PCR und ELISA – Alternativen zum Maustest für die Analyse des Botulismus-Neurotoxin-C1 Giftbildungspotentiales in Umweltproben?

Thomas C. Zechmeister[*1], *Andreas H. Farnleitner*[*2], *Tonie E. Rocke*[3], *Fritz Pittner*[4], *Renate Rosengarten*[1], *Robert L. Mach*[2], *Alois Herzig*[5] *und Alexander K. T. Kirschner*[6]

[1]Institut für Bakteriologie, Mykologie and Hygiene, Veterinärmedizinische Universität, A-Wien, [2]Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Technische Universität, A-Wien, [3]U.S. Fish and Wildlife Service, National Wildlife Health Research Center, Madison, Wisconsin 53711, USA, [4]Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Vienna Biocenter, Universität A-Wien, [5]Biologische Station Burgenland, A-Illmitz, [6]Institut für Medizinische Biologie, Universität A-Wien

Zusammenfassung

Botulismus stellt eine der weltweit bedeutendsten Vogelseuchen dar und wird durch Intoxikation mit Botulismus-Neurotoxin-C1 (BoNt-C1) ausgelöst, das von toxigenen Clostridien unter geeigneten Bedingungen gebildet wird. An den Salzlacken des Nationalparks Neusiedler See-Seewinkel führt der Vogelbotulismus unter den Zugvögeln regelmäßig zu Epidemien mit hohen Verlustzahlen. Für die Detektion von BoNt-C1 gilt der Maus-Bioassay als Standardmethode, ist jedoch ethisch bedenklich sowie zeit- und kostenintensiv. Gemäß dem 3R-Konzept wurden in vitro Alternativmethoden zur qualitativen Detektion des BoNT-C1-Gens mittels Nested-PCR, sowie des BoNt-C1-Toxinproteins mittels Immunostick-ELISA etabliert und zur Ermittlung des Giftbildungspotenzials an kultivierten Sedimentproben verschiedener Salzlacken getestet. Dabei wurde in 52 von 77 untersuchten Proben ein positives Giftbildungspotenzial mit dem Maustest festgestellt. Der Immunostick-ELISA wies eine dem Maustest vergleichbare Sensitivität auf und zeigte eine hoch signifikante Korrelation ($r=0,94$; $p<0,001$) mit dem Maustest. Der Nested-PCR-Ansatz detektierte deutlich mehr Proben mit einem positiven Nachweis von BoNt-C1-Genfragmenten als die beiden BoNt-C1-Toxindetektionsverfahren. Der PCR-Ansatz wies eine sehr geringe Korrelation ($r=0,21$; $p=0,07$) mit dem Maustest auf, während keine Korrelation mit dem Immunostick-ELISA ($r=0,09$; $p=0,46$) gefunden wurde. Offensichtlich konnte das Toxingenfragment mit dem PCR-Ansatz in einigen Proben nachgewiesen werden, in denen trotz Kultivierung kein Toxin exprimiert wurde. Somit scheint der getestete qualitative ELISA für kultivierte Umweltproben zur Analyse des Toxinbildungspotenzials eine sensitive in vitro Alternative zum Maustest darzustellen. Die qualitative Detektion des BoNt-C1-Genfragmentes mittels PCR resultiert jedoch in einer Überschätzung des Giftbildungspotenzials.

Summary: PCR and ELISA - *in vitro* alternatives to the mouse-bioassay for assessing the Botulinum-Neurotoxin-C1 production potential in environmental samples?

Botulism is one of the most important bird diseases world-wide and is caused by the intoxication with Botulinum-Neurotoxin-C1 (BoNt-C1), which is produced by toxigenic clostridia under appropriate conditions. Avian botulism leads regularly to large losses among the migrating bird populations breeding and resting at the saltwater pools of the Austrian national park Neusiedler See-Seewinkel. Despite of its ethical dubiousness and its high technical expense the mouse-bioassay is still used as the routine standard method for the detection of BoNt-C1. According to the 3R-concept, in vitro alternative methods for the qualitative detection of BoNt-C1 (immunostick-ELISA) and a corresponding BoNt-C1 gene fragment (nested-PCR) were established. In order to estimate the BoNt-C1 production potential the methods were tested with sediment samples from different saltwater pools subjected to cultivation conditions appropriate for in vitro BoNt-C1-production. With the mouse-bioassay, 52 out of 77 samples were found to have a positive toxin production potential. The immunostick-ELISA showed a similar sensitivity as the mouse-bioassay and exhibited a highly significant positive correlation ($r=0.94$; $p<0.001$) with the mouse-bioassay in detecting BoNt-C1. The nested-PCR approach revealed higher numbers of positive BoNt-C1 gene fragment detections as compared to the direct toxin analysis approaches. A weak correlation ($r=0.21$; $p=0.07$) with the mouse-bioassay was discernible, no correlation was found with the immunostick-ELISA ($r=0.09$; $p=0.46$). Obviously, the PCR approach detected the BoNt-C1 gene fragment in some of the samples where no toxin expression has occurred. Thus it is suggested that the qualitative immunostick-ELISA represents a potential in vitro alternative to the mouse-bioassay for assessing the BoNt-C1 production potential in environmental samples. In contrast, qualitative BoNt-C1 gene fragment detection via PCR led to an overestimation of the actual toxin production potential.

