



Wechselwirkungen von Clostridien-Toxininfektionen mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum* und Entsorgungsverfahren in der Tierhaltung

30.11.2011 Tierärztliche Hochschule Hannover

Dr. Bernd Köhler



Übersicht der Clostridien-Erkrankungen

- 1. Gasödeminfektionen** (Rauschbrand, Pararauschbrand, Gasbrand, Bradsot, Nekrotisierende Hepatitis u.a.)
- 2. Enterotoxämien** (Breiniere, Nekrotisierende Enteritis, *Cl. perfringens* Typ A- Enterotoxämie, *Cl. sordellii*- Enterotoxämie u.a.)
- 3. Intoxikationen durch Neurotoxine** (Tetanus, Botulismus)
- 4. Lokale Infektionen** [Ulzerative Enteritis (*Cl. colinum*), Antibiotikainduzierte Colitis durch *Cl. difficile*) u.a.]



Definition des Botulismus

**Botulismus = Intoxikation durch Neurotoxine von
*Clostridium botulinum***

2



Gruppen der *Cl. botulinum*- Toxin bildenden *Clostridien*

(nach Raffestin et al. 2009)

Neurotoxin bildende Clostridien	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV (Cl. argentinense)	Cl. butyricum	Cl. barati	Cl. limosum ¹⁾
Toxintypen	A, prot. B/F	E, nonprot. B/F	C/D	G	E	F	C
Toxinsubtypen	A ₁ -A ₄ B ₁ -B ₃ prot.	E ₁ -E ₃ , E ₆ B/F nonprot.	C, D, C/D	G	E ₄ , E ₅	barati F	limosum C
Proteolyse	+	-	-	+	-	-	+
Lipase-Produktion	+	+	+	-	-	-	+
Wichtige physiologische Eigenschaften	Thermoresistente Sporen	Wachstum bereits bei 3°C (Psychrophil)	Wachstum auch bei 40°C				

1) Eigene Untersuchung
prot. = Proteolytisch
nonprot. = Nicht proteolytisch

3



Bildung von *Clostridium botulinum*- Toxin

<i>Clostridium botulinum</i>	-	7 Toxintypen A-G
<i>Clostridium barati</i>	-	Typ F
<i>Clostridium butyricum</i>	-	Typ E
<i>Clostridium limosum</i>	-	Typ C (eigene Untersuchungen)

Clostridium barati und *Clostridium butyricum*- wahrscheinlich
durch die Aufnahme von Toxinplasmiden von
Clostridium botulinum

4



Empfindlichkeit von Tieren und dem Menschen gegen die Toxine der *Clostridium botulinum*- Typen A-G

Toxintyp	Tiere	Mensch
A	Huhn, Nerz, Nutria, Fuchs	E
B	Schwein, Rind, Schaf, Ziege, Pferd	E
C	Vögel, Fische, Rind u.a. Wiederkäuer, Pferd, Nerz, Fuchs, Hund, Wolf, Schwein	R
D	Rind u.a. Wiederkäuer, Pferd	R
E	Nerz, Fische (Karpfen, Forelle u.a.)	E
F	nicht bekannt	E
G	nicht bekannt	E

E = empfindlich
R = resistent

5



Vorkommen von C2-Toxin bei *Clostridium botulinum* Typ C und Typ D

Typ C



Neurotoxin

Binäres
Enterotoxin

Typ D



Binäres
Enterotoxin

Neurotoxin

6



Cl. botulinum C2- Toxin (Enterotoxin)

- **Binäres Toxin aus Hafttoxin und Enterotoxin, kein Neurotoxin !**
- Bildung während der Sporulation
- Ursache verlustreicher Darmerkrankungen bei Wasservögeln
- Cytopathogen für viele Zellarten besonders für Enterozyten
- Erhöhung der Permeabilität der Darmschleimhaut
- Hochgradige Flüssigkeitsakkumulation im Darm und in der Lunge (Lungenödem)
- Nekrotisch-haemorrhagische Schäden der Darmschleimhaut bei fortgeschrittenen Erkrankungen

