

Clostridium botulinum

Molekularbiologischer Nachweis der Toxingene von Nahrungsmitteln

Burkhard Schütze

2009 rettete die Gabe von *Botulinum*-Antitoxin einer Frau in Sachsen-Anhalt das Leben. Erst die rechtsmedizinische Untersuchung des Todes ihrer Tochter kurz zuvor ließ den Verdacht auf Botulismus aufkommen, der auf eine gemeinsame Mahlzeit aus selbst eingelegten Heringen zurückgeführt werden konnte. Aus deren Resten ließen sich neurotoxinbildende Stämme des Bakteriums *Clostridium botulinum* nachweisen.



Dr. rer. nat. Burkhard Schütze

›› **Zur Person**
amtlich zugelassener Sachverständiger für Lebensmittel, Laborleiter Lebensmittelanalytik der LADR GmbH in Geesthacht ‹‹

Laut Robert Koch-Institut (RKI) hatten die Ärzte der Klinik die Vergiftung vermutlich deshalb nicht erkannt, weil es im Landkreis seit mehr als 30 Jahren keine *Botulinum*-Intoxikation mehr gegeben hatte. In der Tat sind derartige Fälle selten, die Sterblichkeitsrate bei Betroffenen liegt mit 30 bis 50 % jedoch sehr hoch, da es sich bei *Botulinum*-Neurotoxin (BoNT) um die giftigste bisher bekannte natürliche Substanz handelt.

Im Verdachtsfall ist der sichere Nachweis des Gifts jedoch nur im Tierversuch möglich. Der direkte Nachweis der Bakterien ist sehr aufwändig und schwierig. Das molekularbiologische Labor der LADR GmbH in Geesthacht bietet ein Verfahren an, das diese Nachteile nicht hat: Mittels kommerzieller Real-Time-PCR können Toxingene von *C. botulinum* nachgewiesen werden. Bei einem positiven Ergebnis ist die Bildung des Gifts durch das Bakterium im betroffenen Lebensmittel möglich.

Neurotoxin BoNT

Wie andere Arten von Clostridien kommt auch *Clostridium botulinum* weltweit natürlich im Boden sowie in den Sedimenten von Gewässern und Meeren vor. Durch

Staub- und Erdpartikel kann das grampositive, obligat anaerobe Bakterium auch auf Lebensmittel gelangen. Keimen die Sporen aus und vermehrt sich *C. botulinum* vom Typ A, B, E oder F dort, können auch die Neurotoxine (BoNT) gebildet werden. Solche toxinhaltigen Lebensmittel sind lebensgefährlich: Werden sie verzehrt, führt dies zu Vergiftungserscheinungen, dem sogenannten Botulismus. *C. botulinum* Typ E steht meist mit dem Verzehr von rohem oder ungenügend erhitztem Fisch in Zusammenhang. Die Ostsee gilt als eine der am höchsten kontaminierten Gegenden weltweit für diesen Clostridien-Stamm. Etwa 4 % der untersuchten Ostseeheringsproben enthalten *C. botulinum* Typ E.

Das Neurotoxin BoNT ist extrem toxisch und der giftigste bisher bekannte natürlich vorkommende Stoff (siehe Abb. 1). Da er die Schlüsselproteine der Reizleitung in den Nervenzellen zerstört, tritt ohne eine schnelle Gabe von Antitoxinen der Tod durch Atemlähmung oder Herzstillstand ein. Das Antitoxin neutralisiert frei im Blut zirkulierendes Gift, ist jedoch unwirksam, wenn das Gift bereits an den Nervenstrukturen gebunden ist. Daher spielt bei ei-

ner verdächtigen Erkrankung die Zeit bis zur Diagnose eine extrem wichtige Rolle. Die Hauptsymptome der Erkrankung sind Erbrechen, Durchfall, Atemnot, Schluckbeschwerden sowie Seh- und Motorikstörungen. Laut RKI wurde seit 2001 von 80 Fällen von lebensmittelbedingtem Botulismus berichtet.

