



BOTULINOM

Helge Böhnel und Frank Gessler



Die Zoonose Botulismus. Der Weg des Botulinum-Toxins von der Bakterie in die Zielzelle



**Vorhaben im BMBF-Förderschwerpunkt
„Forschungsverbünde zu zoonotischen Infektionskrankheiten“
2007-2010**

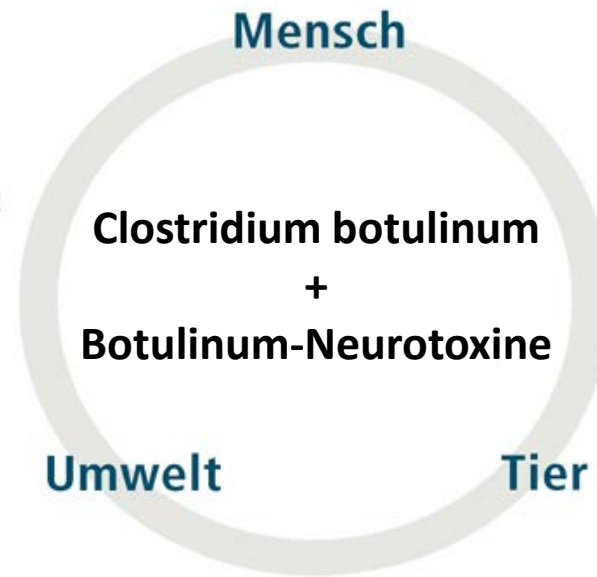


Botulismus

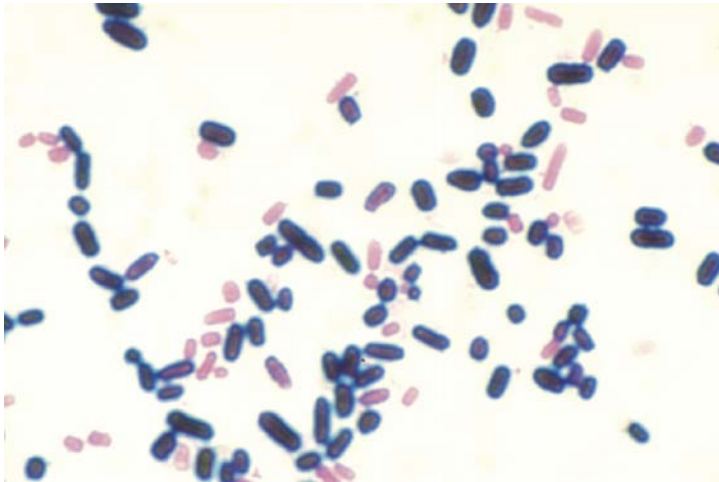
betrifft zumindest alle warmblütigen Tiere
und Mensch

Botulismus ist eine Zoonose

EU-Richtlinie 2003/99 von 2003



Clostridium botulinum



anaerober, gram+ Sporenbildner

4 phänotypische Gruppen

Gruppe I – proteolytisch A, B, F

Gruppe II – nicht proteolytisch B, E, F

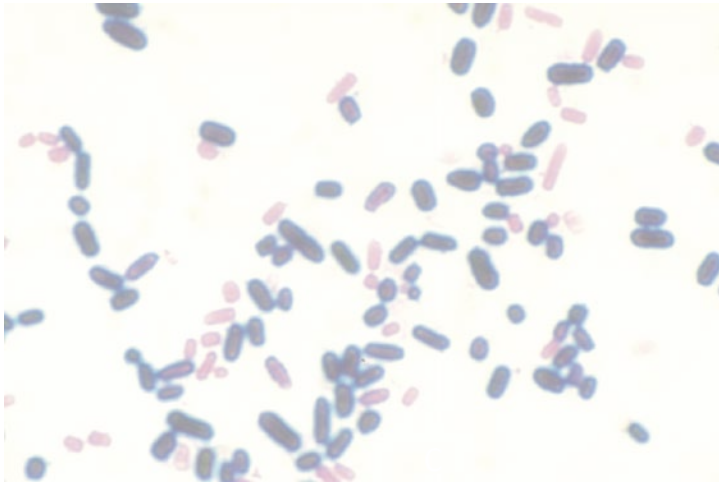
Gruppe III – Typen C und D

Gruppe IV – Typ G

Clostridium botulinum

+

Botulinum-(Neuro)toxine



anaerober, gram+ Sporenbildner

4 phänotypische Gruppen

Gruppe I – proteolytisch A, B, F

Gruppe II – nicht proteolytisch B, E, F

Gruppe III – Typen C und D

Gruppe IV – Typ G



SwissProt

MM 150.000 – Zn-Metalloprotease

Typ A – A1 bis A5 (A7?)

Typ B – B1 bis B6

Typ C – C1, C/D

Typ D – D, D/C

Typ E – E1 bis E6

Typ F – F1 bis F7

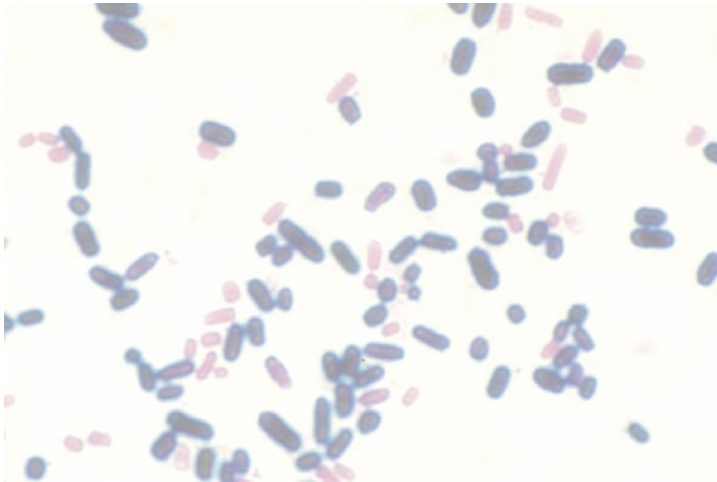
Typ G –

Typ H – ??

