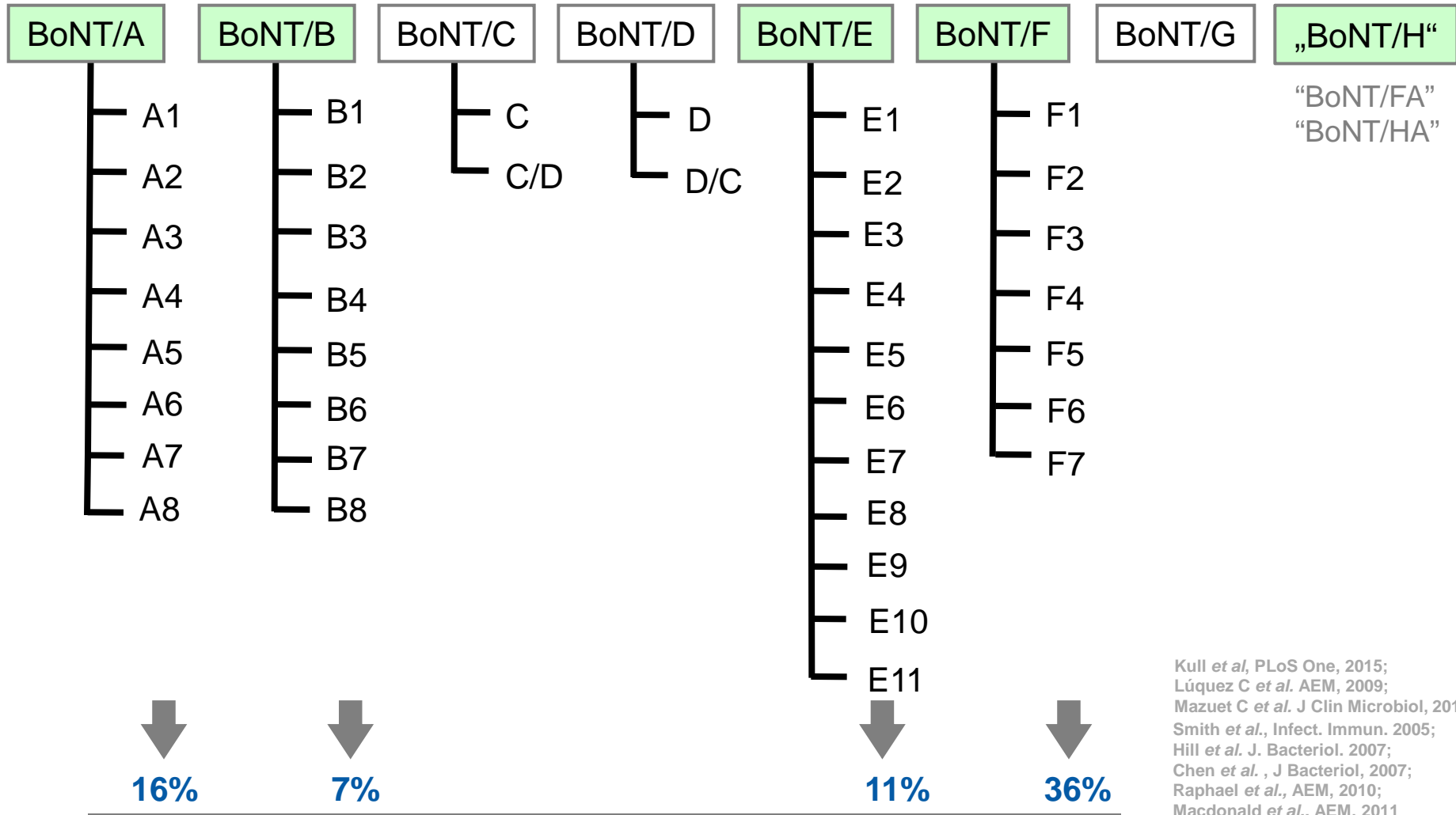
**Grampositive,
sporenbildende,
obligat anaerobe Stäbchen**