7



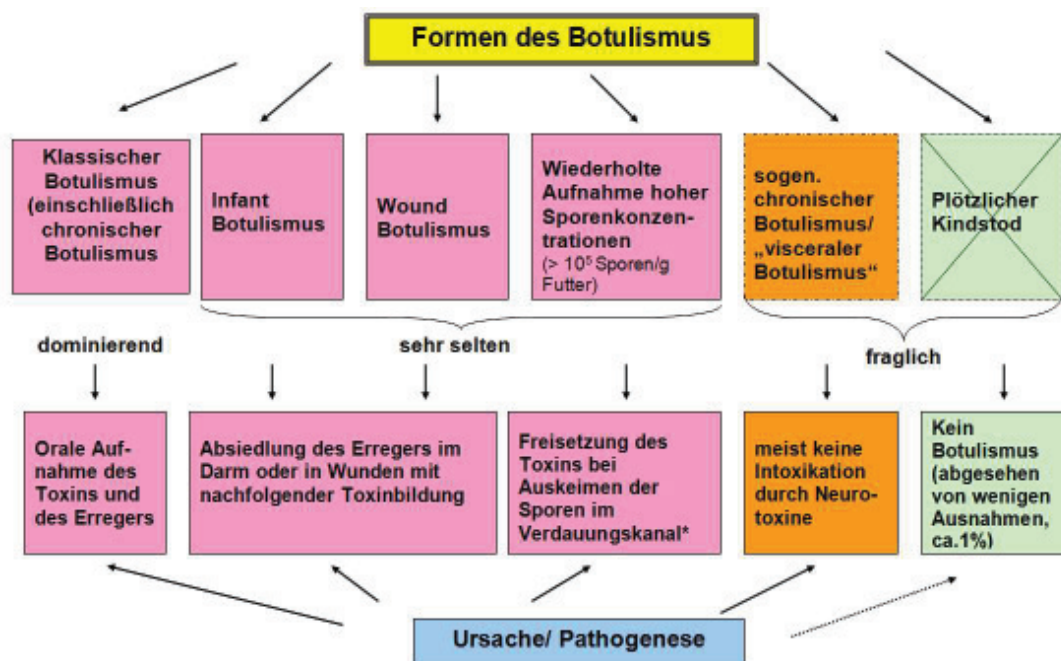
Kodierung der Toxinbildung von pathogenen Clostridienstämmen

Species	Kodierung	Stabilität der Toxinbildung
Gasödemclostridien (<i>Cl. perfringens</i> , <i>Cl. septicum</i> , <i>Cl. novyi</i> , <i>Cl. chauvoei</i> u.a.)	Chromosomal- Kodiert	Weitgehend stabil
<i>Cl. botulinum</i> Neurotoxine der Toxintypen A, B, E, F, G	Plasmid-Kodiert	Instabil, Umweltstämme „meist“ atoxisch bzw. schwach toxisch
<i>Cl. botulinum</i> Neurotoxin der Toxintypen C und D	Plasmid-Kodiert Phagen-Kodiert	Sehr instabil, überwältigende Mehrzahl der Umweltstämme atoxisch ¹⁾
C-2 Toxin von <i>Cl. botulinum</i> Typ C und Typ D- Toxin	Vermutlich Chromosomal- und Phagen-Kodiert ²⁾	Stabilität <u>unbekannt</u>

1) Aktivierung der Toxinbildung setzt spezielle Ereignisketten voraus

2) Toxinbildung chromosomal geprägt

8



* (experimentell beim Meerschweinchen reproduziert)

9



Ergebnis der Kontrolluntersuchung von Rindern (8 Bestände) und Pferden (1 Bestand) mit Verdacht auf endogenen Botulismus

Bestand	Tierart	Untersuchung auf Botulismus		Sonstige Befunde/ Diagnosen
		Nachweis	Toxintyp	
1	Rind	Positiv	D ¹⁾	Negativ
2	Rind	Positiv	A B C D	Negativ
3	Rind	Negativ		<i>Clostridium perfringens</i> Typ D- Enterotoxämie
4	Rind	Negativ		<i>Clostridium perfringens</i> Typ A- Enterotoxämie mit β 2-Toxin bildenden Stämmen ²⁾
5	Rind	Negativ		Negativ (Verdacht Ketose)
6	Pferd	Negativ		Kriminelle Chloralhydratvergiftung
7	Rind	Negativ		<i>Cl. perfringens</i> Typ A- Enterotoxämie durch Stämme mit starker α -Toxinbildung, β 2- Toxin negativ ²⁾
8	Rind	Negativ		Proteolyse verdorbener Silage
9	Rind	Negativ		

