

Entwicklung eines *in vitro* Tests zum Botulinum-Toxinnachweis – erste Ergebnisse

Frank Gessler, Susanne Behrens, Petra Loch und Helge Böhnel

Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Bereich Tierhygiene, Georg-August-Universität, D-Göttingen

Zusammenfassung

Botulismus ist eine schwere, häufig tödliche Intoxikation bei Mensch und Tier. Verursacht wird sie durch die Neurotoxine (BoNT) von Clostridium botulinum, einem anaeroben Sporenbildner. Die bisher bekannten Toxine werden in die Typen A bis G eingeteilt. Da die Toxine zu den giftigsten biologischen Substanzen gehören, können sie nach wie vor nur im Tierversuch sicher nachgewiesen werden. Kein in vitro Verfahren konnte bisher die Nachweisempfindlichkeit der Maus sicher erreichen. Ziel der vorgestellten Untersuchungen war und ist deshalb die Entwicklung eines serologischen Tests, der in einem Schritt die Probe aufkonzentriert und das Toxin detektiert. Erste Ergebnisse liegen für BoNT/D vor.

Summary: Development of an *in vitro* assay for the detection of Botulinum Neurotoxins - preliminary results

*Botulism is a severe, often lethal intoxication, which affects man and animal. It is caused by the neurotoxins (BoNT) of Clostridium botulinum, an anaerobic spore-former. At present the toxin types A-G have been identified. The extreme toxicity of these substances still make the animal testing inevitable. No alternative method could reach the sensitivity of the mouse bioassay. Based on the investigations presented, a serological test shall be developed, which concentrates the sample and detects the toxin in one step. Preliminary results of an *in vitro* test detecting BoNT/D are discussed.*

Keywords: Botulism, Botulinum neurotoxin, *in vitro* test, neurotoxin detection

1 Einleitung

Botulismus ist eine häufig tödlich verlaufende Vergiftung, die sowohl beim Menschen als auch bei zahlreichen Tierarten weltweit beobachtet werden kann. Verursacht wird diese Erkrankung durch die Neurotoxine (BoNT) von *Clostridium botulinum*, einem anaeroben Sporenbildner. Derzeit können 7, ca. 150 kDa schwere Neurotoxine differenziert werden, die mit den Buchstaben A-G belegt wurden (Schiavo und Montecucco, 1997). Von veterinärmedizinischem Interesse sind in erster Linie die Toxintypen C und D, als humanpathogen werden dahingegen vor allem die Typen A, B und E eingestuft.

Im klassischen Erkrankungsfall werden die Toxine oral aufgenommen und im Darm resorbiert. Über die Blutbahn gelangt das Toxin an die peripheren Nervenendigungen, insbesondere die motorische Endplatte. Das internalisierte Toxin blockiert im Axonendknopf dann die Azetylcholinfreisetzung, und die klassischen Symptome einer schlaffen Lähmung bilden sich aus. Unbehandelt kommt es schließlich zum Tod durch Atemlähmung und Kreislaufversagen (Böhnel, 1995).

Die Pathogenese der Botulismus-Intoxikation macht deutlich, daß in diagnostischer Hinsicht der Toxinnachweis im Vordergrund steht. Da das BoNT zu den po-

testesten biologischen Toxinen gehört, muß es nach wie vor in Mäusen nachgewiesen werden. Keine *in vitro* Methode konnte bisher zuverlässig die Nachweisgrenze des Tierversuchs erreichen, die abhängig vom Toxintyp zwischen 2 pg und 100 pg (LD₅₀ Maus) liegt (Lamanna und Sakaguchi, 1971; Terajima et al., 1985). Ziel der hier skizzierten Versuche ist es deshalb, ein Testsystem zu entwickeln, das in einem Schritt die Probe aufkonzentriert und das Toxin detektiert. Grundlage der Testentwicklung ist die ABICAP-Technologie: Das einzelne Teströhrchen bietet die Möglichkeit, die Probe nach dem Prinzip der Säulenchromatographie aufzureinigen und das Toxin ähnlich wie in der Festphasenimmunoanalytik nachzuweisen (Schell et al., 1991; Hartmann et al., 1993).

