

„CHRONISCHER BOTULISMUS“

Als neue Krankheit nicht belegt

Bisher vorgebrachte Evidenzen für ein durch Botulinum-Neurotoxine induziertes Krankheitsbild bei Landwirten sind nicht ausreichend im Hinblick auf die klinische Diagnose und den labor diagnostischen Nachweis.

Botulismus ist eine seltene lebensbedrohende neurologische Erkrankung, die durch von *Clostridium* (*C.*) *botulinum* produzierte Botulinum-Neurotoxine (BoNT) ausgelöst wird. Ursache und Pathogenese der akuten Erkrankung sind seit Langem bekannt, die Mehrzahl wird durch BoNT-enthaltende Lebensmittel verursacht (1, 2).

Seit Mitte der 90er Jahre wird von einem veterinärmedizinischen Problem in Milchviehbeständen berichtet, für das ein Zusammenhang mit *C. botulinum* respektive BoNT postuliert wird – eine in Fachkreisen umstrittene Hypothese. Eine erste Veröffentlichung zum Thema „chronischer Botulismus“ erschien 2001 (3–5): Die Tiere zeigen Leistungsverluste einhergehend mit variablen Symptomen wie Lähmungserscheinungen, Festliegen, Ataxien, Somnolenz und/oder fieberhaften Mastitiden. Die Autoren nehmen ein multifaktorielles Geschehen an, bei dem eine intestinale Besiedelung mit *C. botulinum*, verbunden mit kontinuierlicher Freisetzung von BoNT oder eine exogenen Zufuhr von BoNT, beteiligt ist.

2009 wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang von *C. botulinum* mit in der Landwirtschaft tätigen Personen postuliert, die neurologische Symptome zeigten, wie schubweises Auftreten von Muskelschwäche, mäßig ausgeprägte Tetraparesen, Schluckbeschwerden, Mundtrockenheit, Dysarthrie, schwere Augenlider und gehäufte Harnrang (6). Die Autoren diagnostizierten anhand der Symptome und dem Ausschluss anderer Ursachen erstmals das Vorliegen eines „chronischen Botulismus“ beim Menschen und sprachen von einem „neuen Krankheitsbild“.