Benefield *et al.*, PNAS 2013
Lee *et al.*, PLOS Path. 2013



Derzeit bekannte BoNT Sero- und Subtypen

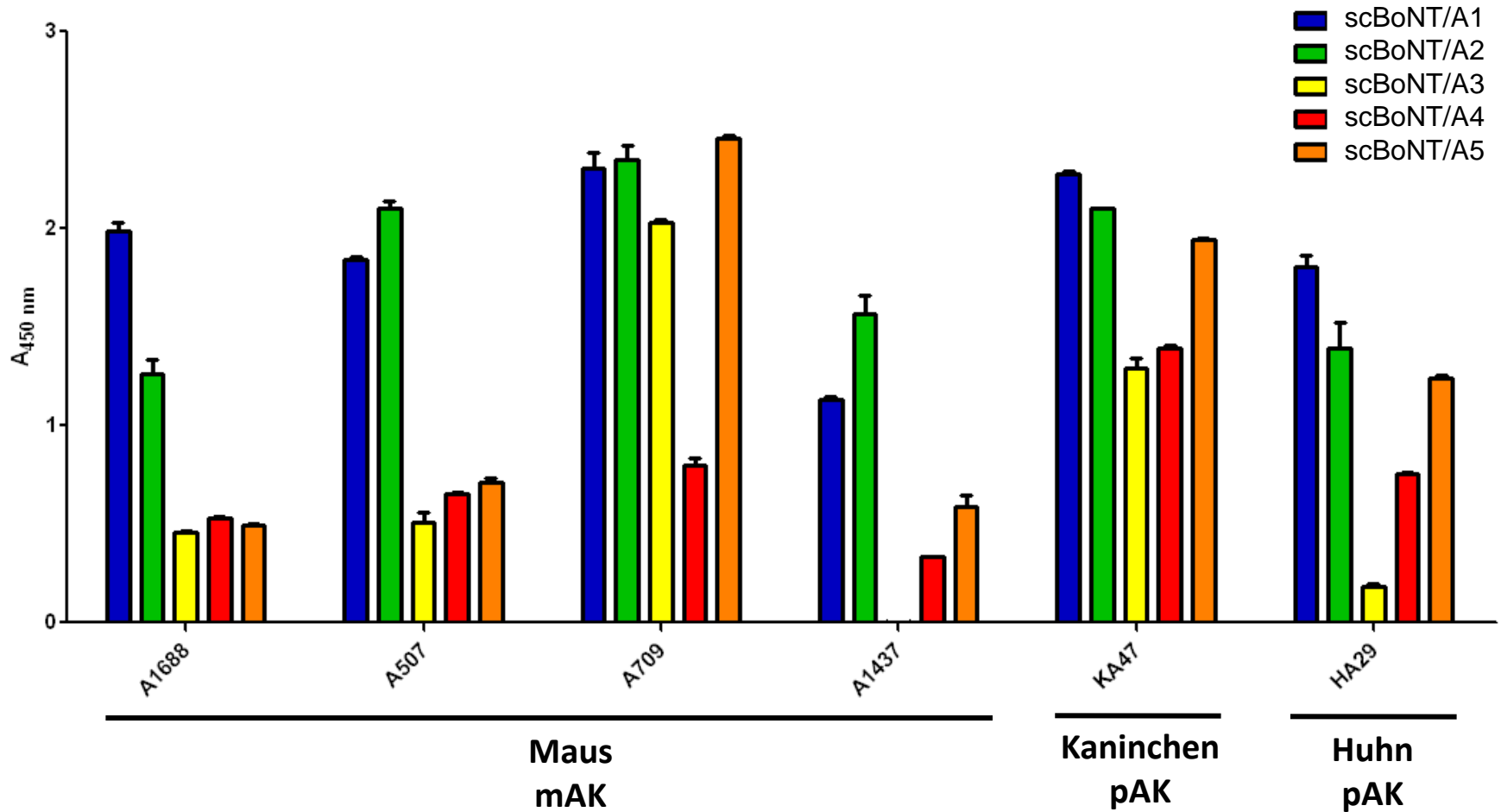


Variabilität der Subtypen auf AS-Ebene

Kull *et al.*, PLoS One, 2015;
 Lúquez C *et al.* AEM, 2009;
 Mazuet C *et al.* J Clin Microbiol, 2012;
 Smith *et al.*, Infect. Immun. 2005;
 Hill *et al.* J. Bacteriol. 2007;
 Chen *et al.*, J Bacteriol, 2007;
 Raphael *et al.*, AEM, 2010;
 Macdonald *et al.*, AEM, 2011
 Dover / Barash *et al.* JID 2013

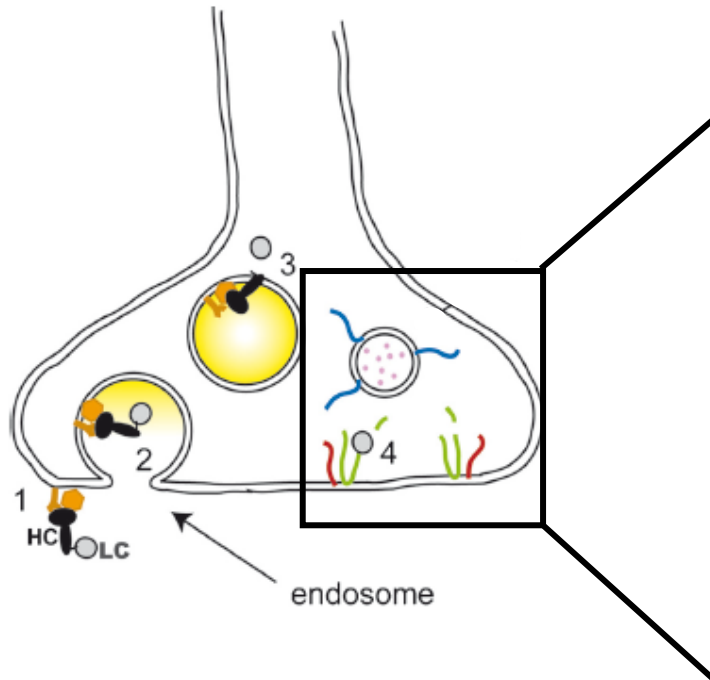


Das Subtypen-Problem...



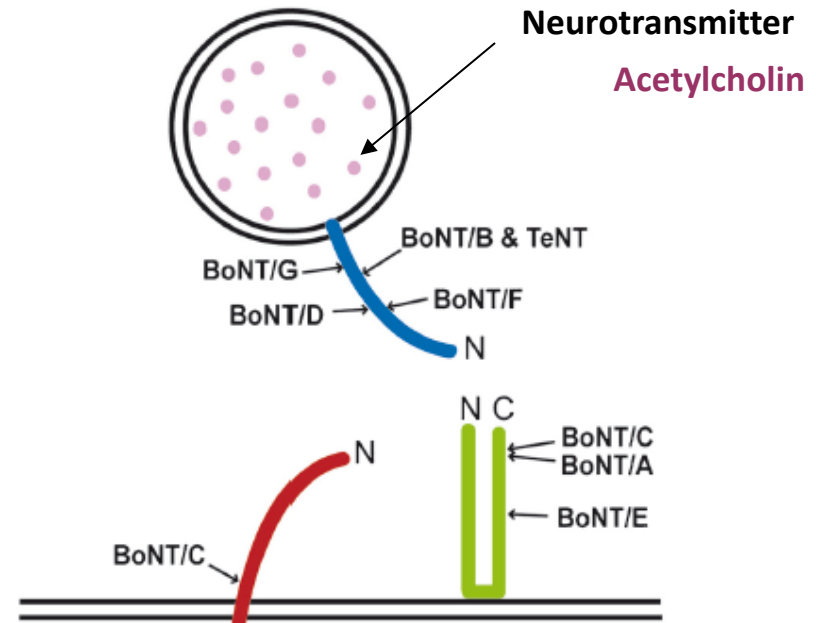


Wirkungsweise der BoNTs



- 1: Andocken des 150 kDa-BoNT
- 2: Endozytose
- 3: Freisetzung der LC ins Zytoplasma
- 4: Spaltung von SNARE-Proteinen:
SNAP-25, VAMP/syntaxin, syntaxin

Brunger *et al.* (2008) Cell.Mol.Life Sci.