Keywords: mouse bioassay, nested PCR, botulinum neurotoxin C1, immunostick ELISA, 3R concept

* gleichberechtigte Erstautoren

1 Einleitung

Botulismus bei Wild- und Zuchtvögeln rückte erstmals zu Beginn des letzten Jahrhunderts in den Blickpunkt öffentlichen Interesses. Seit dieser Zeit wurden fast jährlich massive Botulismusausbrüche mit hohen Verlustraten (>100.000 tote Individuen pro Ausbruch) bei Wildvögeln aus den USA gemeldet (Clarke, 1913; McLean, 1946; Clark, 1987). In Europa wurde Vogelbotulismus mit hohen Verlustzahlen vor allem in Vogelschutzgebieten erstmals ab Mitte der 60er Jahre nachgewiesen. Rund ein Viertel aller europäischen Arten mit teilweise hochgradig gefährdeten Populationen ist davon betroffen (Grüll et al., 1986). In Österreich wurde Vogelbotulismus erstmals 1982 und 1983 an den flachen Salzlacken des Seewinkels nachgewiesen, wobei jährlich ca. 5000 Kadaver aufgesammelt wurden (Grüll, 1983). Seit diesem Zeitpunkt ist es periodisch zu Epidemien mit hohen ökologischen und ökonomischen Einbußen gekommen. Im Nationalpark Neusiedler See-Seewinkel ist es bisher nicht gelungen, durch eine frühzeitige Detektion des Giftbildungspotentials Ausbrüche im Frühstadium zu erkennen, einzudämmen und/oder einen Ausbruch durch entsprechende Managementmaßnahmen zu verhindern. Mittlerweile stellt Botulismus ein weltweites Problem dar, das nicht nur eine Vielzahl von Vogelschutzgebieten betrifft (Gimanez and Ciccarelli, 1987; Harrigan, 1987; Smart et al., 1987), sondern auch vermehrt Hühner- und Gänsehaltungen (Serotyp C1) (Dohms, 1987; Azuma and Itoh, 1987), sowie die Rinderzucht (Serotyp D) (Haagsma and Ter Laak, 1977). Botulismus wird durch Intoxikation mit von *Clostridium spp.* gebildeten Neurotoxinen ausgelöst. Im toxinsensitiven Organismus wird durch enzymatische Spaltung die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin verhindert und damit die Reizübertragung an den Synapsen unterbrochen, was zu Lähmungserscheinungen der Muskulatur und der Atmungsorgane führt (Montecucco and Schiavo, 1994). Das für BoNt-Serotyp C1 codierende Gen ist auf einem Bakteriophagen (Tox+) in der Clostridienzelle lokalisiert (Eklund et al., 1987; Popoff, 1995). Die Giftbildung erfolgt außerhalb des toxinsensitiven Organismus. Bis jetzt ist unklar, ob eine Toxinproduktion allein im Sediment von Gewässern unter Anaerobie, hohen Temperaturen und dem Vorhandensein geeigneter Substrate stattfinden kann *(sludgebed-hypothesis)* und/oder ob Giftbildung und Wachstum der Clostridien innerhalb von Vertebraten- und Invertebratenleichen erfolgt *(microenvironment-concept)* (Haagsma, 1987b). Von den bisher 7 bekannten BoNt-Serotypen ist vor allem BoNt-Serotyp C1 für Vogelbotulismusausbrüche bei Wildvögeln und Geflügel verantwortlich (Popoff, 1995), obwohl auch andere BoNt Serotypen die Potenz besitzen (Clark, 1987). BoNt-C1 kann ebenfalls für Botulismusausbrüche bei Pferd, Rind, Schaf sowie Fischen verantwortlich sein (Smith 1978; Sonnenschein, 1980), nicht jedoch beim Menschen (Holdemann, 1970).