Clostridium botulinum

+

Botulinum-(Neuro)toxine



anaerober, gram+ Sporenbildner

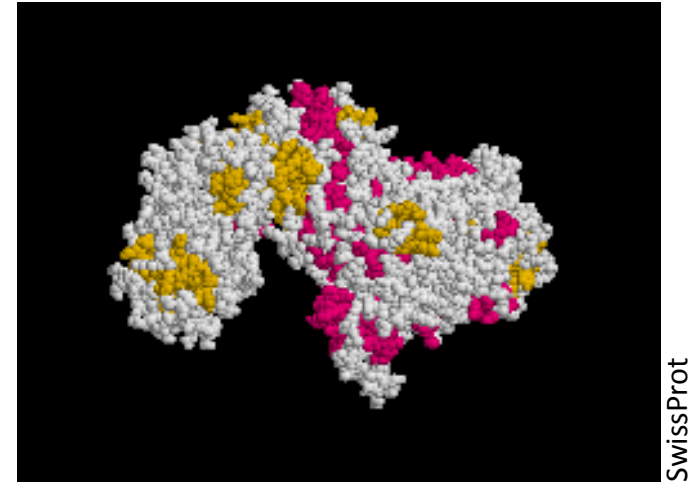
4 phänotypische Gruppen

Gruppe I – proteolytisch A, B, F

Gruppe II – nicht proteolytisch B, E, F

Gruppe III – Typen C und D

Gruppe IV – Typ G



SwissProt

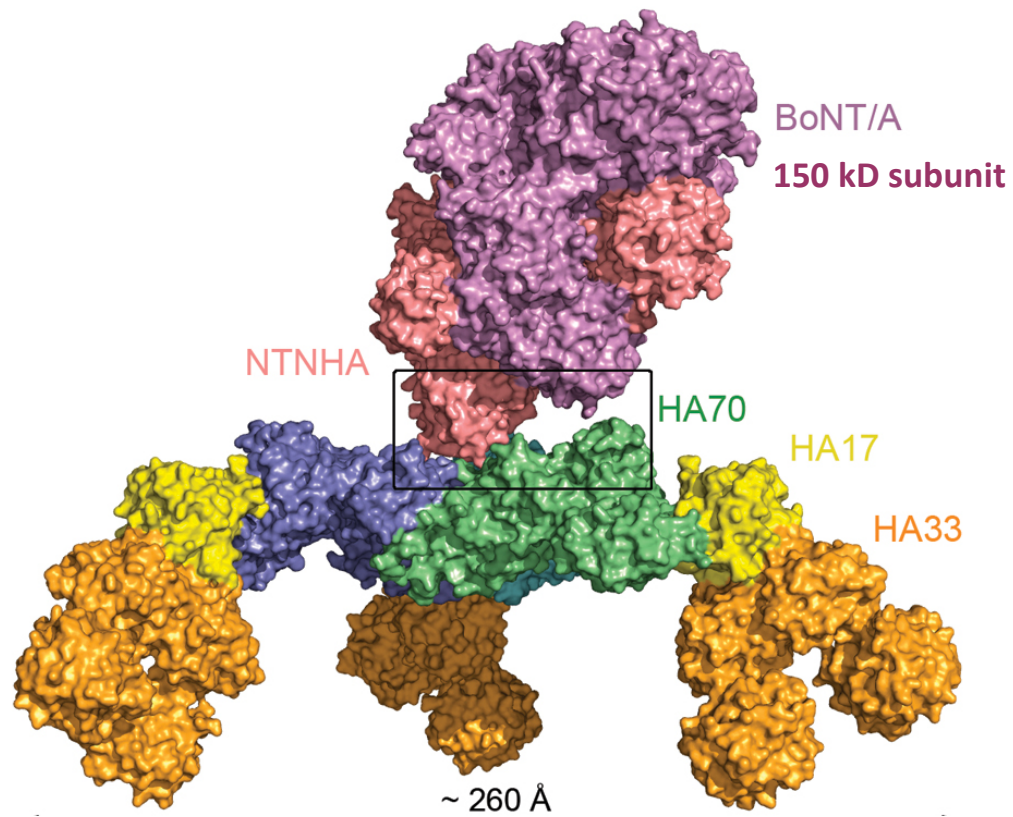
MM 150.000 – Zn-Metalloprotease

Typen A bis H, zahlreiche Subtypen

weitere Toxine

C2 – ADP-Ribosylase -> Aktin

C3 – ADP-Ribosylase -> Rho A, B und C



Lee et al., PLOS pathogens, 2013

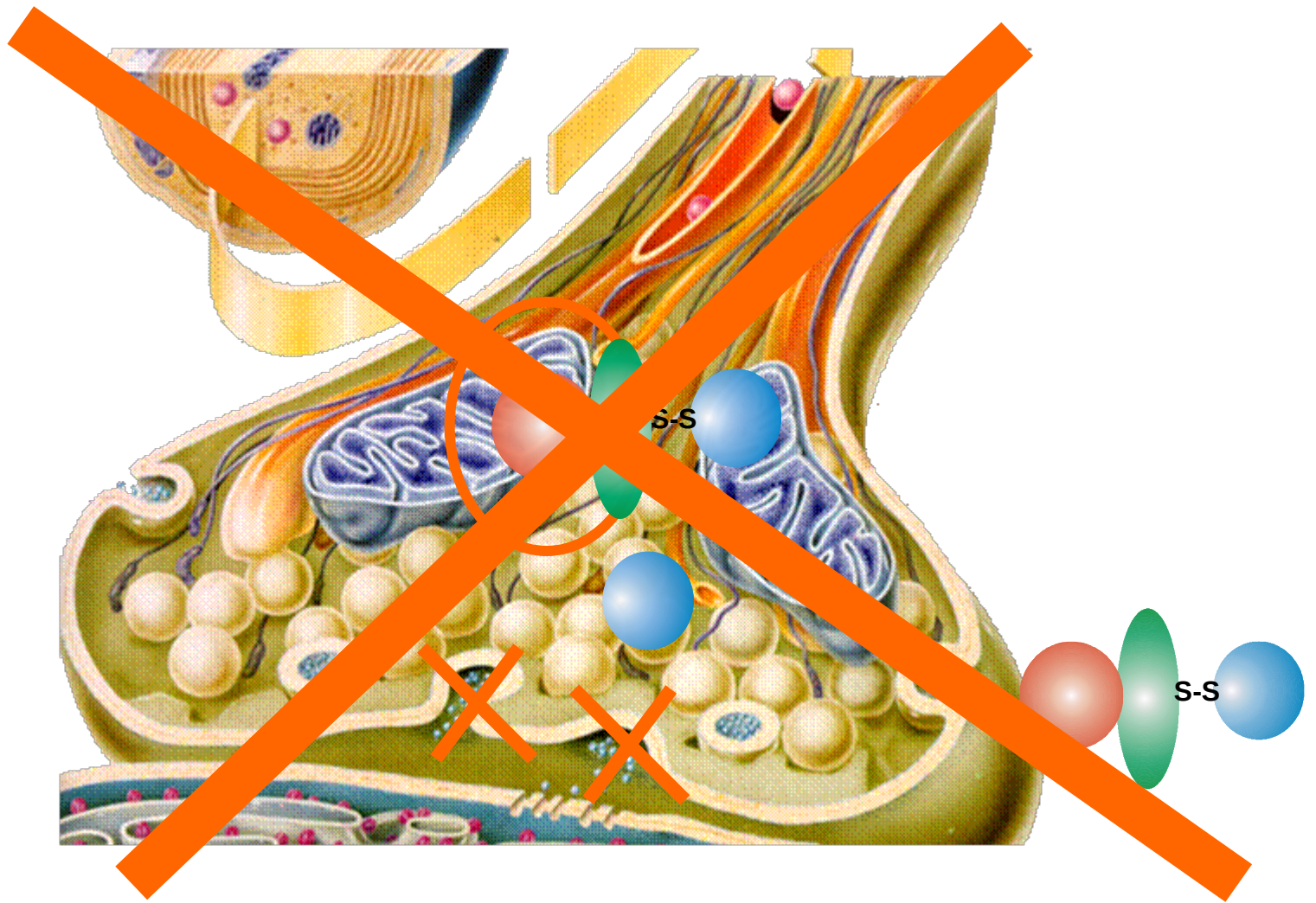




Foto: I. Dutra



Foto: B. Schwagerick

akut

chronisch

Intoxikation

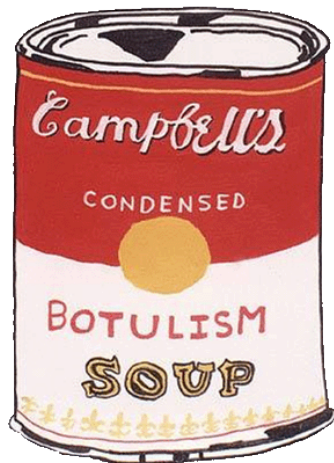
Toxikoinfektion

akut

chronisch

Intoxikation

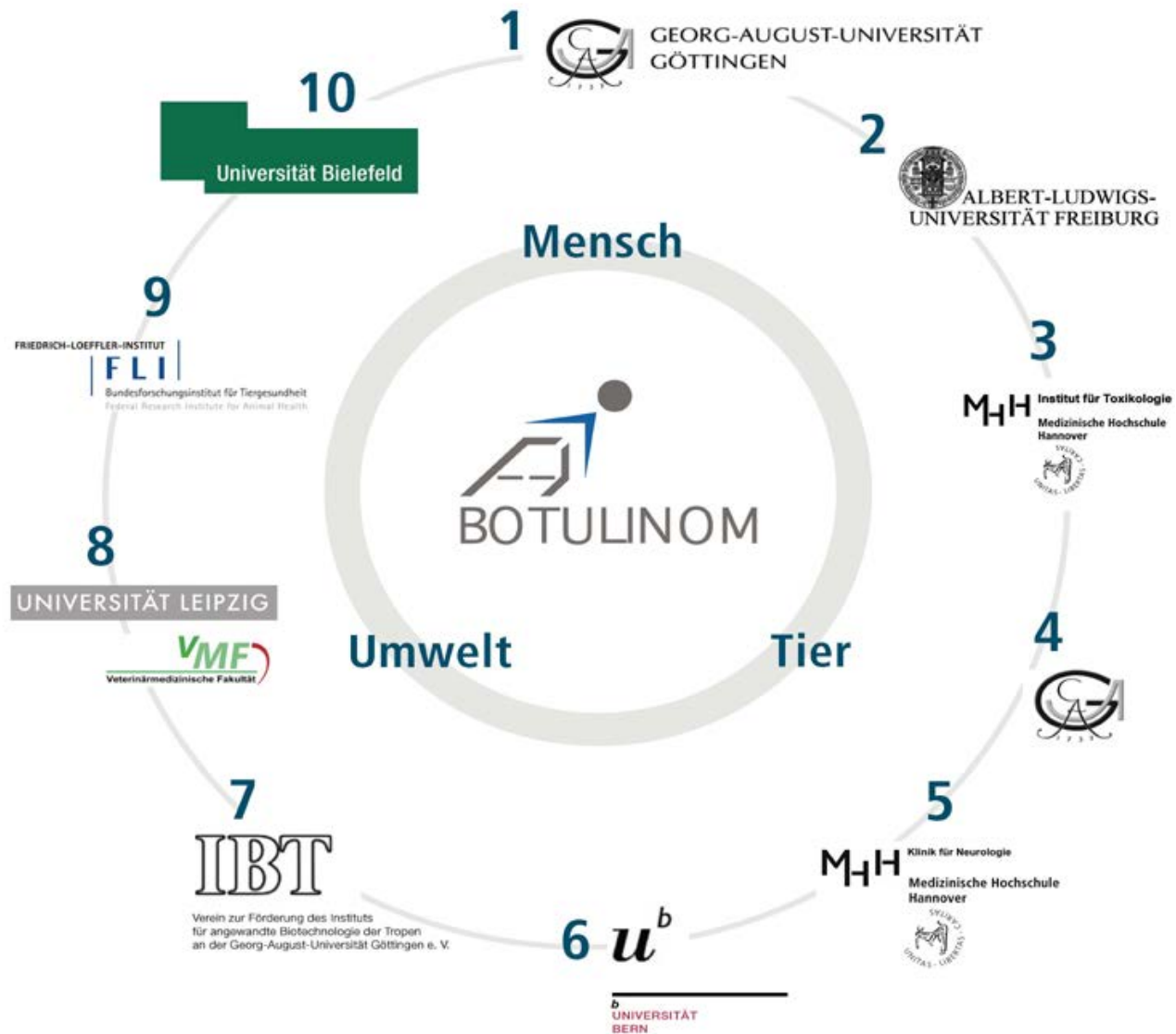
Toxikoinfektion

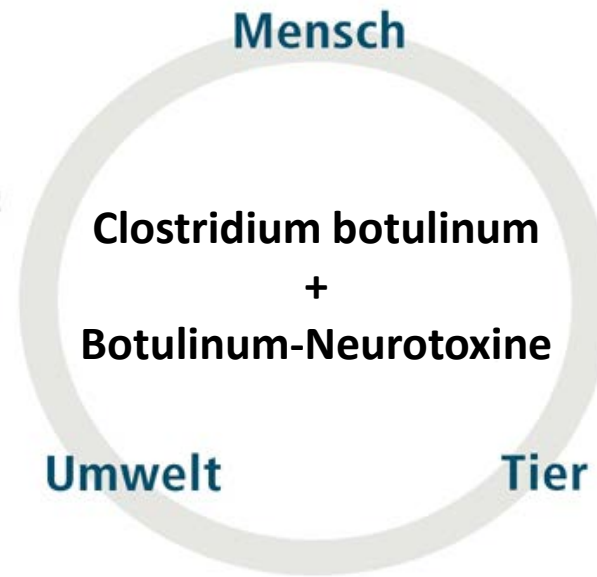


Tony 'Baloney' Juliano



Foto: CDC, Atlanta





Clostridium botulinum
+
Botulinum-Neurotoxine

Prof. Dr. H. Böhnel