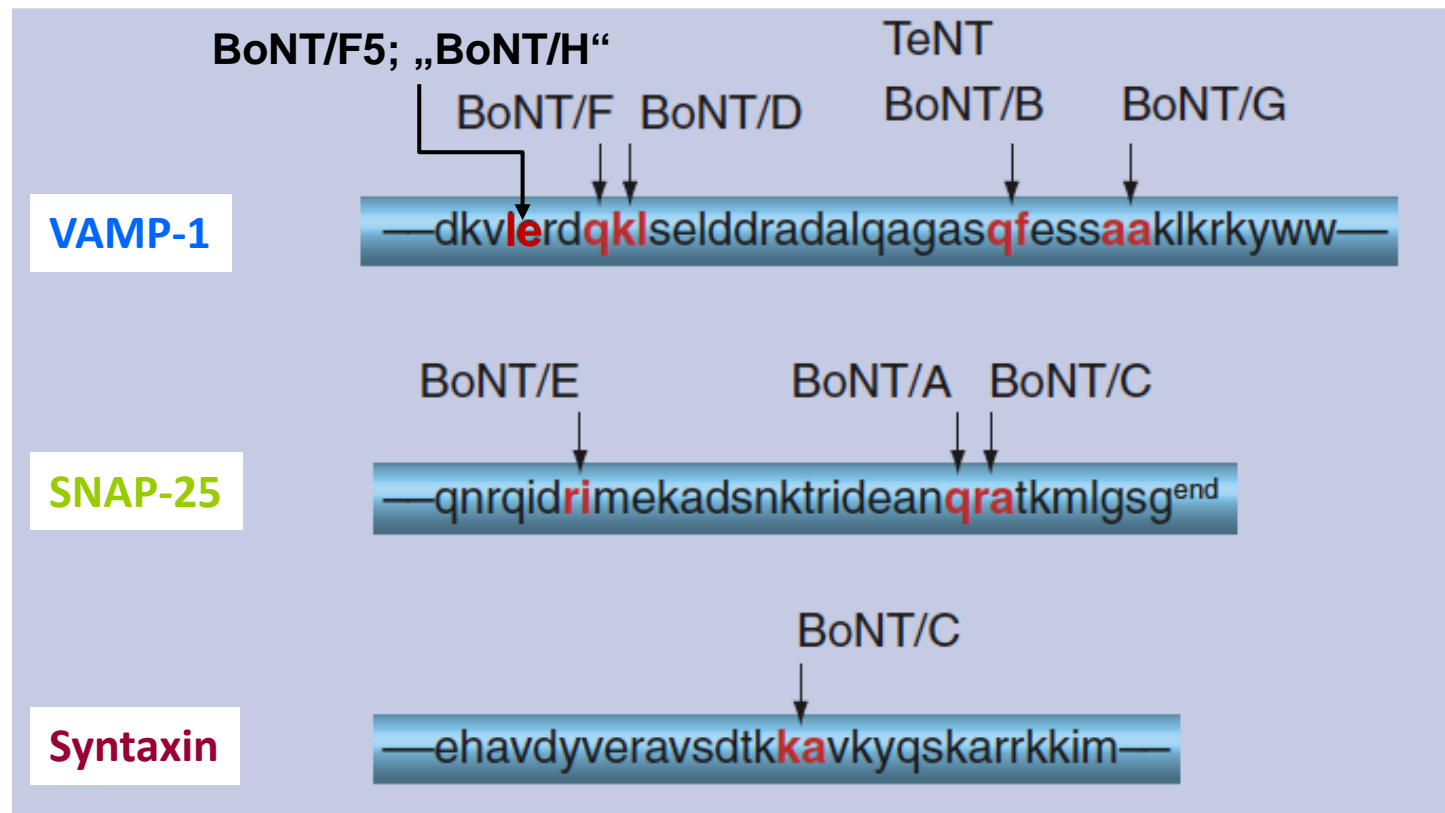
**Blockade der Neurotransmitter-
freisetzung, Paralyse**



Funktionelle Aktivität der BoNTs

Alle Subtypen eines Serotyps schneiden proteolytisch an derselben Aminosäuresequenz des synaptischen Substatmoleküls (Ausnahme: BoNT/F5)

>> Reduktion der Variabilität durch Messung der enzymatischen Aktivität



S. Kalb *et al.*, FEBS Letters, 2012; MR Popoff, P Bouvet. Future Microbiol., 2009

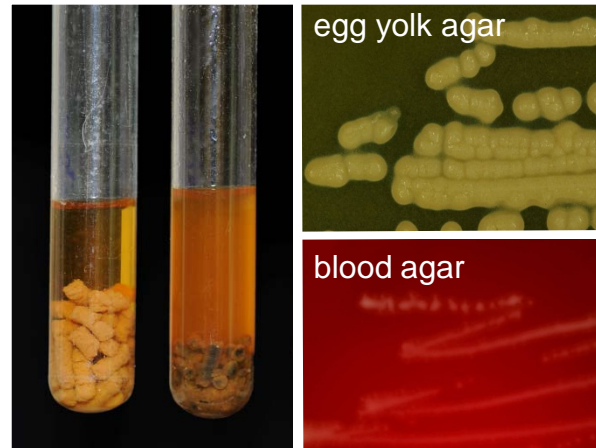


Diagnostik im KL für *C. botulinum*

Lebensmittel,
Klinische Proben,
Umweltproben



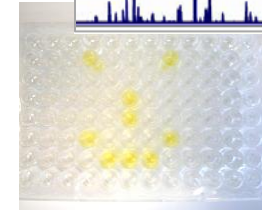
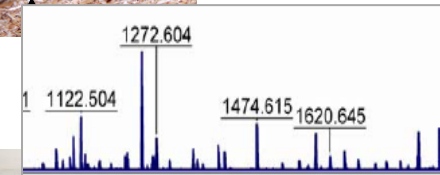
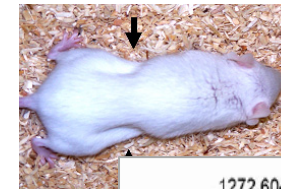
Homogenisierung,
Anaerobe Kultur bei
28°C / 37°C
+/- EtOH-Behandlung