Botulismus kann durch die rechtzeitige Detektion des Erregers und des vom Erreger exprimierten Neurotoxins frühzeitig erkannt werden (Sonnenschein, 1980; Haagsma, 1987a; Smith, 1978; Wictome and Shone, 1998). Zum Nachweis von Botulismustoxinen gilt der Maus-Bioassay bis heute als die mit Abstand empfindlichste und daher meistverwendete Methode (Notermans and Kozaki, 1987). Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,01–0,12 ng Toxin ml^{-1} (Sonnenschein, 1980; Rocke et al., 1998). Es handelt sich dabei um einen *in vivo* Test, bei dem lebenden Mäusen toxinverdächtige Proben (z.B. Extraktionsmedium, Serum) intraperitoneal gespritzt werden. Hinsichtlich seiner Empfindlichkeit ist der Maus-Bioassay bisher zwar allen anderen Tests überlegen, dennoch besitzt er gravierende Nachteile. Diese Methode ist insgesamt aufwändig, da eine Infrastruktur zur Tierzucht, Haltung und Pflege notwendig ist. Ein genereller Nachteil von Tierversuchen ist – abgesehen von der ethischen Bedenklichkeit - außerdem die relativ große Variationsbreite der Ergebnisse, wie sie durch individuelle Unterschiede und subjektive Bewertung bedingt sein kann (Notermans and Kozaki, 1987). Es wurden daher in den letzten Jahren verschiedene *in vitro* Methoden entwickelt, die den Tierversuch ersetzen und die Methodik insgesamt vereinfachen und standardisieren sollen (Wictome and Shone, 1998). Zum Nachweis des verantwortlichen Toxingens wurden Detektionsverfahren mittels PCR bzw. RT-PCR *(reverse transcription–polymerase chain reaction)* entwickelt (Szabo et al., 1993; Franciosa et al., 1996; Williamson et al., 1999; Miskin et al., 1999; McGrath et al., 2000). Die Entwicklung von auf Antikörper-Antigen-Reaktion basierenden ELISA-Tests für humanpathogene BoNt-Serotypen erscheint bereits fortgeschrittener (Potter, 1993). Im Gegensatz dazu konnten für den BoNt-C1- oder -D-Nachweis nur bedingt Erfolge verzeichnet werden, zumal sich die Verfahren als sehr komplex und für eine „Feldadaption" als eher ungeeignet erwiesen (Jubb, 1993; Gregory et al., 1996). Als Basis für die Entwicklung eines feldtauglichen ELISA-Tests können Arbeiten von T. Rocke angesehen werden (Rocke et al., 1998). Bisherige Nachweise des Toxins mittels ELISA waren auf die Direktdetektion im Blutserum betroffener Vögel beschränkt (Rocke et al. 1998; Gregory et al., 1996). Eine Verwendung von Alternativtests in Umweltproben wie z.B. in Sedimenten zur Analyse des Toxinbildungspotenzials wurde bis jetzt nicht durchgeführt, die Tests stellen jedoch einen wichtigen Schritt zur Lokalisierung potenzieller Toxinproduktionsorten dar.

In dieser Studie sollte das Potenzial von PCR und Immunostick-ELISA als *in vitro* Alternativmethoden zum Maus-Bioassay zur Detektion von BoNt-C1 und des entsprechenden BoNt-C1-Genfragmentes getestet werden. Als Nachweis des toxigenen Gens wurde ein Nested-PCR-Ansatz nach Williamson et al. (1999) für DNA-Extrakte kultivierter Proben und zum Nachweis des Toxins in kultivierten Proben ein Immunostick-ELISA nach Rocke et al. (1998) etabliert. Als Proben dienten Sedimente ausgewählter Salzlacken des Nationalparks Neusiedler See–Seewinkel mit hohen und geringen Botulismusopferzahlen.

