

Botulismus heute: Klinische Relevanz und Diagnostik

Dr. Martin Dorner

Robert Koch-Institut

Zentrum für Biologische Sicherheit

Mikrobielle Toxine (ZBS3)

Botulismus, eine seltene Zoonose

Botulismus, eine Zoonose (2003/99/EG)

12.12.2003

DE

Amtsblatt der Europäischen Union

L 325/31

RICHTLINIE 2003/99/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES

vom 17. November 2003

zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates

Botulismus, eine seltene Zoonose

Botulismus, eine Zoonose (2003/99/EG)

12.12.2003

DE

Amtsblatt der Europäischen Union

L 325/31

RICHTLINIE 2003/99/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES

vom 17. November 2003

zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates

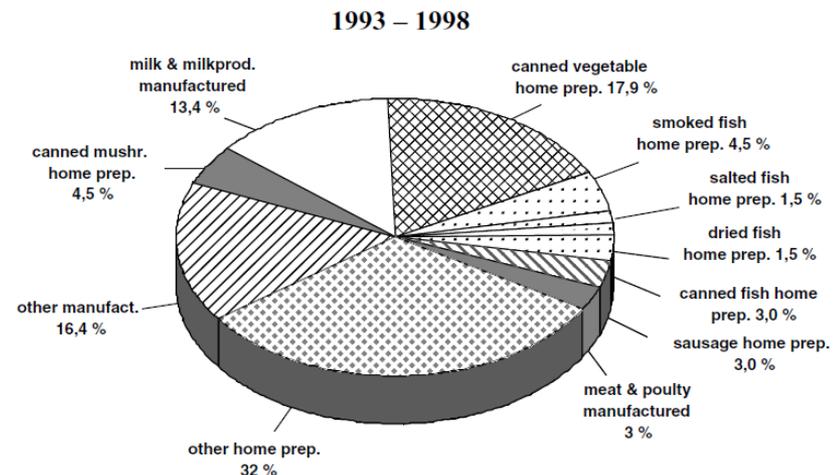
Botulismus, eine seltene Erkrankung

Europa ~ 1200 p.a.

EU ~ 100 p.a.

D ~ 10 p.a.

(< 1% aller Lebensmittel-bedingten Erkrankungen)



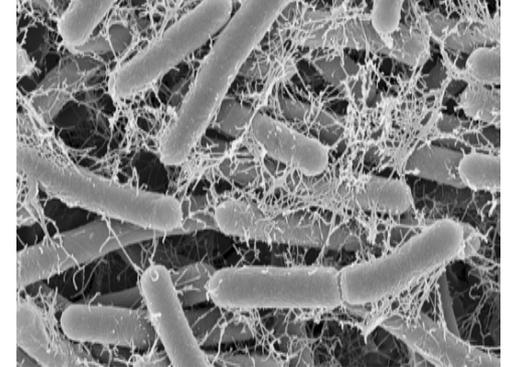
WHO Surveillance Programme for Control of
Foodborne Infections and Intoxications in Europe.
7th Report (1993-1998)
<http://www.bfr.bund.de/cd/2351>



Pathogene Clostridien

**Genus *Clostridium* umfasst über 200 Spezies:
Gram-positive, anaerobe Stäbchen, Sporenbildner**

15 hochpathogene Clostridien (> 60 Toxine!):



Pathogene Clostridien

Genus *Clostridium* umfasst über 200 Spezies:
Gram-positive, anaerobe Stäbchen, Sporenbildner

15 hochpathogene Clostridien (> 60 Toxine!):

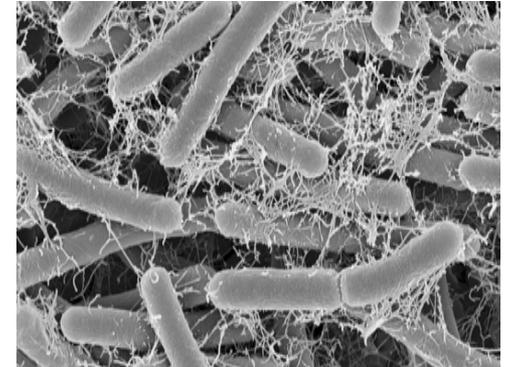


**Mehr Toxine
als jede andere
Bakterienspezies!**

Pathogene Clostridien

Genus *Clostridium* umfasst über 200 Spezies:
Gram-positive, anaerobe Stäbchen, Sporenbildner

15 hochpathogene Clostridien (> 60 Toxine!):



Spezies	Toxine	Krankheiten in Mensch und Tier
<i>C. difficile</i>	3	Diarrhö, Colitis
<i>C. perfringens</i>	17	Diarrhö, Enteritis, Gasbrand, Enterotoxämie
<i>C. septicum</i>	4	Gasbrand, intestinale Myonekrose
<i>C. novyi</i>	8	Gasbrand, nekrotische Hepatitis
<i>C. sordellii</i>	4	Gasbrand, Enterotoxämie, Enteritis, TSS
<i>C. tetani</i>	2	Tetanus
<i>C. botulinum</i>	4	Botulismus (BoNT), Enteritis (C2, C3 Toxine)

Erkrankungen verursacht durch clostridiale Neurotoxine

Botulismus:

Botulinum Neurotoxine (BoNT/A-G)

C. botulinum

C. baratii

C. butyricum

C. argentinense

3 klassische Formen des humanen Botulismus:

Lebensmittelbotulismus

(lat. *botulus*, Wurst[vergiftung])

Wundbotulismus

Säuglingsbotulismus

in D: ca. 5-20 humane Fälle / Jahr;
Meldepflichtige Erkrankung nach
IfSchG

mehr Fälle bei Tieren (Rinder u.
Wasservögel)

Erkrankungen verursacht durch clostridiale Neurotoxine

Botulismus:

Botulinum Neurotoxine (BoNT/A-G)

C. botulinum

C. baratii

C. butyricum

C. argentinense

Absteigende flache Lähmung

Tetanus:

Tetanus Neurotoxin (TeNT)

C. tetani

Spastische Lähmung

Klinische Symptomatik

allgemein:

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

Klinische Symptomatik

allgemein:

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

Lebensmittelbotulismus:

- gastrointestinale Symptomatik
- 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

- **Klinisches Bild (Lebensmittel o. Wundbotulismus):**
 - Hirnnervenstörung (z.B. Ptosis, Bulbärparalysen)
 - fortschreitende, symetrische, absteigende schlaffe Lähmung
 - Dyspnoe
 - Erbrechen
 - Übelkeit
 - Bauchschmerzen
- **Klinisches Bild (Säuglingsbotulismus)**
 - schlaffe Lähmung
 - anhaltende Obstipation (Verstopfung)
 - Gedeihstörung
 - Trinkschwäche
 - Schluckstörung
 - allgemeine Muskelschwäche
 - Dyspnoe (Atemstörung)

mindestens eines der oben aufgeführten Kriterien und...