Intestinaler Botulismus

Eine Sonderform stellt der intestinale Botulismus bei Kleinstkindern dar. Gut untersucht ist hier der Weg über Honig, der von Natur aus mit wenigen Sporen (< 100 Sporen/kg Honig) Clostridien wie beispielsweise *C. botulinum* (siehe Abb. 2) kontaminiert sein kann. Da bei Säuglingen die Magensäureproduktion noch nicht ausreichend ist, können Sporen in den Darm gelangen, auskeimen, sich vermehren und hier *Botulinum*-Toxin produzieren. Wie bei Erwachsenen wird das Gift resorbiert und gelangt zu den Nervenzellen. Erwachsene sind dank ihres Immunsystems, der

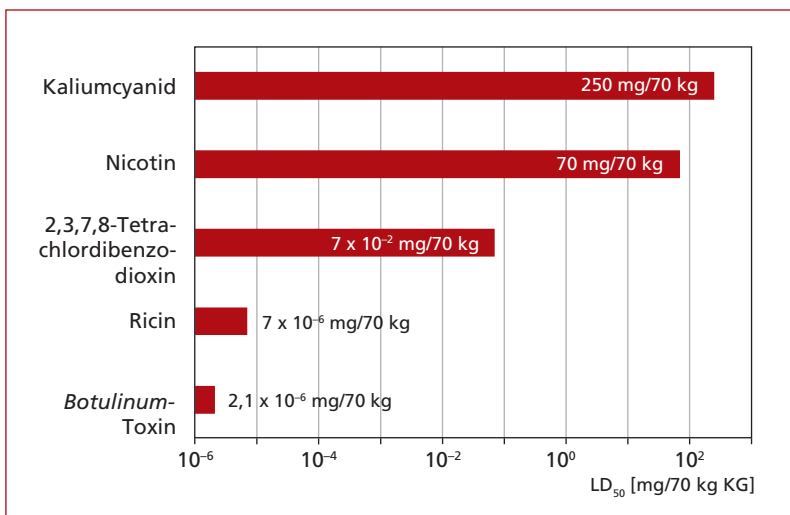


Abb. 1 Die Skala (logarithmische Darstellung) zeigt die letalen Dosen von Kaliumcyanid, Nicotin, TCDD, Ricin und *Botulinum*-Toxin, bei denen 50 Prozent der Versuchstiere starben. Bei *Botulinum*-Toxin reichen wenige µg aus, um einen erwachsenen Menschen zu töten.

Magensäure und ihrer größeren Körpermasse im Verhältnis zu Säuglingen in der Regel durch Honig nicht gefährdet.

Seit mehr als 50 Jahren sind die DGF-Einheitsmethoden das Standardwerk zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Die vierbändige Loseblattsammlung ist eine umfassende Zusammenstellung validierter Analysenverfahren, die dem aktuellen Wissensstand der Fettanalytik gerecht wird.

Internationale Normen werden in einer leicht verständlichen und praxisnahen Form beschrieben, die es dem Anwender leicht macht, diese sofort im Laboralltag anzuwenden. Daneben finden sich auch viele Methoden, die in internationalen Normen noch nicht veröffentlicht wurden.

Ein Großteil der Methoden liegt bereits in englischer Sprache vor. Diese moderne Methodensammlung ist unentbehrlich für Labore, die Routinemethoden im Bereich der Fett- und Tensidanalytik einsetzen müssen.

Aktuelles Inhaltsverzeichnis und Methodenregister im Internet: www.dgfett.de/methods/index.htm



Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V.
2. Aufl. inkl. 21. Akt.fg. 2015. 3052 Seiten.
Mit archivierten Methoden auf CD-ROM.
Loseblattausgabe. 4 Ringordner. Fortsetzungswerk.
ISBN 978-3-8047-3397-8. € 218,- [D]

Vorzugspreis für Mitglieder der DGF und von Euro Fed Lipid: € 152,60 [D]

Alle Preise inklusive MwSt. (D), sofern nicht anders angegeben. Lieferung erfolgt versandkostenfrei innerhalb Deutschlands. Lieferung ins Ausland zuzüglich Versandkostenpauschale von € 8,90 pro Versandstück. Aktualisierungslieferungen zu Loseblattwerken und Buchfortsetzungen werden automatisch vorgemerkt und nach Erscheinen berechnet und geliefert. Diese Fortsetzungen können jederzeit abbestellt werden.

WVVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
Birkenwaldstraße 44 | 70191 Stuttgart
Telefon 0711 2582 -341 | Telefax 0711 2582 -390
www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de