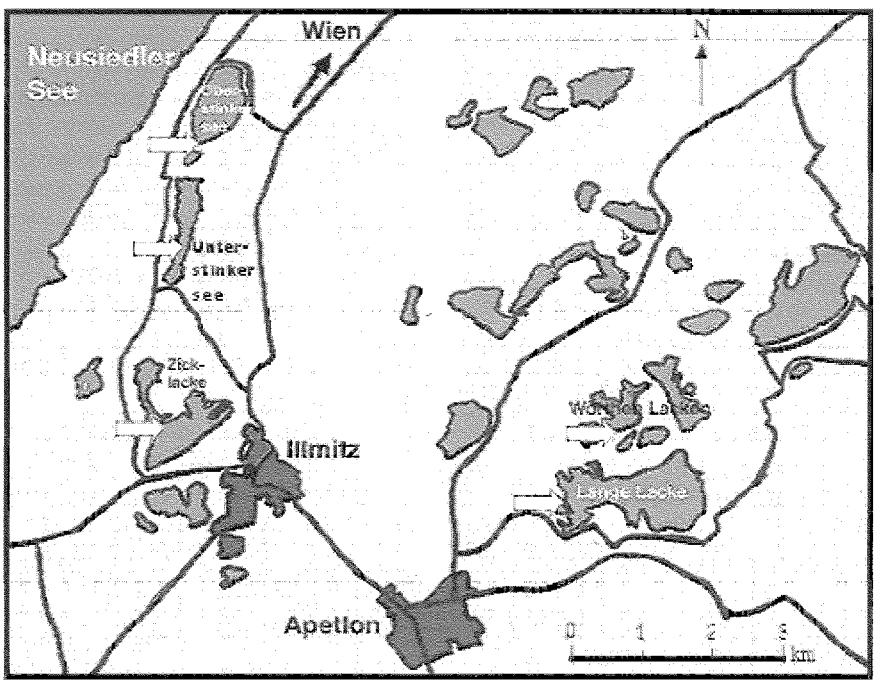

Abb. 1: Probenentnahmestellen im Nationalpark Neusiedler See-Seewinkel

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiet und Probenmaterial

Repräsentative Lackenstandorte mit hohem bzw. geringem Botulismusrisiko (Lange Lacke, Wörthen Lacke Westufer, Zicklacke Westufer, Oberstinker, Unterstinker) wurden im Jahr 2000 von April bis Oktober vierzehntägig beprobt (Abb. 1). Insgesamt wurden 77 Sedimentproben aus einer Tiefe von 1-10 cm als Mischproben von zehn unterschiedlichen Stellen im Ufer- sowie Seichtwasserbereich entlang der Wasseranschlagslinie entnommen und bis zur Probenanalyse bei 4°C gelagert.

2.2 Probenaufarbeitung

Zur Kultivierung von Umweltproben wurden je 0,25 g der Sedimentproben in 10 ml anaerobem *Cooked Meat Medium*, hergestellt aus 1,5% Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, 0,5% Kaliumhydrogenphosphat, 0,05% L-Cystein-HCL, 0,3% Glukose (alle Produkte von Merck, A-Wien), 1,25 g *Cooked Meat* (Difco Laboratories, A-Wien), 0,1 ml Vitamin K-Heminlösung (Becton–Dickinson, A-Wien), bei 37°C für 24 h inkubiert, dann passagiert und weitere 4 Tage bei 37°C inkubiert (Jansen 1987). Die DNA-Extraktion erfolgte aus je 1 ml Kulturüberstand und wurde mit InstaGene-Matrix (BioRad, A-Wien) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Die Qualität der isolierten DNA wurde mittels Gelelektrophorese getestet.

Zur Gewinnung toxinhaltiger Medien wurden je 2 ml der Kulturüberstände sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße, Millipore, Österreich) und das Filtrat ohne weitere Aufreinigung zur jeweiligen Detektion von BoNt-C1-Toxin herangezogen.

2.3 DNA-Detektion mittels Nested-PCR

Die gewählten *Primer* befinden sich in drei konservierten Regionen der L-Ketten-Region des Toxins Serotyp 468-C1 (Tab. 1). Für die Initial-PCR wurde das Primerpaar ToxC-625 und ToxC-1049R herangezogen, wodurch ein Fragment mit rund 424 bp amplifiziert wurde, das als Template für die Nested-PCR diente. Für die Nested-PCR wurde das *Primerpaar* ToxC-825 und ToxC-1049R verwendet (Williamson et al., 1999). Der Reaktionsansatz (100 µl) wurde mit Modifikationen *(touch-down-approach, hot-start)* nach Williamson et al. (1999) am DNA-Termocycler PRIMUS 25 (MWG-Biotech, D-München) durchgeführt. Eine Negativ-Kontrolle und eine Template- (d.h. positive) Kontrolle wurde bei jedem Experiment eingesetzt.

10 µl der Amplifikations-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese mit einem 2% Agarose-Gel (*Gibco–Life Technologies*, A-Wien) in 1xTAE-Puffer (*Gibco–Life Technologies*, A-Wien) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (BioRad, A-Wien) gefärbt und die DNA mittels UV-Transilluminator visualisiert.

2.4 Toxin-Detektion mittels Maus-Bioassay

Für den Maustest (Quodrup and Sudheimer, 1949) wurden je 2x0,5 ml sterilfiltrierte Kulturüberstände verwendet, wobei eine Probe für 5 min auf 99°C zur Denaturierung des Toxins erhitzt, anschließend zentrifugiert und sterilfiltriert wurde. Für jeden Test wurden zwei Mäuse herangezogen. Die Kulturüberstände wurden mit je 0,1 ml Hanks Medium (15,000 *units* Penicillin G, 1,000 *units*

Tab. 1: Oligonukleotid-*Primer* für PCR-Analyse des *C. botulinum* C_1-Toxin-Gens.
Die Positionen der *Primer* sind im Namen der *Primer* enthalten. Die Primer wurden nach der publizierten Stamm 468C-C1 Toxingensequenz (*GenBank accession* no. X53751) nummeriert (Williamson et al., 1999).