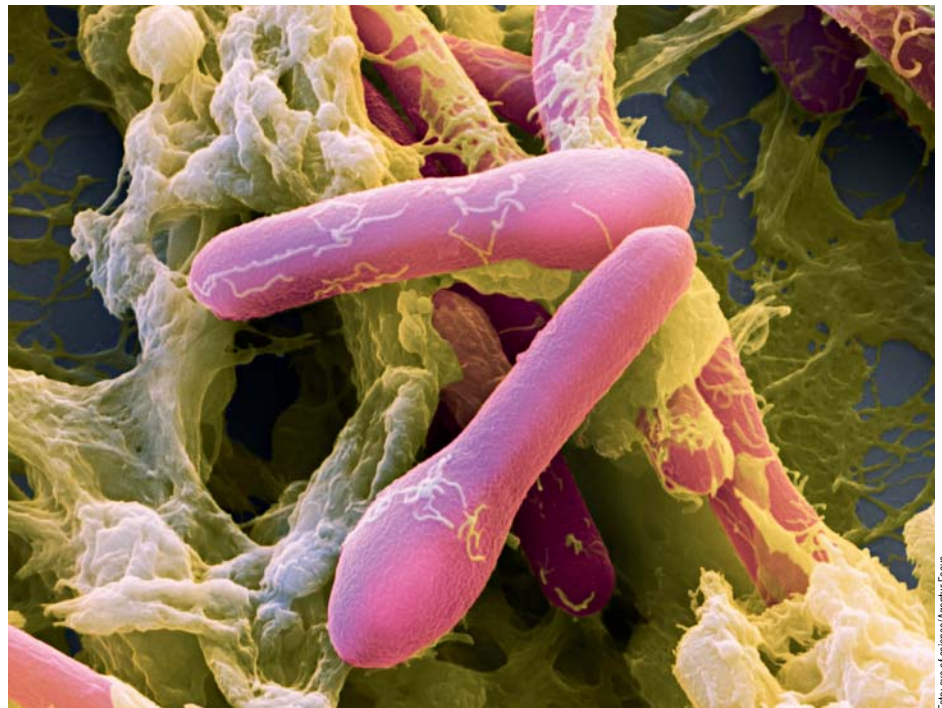


Foto: eye of science/Agentur Focus

Clostridium botulinum ist ein grampositives Bakterium, das aus biochemisch unterschiedlichen Gruppen besteht, deren Gemeinsamkeit die Ausbildung von Botulinum-Neurotoxinen ist.

Gemeldete Verdachtsfälle und aktive Surveillance: 2009 wurden dem zuständigen Gesundheitsamt zwei Erkrankungen bei landwirtschaftlichen Mitarbeitern aus Schleswig-Holstein gemeldet. Es wurden Seh- und Schluckstörungen angegeben sowie ein ELISA-Nachweis des für den Menschen ungewöhnlichen Serotyps BoNT/C im Stuhl. Eine Erkrankung in Sachsen war dem RKI 2010 bekanntgeworden. Im April 2011 bat das RKI die Bundesländer, Fälle von Botulismus zu berichten, die den Gesundheitsämtern seit 2009 gemeldet, aber aufgrund eines fehlenden labor diagnostischen Nachweises aus formalen Gründen nicht an das RKI übermittelt wurden. Im Ergebnis wurden drei zusätzliche Fälle bekannt. Zu einem Fall wurden keine weitergehenden Informationen mitgeteilt, bei den zwei anderen Fällen handelte es sich um Landwirte;

bei einem wurden milde Symptome eines lebensmittelbedingten Botulismus diagnostiziert, bei dem anderen die Diagnose „chronischer Botulismus“ gestellt.

Die Postulierung mit dem „chronischen Botulismus“ ein neues Krankheitsbild beschrieben zu haben, ist derzeit kritisch zu bewerten (7, 8). Denn hierfür fehlen:

- eine Bestätigung der klinischen Diagnose eines neuen Krankheitsbildes durch einen unabhängigen Neurologen;
- die Darlegung valider labor diagnostischer Nachweise und deren Bestätigung durch unabhängige Labore
- sowie weitere Kriterien für einen Kausalzusammenhang zwischen „chronischem Botulismus“ und BoNT.

Anforderungen an die Beschreibung eines neuen Krankheitsbil-

des: Die klinische Beschreibung nur durch einen Experten oder eine Arbeitsgruppe ist nicht ausreichend. In der Wissenschaft bedarf es des wiederholten Nachweises eines neuen Phänomens, bevor es als verifiziert gelten kann. Die konsistente und präzise, klar definierte klinische Beschreibung eines neuen Krankheitsbildes ist der erste Schritt der Definition einer neuen Krankheit oder eines neuen Syndroms.

Anforderungen an den Labornachweis: Die von den Befürwortern der Hypothese des „chronischen Botulismus“ präsentierten Daten zum labordiagnostischen Nachweis von BoNT (4, 5) sind aus drei Gründen problematisch:

1. Die Daten wurden mit ELISA aufbauend auf polyklonalen Antikörpern erhoben. Dabei werden keine Aussagen zur Validierung der ELISA getroffen.

2. Die ELISA-Daten werden nicht, wie in Zweifelsfällen gefordert, durch eine technisch unabhängige Methode (Mausbioassay zum Toxinnachweis, Toxin-Genspezifische PCR oder Erregerisolation) gestützt (9–11). Mittels ELISA werden aus Tier und Mensch in einem örtlich zusammenhängenden Geschehen unterschiedliche Serotypen gemessen. Dies ist zumindest erklärungsbedürftig und verlangt nach einer unabhängigen Bestätigungsdiagnostik.