1) von 16 Proben von 4 Rindern bei einem Tier 1 mal *Cl. botulinum* Typ D-Toxin nach Anreicherung des Darminhaltes in einem die Toxinbildung förderndem Medium in einer Konzentration von 10 Dlm/ml

2) hochgradiger *Clostridium perfringens* Typ A-Gehalt in Mägen und Dünndarm

10



Verdacht / These

Sogenannter
„Chronischer Botulismus“
bzw.
„Visceraler Botulismus“

=

Cl. botulinum Typ C/D-Tox-
infektionen durch C2-Toxin
meist in Assoziation mit
Cl. perfringens Typ A- Tox-
infektion oder anderen
pathogenen *Clostridia* spp.

11



Komplexe Diagnostik von Botulismus

Labordiagnostik				Epidemiologie/ Klinik	Diagnose
Direkter Toxinnachweis (Mäuseversuch)*	Toxinanreicherung (> 10 Dim/ml)*	Erregeranzüchtung (toxische Stämme)*	PCR ¹⁾ Toxingene		
+	+	+		+	Botulismus
+	+			+	Botulismus
+				+	Botulismus
	+			v	Botulismus
		+		v	Botulismus
	+				Verdacht Botulismus
		+			Verdacht Botulismus
			+	v	Verdacht Botulismus
				v	Verdacht Botulismus
			+		kein Botulismus
					kein Botulismus

* mit spezifischer Neutralisation
v verdächtig für Botulismus
1) einschließlich Realtime PCR
+ positiv

12



Aus

“Clostridia Molecular Biology in the Post-genomic Era”

by Holger Brüggemann and
Gerhard Gottschalk

Caister Academic Press 2009, Norfolk KK

Seite 108

- “Compared with culture methods, molecular detection techniques are sensitive, specific, and rapid to perform.”
- “A disadvantage of molecular detection assays is that they do not detect biologically active neurotoxin or even activity of genes.”

13



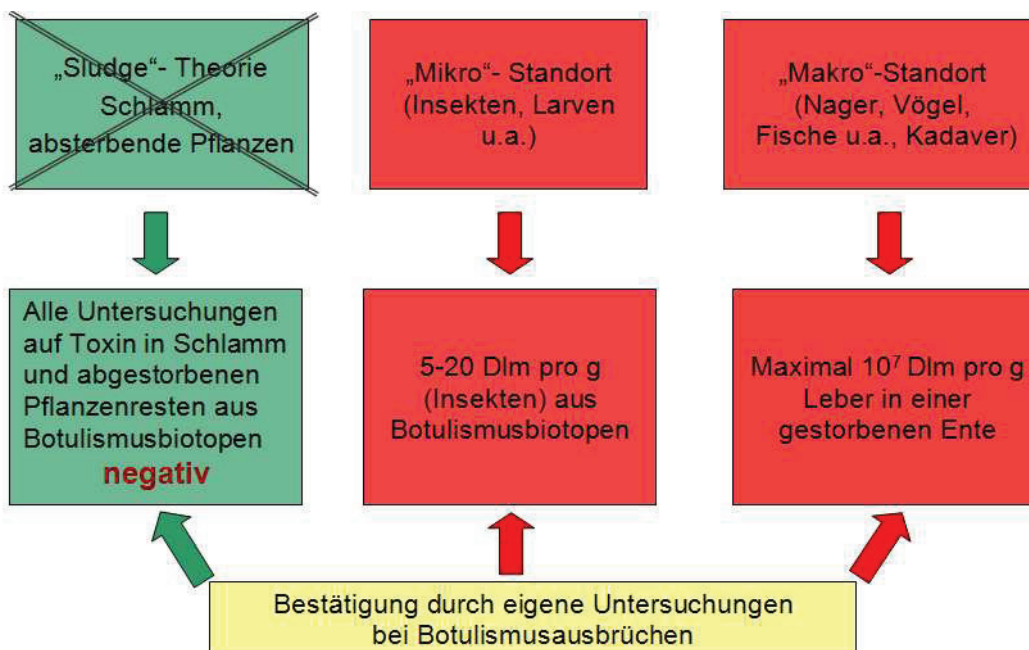
Begünstigende Faktoren für die Vermehrung und Toxinbildung von *Clostridium botulinum* in der Umwelt