Richtung	Primer	Sequenz
Sense	ToxC-625	5'^{625}CTAGACAAGGTAACAACTGGGTTA^{648}3'
Antisense	ToxC-850R	5'^{850}GAAAATCTACCCTCTCCTACATCA^{827}3'
	ToxC-1049R	5'^{1049}AATAAGGTCTATAGTTGGACCTCC^{1026}3'

Mycostatin, 5% Glycerin, 15 mg Streptomycinsulfat, 200 µg Gentamycin, 1 l Hanks *balanced Salt Solution*; pH 7.6) vermischt und ca. 20 g schweren *White-Swiss*-Mäusen intraperitoneal appliziert. Die Mäuse wurden 4 Tage beobachtet. Botulismus wurde diagnostiziert, wenn die Maus, die den unveränderten Kulturüberstand appliziert bekam, starb oder typische Botulismus-Symptome zeigte (Wespentaille, Lidverengung, Fellveränderungen), während die Kontroll-Maus (denaturierter Kulturüberstand) keine Symptome aufwies. Negativ wurde der Test bewertet, wenn beide Mäuse keine Botulismussymptome aufwiesen. Wurden bei der Kontroll-Maus Symptome beobachtet, wurde der Test wiederholt. Als Kontrolle wurde bei 15 repräsentativen Proben einer dritten Maus BoNt-C1-Antitoxin (CDC-Atlanta, USA) 30 min vor der Applikation des Kulturüberstandes verabreicht, um die Spezifität des Toxinnachweises zu verifizieren. In allen Fällen wurde BoNt-C1 eindeutig nachgewiesen.

2.5 Toxin-Detektion mittels Immunostick-ELISA

Nunc©-Immunosticks (Merck Eurolab, A-Wien) wurden vom *National Wildlife Health Center*, Madison, WI, USA, mit Antitoxin gecoatet und für die Untersuchung zur Verfügung gestellt (Rocke et al., 1998). Die Sensitivität der vom NWHC bezogenen Immunosticks wurde mit verschiedenen definierten BoNt-C1-Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 5 ng ml^{-1} in sterilem *Cooked-Meat-Medium* in einem Volumen von 1 ml getestet. Dabei lag die Detektionsgrenze bei 0,25 ng ml^{-1} im Bereich des Maus-Bioassays (Daten nicht dargestellt). Die Spezifität wurde mit verschiedenen Reinstämmen überprüft (Daten nicht dargestellt).

Die Immunosticks wurden in den filtrierten Kulturüberständen der Sedimentproben bei 4°C für 24 h unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend einem *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) mit Rabbit-Antitoxin nach dem Protokoll von Oguma (1984) als primärem Antikörper und Peroxidase-markiertem *Goat-anti-Rabbit* (Kierkegaard and Perry, Dunn-Laboratories, Deutschland) als sekundärem Antikörper unterzogen. Als Positivkontrolle wurde der Kulturüberstand des Reinstamms *C. botulinum* 468 verwendet, als Negativkontrolle wurde steriles *Cooked-Meat-Medium* herangezogen.

2.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse diente das Programm SPSS 10 für MacIntosh. Zum Vergleich der einzelnen Methoden wurde der Spearman-Rang-Korrelations-Test herangezogen.

3 Ergebnisse

Von allen 77 analysierten Sedimentproben zeigten 52 einen positiven Nachweis des BoNt-C1-Toxins mit dem Maus-Bioassay (Tab. 2). Mit dem Immunostick-ELISA wurden 54 Proben als BoNt-C1 positiv bewertet. Korrespondierende BoNt-C1-Toxingenfragmente konnten mit dem Nested-PCR-Ansatz jedoch in 64 Proben positiv nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Methoden untereinander zeigte eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Maus-Bioassay und dem Immunostick-ELISA ($r = 0,94$; $p < 0,001$). Eine nur schwache Korrelation wurde zwischen Maus-Bioassay und dem Nested-PCR-Ansatz gefunden ($r = 0,21$; $p = 0,07$). Immunostick-ELISA und Nested-PCR korrelierten nicht miteinander (Tab. 3).