Falldefinition für Meldung nach IfSG

- **Labordiagnostischer Nachweis:**
 - Erregerisolierung (kulturell) aus Stuhl oder Wundmaterial
 - Toxinnachweis (Maus Bioassay oder ELISA) aus Blut, Stuhl, Mageninhalt oder Erbrochenem
- **Epidemiologische Bestätigung:**
 - labordiagnostischer Nachweis im Lebensmittel (Toxin bzw. bei Honig oder Heroin: Sporen)
 - epidemiologischer Zusammenhang (gemeinsame Quelle, z.B. Lebensmittel, Heroin)
- **Kategorien bei der Meldung:**
 - a) klinisch diagnostizierte Erkrankung
 - b) klinisch-epidemiologisch bestätigte Erkrankung
 - c) klinisch-labordiagnostisch betätigte Erkrankung
 - d) labordiagnostisch nachgewiesener Fall bei nicht erfülltem klinischen Bild
 - e) labordiagnostisch nachgewiesener Fall bei unbekanntem klinischen Bild

Für die Statistik werden nur Kategorien b + c gewertet

Behandlung

Therapie:

- **trivalentes Antitoxin (A, B, E) vom Pferd (Novartis / Behring)**
- **BabyBIG human IgG (A, B) (USA, in D nicht zugelassen)**
- **zeitnahe Gabe notwendig (erste 48 h nach Intoxikation)**
- **Antibiotika (nur bei Wund- und Säuglingsbotulismus; gleichzeitige Gabe von Antitoxin empfohlen)**

Behandlung:

- **künstliche Beatmung bei respiratorischer Insuffizienz**
- **intensivmedizinische Betreuung**

Symptome können über mehrere Monate anhalten!

Komplexität von Botulinum Neurotoxinen

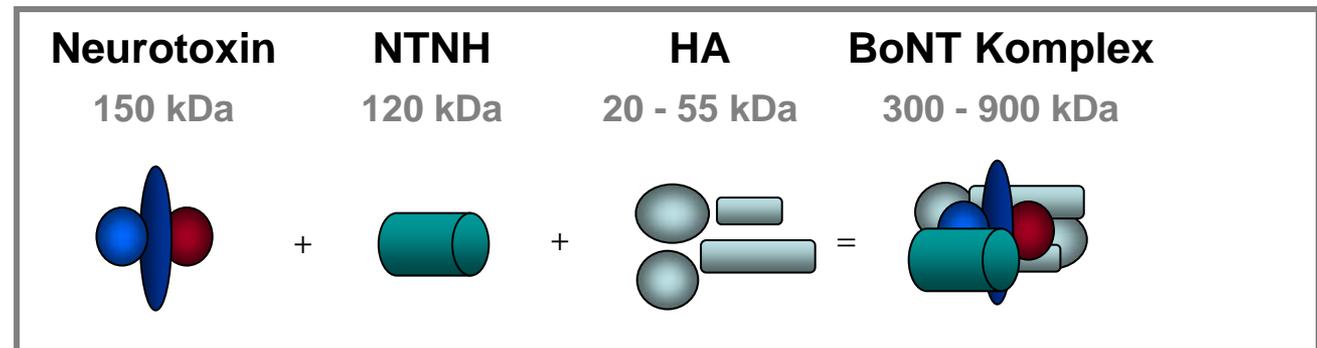
Lethale Dosis:

1 ng/kg i.v or i.m.

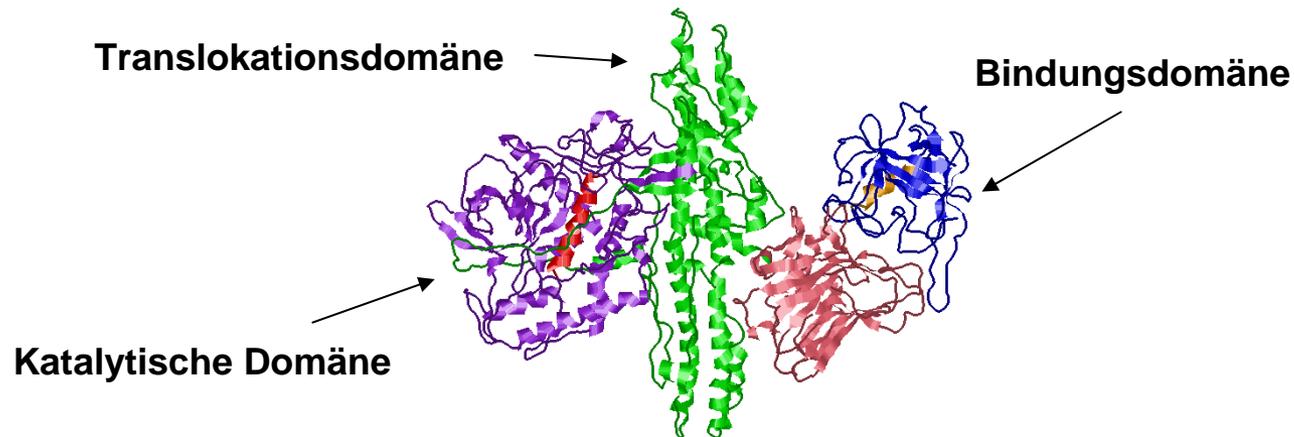
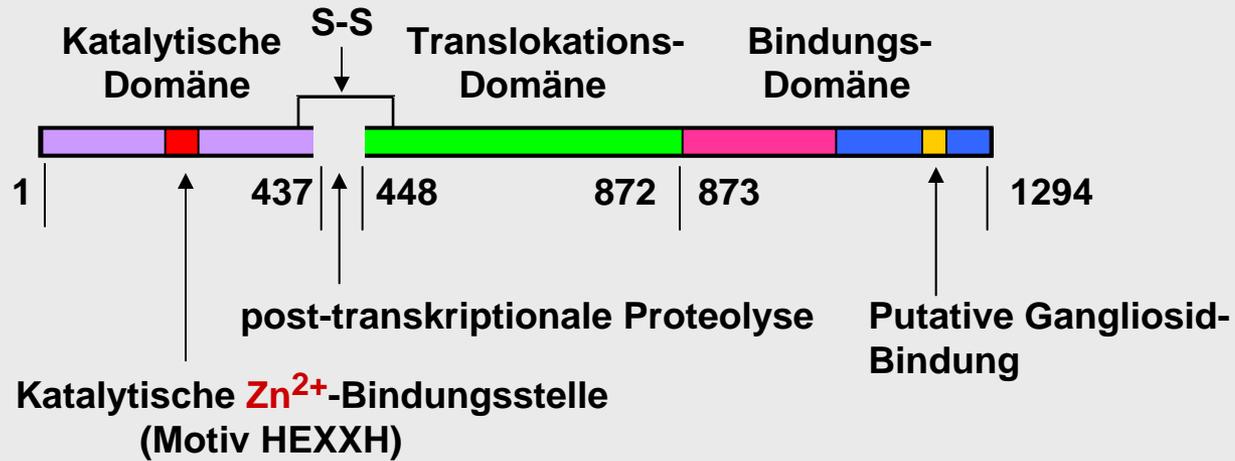
10 ng/kg inhalativ