Einzelkolonie:

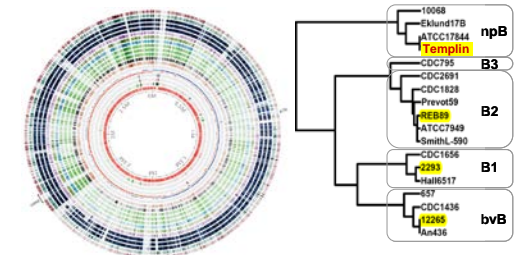
- anaerobes Wachstum
- Gram-positiv
- Katalase-negativ
- Sporenbildung

Detektion von BoNT:



Detektion des Pathogens:

Sequenzierung BoNT Gen,
Komplexgene; 16S rRNA-Gen,
Genomsequenzierung



Homogenisierung,
direkte Analyse



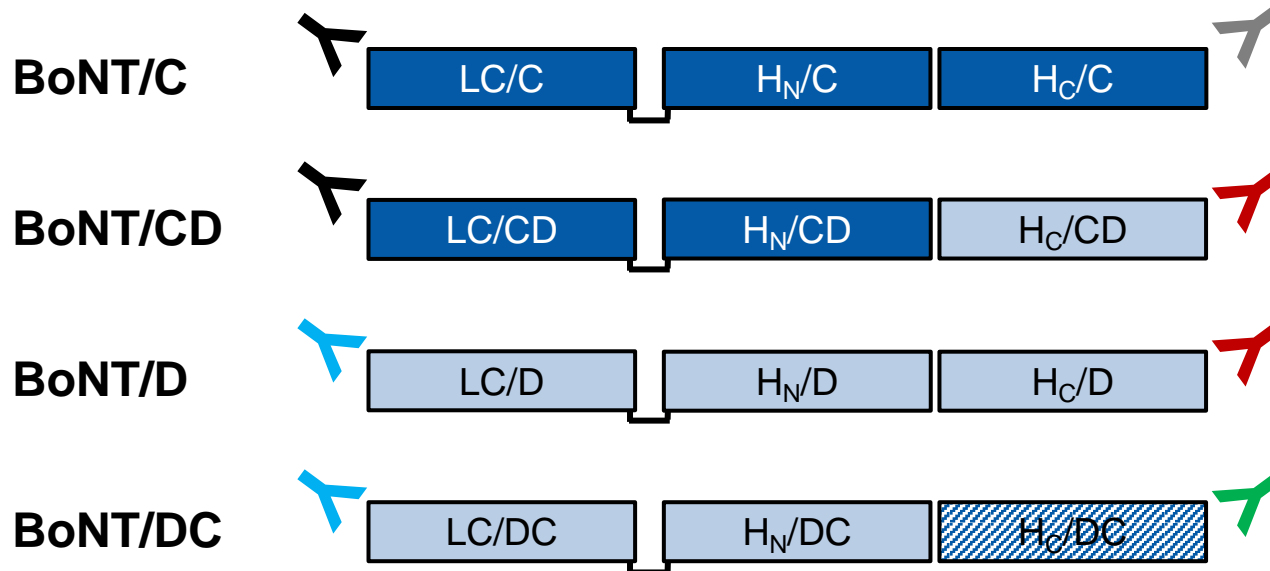
Immunologische BoNT-Detektion

Antigen	monoklonale Antikörper (Maus IgG)	polyklonale Antikörper (Huhn IgY)	polyklonale Antikörper (IgG)
BoNT/A	✓ (20 mAK)	✓	✓
BoNT/B	✓ (5 mAK)	✓	✓
BoNT/C	✓ (10 mAK)	✓	--
BoNT/D	✓ (2 mAK)	✓	--
BoNT/E	✓ (7 mAK)	✓	✓
BoNT/F	✓ (4 mAK)	✓	✓

Pauly et al., *Analyst*, 2009; Pauly et al., *Poult. Sci.*, 2009; Weingart et al., *AEM*, 2010;
Simon et al., *Toxins*, 2015; Hansbauer et al., *Analyst*, 2016;



Veterinärmedizinisch relevante BoNTs



Neu: Vier spezifische mAK-Kombinationen zur Differenzierung und Quantifizierung

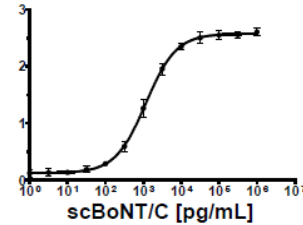
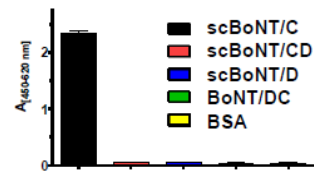
- 92-97% Sequenzidentität der homologen Domänen untereinander
- 92-98% Sequenzidentität der homologen Domänen untereinander
- 74% Sequenzidentität zu H_C/C Subdomäne

Hansbauer *et al.*, Analyst, 2016



Veterinärmedizinisch relevante BoNTs

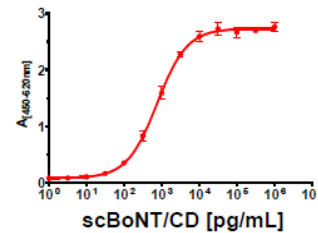
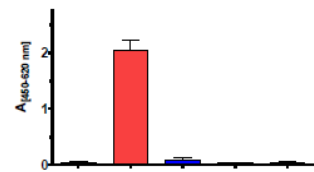
BoNT/C ELISA



Limit of detection:

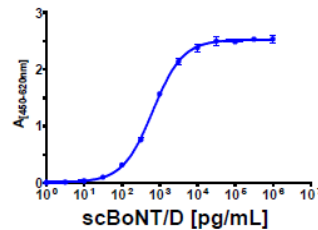
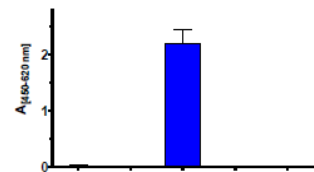
11 pg/mL