1. Anaerobiose bzw. Vorkommen von sauerstoffzehrenden Bakterien
2. Ausreichende Nährsubstrate
3. Optimaler pH-Wert
4. Längere Hitzeperiode mit Wassertemperaturen über 20°C für mindestens 10 -14 Tage
5. Relevantes Toxinbildungsvermögen des Erregers bzw. Bedingungen, die seine Toxinbildung induzieren
6. Stabilität des Neurotoxinbildungsvermögens von *Cl. botulinum*-Stämmen in der Umwelt

14



Toxinbildung von *Clostridium botulinum* in der Umwelt



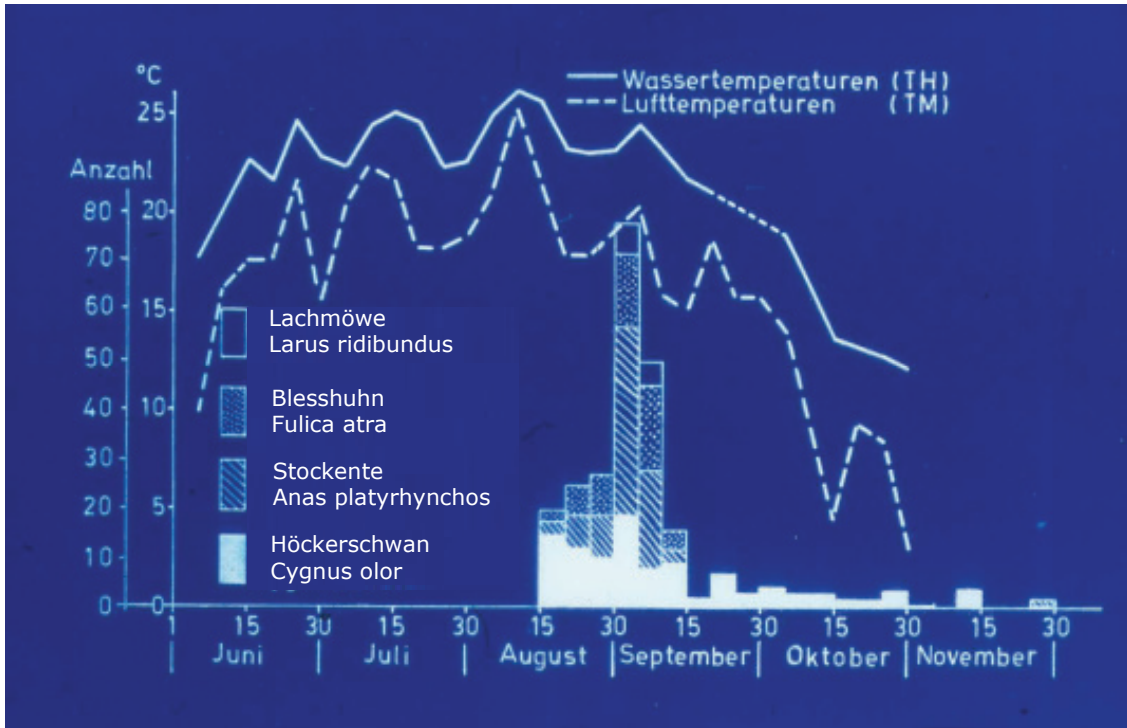
15



Wechselwirkungen von Clostridien-Toxininfektionen
mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von
Clostridium botulinum und Entsorgungsverfahren in der Tierhaltung