1000 ng/kg oral

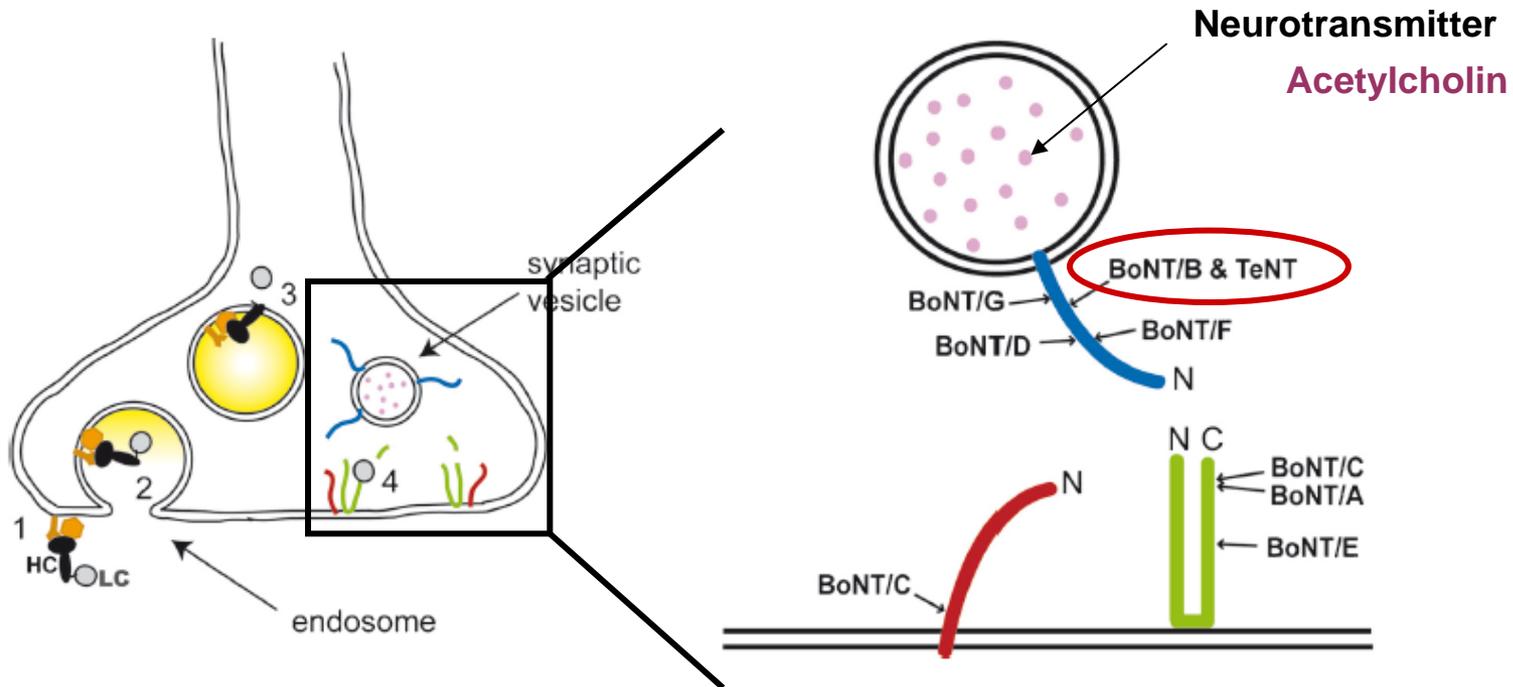
Serotyp	Spezies	Subtyp
A	Mensch	A1, A2, A3, A4, A5(B)
B	Mensch	B1, B2, B3, B4, B5, B6
C	Vogel	C1, C/D
D	Rind	D, D/C
E	Mensch	E1, E2, E3, E4 (<i>C. butyricum</i>), E5 (<i>C. butyricum</i>), E6
F	Mensch	F1, F2, F3, F4, F5 (<i>C. baratii</i>), F6, F7
G	?	



Struktur der Botulinum Neurotoxine (BoNT)



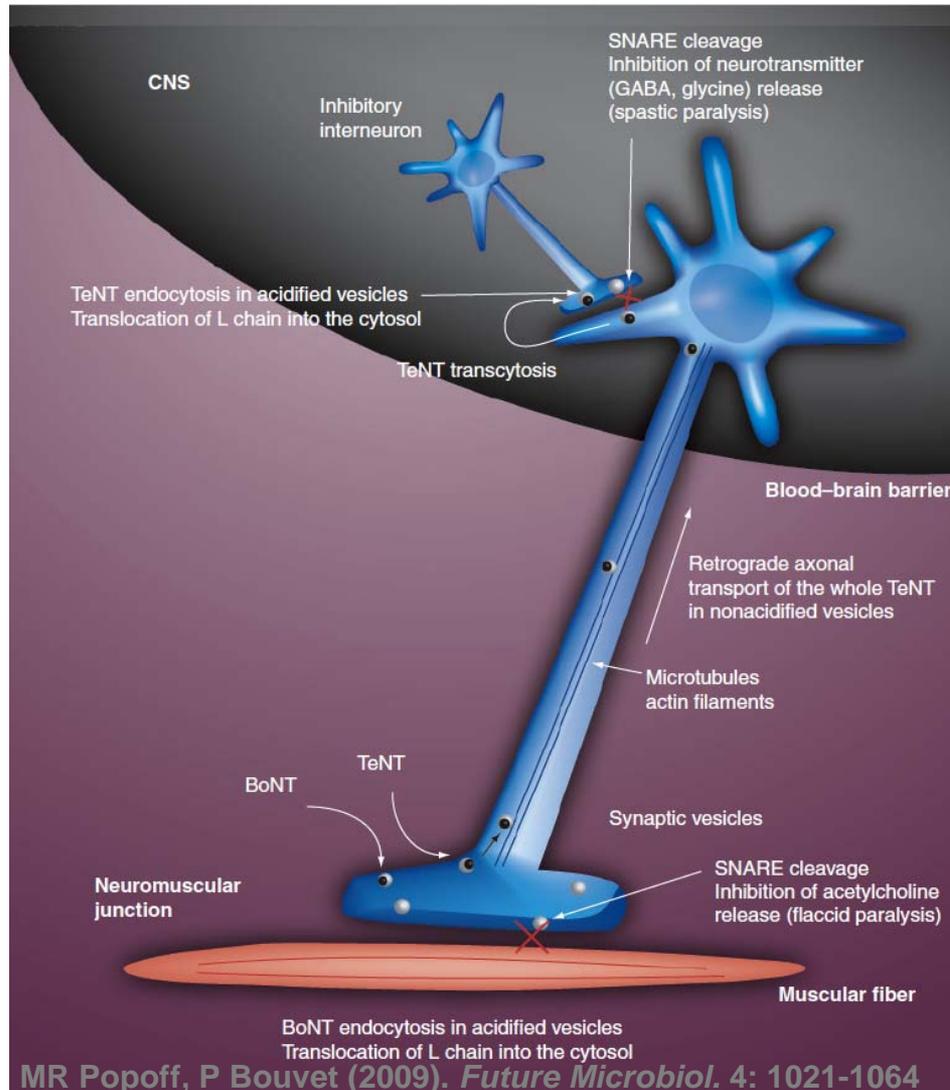
Aktivität der Botulinum Neurotoxine



- i: Andocken des 150 kDa-BoNT
- ii: Endozytose
- iii: Freisetzung der LC ins Zytoplasma
- iv: Spaltung von SNARE-Proteinen:
SNAP-25, **VAMP/synaptobrevin**, **syntaxin**

Blockade der Neurotransmitterfreisetzung, Paralyse

Vergleich: Wirkung von Tetanus Neurotoxin (TeNT)



- **Struktur von BoNT und TeNT nah verwandt (ca. 50 % Identität auf AS-Ebene)**
- **BoNT wirkt lokal an der neuromuskulären Endplatte**
- **TeNT: retrograder axonaler Transport zum ZNS**
- **Transzytose in inhibitorische Interneuronen**
- **dort Spaltung von VAMP-1**
 - ➔ **Inhibition der Neurotransmitterausschüttung GABA, Glycin**
 - ➔ **spastische Paralyse**