BoNT/CD ELISA



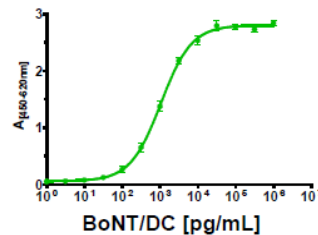
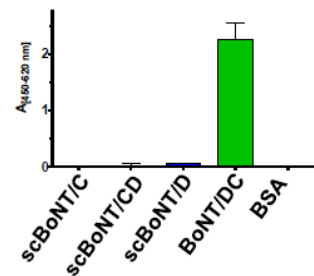
24 pg/mL

BoNT/D ELISA



2 pg/mL

BoNT/DC ELISA

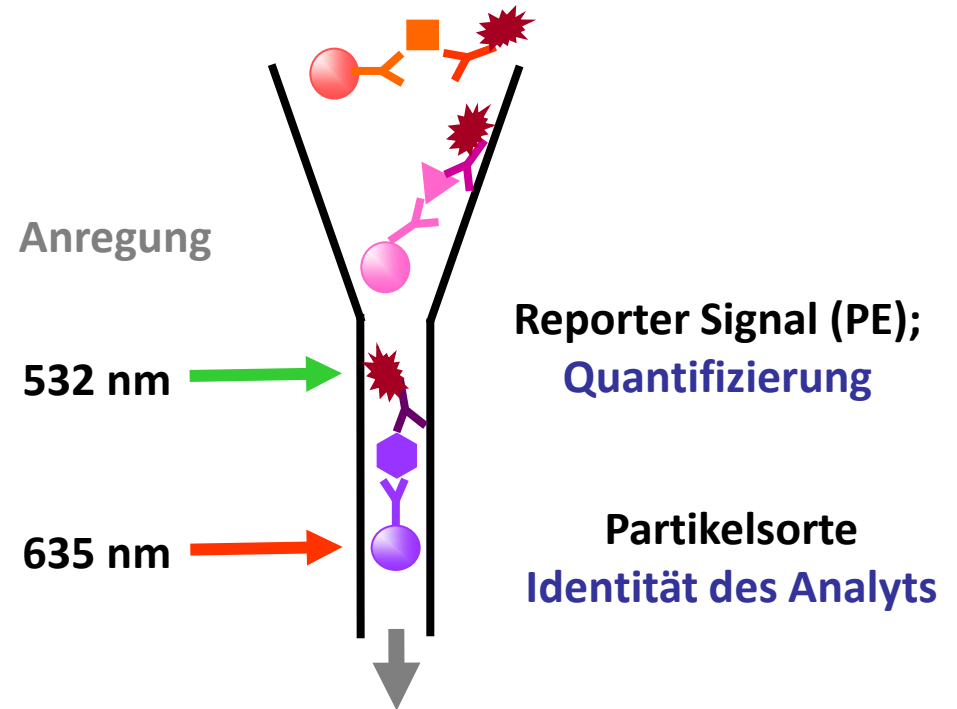
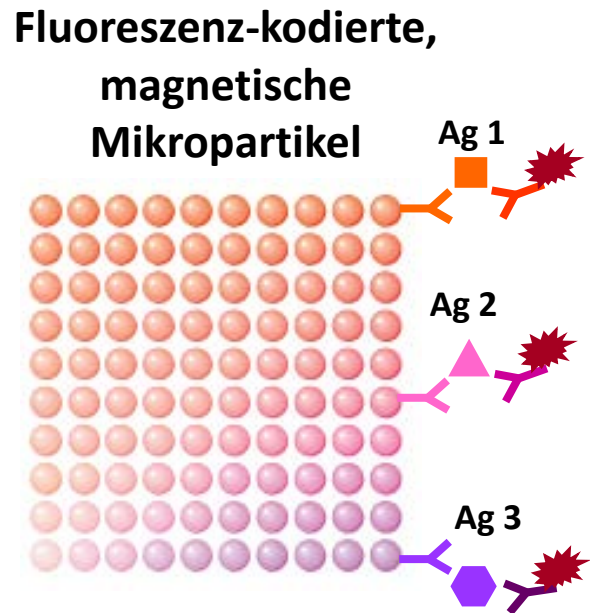


16 pg/mL

Hansbauer *et al.*, Analyst, 2016



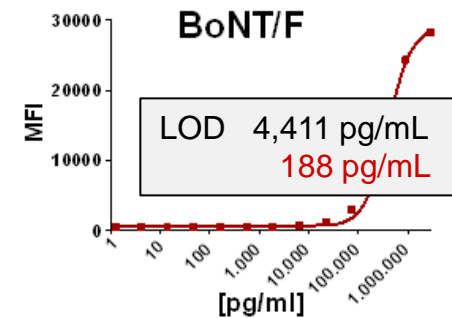
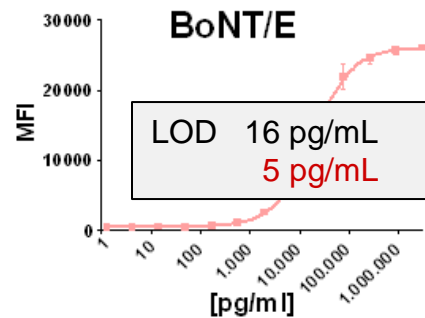
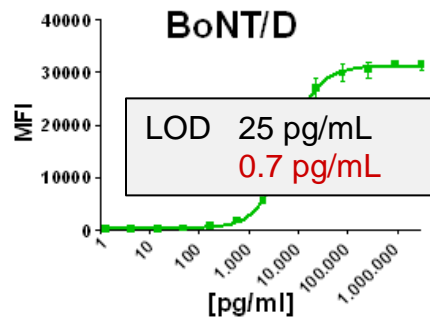
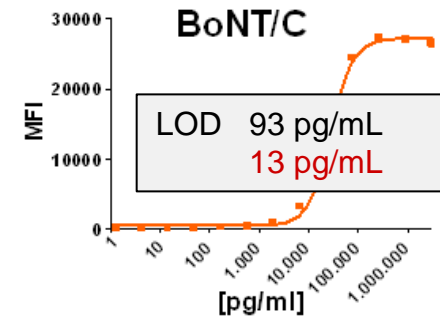
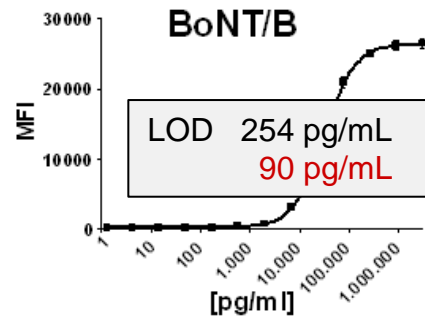
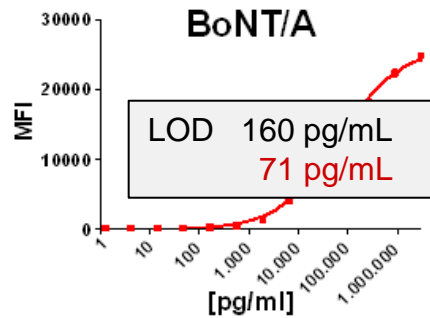
Suspensionsarray: Luminex-Technik