Dr. B. Köhler,

RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam



16



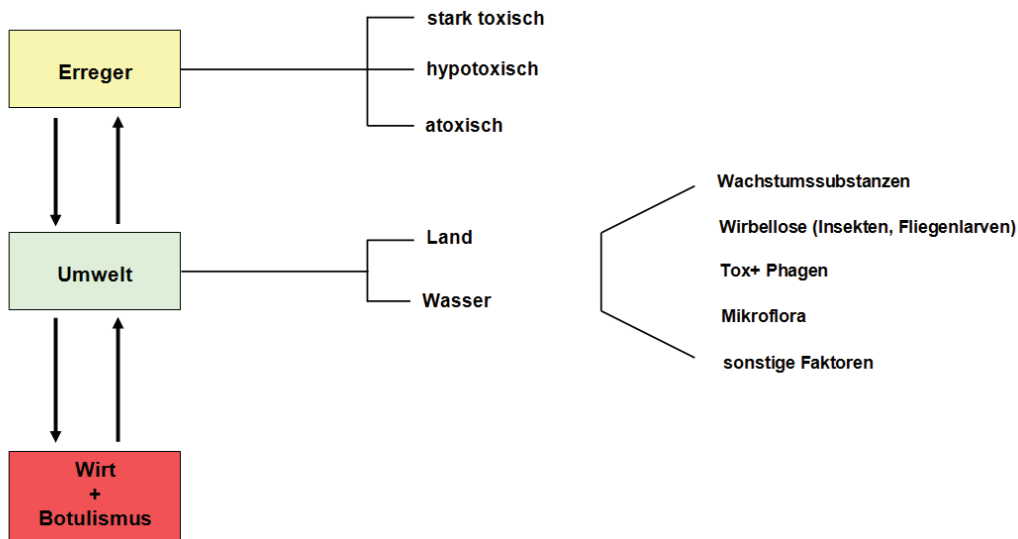
Wechselwirkungen von Clostridien-Toxininfektionen
mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von
Clostridium botulinum und Entsorgungsverfahren in der Tierhaltung

Dr. B. Köhler,

RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam



Faktoren, die die Erreger- Wirt- Beziehung von *Cl. botulinum* Typ C
entscheidend beeinflussen



17



Nachweis Botulinum- Neurotoxin bildender Keime im Boden eines Areal mit akutem Auftreten von Botulismus bei Wasservögeln

Zeitpunkt der Probenahme	Anzahl der Proben	Nachweis von Botulinustoxin im Mäuseversuch		Toxintypen			Epidemiologische Bemerkungen
		Anzahl	Prozent	C	E	B	
August 1999	20	11	55	9			Verlustreicher Ausbruch von Botulismus bei Wasservögeln (Typ C)
Oktober 1999	20	3	15	2	2	1	Vereinzelt Botulismusfälle (Typ C)
Dezember 1999	20	1	5		1		Winter, keine Erkrankungen
Februar 2000	20	0			0		
April 2000	20	0					
Juni 2000	20	0					Sporadische Botulismusfälle (Typ C)
August 2000	20	1	5	1			
13 Monate	140	16	11,4	12	4	1	
Juli/August 2001	30	0					Keine Erkrankungen

18



Untersuchungen zum Vorkommen von *Cl. botulinum*- Neurotoxin bildenden Stämmen im Biokompost, in Gärrückständen, in Gülle aus landwirtschaftlichen Betrieben und in Klärschlamm von Kläranlagen

Untersuchungsmaterial	Anzahl der geprüften Betriebe	Anzahl der Proben	Nachweis Toxin bildender <i>Cl. botulinum</i> - Stämme ¹⁾		Sonstiges
			Anzahl	Prozent	
Kompostproben	20	102	2 ²⁾	2	2 Proben schwach toxisch/ Ohne Zuordnung zu speziellem Toxintyp
Klärschlamm	14	56	0	0	
Gülle aus Rinder- Schwein- und Geflügelbetrieben (ca. 6-wöchige Vergärung)	31	94	0	0	
Proben aus Biotonne	11	22	0	0	
Biogasanlagen (Studie 2010)	12	83	9	11	3x Typ C, Rohstoffe 2x Typ B Rohstoffe 1x Typ D Rohstoffe 3x Typ A, Gärrückstand
Summe	88	357	9	2	

1) Nachweis mittels Mausbioassay nach 7 tägiger Anreicherung in cooked meat-Medium bzw. Maltose Kalbfleischbouillon nach Nishida und Nakagawara (Grenzwert ≥ 10 Dlm/ml)

2) zweifelhafter Befund, Toxin nicht typisierbar

19



Untersuchung von 10 Biogasanlagen auf *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme im Jahr 2010

Anlage (Nr.)	Untersuchte Rohstoff- proben	Untersuchte Gärrück- standsproben	Nachweis Neurotoxinbildender <i>Cl. botulinum</i> -Stämme						Positive Proben insgesamt		Herkunft positiver Proben
			A	B	C	D	E	Poly- valent	Anzahl	%	
1-7	21	28									
8	4	4	3	1	1	1			6	78	3 x Gärrück- stände 3 x Rohstoffe
9	3	4			2				2	28	Rohstoffe
10	3	4		1					1	14	Rohstoffe
Σ	10	31	3	2	3	1			9	13	