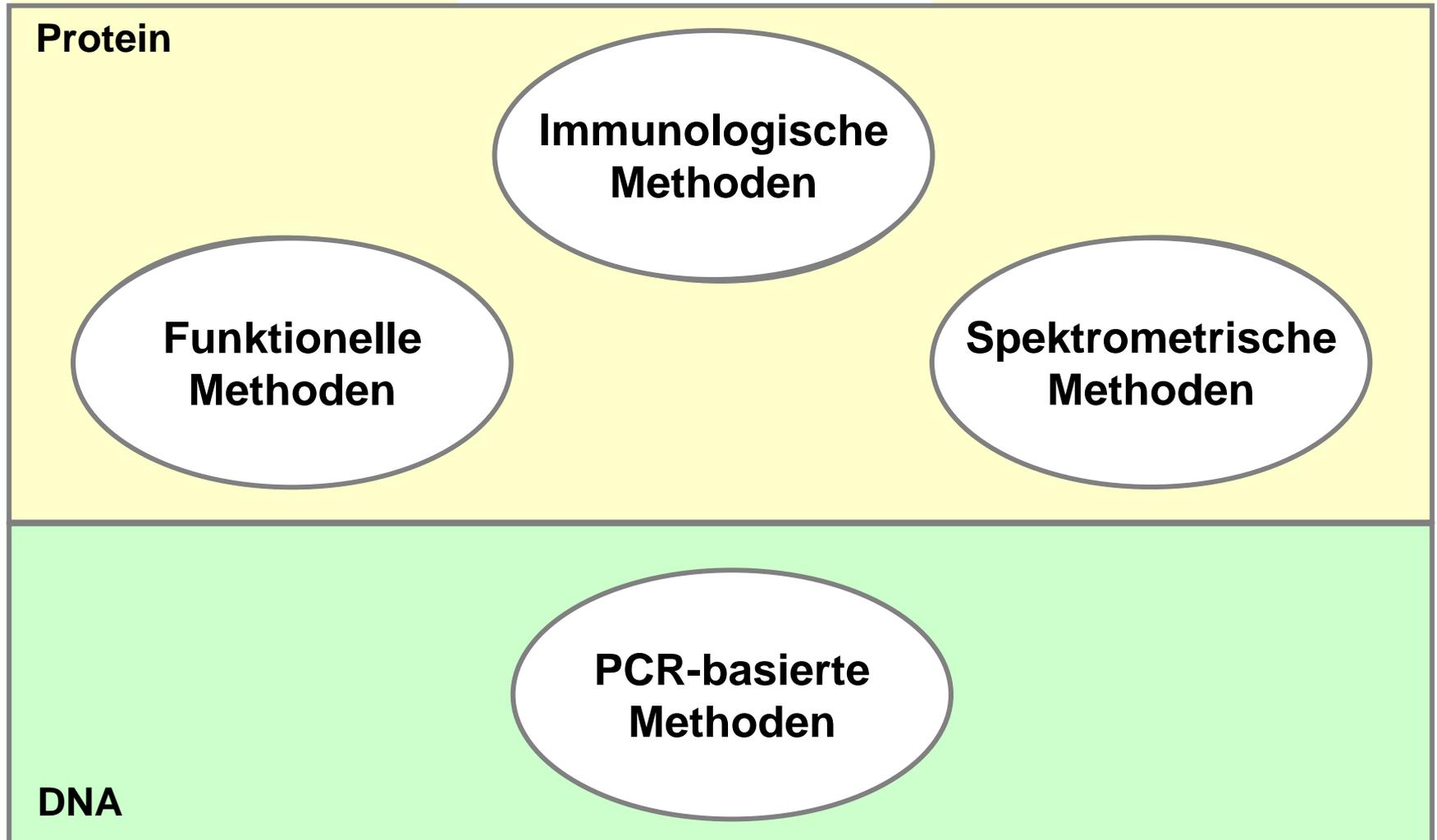
(Vgl.: BoNT inhibiert ACh-Freisetzung)

Status quo: Labordiagnostik von Botulismus

- **Schwierig und fehleranfällig aufgrund**
 - **der Subtypen-Problematik**
 - **der Existenz von Neurotoxinen und Toxin-Komplexen**
 - **der hohen Toxizität der BoNT**

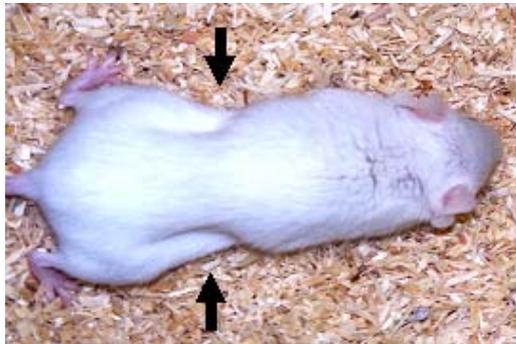
>> Mehr als 25 verschiedene Toxine müssen sicher erfasst werden!
 - **keine standardisierte Diagnostik in Deutschland!**
 - **Matrices interferieren mit dem Nachweis des Erregers und der Toxine**
- >> Ziel RKI: Generierung und Charakterisierung von Antikörpern (monoklonale und polyklonale) spezifisch für alle BoNT-Serotypen zum Aufbau einer standardisierten Diagnostik.**

Diagnostik von Toxinen am RKI



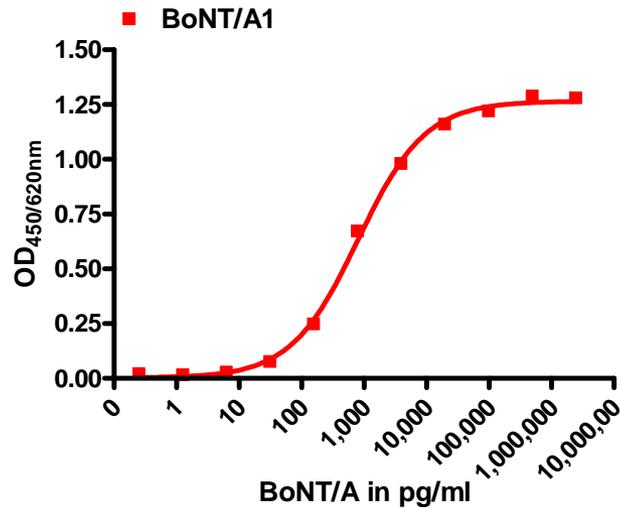
Detektion von BoNT

„Gold Standard“ Maus Letalitätstest (DIN 10102)