D. Pauly *et al.*, 2009. *Analyst* 134, 2028; Ch. Steiniger, ZBS3 / RKI, unpublished;



Suspensionsarray: Luminex-Technik

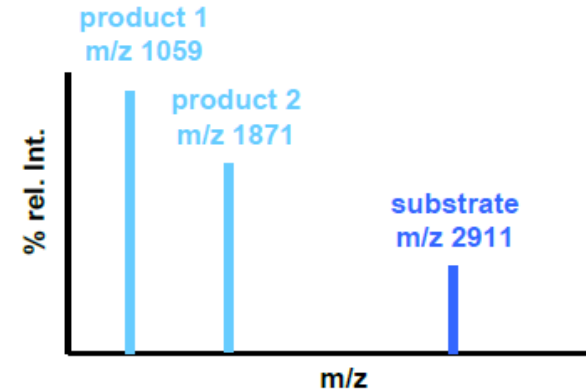
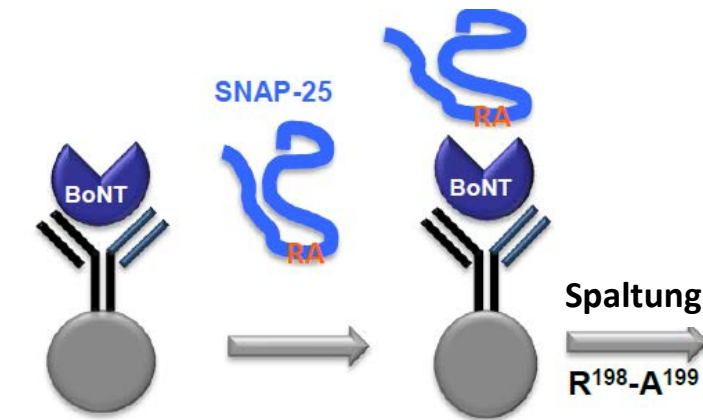


Detektion aus V = 50 μ L; V = 1 mL

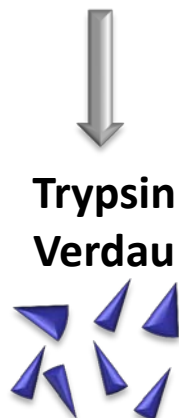
D. Pauly *et al.*, Analyst 2009; Ch. Steiniger, ZBS3 / RKI, unpublished;



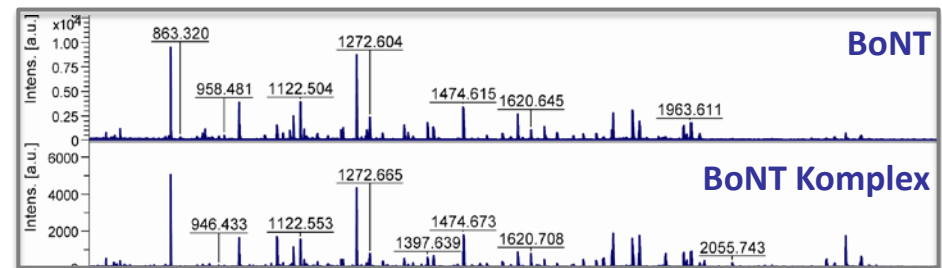
Massenspektrometrische Bestätigungsdiagnostik



Kalb *et al.*, Anal Biochem 2006;
Moura *et al.*, FEMS IMM 2011



Identifizierung
spezifischer
Peptide mittels
LC-MS/MS



Hansbauer *et al.*, Analyst, 2016



Kreuzvalidierung von Detektionsmethoden

BoNT Serotyp	Stamm	ELISA	Real-time PCR	MBA	Endopep-MS (Differenzierung)	LC-MS/MS (Sequenzabdeckung)
C	NCTC8548	C	C	+	C	BoNT/C (82%)
CD	C6814	CD	CD	+	CD	BoNT/CD (61%)
D	D4947	D	D	+	D	BoNT/D (65%)
DC	Eppendorf	DC	DC	+	DC	BoNT/DC (71%)