- 3046 Referenzstämme und Feldisolate, davon 185 ursprünglich als *Clostridium botulinum* typisiert



Prof. Dr. H. Böhnel

- 3046 Referenzstämme und Feldisolate, davon 185 ursprünglich als *Clostridium botulinum* typisiert
- Stabilisierung und Identifizierung der Stämme



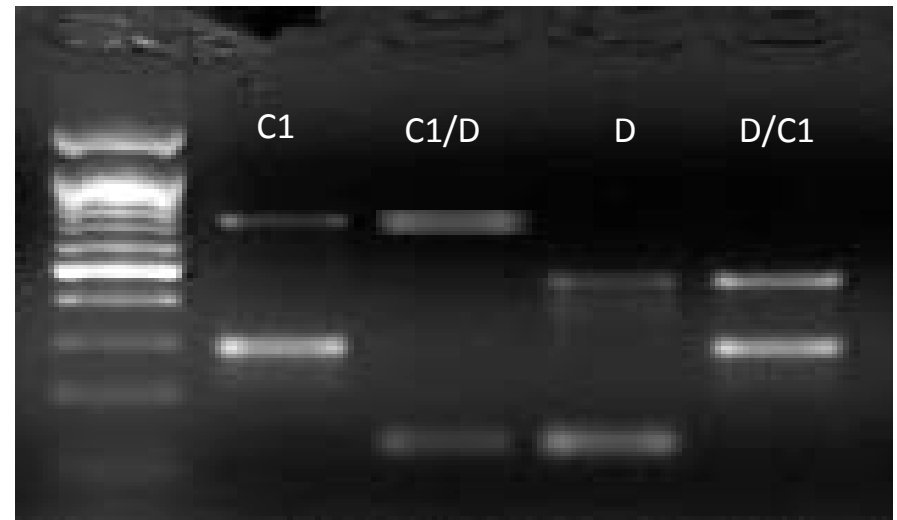
Prof. Dr. H. Böhnel

- 3046 Referenzstämme und Feldisolate, davon 185 ursprünglich als *Clostridium botulinum* typisiert
- Stabilisierung und Identifizierung der Stämme
- Toxingensequenzierung, Toxizitätsprüfung und Typisierung bei *Clostridium botulinum*-Stämmen



Prof. Dr. H. Böhnel

- 3046 Referenzstämme und Feldisolate, davon 185 ursprünglich als *Clostridium botulinum* typisiert
- Stabilisierung und Identifizierung der Stämme
- Toxingensequenzierung, Toxizitätsprüfung und Typisierung bei *Clostridium botulinum*-Stämmen
- Multiplex-PCR zur einfachen und schnellen Differenzierung der C/D-Mosaikstämme



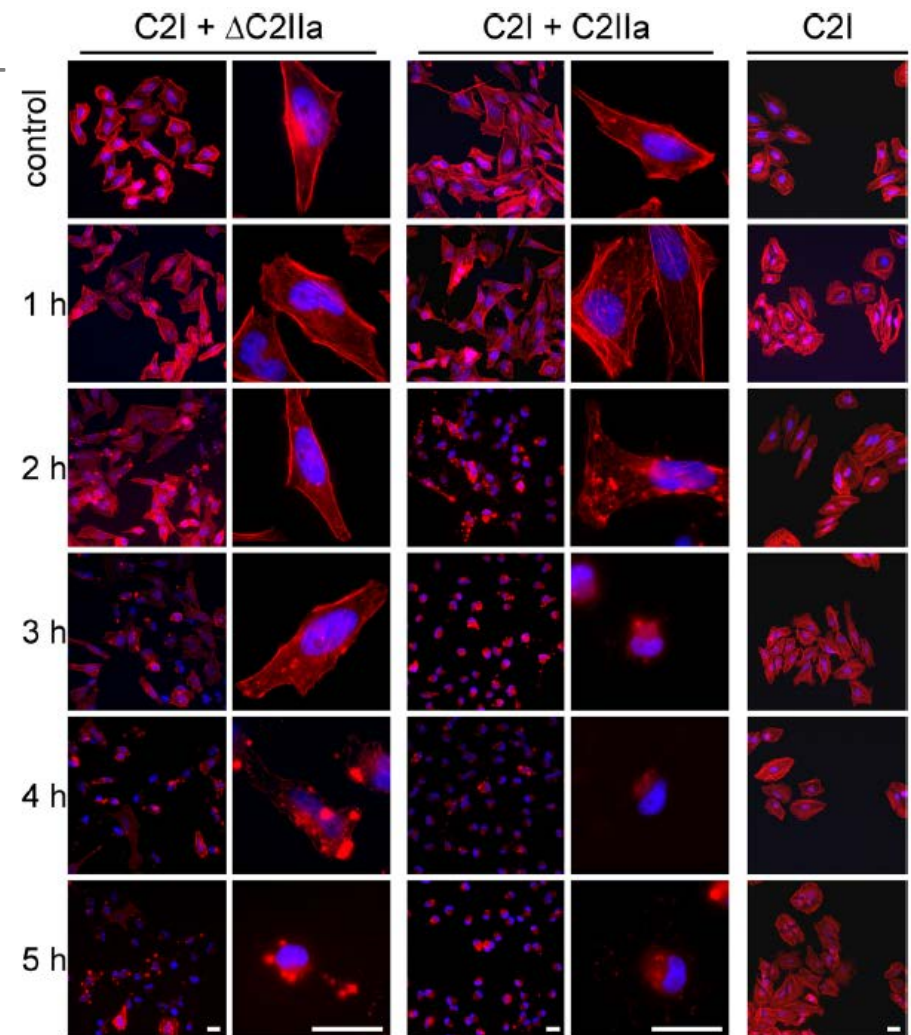
Weitergabe der Stammsammlung an Prof. Rodloff, Leipzig