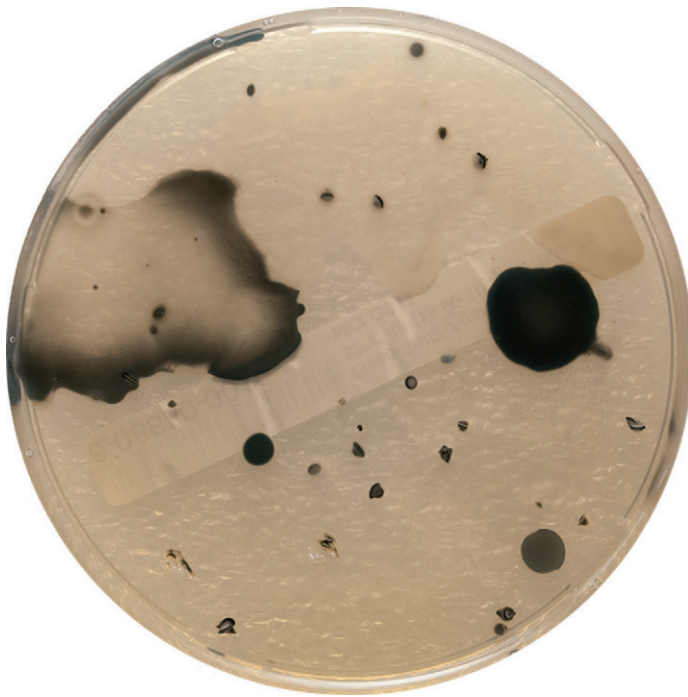


Abb. 2
Sulfitreduzierende
Clostridien

**Direkter Nachweis von Bakterium
und Toxin sehr aufwändig**

Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate bei Botulismus sind Untersuchungen auf Anwesenheit oder Abwesenheit von *C. botulinum* bei gefährdeten Lebensmitteln wie Honig, Säuglingsnahrung,

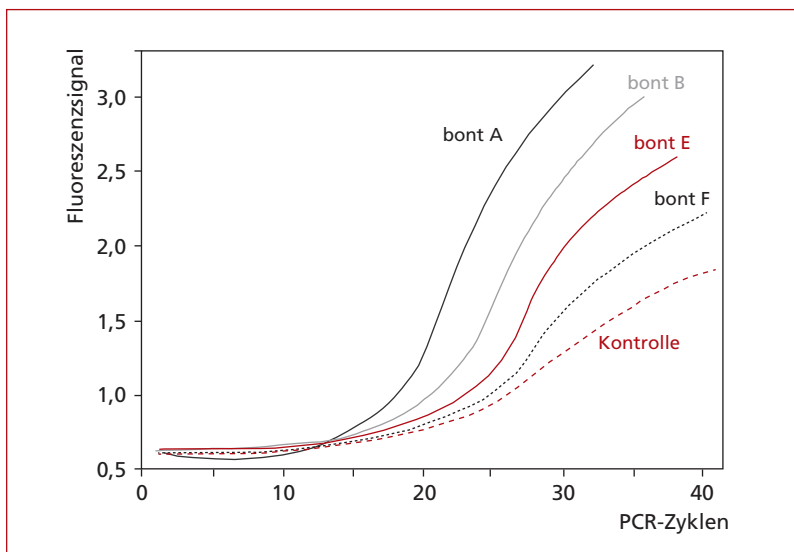


Abb. 3 Bei der Real-Time-Multiplex-PCR werden Fluoreszenzsignale gemessen. Wird ein Toxingen repliziert, steigt das Signal exponentiell an. Der Nachweis auf DNA-Ebene ist damit erbracht.

Konservendosen, dem Inneren von Fleisch- und Fischwaren oder vakuumverpackten Lebensmitteln wie Räucherfisch und Wurstwaren von besonderem Interesse. Allerdings erfolgt die Überprüfung der Lebensmittel auf *C. botulinum* routinemäßig eher selten. Häufiger lassen Lebensmittelhersteller lediglich überprüfen, ob ihre Produkte frei von Sulfit reduzierenden Clostridien sind.

Der direkte Nachweis des Bakteriums ist im Labor unzweifelhaft sehr aufwändig: Der Nachweis von *Clostridium botulinum* gemäß § 64 LFGB ist nach der Methode 06.00-26 durchzuführen. Das Untersuchungsverfahren umfasst viele Einzelschritte und dauert bis zur Isolation von Reinkulturen eine Woche und länger. Der sichere Toxinnachweis ist aus Serum, Erbrochenem oder Lebensmittelresten nach wie vor nur im Tierversuch, mit dem sogenannten Toxin-Mäusetest möglich. Man injiziert dabei aufbereitete, erhitzte und nicht erhitzte Homogenate des verdächtigen Lebensmittels und Extrakte aus Anreicherungs- und Reinkulturen an Mäuse und beobachtet die Versuchstiere. Sterben daraufhin die Tiere, denen die nicht erhitzten Homogenate injiziert wurden, mit den typischen Symptomen und überleben Vergleichsgruppen, die mit Antitoxin geschützt wurden, gilt dies als Nachweis für das Vorhandensein von BoNT in der Probe. Dieser Nachweis ist Bestandteil der amtlichen Methode und wird in Dienstleistungslaboren nicht durchgeführt. Im Verdachtsfall von Botulismus sind Toxinuntersuchungen nötig, hier ist jedoch in erster Linie das Konsiliarlabor für *Clostridium botulinum* am RKI gefragt. Dort können auch immunologische und spektrometrische Verfahren zum Toxinnachweis durchgeführt werden.