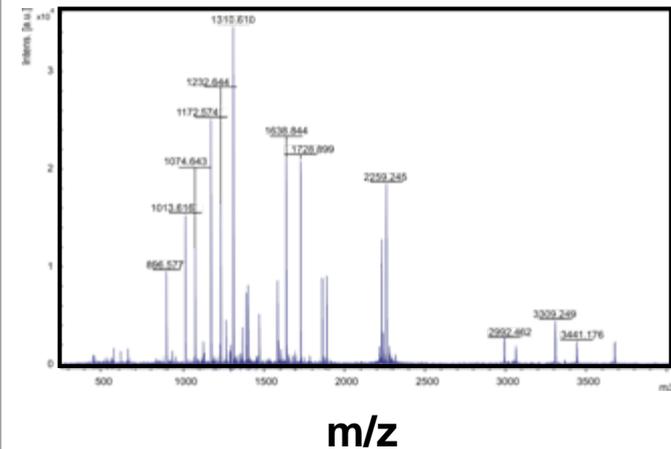
Detektionslimit:
BoNT/A1 5 pg/ml

ELISA



Detektionslimit:
BoNT/A1 14 pg/ml

MALDI-TOF MS



Detektionslimit:
BoNT/A1 200.000 pg/ml

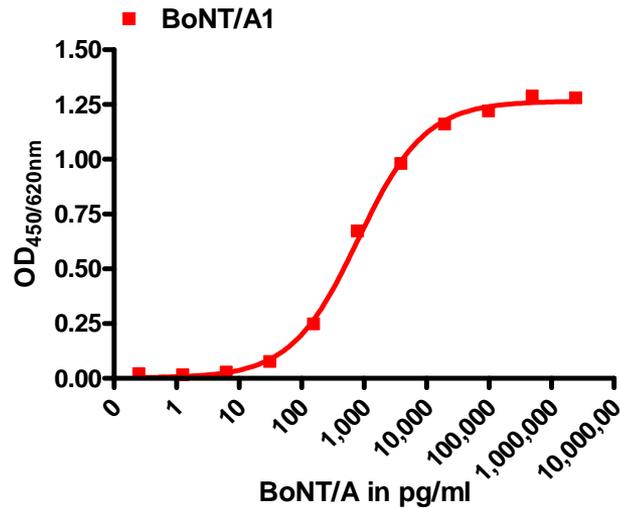
Detektion von BoNT

„Gold Standard“ Maus Letalitätstest (DIN 10102)



RKI:
BoNT/A bis /F
TeNT

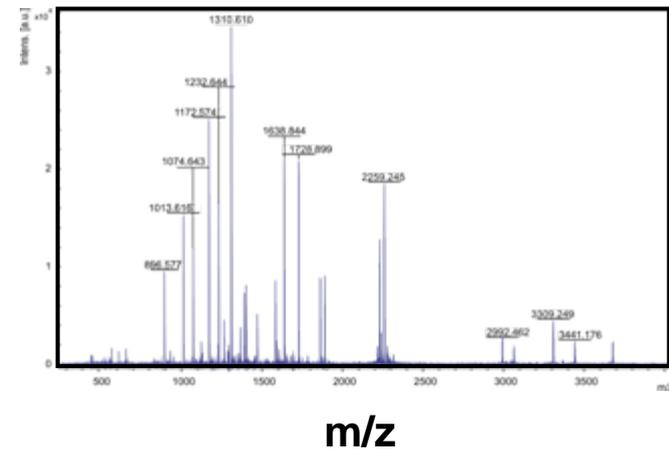
ELISA



RKI:
BoNT/A, /B, /E, /F
BoNT/C, /D in Arbeit

Pauly et al, (2009). *Analyst* 134: 2028

MALDI-TOF MS

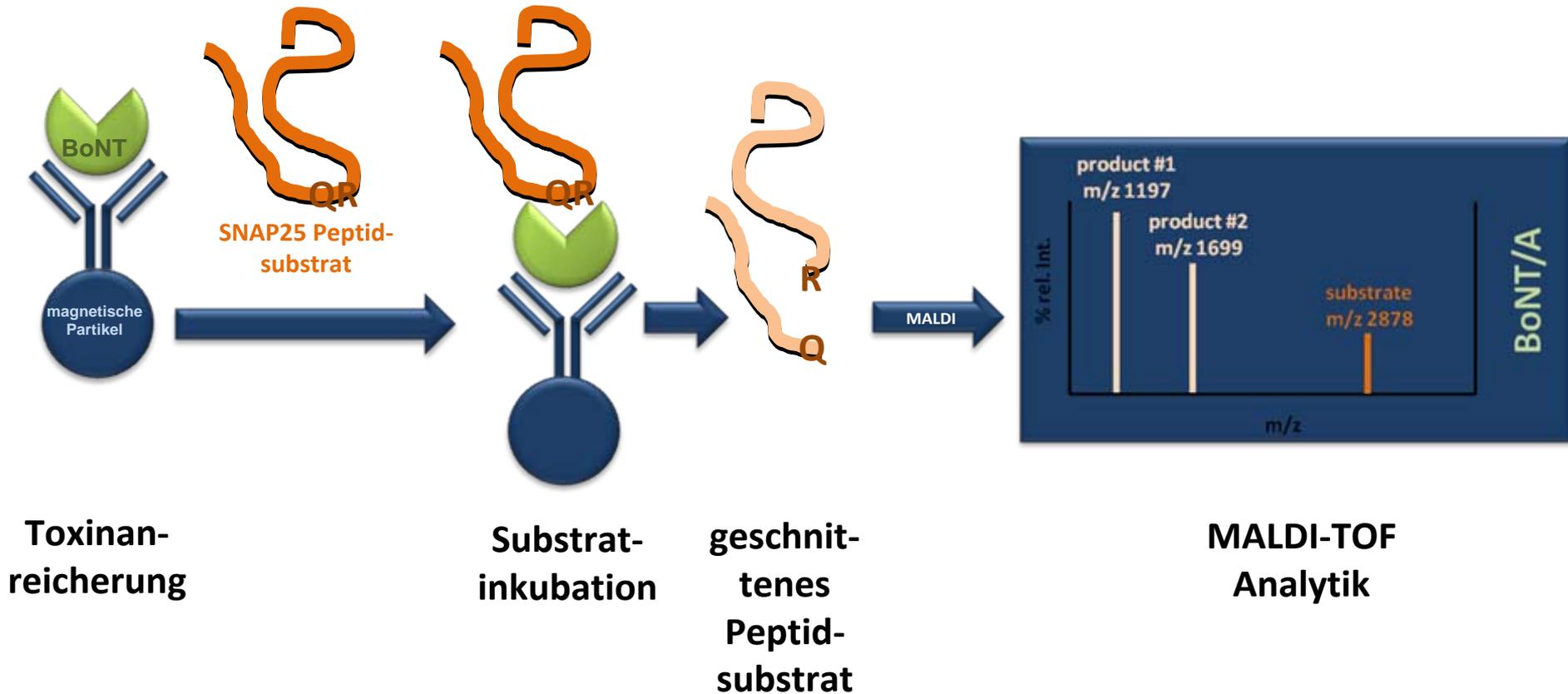


RKI:
BoNT/A, /B
(inkl. Subtypisierung)

Kull et al, (2010). *Anal.Chem.* 82: 2916



Funktioneller Endopeptidase-MS Assay



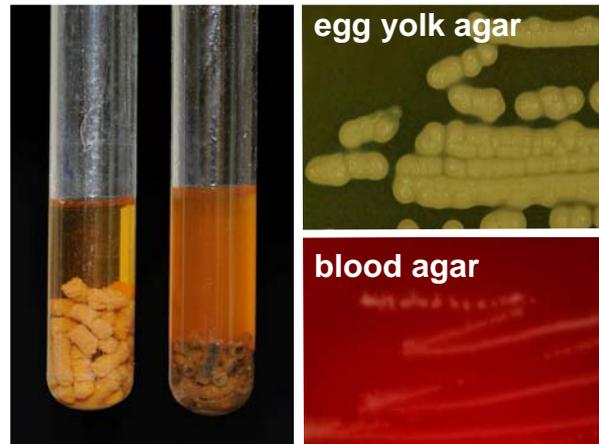
Methode ist mittels eines internen Standards auch für quantitativen Nachweis geeignet!