3. Probenmaterial mit positivem Labornachweis wurde bisher keiner unabhängigen Überprüfung zugänglich gemacht.

Eine komplexe Gruppe von Toxinen

Die Diagnostik von Botulismus ist außerordentlich anspruchsvoll: Bei den BoNT-Molekülen handelt es sich um eine komplexe Gruppe von Toxinen, die derzeit sieben bestätigte Serotypen und mehr als 30 Subtypen umfasst, wobei sich letztere in ihrer Aminosäuresequenz um bis zu 36 Prozent unterscheiden können (12). Da die Neurotoxine als Komplex verpackt in Hüllproteine produziert werden, müssen sowohl die freien Neurotoxine, als auch die Neurotoxin-Komplexe sowie alle Subtypen der Serotypen sicher erfasst werden.

Die hohe Toxizität der BoNT-Moleküle stellt per se höchste Anforderungen an die Sensitivität diagnostischer Verfahren. Derzeit gibt es keine nach dem Medizinproduktegesetz verkehrsfähigen Diagnostika für Botulismus. Ein einheitliches Verfahren zum Umgang mit klinischen Proben, Lebensmittel- und Umweltpollen unter Verwendung standardisierter Reagenzien existiert nicht. Für den Labornachweis der Toxine oder des Erregers können Serum und verdächtige Lebensmittel (lebensmittelbedingter Botulismus), daneben Fäzes, Mageninhalt (Säuglingsbotulismus) oder Wundabstrich (Wundbotulismus) herangezogen werden.

Im Fall des postulierten „chronischen Botulismus“ wird in der Regel Fäzes sowie Serum untersucht. Aufgrund seiner exzellenten Sensitivität wird der Mausbioassay als funktioneller Nachweis der BoNT-Moleküle zur Untersuchung von Lebensmittelproben und klinischen Proben verwendet (13). Daneben finden immunologische, funktionelle und spektrometrische Verfahren oder Kombinationen dieser Methoden Anwendung, von denen allerdings nur wenige die Sensitivität des Mausbioassays erreichen und/oder umfassend für diagnostische Zwecke validiert wurden (10, 14, 15).

Massenspektrometrische Verfahren erreichten im Vergleich zum Mausbioassay eine hervorragende Sensitivität und Spezifität und erlauben eine zweifelsfreie Zuordnung zu einem bestimmten Protein (16–20). Eine valide Bestätigungsdiagnostik für BoNT beruht auf der Durchführung des Mausbioassays oder eines massenspektrometrischen Verfahrens (10). Die Aussagekraft eines Toxinnachweises, der sich ausschließlich auf immunologische Verfahren wie den ELISA stützt, muss als eher gering eingeschätzt werden.

Nachweisverfahren, bei denen ausschließlich polyklonale Antikörper zum Einsatz kommen, zeigen unter Umständen eine ungenügende Spezifität und Sensitivität bei der Untersuchung von Analyten aus komplexen Matrices (10). Dagegen eignen sich ELISA-Verfahren

mit monoklonalen Antikörpern aufgrund ihrer guten Sensitivität und ihrer höheren Spezifität als Screening-Verfahren für Botulismus-Verdachtsproben (10).

Der Nachweis des Toxin-Gens allein über molekularbiologische Verfahren ist ebenfalls nicht ausreichend, denn es sind Clostridien bekannt, die „stille Gene“ tragen (hier werden die Toxine vom Bakterium nicht produziert). Noch problematischer ist der Nachweis von anti-BoNT-Antikörpern im Patientenserum. Nur wenige Patienten, die zu medizinischen oder kosmetischen Zwecken repetitiv mit BoNT behandelt werden, bilden Antikörper gegen BoNT (21), das heißt, die diagnostische Aussagekraft eines gegebenenfalls messbaren anti-BoNT-Antikörperspiegels ist im Fall von Botulismus sehr eingeschränkt.

Ein Indiz für einen Botulismus-Fall ist der Nachweis des Bakteriums im Stuhl von Verdachtspatienten. Allerdings ist hier zu beachten, dass der Erreger (selten) auch aus dem Stuhl gesunder Personen isoliert werden kann.