- Genomsequenzierung und Annotation
Clostridium botulinum Typ C, Stamm IBT 2300
(Datenbank GenDB)

- Genomsequenzierung und Annotation
Clostridium botulinum Typ C, Stamm IBT 2300
(Datenbank GenDB)
- „neues“ C2-Toxin identifiziert
(um 129 Aminosäuren verlängert)

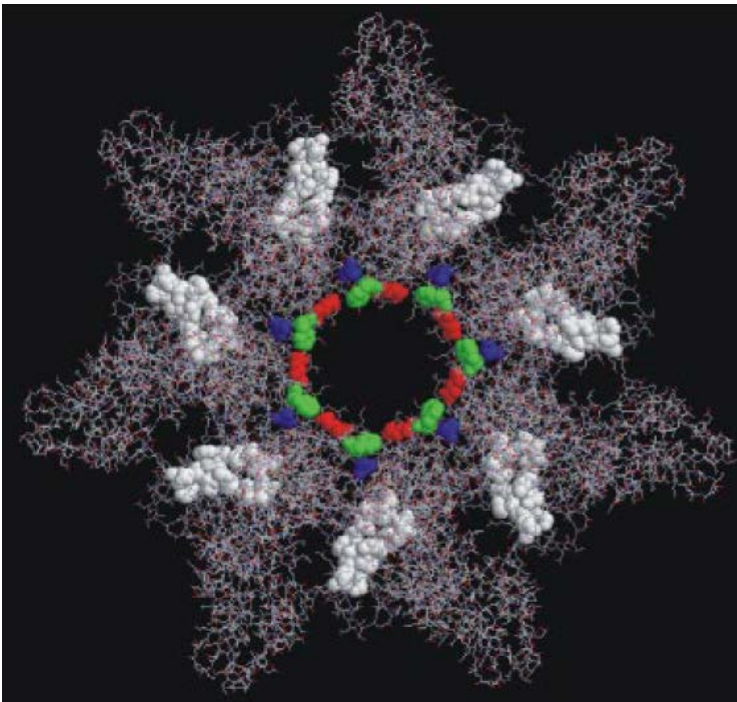
(C) 2300 Verlängerung	716	LDKLINDIDHISSINIMNNTNSGIDYTTGLSNRIKGS DGIYRAETKAFSERTKEINYSRGYYRIRFVVQCSSSFTCNFQL	795
(C) 2300	586	LVKVITFKENISSINIINDTNFGVESMTGLSKRIKGNDGIYRASTKSFSFKSKEIKYPEGFYRMRFVIQSYEPFTCNFKL	665
(C) 203U28	586	LVKVITFKENISSINIINDTNFGVQSMTGLSNRSKGQDGIYRAATTAFSEKSKELKYPEGRYRMRFVIQSYEPFTCNFKL	665
		* *:*. ::*****:*.** *:: ****:* **,***** *:***::***:*. * *:***:*. ..*****:*	
(C) 2300 Verlängerung	716	FNNQIFSRSPHEGFFDEFAYFKYDGNNSFLDISCNIISNSN--PGVFLIEVTRI-	847
(C) 2300	586	FNNLIYSNSFDIGYYDEFFFYFYNGSKSFFDISCDIINSINRLSGVFLIELDKLI	720
(C) 203U28	586	FNNLIYSSSFDKGYDEFFFYFYNGSKSFFNISCDIINSINRLSGVFLIELDKLI	720
		*** *: * **, *:*** ** *:***::***:***:***. * .*****: ::	

- Genomsequenzierung und Annotation
Clostridium botulinum Typ C, Stamm IBT
(Datenbank GenDB)
- „neues“ C2-Toxin identifiziert
(um 129 Aminosäuren verlängert)



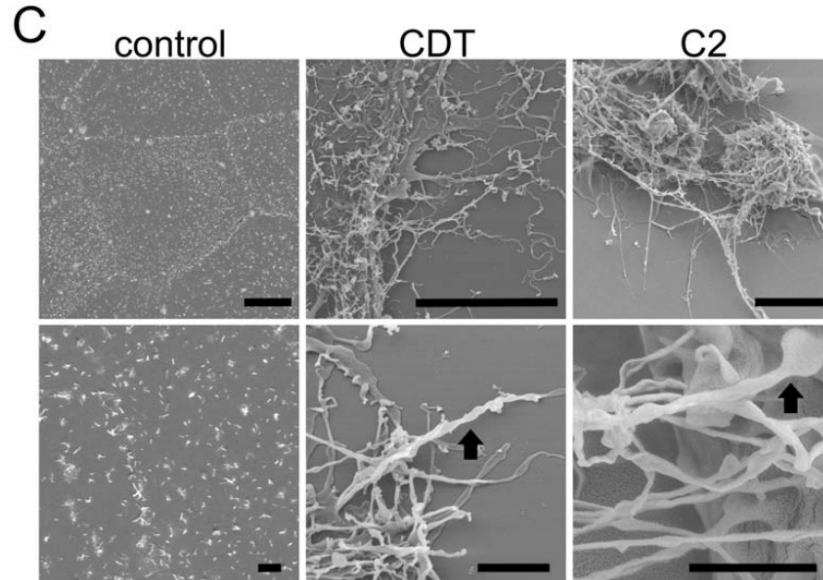
Sterthoff et al., Infect. Immun., 2010

- Glu³⁹⁹, Asp⁴²⁶, Phe⁴²⁸ von Bedeutung für die Bindung von C2II und die Translokation der enzymatischen Komponente C2I ins Zytosol



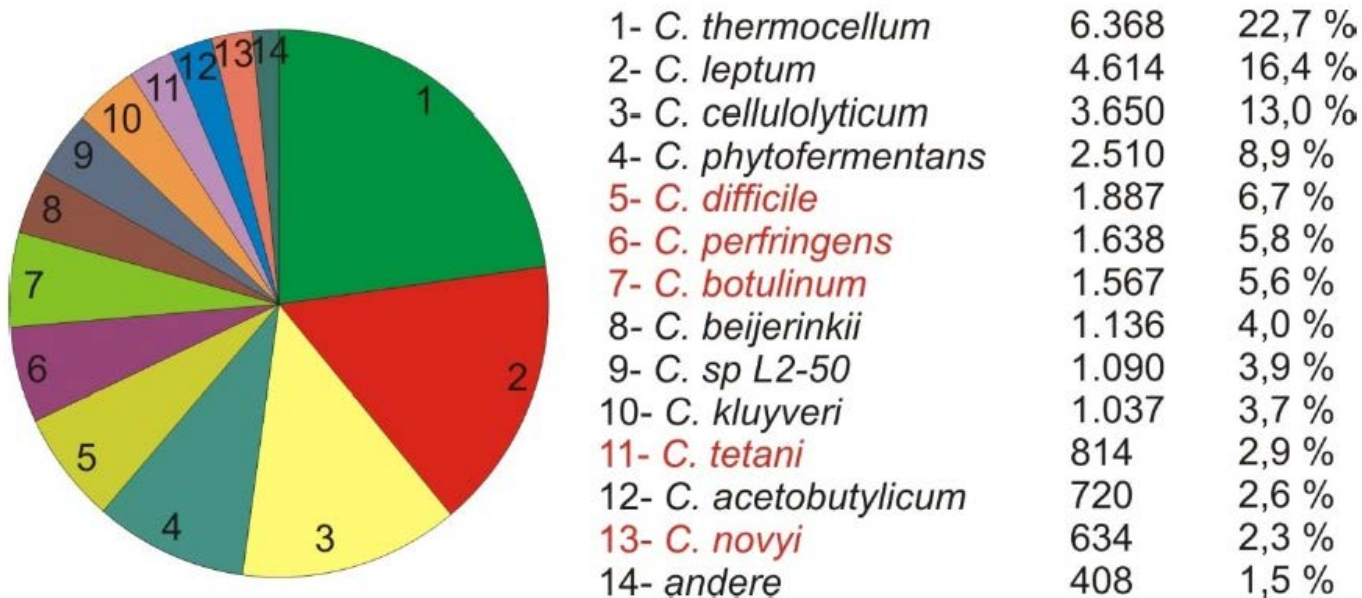
Lang et al., Biochem., 2008
Neumeyer et al., J. Biol. Chem., 2008