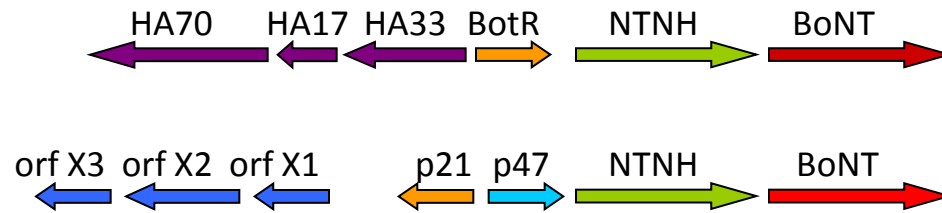
Hansbauer *et al.*, Analyst, 2016

Überprüfung der Spezifität mit > 90 Stämmen und Primärproben



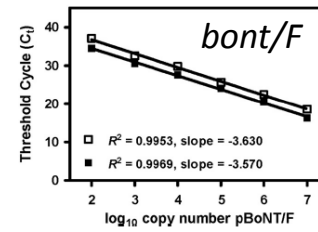
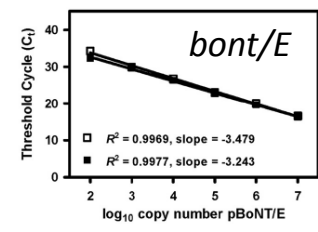
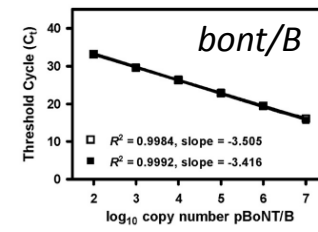
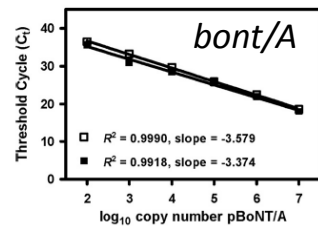
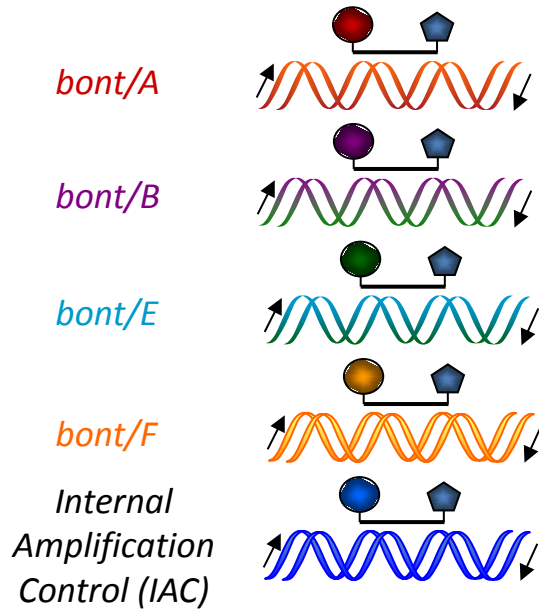
Molekularbiologische Methoden

Nachweis des konservierten *ntnh*-Gens als Surrogatmarker für BoNT



Raphael et al., *J. Microbiol. Methods*, 2007

Nachweis der *bont*-Gene mittels Multiplex TaqMan PCR



Kirchner et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010



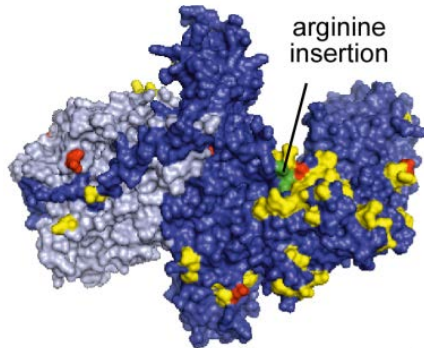
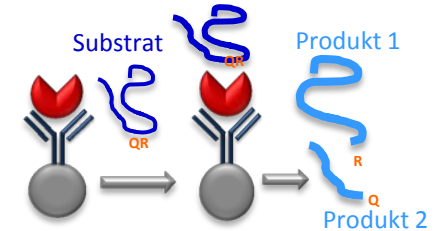
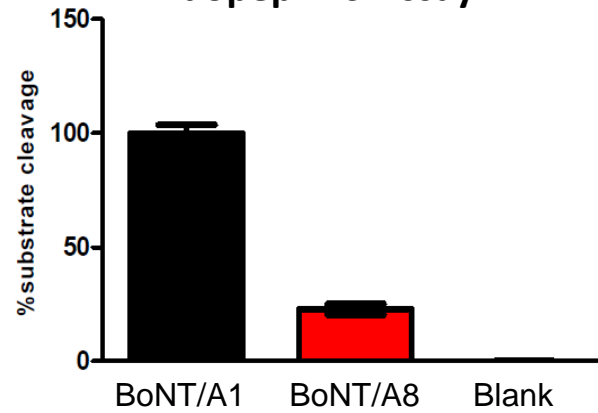
Fallbeispiel I aus dem KL für *C. botulinum*

- Lebensmittelbotulismus, Chemnitz (2007): ♂ 63 Jahre
- Neue BoNT Subtypen auch in DE!

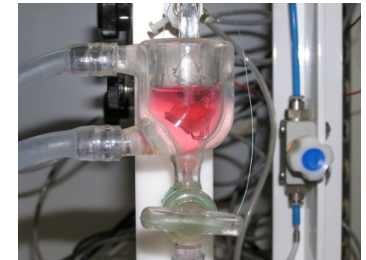
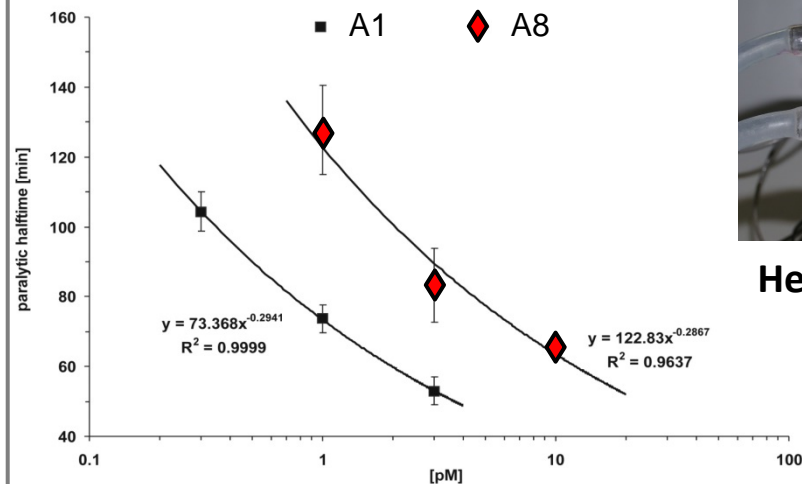


Kull *et al.*,
PLOS One, 2015

Endopep-MS Assay



Neuer Subtyp: „BoNT/A8“
6.6% to 12.3% Unterschied
zu bekannten BoNT/A1-A7



Hemidiaphragma Assay



Fallbeispiel II aus dem KL für *C. botulinum*

- Lebensmittelbotulismus, Banska Bystrice, Slowakei (2015): ♂ 42 J.
- Kommerzielles Hummus-Produkt als voraussichtliche Quelle
- Rückruf-Aktion!