Unabhängige Bestätigung der Laborbefunde erforderlich

Das RKI hat die Befürworter der Hypothese des „chronischen Botulismus“ frühzeitig kontaktiert und Proben von Verdachtsfällen erbeten. Die erhaltenen Patientenproben waren trotz mehrfacher Bemühungen des RKI nicht identisch mit Proben, die bereits positiv befundet worden waren; es handelte sich um unabhängige Proben derselben Patienten. Es wäre aus Sicht der guten wissenschaftlichen Praxis notwendig gewesen, von anderer Seite positiv getestetes, identisches Probenmaterial an unabhängiger Stelle zu untersuchen, um das Argument auszuräumen, dass die nicht identischen Proben zu einem für den Labornachweis nicht geeigneten Zeitpunkt genommen wurden. Insgesamt wurden im RKI 25 Proben von 17 Personen mit Verdacht auf „chronischen Botulismus“ untersucht. Die Verdachtsdiagnose oblag dem betreuenden Mediziner, ein großer Teil der untersuchten Personen hatte Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutz-

tieren. Serum- und Stuhlproben wurden auf Toxin im Mausbioassay (DIN 10 102) und mittels validierter ELISA-Verfahren (22) untersucht. Die Stuhlproben wurden nach anaerober Anzucht ebenfalls auf Toxin im Mausbioassay und ELISA untersucht. Darüber hinaus wurden alle Proben nach anaerober Anzucht mittels genetischer Verfahren auf die Botulinum-Neurotoxin-Gene (Serotypen A–G) sowie ein Surrogatmarker-Gen, das NTN1, untersucht (23, 24). In keiner Probe konnten BoNT, BoNT-Gensequenzen oder mittels mikrobiologischer Methoden *C. botulinum* nachgewiesen werden.

Bei einem epidemiologischen Zusammenhang zwischen einer Erkrankung bei Tier und Mensch wäre anzunehmen, dass sich jeweils der gleiche BoNT-Serotyp und Subtyp nachweisen lässt. Daher wurden am RKI auch ausgewählte veterinärmedizinische Biopsieproben von fünf Rindern aus einem Bestand mit Todesfällen beziehungsweise Notchlachtung und Verdacht auf „chronischen Botulismus“ untersucht. Die Untersuchung erfolgte wie oben dargestellt und ergab jeweils negative Resultate.

In Übereinstimmung mit Veterinär- und Lebensmittelbehörden werden folgende Maßnahmen vorgeschlagen (8, 25):

1. Entwicklung von klinischen Kriterien für die Diagnostik und differenzialdiagnostische Abgrenzung, zum Beispiel durch die DGN. Sinnvoll wäre ein Algorithmus für die standardisierte diagnostische Vorgehensweise bei einem klinischen Verdachtsfall. Verdachtsdiagnosen müssen durch einen zweiten, unabhängigen Neurologen überprüft werden. Dieser muss vollständigen Zugang zu den vorliegenden Ergebnissen aller diagnostischer Verfahren erhalten.

2. Einführung einer qualitätsgesicherten BoNT-Diagnostik in allen Laboratorien, die in Deutschland Botulismusdiagnostik betreiben.

- Durchführung einer überprüfbaren, standardisierten Diagnostik basierend auf hoch spezifischen Reagenzien und hoch gereinigten Toxin-Standards;

- Einsatz technisch unabhängiger, komplementärer Methoden zum Nachweis der BoNT-Moleküle und der Erreger (10);

- Veröffentlichung der Methoden inklusive umfangreicher Validierung aus komplexen Matrices;

- Durchführung von externen Qualitätssicherungsübungen unter Einbindung nationaler und internationaler Expertenlabore. Hierzu koordiniert das RKI seit 2012 das EU-Projekt EQuATox, das die Qualitätssicherung im Feld biologischer Toxine anstrebt (26).