- Glu³⁹⁹, Asp⁴²⁶, Phe⁴²⁸ von Bedeutung für die Bindung von C2II und die Translokation der enzymatischen Komponente C2I ins Zytosol
- C2 führt zur Bildung einer netzartigen Struktur von Protrusionen -> deutliche Zunahme der Bakterienadhäsion am Modell *Clostridium difficile*



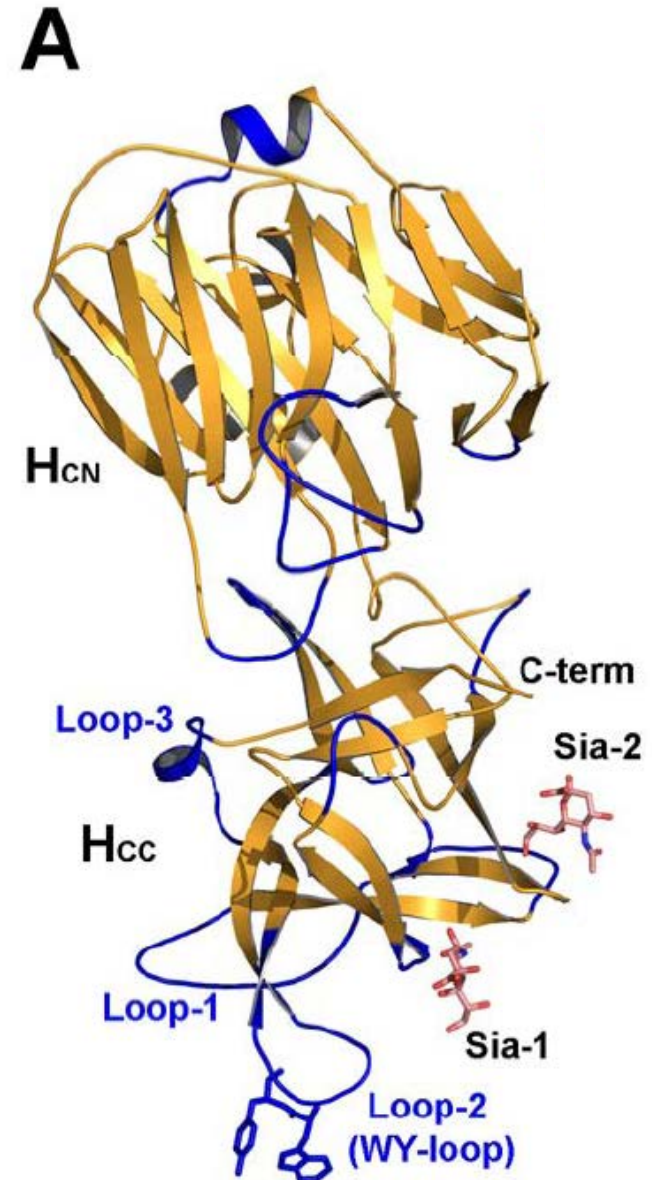
Schwan et al., PLOS Pathogen, 2009

- Genomsequenzierung und Annotation
Clostridium botulinum Typ C, Stamm IBT 2300
(Datenbank GenDB)
- „neues“ C2-Toxin identifiziert
(um 129 Aminosäuren verlängert)
- Metagenomanalyse Gärrestprobe



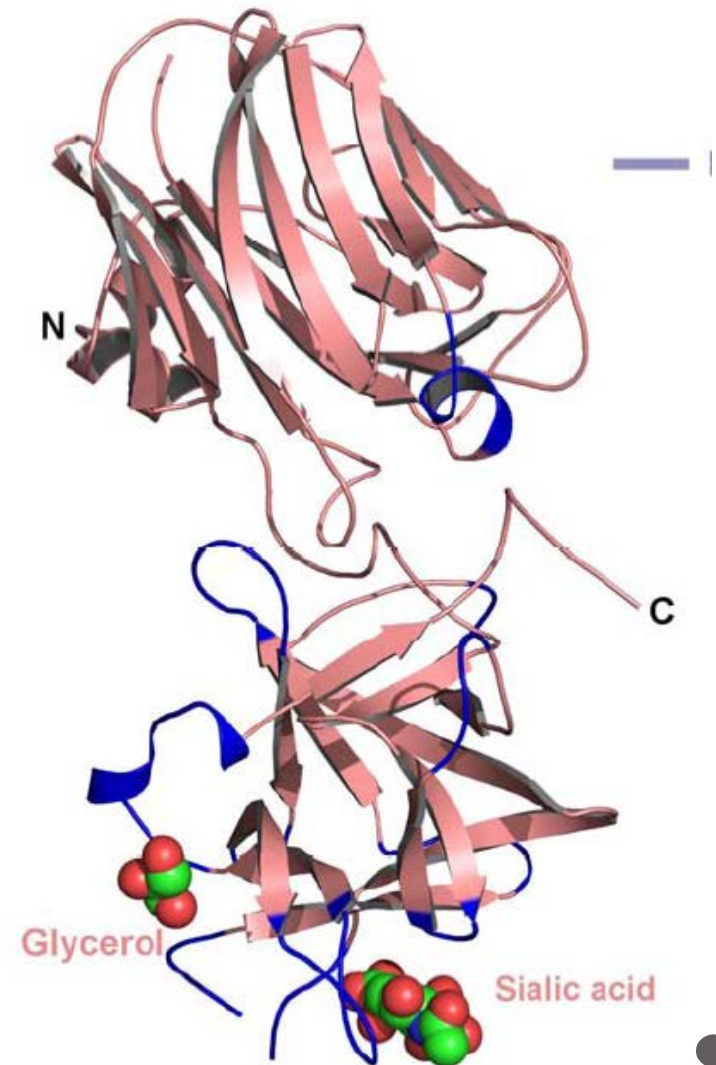
- BoNT/C1 besitzt zwei neuartige Gangliosid-Bindungstaschen

Strotmeier et al., Mol. Microbiol., 2011
Strotmeier et al., Biochem. J., 2010
Rummel et al., J. Neurochem., 2009



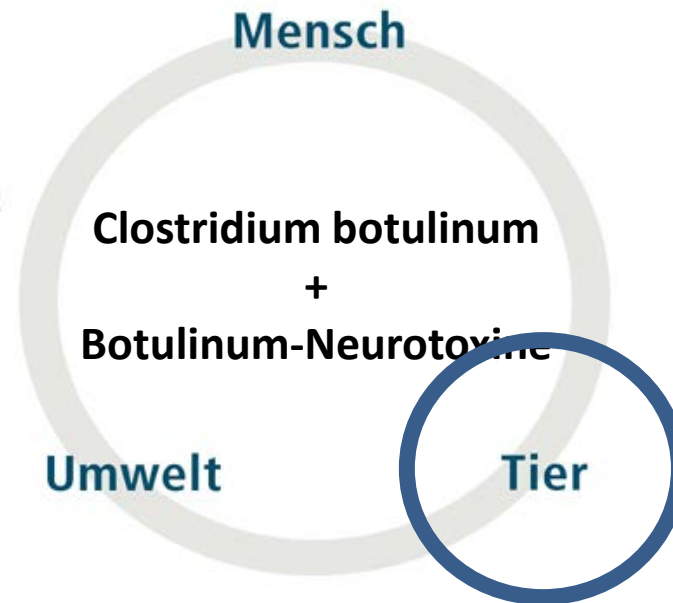
- BoNT/C1 besitzt zwei neuartige Gangliosid-Bindungstaschen
- BoNT/D Gangliosidbindungstasche homolog TeNT, weitere Tasche an Position wie BoNT/A, B, E, F und G, AS abweichend

Strotmeier et al., Mol. Microbiol., 2011
Strotmeier et al., Biochem. J., 2010
Rummel et al. , J. Neurochem., 2009



Prof. Dr. H. Bigalke/Dr. A. Rummel

- BoNT/C1 besitzt zwei neuartige Gangliosid-Bindungstaschen
- BoNT/D Gangliosidbindungstasche homolog TeNT, weitere Tasche an Position wie BoNT/A, B, E, F und G, AS abweichend
- neuronale Aufnahme wahrscheinlich über 2 Rezeptoren
 - ➡ humantoxisch nach parenteraler Applikation Inhalation?