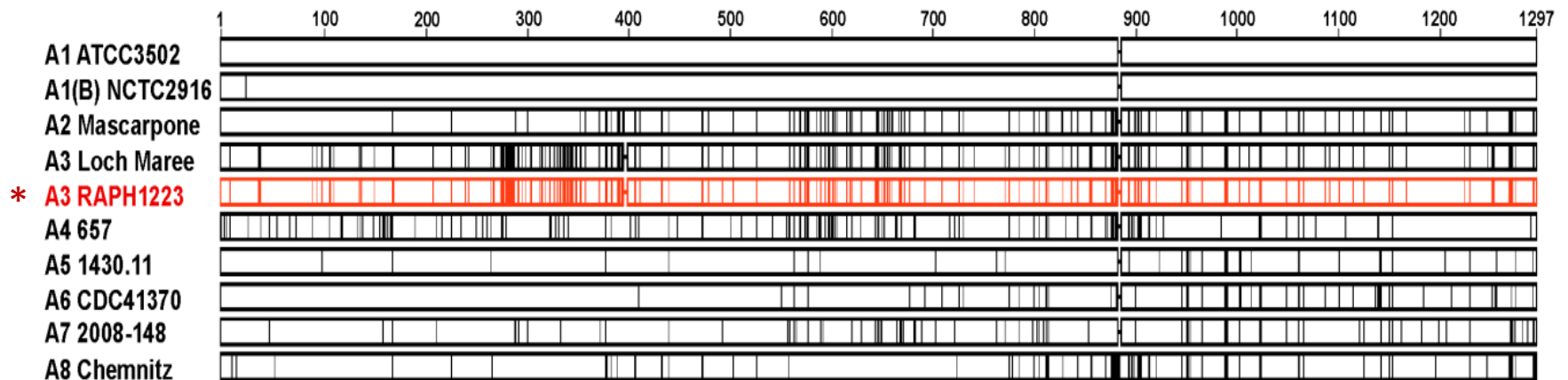
Maďarová *et al.*, (eingereicht)



@ Wikipedia / David Crocker, CC BY-SA 2.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9189575>

Erster und zuvor
 einzig bekannter Fall,
 der durch BoNT/A3
 ausgelöst wurde:

1922; Loch Maree, UK
 (8 Tote)



* BoNT/A3: extrem seltener Subtyp mit 15,4% Divergenz von BoNT/A1 auf AS-Ebene



Fortschritte im Bereich Standardisierung

EU Projekt EQuATox: www.equatox.eu

Aufbau von Qualitätssicherungsmaßnahmen im Bereich biologischer Toxine



Teilnehmer:

35 Labore aus 20 Ländern
aus dem **Sicherheits-,
Gesundheits- und
Lebensmittelsektor**

Grant Agreement N°: 285120
Coordination and Support Action

2012 - 2014

EU Contribution: 1,338,634 EUR

Rizin

Saxitoxin

**Staphylokokken
Enterotoxin B**

**Botulinum
Neurotoxine**

Chemiewaffenübereinkommen

Biologiewaffenübereinkommen



1. Internationaler Leistungstest: BoNT-Detektion

- Botulinum Neurotoxin A, B & E (0,5 ng/mL–1000 ng/mL)
 - Probenmatrices: Puffer, Serum, Milch, Fleischextrakt
 - Teilnehmer: 23 internationale Labore
-
- Einige Labore hatten Probleme mit der Untersuchung von klinischen Proben, insbesondere Serumproben
 - Es gab Probleme mit der Spezifität und Sensitivität der angewendeten Verfahren, insbesondere bei der Analyse von Mischung verschiedener Serotypen
 - Die Quantifizierung von BoNT erwies sich als verbesserungswürdig



Notwendigkeit von Referenzmaterialien und weiteren QM-Maßnahmen

http://www.mdpi.com/journal/toxins/special_issues/detect-identi-toxins

Worbs *et al.*, Toxins, 2015; Weisemann *et al.*, Toxins, 2015; Simon *et al.*, Toxins 2015; Kalb *et al.* Toxins 2015; Bigalke *et al.*, Toxins 2015



Zusammenfassung

Herausforderungen in der BoNT-Diagnostik

- Hohe molekulare Variabilität der BoNT-Moleküle
 - sieben Serotypen mit > 40 Subtypen sowie Mosaik-Toxine
 - Funktionelle Diversität
- Sehr seltene und neuartige BoNT-Subtypen kursieren!
- Komplexität der BoNT-Moleküle: Erfassung aller Neurotoxine und Komplexe, je nach Untersuchungsmatrix
- Zugänglichkeit aller beschriebenen Subtypen für Validierungszwecke

Unsere Strategie, um mit der molekularen Variabilität der BoNTs umzugehen:

- Kombination verschiedener Methoden auf technisch unabhängigen Ebenen
 - Kombination von hochspezifischen und pan-spezifischen Immunoassays
 - Massenspektrometrische Bestätigungsdiagnostik
- Reduktion der Variabilität durch funktionelle *in vitro* Assays: Adressierung der katalytischen Aktivität – geringere Variabilität als antigene Struktur

Notwendigkeit der nationalen und internationale Vernetzung, um Qualitätssicherungsmaßnahmen zu entwickeln und zu implementieren



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



**Konsiliarlabor
für *C. botulinum*:**

 **DornerB@rki.de**

 **030/18754 2500**

**Robert Koch-Institut
Berlin**
Eva-Maria Hansbauer
Martin Skiba
Melanie Schulz
Skadi Kull
Charlotte Steiniger
Diana Pauly
Tanja Schreiber
Sebastian Kirchner
Laura von Berg
Daniel Stern
Maren Krüger
Sylvia Worbs
Martin Dorner

CDC, USA
Suzy Kalb
John Barr

**Medizinische Hochschule
Hannover**

Stefan Mahrhold
Jasmin Weisemann
Andreas Rummel

LGL Oberschleißheim
Ute Messelhäuser

ANSES, Maisons-Alfort, F
Cédric Woudstra
Patrick Fach

CEA, Marcuole, F
Laurent Bellanger



FUNDING