3. Bei postulierten Fällen von „chronischem Botulismus“: Kombination von Methoden zum Nachweis der Neurotoxine auf verschiedenen technischen Ebenen, um Störeffekte durch das Probenmaterial auszuschließen. ELISA-Ergebnisse sollten durch den Mausbioassay, massenspektrometrische Verfahren oder den eindeutigen Nachweis beziehungsweise die Isolation des toxinproduzierenden Erregers gestützt werden. Die Methoden müssen im Hinblick auf das Vorliegen des BoNT-Serotyps zu kongruenten Ergebnissen führen.

4. BoNT-positive Proben sind von einem unabhängigen Expertenlabor zu bestätigen. Dies setzt die Zugänglichkeit des identischen humanbeziehungsweise veterinärmedizinischen Probenmaterials voraus.

5. Untersuchung eines Kausalzusammenhanges zwischen BoNT und den beschriebenen Symptomen. Dies ist derzeit schwierig, nicht nur aufgrund der geringen Zahl bekanntgewordener humaner Verdachtsfälle, sondern auch aufgrund der beschriebenen Probleme des labordiagnostischen Nachweises und der fehlenden klinischen Kriterien für das postulierte Krankheitsbild.

Dr. rer. nat. Brigitte G. Dörner

Coautoren: Dr. med. vet. Dirk Werber, Dr. rer. nat. Martin B. Dörner, Prof. Dr. med. Klaus Stark, Susanne Glasmacher, Dr. med. Lars Schaade, Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Burger, Prof. Dr. med. Erich Schmutzhard

Anschrift für die Verfasser

Dr. rer. nat. Brigitte G. Dörner
Robert Koch-Institut, Berlin, DörnerB@rki.de
Prof. Dr. med. Erich Schmutzhard
Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Innsbruck, Österreich; erich.schmutzhard@i-med.ac.at

KERNAUSSAGEN


- Es handelt sich bei den bislang bekannten Kasuistiken von „chronischem Botulismus“ im Menschen um Einzelfälle unklarer Ätiologie. Ob ein derartiges mögliches neues Krankheitsbild existiert, ist derzeit nicht belegt.

- Während zwei Labore bei einigen betroffenen Landwirten und deren Tieren das Vorliegen von BoNT in unterschiedlichen Serotypen präsentierten (3–5), ist es mehreren Laboren, unter anderem dem RKI, in unabhängigen Stichprobenartigen Untersuchungen nicht gelungen, den Nachweis von BoNT oder des Bakteriums *C. botulinum* zu verifizieren. Bislang ist kein Fall dokumentiert worden, in dem eine Probe von unabhängiger Seite positiv getestet wurde.

- Zur Klärung der Frage, ob ein neues Krankheitsbild vorliegt und ob es durch BoNT hervorgerufen wird, wäre es zum einen notwendig, Kriterien (klinisch, differenzialdiagnostisch) für die Abgrenzung eines möglichen neuen Krankheitsbildes festzulegen, zum Beispiel durch die Deutsche

Gesellschaft für Neurologie. Zudem sollten klinische Verdachtsfälle durch einen zweiten Neurologen untersucht werden. Das RKI und die DGN bitten daher um sofortige Meldung von klinischen Verdachtsfällen an das zuständige Gesundheitsamt, wie es auch nach IfSG vorgesehen ist, so dass entsprechende unabhängige Untersuchungen zu dem Krankheitsbild zeitnah veranlasst werden können. Erforderlich wäre es zum anderen, eine labordiagnostisch mit mehreren Methoden konsistente Untersuchung der aufgrund klinischer Befunde formulierten Verdachtsdiagnose durchzuführen. Die Laboruntersuchungen müssen ebenfalls durch ein zweites unabhängiges Labor bestätigt werden.

- Das Festlegen allgemeingültiger klinischer Kriterien und die Durchführung valider labordiagnostischer Verfahren legen den Grundstein, den postulierten kausalen Zusammenhang zwischen BoNT und den beschriebenen Symptomen sinnvoll epidemiologisch zu überprüfen.