Dr. C. Seyboldt

PD Dr. F. Gessler

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- DNA-Mikroarray zur
 Detektion und Typisierung
 von *Clostridium botulinum*

Target	Anzahl der Sonden	Subtypen	Bemerkung
NTNH	3	7	Weitere Sonde für 2.Layout geplant
BoNTA	8	4	
BoNTB	4	3	
BoNTC	6	2	
BoNTD	4	2	
BoNTE	9	4	Inkl. BoNTE von <i>C. butyricum</i>
BoNTF	17	4	Inkl. BoNTF von <i>C. baratii</i>
BoNTG	5	1	
fldB	3	1	
rnpB	8	3	Typ G noch nicht integriert

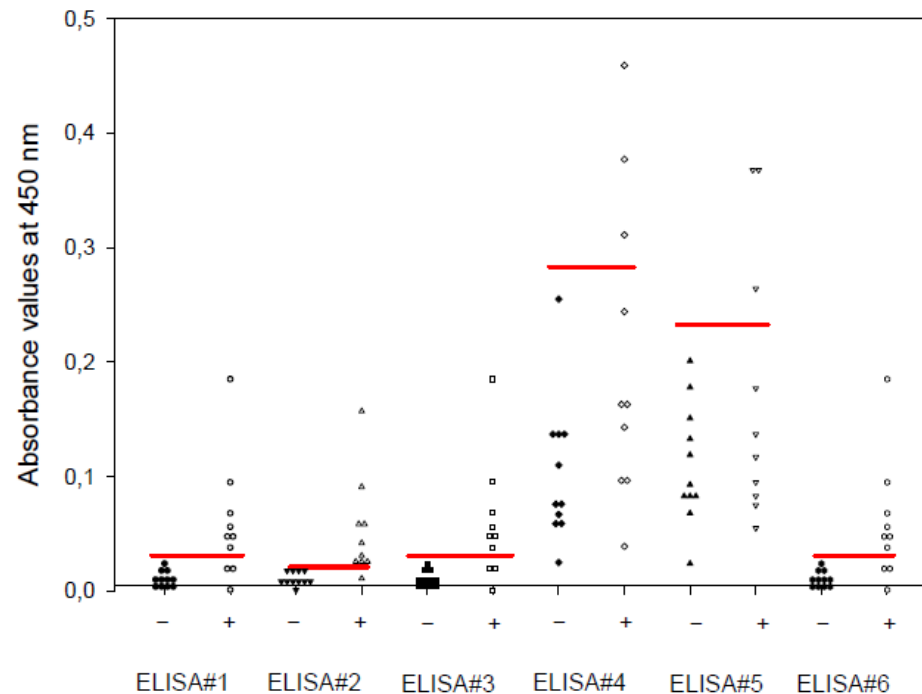
Dr. C. Seyboldt

PD Dr. F. Gessler

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- DNA-Mikroarray zur Detektion und Typisierung von *Clostridium botulinum*

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch



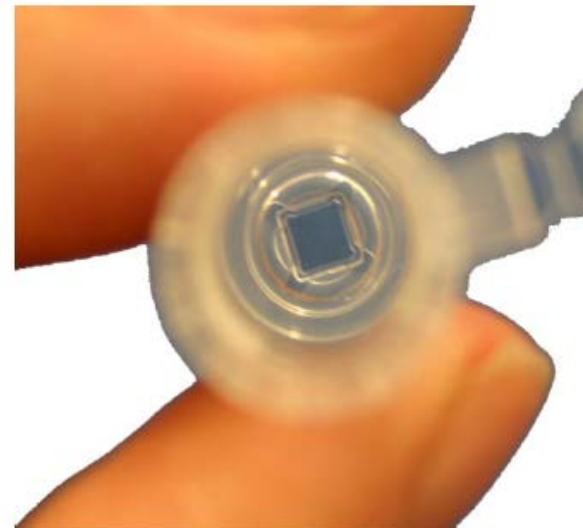
Mawhinney et al., Vet. J., 2012

Dr. C. Seyboldt

PD Dr. F. Gessler

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- DNA-Mikroarray zur Detektion und Typisierung von *Clostridium botulinum*
- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- Multiplex Biochip zum Toxinnachweis



Dr. C. Seyboldt

PD Dr. F. Gessler

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- DNA-Mikroarray zur Detektion und Typisierung von *Clostridium botulinum*
- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- Multiplex Biochip zum Toxinnachweis
- qPCR Toxingene, Multiplex

Dr. C. Seyboldt

- DNA-Mikroarray zur Detektion und Typisierung von *Clostridium botulinum*

PD Dr. F. Gessler

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- Multiplex Biochip zum Toxinnachweis
- qPCR Toxingene, Multiplex

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch

Dr. C. Seyboldt

- DNA-Mikroarray zur Detektion und Typisierung von *Clostridium botulinum*

PD Dr. F. Gessler

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- Multiplex Biochip zum Toxinnachweis
- qPCR Toxingene, Multiplex

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- ELISA zum Toxinnachweis

Dr. C. Seyboldt

- DNA-Mikroarray zur Detektion und Typisierung von *Clostridium botulinum*

PD Dr. F. Gessler

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- Multiplex Biochip zum Toxinnachweis
- qPCR Toxingene, Multiplex

Prof. Dr. M. Krüger, PD Dr. W. Schrödl

- ELISA zum AK-Nachweis Tier und Mensch
- ELISA zum Toxinnachweis
- Pansenmikroflora Dysbiose

orientierende Fall-Kontroll-Studie

Fall-Kontroll-Studie Botulinom in Milchviehbetrieben Frbg.Nr P_____

Name des Prüfers:

Datum

--	--	--	--	--	--	--	--

Einrichtung des Prüfers:

orientierende Fall-Kontroll-Studie

		Fall 1	Fall 2	Fall 3	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
Allgemein	Habitus	3	0	3	0	0	0
	Ernährungszustand	3	0	3	1	0	3
	Verhalten	2	0	2	0	0	1
	Ataxien	3	3	2	0	1	0
	untyp. Beinstellung	1	3	2	0	0	0
Verdauung	Kot	0	1	0	0	0	1
	Pansen	3	1	3	1	0	0
	Wiederkauverhalten	0	0	0	0	0	0
	Darm	1	1	1	0	1	0
Systemisch	tröpfelnder Harnabsatz	0	0	0	0	0	0
	gestaute Venen	0	0	3	0	3	0
	Ödeme	0	0	0	0	0	0
	auffällige Atmung	2	1	1	0	0	1
	Entzündung an Klauen und Gelenken	2	3	3	0	3	0
	Muskelatrophie	0	1	3	0	0	3
Neurologisch	fehlende Abwehrbewegung Kopf	2	0	2	0	0	0
	Mydriasis	3	0	0	0	0	0
	fehlender Lidreflex	3	0	1	0	0	0
	fehlender Ohrreflex	2	0	0	0	0	0
	Schluckbeschwerden	1	0	0	0	0	0
	auffällige Lautäußerungen	0	0	0	0	0	0
	eingeschränkter Zungenreflex	1	0	0	0	0	0
	muköser Speichel	1	0	0	0	0	0
	hängende Unterlippe	1	0	0	0	0	0
	eingeschränkter Analreflex	0	0	2	0	0	0
	eingeschränkter Hautreflex	1	0	1	0	0	1
	eingeschränkter Klauenreflex	1	0	1	0	0	0
	Fibularislähmung	1	0	0	0	0	0
	Ischiadikuslähmung	2	2	1	0	1	0
	Obturatorislähmung	1	0	0	0	1	0
	Radialislähmung	0	1	0	0	0	0
Kotuntersuchung	C. perfringens	0	3	1	0	2	0
	C. botulinum	3	1	1	0	2	0
	sulfitreduzierende Clostridien	0	0	0	0	0	0
	Salmonellen	0	0	0	0	0	0
	Mykobakterien	1	2	0	0	0	0