20



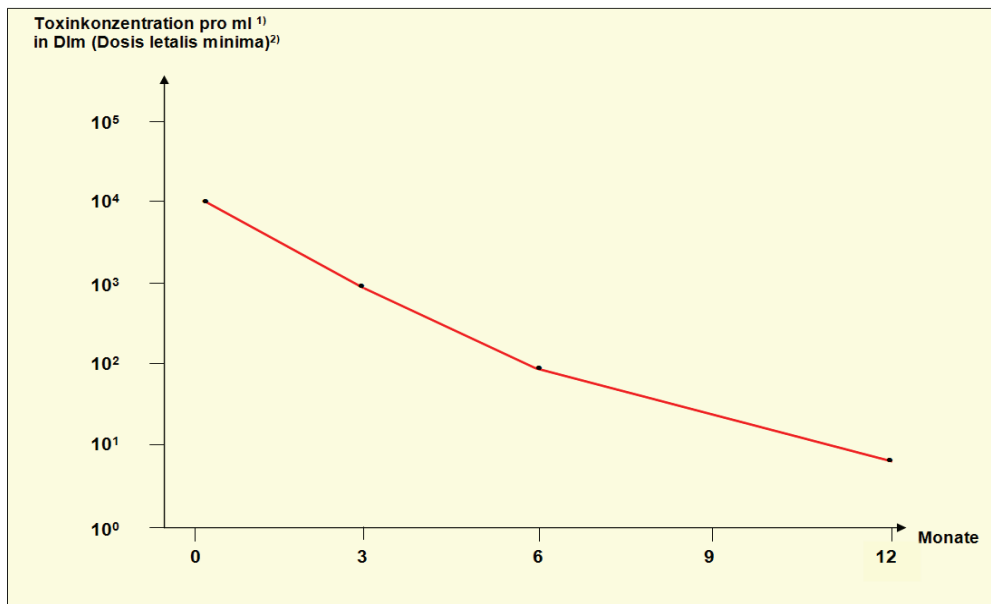
Ergebnisse der Stufenkontrolle in einer Biogasanlage mit Nachweis Neurotoxin Typ A bildender *Cl. botulinum*- Stämme im Gärrückstand

Untersuchungs- material	Anzahl der Proben	Positive Proben	Neurotoxintypen von <i>Clostridium botulinum</i>				
			A	B	C	D	E
Gärrückstände	3	3	3				
Vorerhitzungscontainer	2	2	1		1		
Gärtanks/Leitungssysteme zwischen den Tanks	6	5	2	1	1	1	
Summe	11	10	6	1	2	1	

21



Persistenz von Neurotoxin Typ A bildenden *Clostridium botulinum*-Stämmen in einer positiven Gärrückstandsprobe



1) Nach 7 tägiger Anreicherung im cooked meat medium
2) ca. 25g schwere Mäuse

22



Hemmung der Vermehrung von *Cl. botulinum* in Gärrückständen von Biogasanlagen

- Vergleichsweise lange Generationszeit von *Cl. botulinum* von 20-30 Minuten im Verhältnis zu *Cl. perfringens* (Generationszeit 8-10 Minuten) u.a. schnell wachsenden Bakterienarten
- Suboptimale Temperaturen (Klärschlamm und Gülle)
- Verschiebung des Nährsubstrates in Richtung Zellulose u.a. pflanzlichen Rohstoffen
- Dominanz Zellulose abbauender Mikroflora
- Mangel von ausreichenden Nährstoffen für *Cl. botulinum*, die zudem von schnell wachsenden Keimen aufgebraucht werden
- Unzureichende Anaerobiose
- Konkurrenzmikroflora, die *Cl. botulinum* durch Bacteriozide hemmt
- pH-Wert (saurer pH-Wert hemmend, leicht alkalischer pH-Wert optimal für pathogene Clostridien)

23



Hygienische Probleme beim Betreiben von Biogasanlagen, die die Verbreitung von pathogenen Clostridien fördern