Isolierung und Charakterisierung von Clostridien aus Realproben

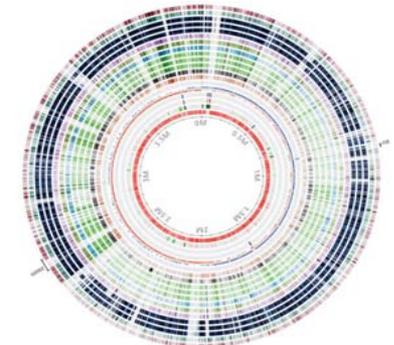
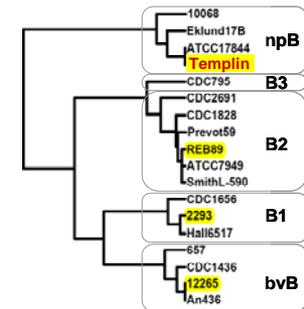
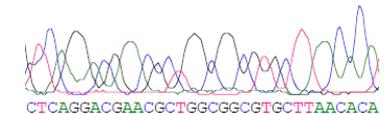
Ausgangsmaterial:
Lebensmittel,
Stuhl- oder Gewebeprobe,
Umweltprobe



**Homogenisierung,
anaerobe Anzucht**



**Toxin/Erreger-Nachweis:
Sequenzierung
BoNT-Gen, 16S rRNA-Gen**



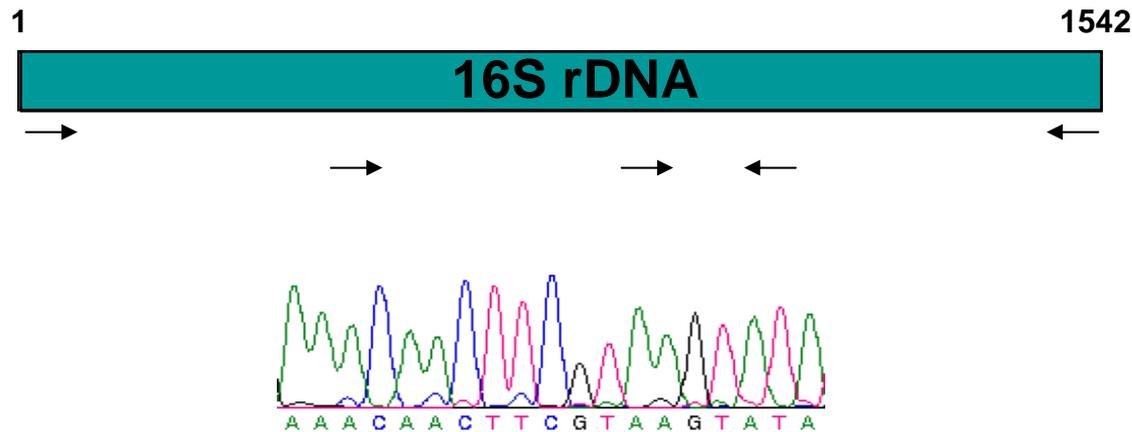
**Homogenisierung,
direkte Analyse**

- Einzelkolonien:** ✓
- anaerobes Wachstum
 - Gram-positiv
 - Lipase-positiv
 - Katalase-negativ
 - Sporenbildung

Molekularbiologische Typisierung

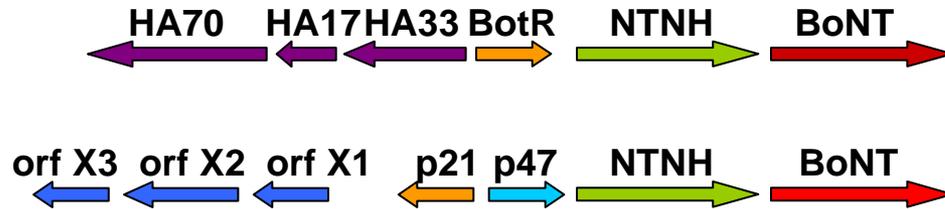
1. Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

Prokaryoten (Bakterien und Archaeen)			
Ribosom	Untereinheit	rRNA	Nukleotide
70 S	50 S	23 S	2900 nt
		5 S	120 nt
	30 S	16 S	1500 nt



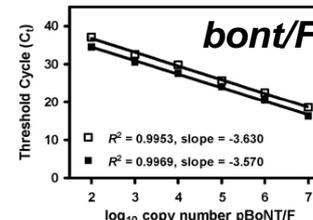
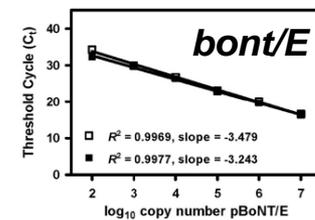
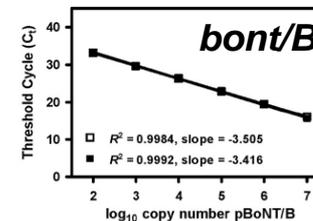
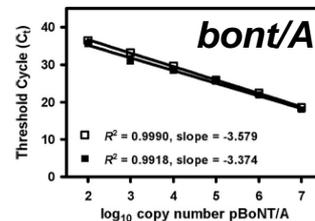
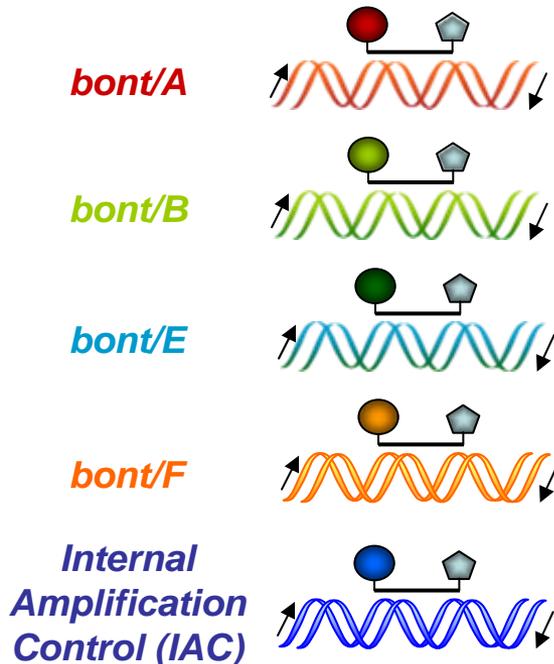
Molekularbiologischer Toxingen-Nachweis

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



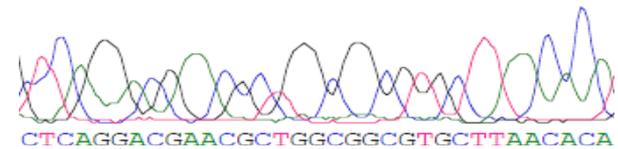
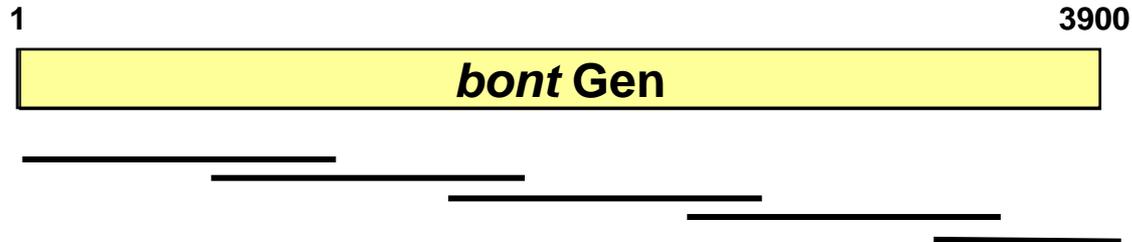
Raphael et al. (2007) *J. Microbiol. Methods* 71: 343-346