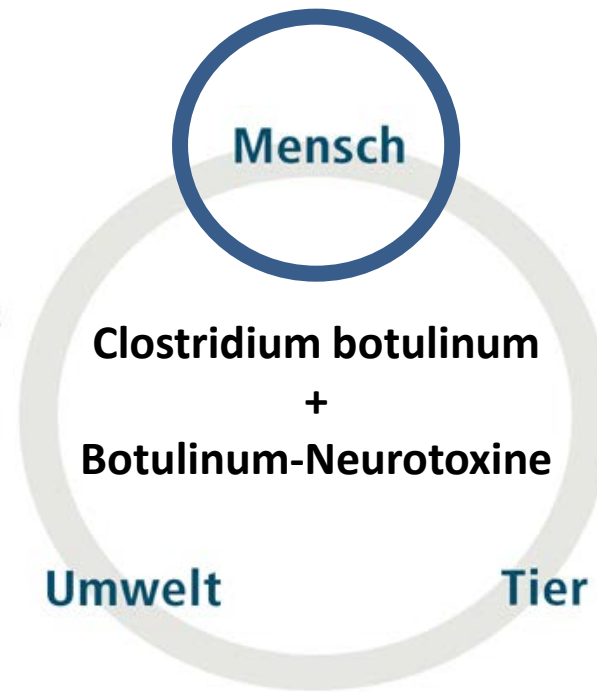
in Zusammenarbeit
mit RGD M-V
Dr. B. Schwagerick

orientierende Fall-Kontroll-Studie

1. betrieb	BoNT indirekt Pansensaft				
	A	B	C	D	E
Fallbetrieb 1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Fallbetrieb 2	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.
Fallbetrieb 2	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.
Fallbetrieb 2	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.
Fallbetrieb 3	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.
Fallbetrieb 3	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.
Fallbetrieb 3	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.
Kontrollbetrieb 1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Kontrollbetrieb 1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Kontrollbetrieb 1					
Kontrollbetrieb 2					
Kontrollbetrieb 2					
Kontrollbetrieb 2					
Kontrollbetrieb 3					
Kontrollbetrieb 3					
Kontrollbetrieb 3					

	Erregernachweis Kot <i>C. botulinum</i> Typ:					Erregernachweis Pansensaft (PS) <i>C. botulinum</i> Typ:				Antikörper (IgG) Serum Typen:		Antikörper (IgA) Kot Typen:		Antikörper (IgA) PS Typen:		Lakto- ferrin	
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	ABE	CD	ABE	CD	ABE	CD	PS	Kot
Verdächtig						a)						b)				c)	
positiv	6	0	1	0	9	13	2	7	1	37	26	56	60	17	11	50	81
negativ	161	167	166	167	158	151	162	157	163	130	141	111	107	148	154	115	86
gesamt	167	167	167	167	167	164	164	164	164	167	167	167	167	165	165	165	167
Un- verdächtig																	
positiv	0	0	0	0	5	0	0	0	0	20	8	1	33	13	7	14	34
negativ	85	85	85	85	78	84	84	84	84	65	77	84	52	70	76	70	51
gesamt	85	85	85	85	83	84	84	84	84	85	85	85	85	83	83	84	85

a: p = 0,005; b: p = 0,000; c: p = 0,031



ca. 60 Personen aus Verdachts-
betrieben voruntersucht



30 Personen weitergehend
untersucht



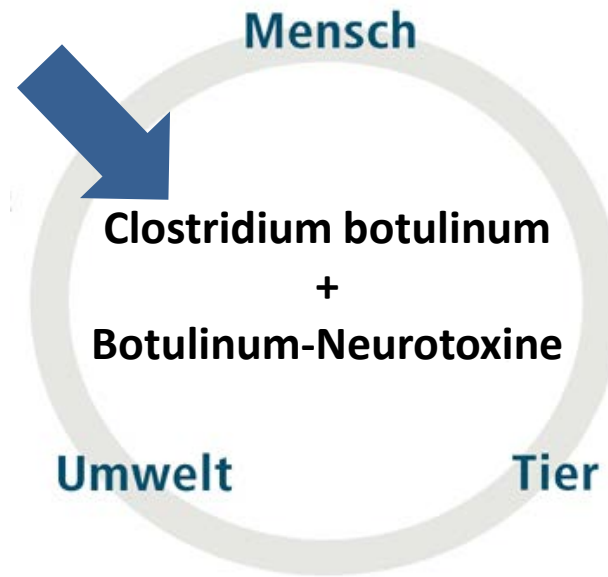
10 Personen detailliert an
MHH untersucht

+

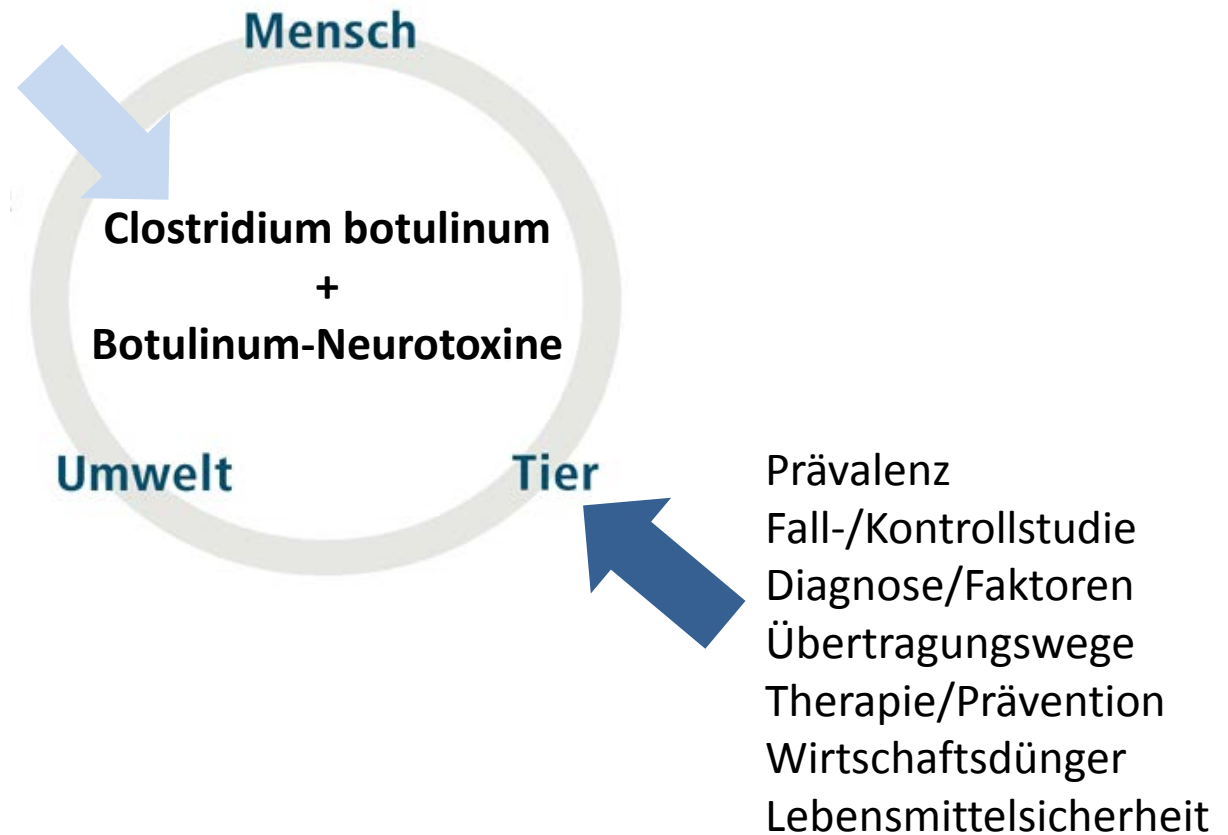
20 Personen aus
Spontanmeldungen
detailliert an MHH untersucht