Vereinfachter Nachweis mit Real-Time-PCR

War die mikrobielle Anzucht der Clostridien-Spezies aus den entsprechenden untersuchten Lebensmitteln erfolgreich, so besteht die Möglichkeit, die isolierten Bakterienkolonien mittels 16S-rRNA-

Gensequenzierung zu identifizieren. Molekularbiologisch ist hier jedoch, aufgrund von Sequenzhomologien, eine Unterscheidung zwischen *Clostridium botulinum* und *Clostridium sporogenes* nicht eindeutig möglich. Werden andere Clostridien-Arten ermittelt, liegt zumindest *C. botulinum* nicht vor. Die Sequenzierung ist verhältnismäßig teuer und kann nur von Speziallabors durchgeführt werden. Als Alternative dazu können zur Einschätzung des Risikos einer vermeintlichen Toxinbildung durch *C. botulinum* auch weitere schnellere molekularbiologische Verfahren herangezogen werden. Mit diesen ist es möglich, in Lebensmitteln die für den Menschen gefährlichen *Clostridium-botulinum*-Toxintypen A, B, E

oder F über die Toxingene (bont A, B, E, F) nachzuweisen (siehe Abb. 3).

Ablauf der Real-Time-Multiplex-PCR

Dafür wird zuerst eine für Clostridien geeignete anaerobe kulturelle Anreicherung durchgeführt. Anschließend erfolgt die DNA-Extraktion aus der TPGY-Anreicherungsbouillon und anschließend wird die Multiplex-PCR der Toxingene A, B, E und F durchgeführt. Fällt diese Untersuchung negativ aus, konnten folglich die Toxingene von *C. botulinum* nicht nachgewiesen werden. Die Lebensmittel sind also nicht mit *C.-botulinum*-Stämmen, die zur Toxinproduktion befähigt sein könnten, belastet. Werden hingegen die Toxingene

Labor und mehr

Neues von Legionellen

Der Krankheitserreger *Legionella pneumophila*, der u. a. in Warmwassersystemen vorkommt, vermehrt sich bei Temperaturen zwischen 50 und 60 °C, wie Wissenschaftler des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig in einer Studie zeigen konnten. Eine zusätzliche Gefährdung für den Menschen lässt sich aus diesem Befund nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand nicht ableiten. Welche Konsequenzen sich daraus für das Management von Heißwassersystemen, Klimaanlage und Kühltürmen ergeben, sollte nach Einschätzung der Forscher durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Legionellen verursachen in Europa Schätzungen zufolge jedes Jahr etwa 100 000 Fälle von schweren Lungenentzündungen. Die Legionellose, deren schwerste Form auch als Legionärskrankheit bezeichnet wird, tritt oft gehäuft in Form von Ausbrüchen auf, die viele Menschen erfassen. Wenn die Infektion nicht rechtzeitig erkannt wird, kann sie rasch zum Tod führen. Obwohl *L. pneumophila*, der wichtigste Krankheitserreger unter den Legionellen, seit 1976 bekannt ist, lassen sich Ausbrüche von Legionellosen bis heute nicht effizient verhindern. Die Keime vermehren sich in erster Linie in Warm- und Heißwassersystemen und gelangen über Wassertröpfchen in die Lunge der Menschen. Duschen, Kühltürme und Klimaanlage stellen wesentliche Infektionsquellen dar. Die deutsche Gesetzgebung sieht daher vor, dass alle relevanten Heißwassersysteme regelmäßig auf das Vorkommen von Legionellen hin untersucht werden.

Prof. Manfred Höfle, Leiter der Arbeitsgruppe Mikrobielle Diagnostik am HZI, koordiniert ein von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördertes Projekt über die Ökologie der Legionellen, an dem deutsche, palästinensische und israelische Partner beteiligt sind.

Höfle und seine Kollegen untersuchten die Legionellen-Population im Trinkwasser auf dem gesamten Weg von den natürlichen Reservoirs in Stauseen über Wasserspeicher und Leitungen bis hin zum Wasserhahn. Mittels molekularbiologischer Methoden stellten sie fest: Im heißen Leitungswasser kommen deutlich mehr Legionellen vor als im kalten. Auch wenn bei Legionellen im Wasser immer Wachsamkeit geboten ist, geben diese Befunde nach Aussage der Wissenschaftler bislang keinen Anlass zu zusätzlicher Sorge.