- Breites Rohstoffspektrum einschließlich von Produkten aus Tierproduktionsanlagen (Gülle, Einstreu, Kadaver u.a.) und verdorbenen Lebensmitteln
- Erhöhte Betriebstemperatur von 35-41°C, die die Vermehrung pathogener Clostridien begünstigt
- Kontinuierlicher Produktionsprozess (z. T. über mehrere Jahre), der die Entwicklung von Erregerkreisläufen fördert
- Kurze Vergärungsdauer (< 1 Woche), was die Passage pathogener Clostridien begünstigt
- Verbringung der Gärrückstände in die Umwelt insbesondere auf landwirtschaftliche Nutzflächen, was zur Kontamination von Futtermitteln, Lebensmitteln und industriellen Rohstoffen mit Neurotoxin bildenden *Clostridium botulinum*- Stämmen u.a. pathogenen Clostridien führen kann

24



Veterinärhygienische Mängel beim Betrieb von Biogasanlagen

- Annahme und Lagerung der Rohstoffe **in nur einem** Vorratssilo
- Vermehrung pathogener Clostridien im Rohstoffvorratssilo, was die stationäre Kontamination der Anlagen begünstigt und den Infektionsdruck in der Biogasanlage erhöht
- Einsatz von Starterkulturen ohne veterinärhygienische Kontrolle (häufig aus benachbarter Anlage)
- Fehlende Möglichkeiten zur Unterbrechung des Produktionsprozesses bei Kontamination mit Neurotoxin bildenden *Clostridium botulinum*- Stämmen und zur Durchführung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen
- Sammlung der Gärrückstände meist in einem einzigen Lagertank bzw. in miteinander verbundenen Tanks, was die laufende Rekontamination der Gärrückstände fördert
- Fehlendes Schwarz- Weiß-Prinzip, was ebenfalls zur Rekontamination der Gärrückstände führen kann

25



Veterinärhygienische Richtlinien/Anforderungen für den Betrieb von Biogasanlagen

- Regelmäßige Rohstoffkontrolle insbesondere von tierischen Rohstoffen
- Kein Einsatz von tierischen und pflanzlichen Rohstoffen aus Beständen mit Botulismusausbrüchen
- Mikrobiologische Untersuchung von Starterkulturen auf Neurotoxin bildende *Clostridium botulinum*- Stämme
- Ausstattung aller Biogasanlagen mit 2 Rohstoffsilos, die wechselseitig (etwa 4 wöchiger Rhythmus) nach Reinigung und Desinfektion betrieben werden sollten
- Ausstattung aller Biogasanlagen mit 2 Gärrückstandssilos, die abwechselnd in ca. 3 monatigem Abstand zu befüllen sind
- Sicherung der Gärrückstände vor nachträglichen Kontaminationen (Schwarz-Weiß-Prinzip)
- **Jährliche Kontrolluntersuchung der Gärrückstände aller Biogasanlagen hinsichtlich des Vorkommens Neurotoxin bildender *Clostridium botulinum*-Stämme**

26



Verfahrensweisen bei positivem Befund von Toxin bildenden *Cl. botulinum* in Biogasanlagen

Untersuchungsergebnisse

Rohstoffe	Gärrückstände	Bewertung/Schlussfolgerung
-	-	Keine Beanstandung
+ ¹⁾	-	Keine Beanstandung
-	+ ¹⁾	Stufenkontrolle → Hygienische Bewertung der Ergebnisse
+ ¹⁾	+ ¹⁾	- Stufenkontrolle - Hygienische Maßnahmen - Sperrung positiver Rohstoffe

+¹⁾ Positiv (Nachweis Toxin bildender Stämme)

27



**Wechselwirkungen von Clostridien-Toxininfektionen
mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von
Clostridium botulinum und Entsorgungsverfahren in der Tierhaltung**

Dr. B. Köhler,

RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

RIPAC-LABOR GmbH
Am Mühlenberg 11
14476 Potsdam-Golm

Tel: +49(0)331 581840-0
Fax: +49(0)331 581840-10
www.ripac-labor.de

Email: info@ripac-labor.de

28



**Wechselwirkungen von Clostridien-Toxininfektionen
mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von
Clostridium botulinum und Entsorgungsverfahren in der Tierhaltung**

Dr. B. Köhler,

RIPAC-LABOR GmbH, Potsdam



29