5 Fälle mit chronischem Botulismus

Inhibitoren
enterale Resorption/Inhalation
C2 bei Resorption/Infektion

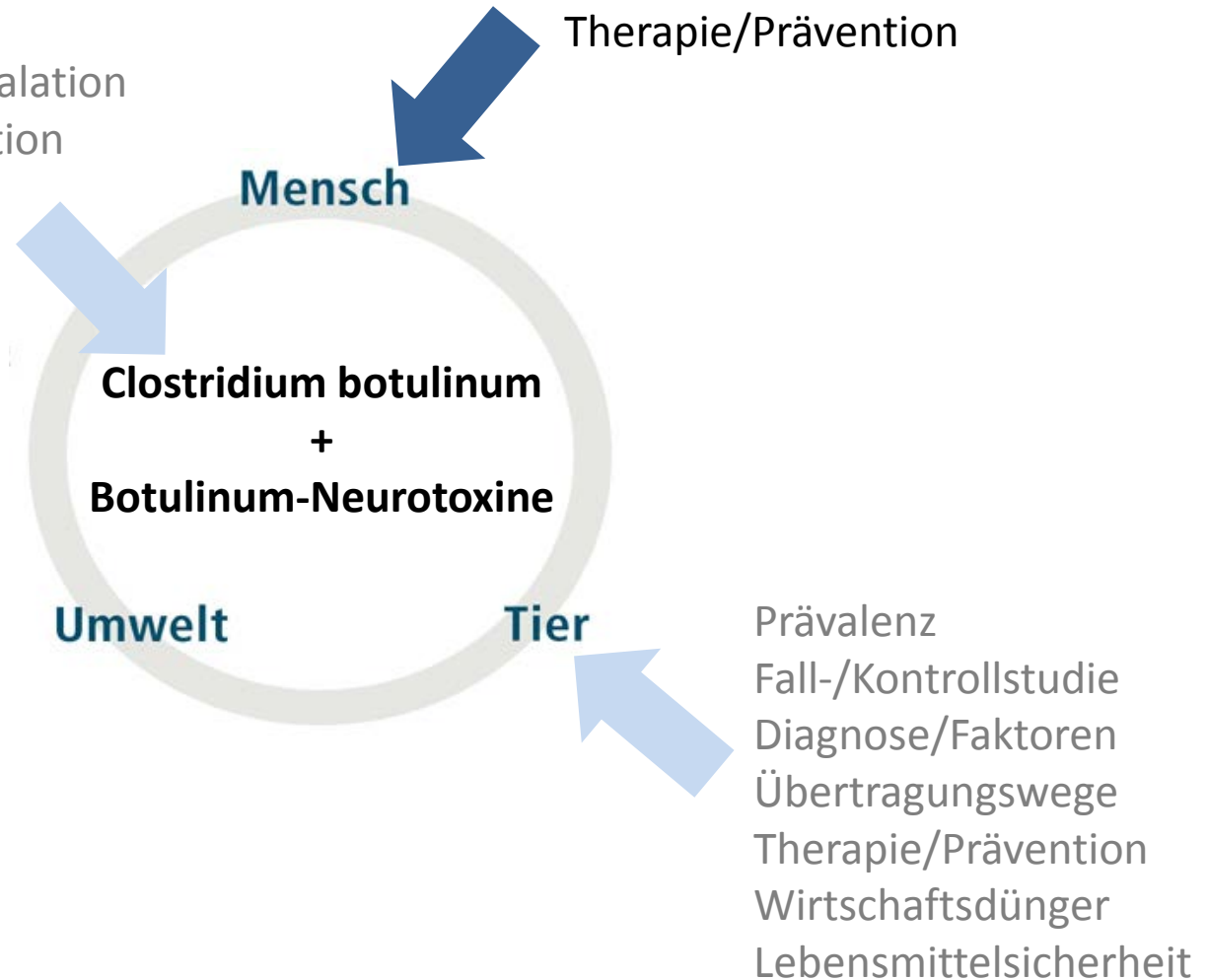


Inhibitoren
enterale Resorption/Inhalation
C2 bei Resorption/Infektion



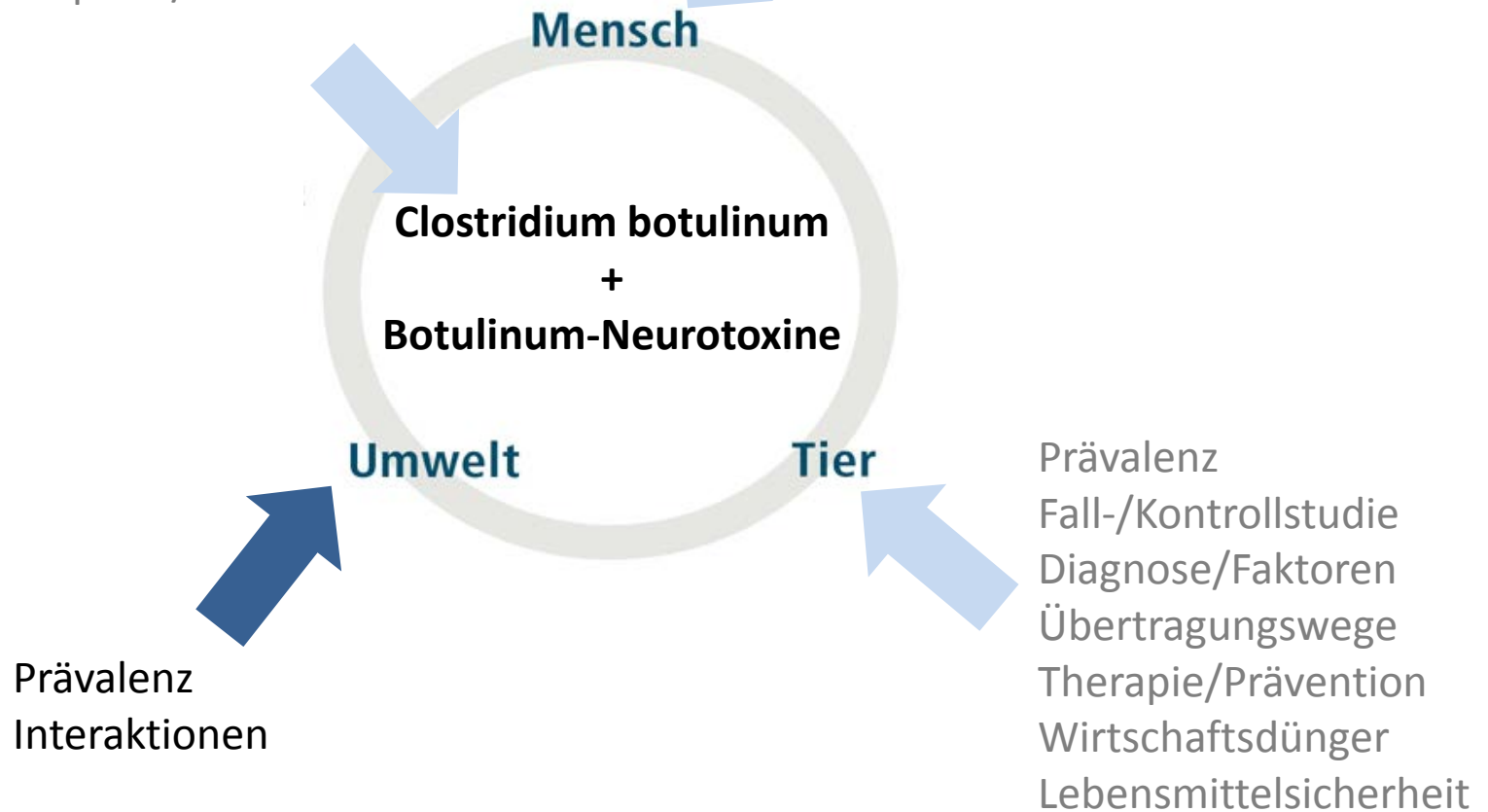
Inhibitoren
enterale Resorption/Inhalation
C2 bei Resorption/Infektion

Nosologie
Epidemiologie
Transmission
Therapie/Prävention

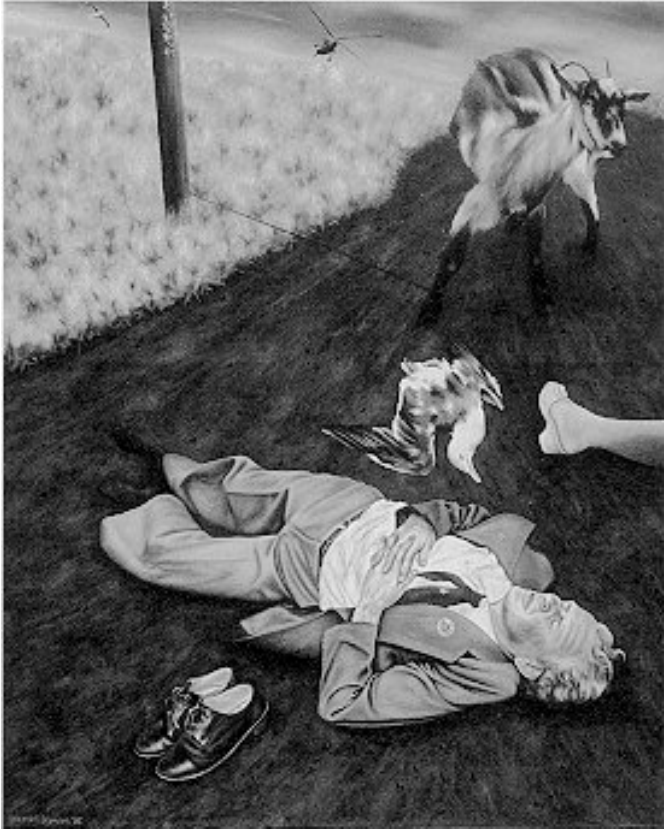


Inhibitoren
enterale Resorption/Inhalation
C2 bei Resorption/Infektion

Nosologie
Epidemiologie
Transmission
Therapie/Prävention



Forschungsvorhaben gefördert aus Mitteln des BMBF Zoonosen



Dermot Seymour
Botulism over Mullaghcreevy, 1985

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!