4 Diskussion

Botulismus-Management in von Vogelbotulismus betroffenen Gebieten konnte bisher nur in Ansätzen durchgeführt werden, da keine raschen und billigen Detektionsmethoden des Botulismus-Neurotoxins-C1 mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Verfügung standen. Die Verwendung des Maus-Bioassay in der routinemäßigen Analyse größerer Mengen von Umweltproben ist durch den zeitlichen und materiellen Aufwand limitiert. Im weiteren ist dieser Test aufgrund der relativ großen Variationsbreite der Ergebnisse (Westphal, 1991) nur eingeschränkt anwendbar. Deshalb wurden zwei Alternativmethoden zur Detektion von BoNt-C1 bzw. eines korrespondierenden BoNt-C1-Genfragmentes für die qualitative routinemäßige Analyse von Umweltproben adaptiert und mit dem Maus-Bioassay verglichen. Der Immunostick-ELISA wurde gewählt, da er sich bereits kürzlich bei der Detektion von BoNt-C1 in Blutseren frisch toter Vögel bewährt hat (Rocke et al., 1998). Aufgrund der Einfachheit des Verfahrens ist

Tab. 2: Anzahl der positiven und negativen Proben,
analysiert mittels Maus-Bioassay, Immunostick-ELISA sowie mittels Nested-PCR-Ansatz (n=77).

	Maustest	ELISA	PCR
positive Nachweise	52 (67,5 %)	54 (70,1 %)	64 (83,1 %)
negative Nachweise	25 (32,5 %)	23 (29,9 %)	13 (16,9 %)

Tab. 3: Spearman's-Rang-Koeffizient und Signifikanzniveau der Korrelationen zwischen Maus-Bioassay, Immunostick-ELISA sowie Nested-PCR-Ansatz (n=77).

	Maustest vs. ELISA	Maustest vs. PCR	ELISA vs. PCR
Spearman's rho (r)	0,94	0,21	0,08
Signifikanz (p)	< 0,001	0,07	0,46

dieser Test für den Einsatz außerhalb des Labors potenziell geeignet und könnte daher für Nationalparks, Vogelschutzgebiete, Zoos sowie Geflügelfarmen eine rasche Methode zur Früherkennung des Toxins in Umwelt- und Veterinärproben darstellen. Seine Sensitivität ist mit einer Detektionsgrenze von 0,25 ng ml^{-1} ähnlich derjenigen des Maus-Bioassay (Rocke et al., 1998). Durch die beschränkte simultane Probenbearbeitungskapazität eignet sich der Prozess allerdings nur beschränkt zur Routineanalytik. Der Immunostick-ELISA basiert auf der Wechselwirkung mit der Tertiärstruktur des BoNt-C1-Toxins, lässt jedoch keine Aussage über die enzymatische Giftwirkung zu. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt jedoch, dass bei Vorliegen einer intakten für den diagnostischen Antikörper spezifischen Epitopstruktur, die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines aktiven BoNt-C1-Toxins zumindest bei dem hier verwendeten Kultivierungsverfahren sehr hoch ist. Der Umstand, dass mit dem ELISA-Verfahren um 2 positive Toxinnachweise mehr detektiert wurden, könnte darauf hindeuten, dass eine leichte Überschätzung von aktivem BoNt-C1-Toxin mittels ELISA auftreten könnte.

Mit dem Nested-PCR Ansatz (Williamson et al., 1999) wurde eine konservierte Region der BoNt-C1-DNA amplifiziert, wodurch ein sensitiver Nachweis des Toxingens in Umweltproben, die einer Kultivierung unterworfen werden, ermöglicht wurde. Die im Sediment vorkommenden und unter den applizierten *in vitro* Kultivierungsbedingungen teilungsaktiven vegetativen BoNt-C1-Zellen bzw. -Sporen können mit diesen Ansätzen nachgewiesen werden (Haagsma, 1987b; Farnleitner et al., 2000).