3. Nachweis der *bont*-Gene mittels Multiplex TaqMan PCR

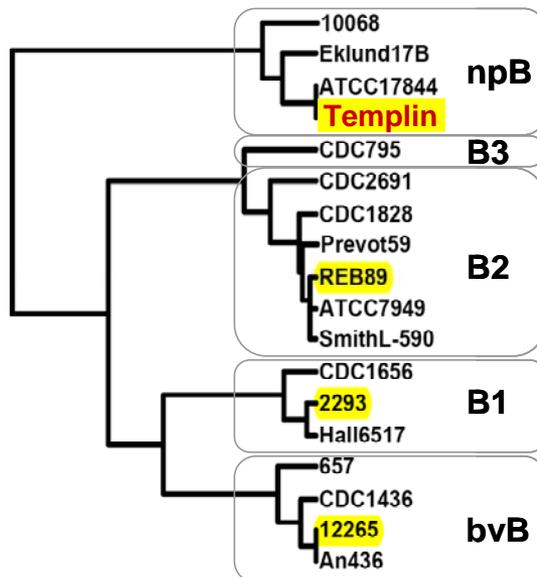


Weitere Analyse

1. *bont* Sequenzierung (5 Fragmente)



2. Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zur Bestimmung des Subtyps



Ausgangsmaterial für Diagnostik

- **Toxin-Nachweis**
 - Serum, Mageninhalt etc.
 - Stuhl (Säuglingsbotulismus)
 - Lebensmittel, Futter
- **Erreger-Nachweis**
 - Direkter Nachweis aus Lebensmittel, Stuhl etc.
 - anaerobe Anzucht (Lebensmittel, Stuhl, Autopsie-Material, etc.)

CAVE:

Der Nachweis des BoNT-Gens besagt nicht, dass das Protein exprimiert wird (>> *silent genes*)

Klinischer Fall I: Botulismus

- 2009: älteres Ehepaar aus Köln mit neurologischer Symptomatik
- nach ca. 1 Woche Verdacht auf Lebensmittel-Botulismus
- Patient künstlich beatmet, Patientin nur schwache Symptomatik
- Lebensmittel, Wischproben (CVUA-RRW, Dr. Aust): RIPAC; RKI

Labor RIPAC

- Wischproben und Putenwurst mit *C. botulinum* Sporen belastet
- nach Anzucht: **Serotyp A** (Maus-Bioassay)
- kein direkter Toxinnachweis aus Putenwurst -> Quelle?
- Lebensmittel konnte nicht identifiziert werden

RKI

- Stuhlproben nach Anzucht positiv:
Serotyp: A in Maus-Bioassay und ELISA (kein BoNT/B nachweisbar)
Genotyp: A+B in der PCR
- Stamm konnte isoliert werden: **bivalenter A(B) Stamm** der BoNT/A produziert und ein stilles B-Gen trägt
- Ergebnisse RIPAC bestätigt, gleicher Stamm aus Wischproben und Putenwurst isoliert

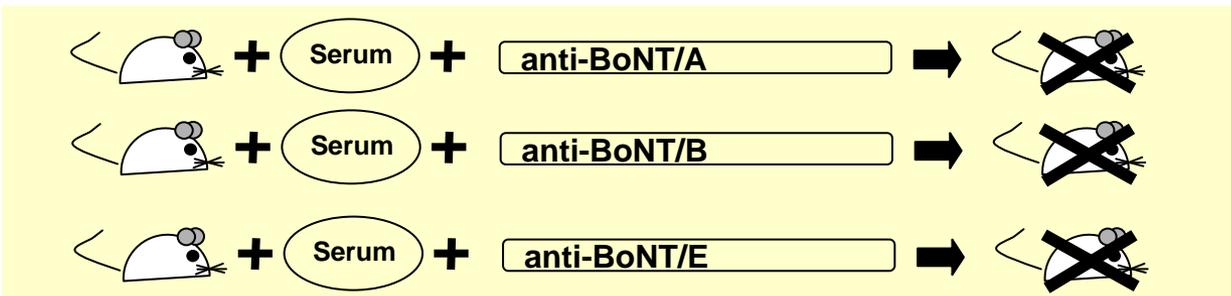
Fazit: Lebensmittelbotulismus durch unbekannte Quelle ausgelöst durch einen bivalenten A(B) Stamm

Klinischer Fall II: atypische Tetanusinfektion

- Fallbericht: sehr ungewöhnlicher Verlauf einer Tetanusinfektion bei einem immunisierten 14-jährigen Jungen
- d 0: Botulismussymptomatik mit linksseitiger Ptosis, Parästhesie, Sehstörungen; eine Woche vorher eine kleine Schürfwunde am Knie, die im normalen Heilungszustand war; schnelle Verschlechterung des Zustands
- initialer Maustest (d 3) deutete auf Botulismus:



- Patient wurde mit anti-BoNT/A, /B, /E F(ab)₂-Fragmenten (Chiron Behring) behandelt
- d 4: klinischer Verlauf änderte sich von flacher Paralyse zu permanentem Rigor, Karpopedalspasmen, *risus sardonius* >> Behandlung mit Tetagam (hu anti-TeNT IgG, Aventis Behring)
- zweiter Maustest mit monovalenten Antitoxinen aus Kaninchen:



Klinischer Fall II: atypische Tetanusinfektion

- wg. klinischer Symptomatik dritter Maustest mit Tetagam:

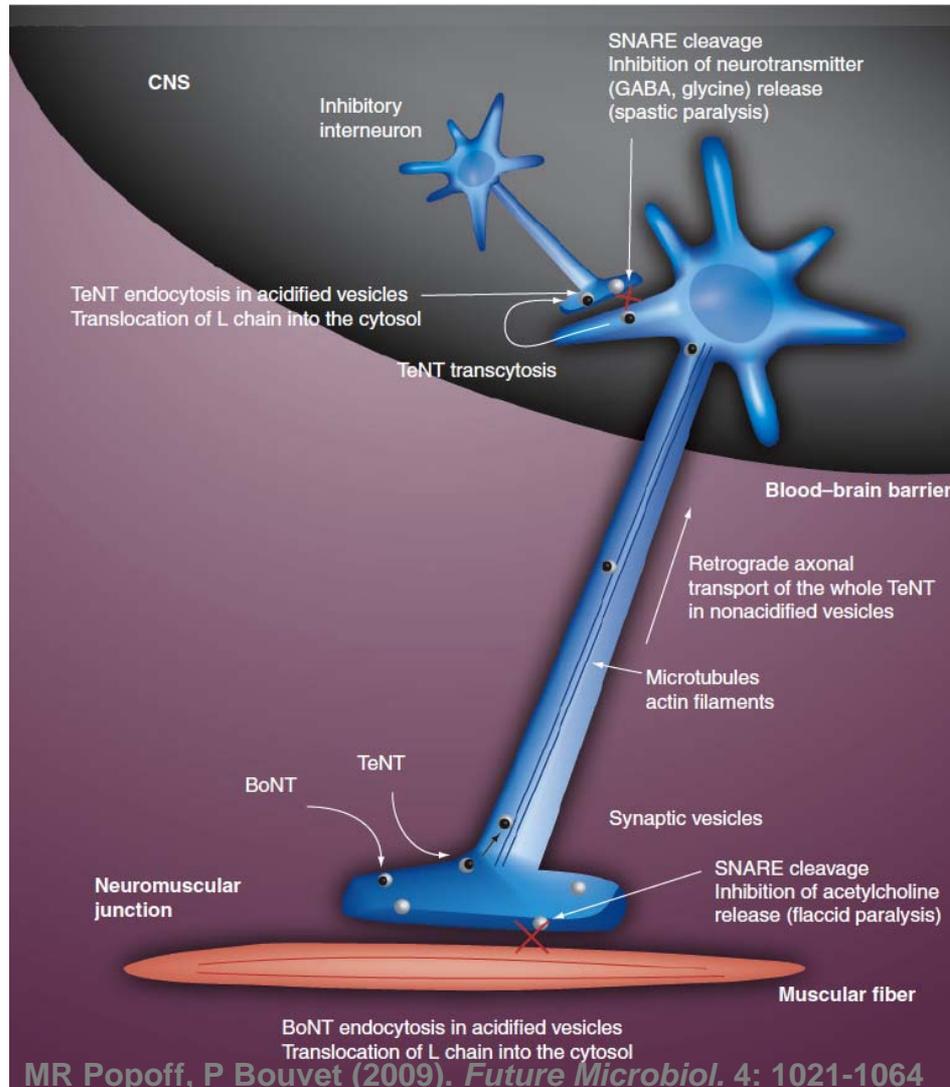


- Behandlung mit Tetagam für einige Tage: Zustand des Patienten besserte sich deutlich, Entlassung nach 3,5 Wochen

Äußerst ungewöhnlicher Fall:

- Patient entwickelte einen atypisch beginnenden, aber fulminanten Tetanus, obwohl sein anti-TeNT-Titer im Blut ausreichenden Schutz suggerierte (2,1 IE/ml);
 - Titer stellt die Summation aus protektiven und nicht-protektiven AK dar;
- Klinischer Verlauf: Botulismussymptomatik >> Tetanussymptomatik;
 - aus Mausexperimenten ist bekannt, dass nach Applikation sehr hoher Dosen TeNT initial Botulismussymptome auftreten (Matsuda et al., 1982, BBRC 104, 799)

Vergleich: Wirkung von Tetanus Neurotoxin (TeNT)



- **Struktur von BoNT und TeNT nah verwandt (ca. 50 % Identität auf AS-Ebene)**
- **BoNT wirkt lokal an der neuromuskulären Endplatte**
- **TeNT: retrograder axonaler Transport zum ZNS**
- **Transzytose in inhibitorische Interneurone**
- **dort Spaltung von VAMP-1**
 - ➔ **Inhibition der Neurotransmitterausschüttung GABA, Glycin**
 - ➔ **spastische Paralyse**

(Vgl.: BoNT inhibiert ACh-Freisetzung)

Klinischer Fall II: atypische Tetanusinfektion

- wg. klinischer Symptomatik dritter Maustest mit Tetagam:



- Behandlung mit Tetagam für einige Tage: Zustand des Patienten besserte sich deutlich, Entlassung nach 3,5 Wochen

Äußerst ungewöhnlicher Fall:

- Patient entwickelte einen atypisch beginnenden, aber fulminanten Tetanus, obwohl sein anti-TeNT-Titer im Blut ausreichenden Schutz suggerierte (2,1 IE/ml);
 - Titer stellt die Summation aus protektiven und nicht-protektiven AK dar;
- Klinischer Verlauf: Botulismussymptomatik >> Tetanussymptomatik;
 - aus Mausexperimenten ist bekannt, dass nach Applikation sehr hoher Dosen TeNT initial Botulismussymptome auftreten (Matsuda et al., 1982, BBRC 104, 799)
- Maustest mit trivalenten anti-BoNT/A, /B, /E Antitoxin war irreführend;
 - das trivalente Pferdeserum wird aus gegen TeNT geimpften Tieren gewonnen!!!
 - 5 IE/ml anti-Tetanustoxin IgG im anti-BoNT/A, /B, /E Antitoxin enthalten!!!

Klinischer Fall III: iatrogenener Botulismus (USA)

- Kosmetische Injektion von **nicht-zugelassenem, gereinigtem BoNT/A für den Laborgebrauch (anstelle von Botox)**
- 3 Patienten + 1 Mediziner (ohne Lizenz, Selbstbehandlung)
- 20 µg (= 8 MU) statt 20 U i.m.
- Symptome: Dysphagia, Dysarthria, Dyspnea, Muskelschwäche
- Aufnahme in Klinik nach 12-24 h
- Toxinnachweis im Serum positiv
- Antitoxin-Gabe innerhalb 24 h nach Aufnahme, bis auf Patientin 1
- künstliche Beatmung: 36-171 d
- Patientin 1 (171 d beatmet, hat noch Jahre später Beschwerden!)

BRIEF REPORT

Chertow *et al.* (2006) *JAMA* 296: 2476

Botulism in 4 Adults Following Cosmetic Injections With an Unlicensed, Highly Concentrated Botulinum Preparation

Dual-Use-Charakter BoNT

- **BoNT = giftigste bekannte Substanz, Pathogenitätsfaktor**
- **Langjährige Geschichte der militärischen Verwendung (B-Waffenprogramme)**
>> BoNT fällt unter das Kriegswaffenkontrollgesetz und BWÜ
- **Bioterrorismus (Kategorie A der CDC)**
>> Wein *et al.* 2005 in PNAS – aktuelles Bedrohungsszenario?



- **Medizinische Nutzung**
- **Kosmetische Nutzung**

Medizinische Anwendung von BoNT

Toxin Serotyp	Produkt / Firma
A	Dysport / Ipsen BOTOX / Allergan Xeomin / Merz
B	Neurobloc / Solstice Neurosciences Myobloc
C, E, F	noch nicht zugelassen



Medizinische Anwendung von BoNT

Krankheit	Jahr
Strabismus (Schielen)	1981
Blepharospasmus (Lidkrampf)	1982
Hemifacialer Spasmus (Krampf der Gesichtsmuskeln)	1982
Cerebralpareesen (cerebrale Lähmungserkrankung)	1985
Spastiken	1985
Hyperhidose (übermäßige Schweissproduktion)	1988
Allgemeine Schmerzzustände, nach OP etc.	1994
Spasmen im Ellbogen, Fingern etc.	2010
Migräne	2010

....

Für viele der Anwendungen gibt es *Case Reports* oder Fall-Kontrollstudien, aber noch keine reguläre Zulassung.

Aktuell >10 Publikationen pro Monat mit neuen klinischen Anwendungen!

Zusammenfassung

- **Botulismus ist eine seltene Erkrankung mit immer wieder schweren oder tödlichen Verläufen und zählt zu den Zoonosen.**
- **Botulismus wird durch Botulinum Neurotoxine ausgelöst, die eine große Proteinfamilie mit 7 Serotypen (A bis G) und mehr als 25 Subtypen bilden.**
- **Aufgrund der Komplexität der Neurotoxine ist die Diagnostik von Botulismus nach wie vor sehr schwierig und fehleranfällig.**
- **Arbeiten zum Aufbau einer standardisierten Diagnostik laufen derzeit am RKI und basieren auf der Kombination von immunologischen, funktionellen, spektrometrischen und molekularbiologischen Methoden.**
- **Botulinum Neurotoxine sind klassische *Dual-Use*-Substanzen (mögliche Biowaffenanwendung versus medizinische / kosmetische Anwendung)**

Vielen Dank!

**Das RKI ist an der Untersuchung
von aktuellen Botulismusfällen interessiert.**

Bitte kontaktieren Sie:

**Dr. Dorner
Robert Koch-Institut
Zentrum für Biologische Sicherheit
Mikrobielle Toxine
Nordufer 20
13353 Berlin
DornerB@rki.de
Tel. 030-18754-2500**