Lesnik R et al.: Legionella species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: from cold adaptation to thermophily. ISME J (2015), doi:10.1038/ismej.2015.199

Ihr Online-Zugang

Alle Inhalte der DLR erhalten Sie auch als PDF-Datei zum Download über die Website www.behrs-online.de.

Nach erfolgreicher **Registrierung in BEHR'S...ONLINE** geben Sie im Menü „Mein Konto“ Ihren Freischaltcode ein. Auf unserer Website www.dlr-online.de werden die Inhalte der DLR zukünftig nicht mehr aktualisiert.

nachgewiesen, besteht die Möglichkeit, dass die vorhandenen *C. botulinum*-Bakterien unter geeigneten Bedingungen auch tatsächlich die gefährlichen Toxine bilden könnten. Bei einem positiven PCR-Ergebnis wird zudem ein Ausstrich aus der TPGY-Anreicherungsbouillon gemacht. Nach 48 h und unter anaeroben Bedingungen werden verdächtige Kolonien im Eigelb-Lactose-Agar und im Blut-Agar erneut mittels Real-Time-PCR untersucht. Dabei wird eine zweite rt-PCR der Toxingene A, B, E und F durchgeführt. Werden auch hier die Toxingene „nachgewiesen“, bedeutet das, dass sich in der Lebensmittelprobe lebensfähige und zur Toxinbildung befähigte *Clostridium botulinum*-Bakterien befinden. Grundsätzlich gilt bei einem positiven Testergebnis, dass hier ein Umgang mit dem Lebensmittel im Sinne der Lebensmittelsicherheit für den Verbraucher maßgeblich ist und entsprechende Maßnahmen eingeleitet werden müssen.

Vorsicht bei Bombagen

Trotz der Labortests, die die Hersteller in Auftrag geben, sollten Verbraucher bei Risiko-Lebensmitteln – wie beispielsweise säurearmen Konserven, insbesondere mit selbst eingekochtem Fleisch, Fisch und Gemüse, vakuumverpacktem Knochen-schinken und Räucherfisch – große Vorsicht walten lassen. Dies zeigt auch der Fall der beiden Frauen aus dem Landkreis Stendal, die von einem selbstgemachten, nicht ausreichend gesäuerten Heringstopf aßen. Honig ist in diesem Zusammenhang nicht als Risikolebensmittel einzustufen, aber Säuglinge unter einem Jahr sollten

keinen Honig verzehren. Im Supermarkt findet sich auf Honig deshalb in der Regel der Hinweis: Honig ist naturbelassene Rohkost und daher für Kinder unter zwölf Monaten ungeeignet.

Die betroffenen Lebensmittel müssen nicht unbedingt geschmacklich verändert sein, auch besitzen nicht alle *C. botulinum*-Stämme Proteasen oder Lipasen. Ebenso ist die Gasbildung nicht obligat. Wenn es allerdings bei Konserven schon zu einer Bombage und bei Einweckgläsern zu einem selbsttätigen Öffnen gekommen ist, sollten vom Lebensmittel nicht einmal mehr kleinste Mengen probiert, sondern es sofort entsorgt werden. Grundsätzlich ist zu empfehlen, dass selbst eingewecktes Gemüse oder Fleisch zweimal erhitzt, also tyndalisiert wird. Die eventuell gebildeten Toxine von *Clostridium botulinum* und vegetative Bakterien werden im ersten Schritt durch die Hitze zerstört. Ausgekeimte Sporen werden erst im zweiten Schritt abgetötet.

Fazit

Da kommerziell hergestellte Konserven als sicher gelten, ist die Gefahr an Botulismus zu erkranken, heutzutage sehr gering. Dennoch stellt die Untersuchung der genannten Risiko-Lebensmittel auf die Toxingene von *Clostridium botulinum* ein schnelles und geeignetes Verfahren dar, um die Lebensmittelsicherheit zu erhöhen. ■

Die Spezial-Abteilung Lebensmittelanalytik der LADR GmbH in Geesthacht bei Hamburg arbeitet in der Regel im Auftrag von Lebensmittelunternehmen für die externe Qualitätskontrolle und nimmt somit Aufgaben für den gesundheitlichen Verbraucherschutz wahr. Das Labor führt unter anderem die Real-Time-Multiplex-PCR durch.

Anschrift des Autors

Dr. rer. nat. Burkhard Schütze
Laborleiter Lebensmittelanalytik
LADR GmbH – MVZ Dr. Kramer und Kollegen
Lauenburger Str. 67
21502 Geesthacht
lebensmittel@ladr.de
www.ladr-lebensmittel.de