Es zeigte sich, dass im Gebiet des Nationalparks Neusiedler See-Seewinkel etwa 70% aller untersuchten Sedimentproben Giftbildungspotenzial aufwiesen (Tab. 2). Dabei lieferten der Maus-Bioassay und der Immunostick-ELISA hoch signifikant korrelierende Ergebnisse (Tab. 3). Der PCR-Ansatz hingegen führte zu deutlich höheren Detektionsraten (83.1%), was darauf hinweist, dass die Expression des Toxingens nicht in allen Fällen stattfindet. Obwohl das Gen im Anreicherungsmedium nachgewiesen wurde, scheinen bestimmte Faktoren eine Expression zu verhindern (Rocke and Samuel, 1999), bzw. kommt es zu Veränderungen in der Tertiärstruktur des Genprodukts, sodass ein Nachweis mit Maustest (Verlust der Aktivität) und Immunostick-ELISA (Veränderung des Antigen-Epitops für die Wechselwirkung mit dem Antikörper) nicht mehr möglich ist (Oguma et al., 1981). Der Nested-PCR-Ansatz zeigte zwar eine schwach signifikante Korrelation mit dem Maus-Test, allerdings konnte mit dem Immunostick-ELISA keine Korrelation gefunden werden. Somit erscheint der Immunostick-ELISA Test zur Detektion von BoNt-C1-Toxinprotein in kultivierten Umweltproben geeignet zu sein und stellt in qualitativer Hinsicht einen brauchbaren Alternativtest zum Maus-Bioassay dar. Der qualitative PCR-Ansatz bietet die Möglichkeit der routinemäßigen Analyse größerer Probenmengen, überschätzt jedoch das aktuelle Giftbildungspotenzial. Es ist aber denkbar, dass dieselbe Probe unter etwas geänderten Expressions-Bedingungen zur detektierbaren Form des Toxins führen kann, und deshalb ist der PCR-Ansatz für bestimmte Fragestellungen, vor allem unter dem Gesichtspunkt einer zukünftig möglichen quantitativen Detektierbarkeit von BoNt-C1, weiterhin zu berücksichtigen, z.B. *Real-Time-PCR* (Kimura et al., 2001). Andere Mikrohabitate, in denen eine signifikante BoNt-C1 Produktion erwartet werden kann (Faeces, Fliegenmaden, Makrozoobenthos), sollen in zukünftigen Studien auf die generelle Anwendbarkeit dieser Alternativmethoden untersucht werden.

Literatur

Azuma, R. and Itoh, T. (1987). Botulism in Waterfowl and Distribution of Botulinum Type C in Japan. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (167-190). Springfield: Thomas.

Clark, W. E. (1987). Avian Botulism. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (89-106). Springfield: Thomas.

Clarke, F. C. (1913). Preliminary report upon the Disease occurring among the Ducks of the Southern San Joaquin Valley during the fall of 1913. *Condor 15*, 214-226.

Dohms, J. E. (1987). Laboratory investigation of botulism in poultry. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (295-314). Springfield: Thomas.

Eklund, M. W., Poysky, F., Oguma, K. et al. (1987). Relationship of Bacteriophages to Toxin and Haemagglutinin Production by Clostridium Botulinum Types C and D and its Significance in Avian Botulism Outbreaks. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (191-222). Springfield: Thomas.

Farnleitner, A. H., Kirschner, A. K. T., Mach, R. L. et al. (2000). Bacterial neurotoxin production in flat saltwater pools in eastern Austria: A polyphasic approach investigating ecological, microbial and molecular aspects of toxigenesis. *7th EMMS & International Workshop on the Measurement of Microbial Activities in the Carbon Cycle in Aquatic Environments, Netherlands.*

Franciosa, G., Fenicia, L., Caldiani, C. and Aureli, P. (1996). PCR for detection of clostridium botulinum type C in avian and environmental samples. *J. Clin. Microbiol. 34*, 882-885.

Gimanez, D. F. and Ciccarelli, A. S. (1987). Avian Botulism in South America. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (143-152). Springfield: Thomas.

Gregory, A. R., Ellis, T. M., Jubb, T. F. et al. (1996). Use of Enzyme-linked Immunoassays for Antibody to types C and D Botulinum Toxins for investigations of botulism in cattle. *Australian Veterinary Journal, 73*, 2, 55-61.

Grüll, A. (1983). Erstes gesichertes Auftreten von Wasservogel-Botulismus im Seewinkel-Burgenland. *Egretta 26*, 51-65.

Grüll, A., Rauer, G. und Sagmeister, H. (1986). Ökologische Untersuchung am Wasservogel-Botulismus im Seewinkel (Neusiedlerseegebiet). Arbeitsgemeinschaft *Gesamtkonzept Neusiedler See Forschungsprojekt BC 7a*

„Botulismus". Endbericht 1984-1986.

Haagsma, J. and Ter Laak, E. A. (1977). Kanttekeningen bij het optreden von botulismus in Nederland in 1976. *Het vogeljaar 25*, 74-78.

Haagsma, J. (1987a). Avian Botulism in the Netherlands. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (153-166). Springfield: Thomas.

Haagsma, J. (1987b). Laboratory Investigation of Botulism in Wild Birds. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (283-294). Springfield: Thomas.

Harrigan, K. E. (1987). Avian Botulism in Australia and New Zealand. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (133-142). Springfield: Thomas.

Holdeman, L. V. (1970). The ecology and natural history of Clostidium botulinum. *J. Wildlife Disease, 6*, 205-210.