 **Literatur im Internet:**
www.aerzteblatt.de/lit3514
oder über QR-Code



LITERATURVERZEICHNIS DÄ 35–36/2014:

„CHRONISCHER BOTULISMUS“

Als neue Krankheit nicht belegt

Bisher vorgebrachte Evidenzen für ein durch Botulinum-Neurotoxine induziertes Krankheitsbild bei Landwirten sind nicht ausreichend im Hinblick auf die klinische Diagnose und den labor diagnostischen Nachweis

LITERATUR

1. Johnson EA, Montecucco C: Botulism. *Handb Clin Neurol* 2008; 91: 333–68.
2. Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern. http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/resqbo8cCmdrg/PDF/22yDAIlgk34pw.pdf
3. Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F: Visceral botulism – a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J Vet Med* 2001; 48: 373–83.
4. Krüger M, Große-Herrenthey A, Schrödl W, Gerlach A, Rodloff A: Visceral botulism at dairy farms in Schleswig-Holstein, Germany – Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust. *Anaerobe* 2012; 18: 221–3.
5. Rodloff AC, Krüger M: Chronic *Clostridium botulinum* infections in farmers. *Anaerobe* 2012; 18: 226–8.
6. Dressler D, Saberi FA: Botulinum toxin: from drug to poison. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2009; 77: 49–54.
7. Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Kein eindeutiger Beweis für „chronischen Botulismus“ beim Menschen. <http://www.dgn.org/stellungnahmen-der-dgn/1941-pressemittteilung-08022012.html>
8. „Chronischer Botulismus“. http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/SonstigeKrankheiten/ChronischerBotulismus_StandpunktBMELV.html.
9. Ferreira JL, Maslanka S, Johnson E, Goodnough M: Detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. *J AOAC Int* 2003; 86: 314–31.
10. Dorner MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG: Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 364: 219–55.
11. Deutsches Institut für Normung e.V. DIN EN ISO 15 189 Medizinische Laboratorien – Besondere Anforderungen an die Qualität und Kompetenz. 2007, Beuth Verlag: Berlin, Germany. 1–46.
12. Hill KK, Smith TJ: Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 364: 1–20.
13. Deutsches Institut für Normung e.V. DIN 10 102 Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischzerzeugnissen: Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin. 1988, Beuth Verlag: Berlin, Germany. 1–5.
14. Lindström M, Korkeala H: Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 298–314.
15. Capek P, Dickerson TJ: Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection. *Toxins (Basel)*, 2010; 2: 24–53.
16. Kalb SR, Garcia-Rodriguez C, Lou J, et al.: Extraction of BoNT/A, /B, /E, and /F with a single, high affinity monoclonal antibody for detection of botulinum neurotoxin by Endopep-MS. *PLoS ONE*, 2010; 5: e12237.
17. Kalb SR, Moura H, Boyer AE, McWilliams LG, Pirkle JL, Barr JR: The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal Biochem* 2006; 351: 84–92.
18. Parks BA, Shearer JD, Baudys J, et al.: Quantification of botulinum neurotoxin serotypes A and B from serum using mass spectrometry. *Anal Chem* 2011; 83: 9047–53.
19. Wang D, Baudys J, Kalb SR, Barr JR: Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2011; 412: 67–73.
20. Kull S, Pauly D, Störmann B, et al.: Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010; 82: 2916–24.
21. Bigalke H: Botulinum toxin: application, safety, and limitations. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 364: 307–17.
22. Pauly D, Kirchner S, Störmann B, et al.: Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst* 2009; 134: 2028–39.
23. Kirchner S, Krämer KM, Schulze M, et al.: Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 4387–95.
24. Hill BJ, Skerry JC, Smith TJ, Arnon SS, Douek DC: Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiol* 2010; 10: 267.
25. Bräuning J: „chronischer“ Botulismus – Aktueller Stand der Wissenschaft. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/chronischer-botulismus-aktueller-stand-der-wissenschaft.pdf>
26. EQuATox project, 2012. Establishment of Quality Assurances for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk. Grant Agreement Number 285120, funded under FP7-SEC-2011. www.equatox.eu