Jansen, B. C. (1987). Clostridium Botulinum Type C, its Isolation, Identification and Taxonomic Position. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (123-132). Springfield: Thomas.

Jubb, T. F. (1993). Diagnosis of Botulism in Cattle using ELISA to detect Antibody to Botulinum Toxins. *Australian Veterinary Journal, 70, 6*, 226-227.

Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H. and Fuji, T. (2001). Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of clostridium botulinum type E in modified-atmosphere-packaged fish. Appl. *Environ. Microbiol. 67*, 206-216.

McGrath, S., Dooley, J.S.G. and Haylock, R. W. (2000). Quantification of Clostridium botulinum Toxin Gen Expression by Competitive Reverse Transcription – PCR. *Appl. Environ. Microbiol. 66*, 1423–1428.

McLean, D. D.(1946). Duck disease at Tlare Lake. *Calif. Fish Game 32*, 71.

Miskin, I. P., Farrimond, P. and Head, I. M. (1999). Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiol. 145*, 1977-1987.

Montecucco, C. and Schavio, G. (1994). Peripheral actions of the botulinum toxins. *Mol. Microbiol. 13*, 1-8.

Notermans, S. and Kozaki, S. (1987). In vitro Techniques for detecting botulinal toxins. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (323-338). Springfield: Thomas.

Oguma, K., Syutu, B., Agui, T. et al. (1981). Homogenity and heterogenity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. *Infect. Immun., 34*, 382-388.

Oguma, K., Murayama, S., Syuto, B. et al. (1984). Analysis of Antigenicity of Clostridium botulinum Type C1 and D Toxins by Polyclonal and Monoclonal Antibodies. *Infect. Immun., 43*, 584-588.

Quodrup and Sudheimer (1949). Detection of botulinum toxin in the bloodstream of wild ducks. J. Am. Vet. Med. Ass. 102, 264-266.

Rocke, T. E. and Samuel, M. D. (1999). Water and Sediment Characteristics associated with avian botulism outbreaks in wetlands. *J. Wildlife Disease, 63*, 1249-1260.

Rocke, T. E., Smith, S. R. and Nashold, S. W. (1998). Preliminary evaluation of a simple in vitro test for the diagnosis of type C botulism in wild birds. *J. Wildlife Disease., 34*, 744-751.

Popoff, M. R. (1995). Ecology of Neurotoxigenic Strains of Clostridia. In C. Montecucco (ed), *Clostridial Neurotoxins*. Berlin-Heidelberg: Springer.

Potter, M. D. (1993). An ELISA for Detection of Botulinal Toxin Types A, B and E in inoculated food samples. *J. Food Prot., 56*, 856–861.

Smart, J. L., Roperts, T.A. and Underwood L. (1987). Avian Botulism in the British Isles. In M. W. Eklund and V. R. Dowell (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective* (111-122). Springfield: Thomas.

Smith, G. R., Milligan, R. A. and Moryson, J. C. (1978). Clostridium botulinum in aquatic environments in Great Britain and Ireland. *J. Hygiene. 80*, 431-438.

Sonnenschein, B. (1980). Clostridium botulinum. In Blobel und H. Schießer, *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. 2* (692–745). Stuttgart: Fischer Verlag.

Szabo, E. A., Pemberton, J. M. and Desmarchelier, P. M. (1993). Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin type A to E by PCR. *Appl. Environ. Microbiol. 59*, 3011-3020.

Westphal, U. (1991). *Botulismus bei Vögeln.* Wiesbaden: Aula Verlag.

Wictome, M. and Shone, C. C. (1998). Botulinum Neurotoxins, Mode of Action and Detection. *J. Appl. Bacteriol. 76*, 539–545.

Williamson, J. L., Rocke, T. E. and Aiken, J. M. (1999). In-situ detection of the clostridium botulinum type C1 toxin gene in wetland sediment with a Nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol. 65*, 3240-3243.

Danksagungen

Das Projekt war Teil des Nationalparkprojektes NP-24 des Nationalparks Neusiedler See Seewinkel. Wir danken dem Nationalparkdirektor K. Kirchberger und den Nationalparkgebietsbetreuern sowie den Mitarbeitern der Biologischen Station Illmitz für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Weiterer Dank gebührt Dr. S. Kölbl und Dr. J. Flatscher von der Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Mödling für die Durchführung einiger Maustests sowie M. Fuchsberger für die zur Verfügungstellung der Übersichtskizze der geographischen Lage des Nationalparks.

Korrespondenzadresse

Mag. Thomas C. Zechmeister
Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Tel.: +43-1-25077 2130
Fax: +43-1-25077 2190
E-mail: thomas.zechmeister@vu-wien.ac.at