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiere

Der Toxinnachweis im Versuchstier wurde in NMRI-Mäusen der Gewichtsklasse 20-25 g geführt. Die Tiere stammten aus institutseigener Zucht. Zur Antikörpergewinnung wurden 2 Kaninchen und 2 Ziegen unbestimmter Rasse eingesetzt.

2.2 Bakterienstämme

Aus Stammsammlungen wurden insgesamt 35 *C. botulinum*-Stämme der ver-

schiedenen Toxintypen bezogen. Die Stämme wurden auf Verstoffwechslung verschiedener Kohlenstoff-Quellen, sonstige biochemische Leistungen, die Fettsäurenverteilung in der Bakterienzellwand und das Resistenzverhalten geprüft. Elektrophoretisch wurden die löslichen Antigene aufgetrennt und verglichen, ebenso die Plasmide. Schließlich wurden die Stämme auf ihr Toxinbildungsvermögen gescreent und typisiert.

Auf der Basis dieser Ergebnisse, die an anderer Stelle beschrieben werden (Loch, in Vorbereitung), wurde dann von den Toxintypen A bis E aus jeder Gruppe ein Stamm ausgewählt, der für die Testentwicklung verwendet werden sollte.

Da die Tests in der Reihenfolge der Toxintypen D, C, B, A und E entwickelt werden sollen, wurden die nachfolgend aufgeführten Entwicklungsschritte zunächst für *Clostridium botulinum* Typ D durchgeführt und sollen beispielhaft an ihm vorgestellt werden.

2.3 Toxinproduktion

Die Toxinproduktion für den Typ D wurde im Fermenter optimiert. Mit den erarbeiteten Fermentationsparametern wurde der *Clostridium botulinum* Typ D-Stamm dann in vier 10-l-Batch-Läufen kultiviert, so daß hinreichend Ausgangsmaterial für die chromatographische Reinigung zur Verfügung stand.

2.4 Toxinreinigung

Die Fermenterkultur wurde zunächst über ein zweistufiges Filtrationsverfahren vorgereinigt und konzentriert. Über das Hohlfasermembranmodul SPS 9005-8 (Fresenius) mit einer Abscheiderate von 1 Mio. Da wurden die Bakterien im Retentat zurückgehalten und verworfen. Das Filtrat wurde über ein weiteres Modul mit einer Abscheiderate von 30 kDa (SPS 6005-8B/4, Fresenius) gereinigt. Dabei wurden die niedermolekularen Bestandteile, insbesondere die Medienproteine abgetrennt. Das Retentat wurde in den anschließenden drei flüssigchromatographischen Reinigungsschritten eingesetzt. Die hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose HP (Amersham Pharmacia), wurde mit 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0, 1 M Ammoniumsulfat als Startpuffer und 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0 als Elutionspuffer durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE und im Hämagglutinationstest geprüft. Der Peak, in dem das Toxin elektrophoretisch nachgewiesen werden konnte, wurde auf seine Toxizität in der Maus kontrolliert. Die Fraktionen, in denen das Toxin eluiert war, wurden gepoolt, gegen 50 mM Tris, pH 8,0 dialysiert und auf einen Anionenaustauscher (Source 30Q, Amersham Pharmacia) aufgetragen. Als Elutionspuffer wurde 50 mM Tris, pH 8,0, 2 M NaCl eingesetzt. Erneut wurden die Fraktionen, abgesehen vom Hämagglutinationstest wie nach dem ersten chromatographischen Reinigungsschritt untersucht. Die toxinhaltigen Fraktionen wurden wieder gepoolt, gegen 50 mM Tris, pH 6,0 dialysiert und mit Hilfe eines höherauflösenden Anionenaustauschers (Source 15 Q, Amersham Pharmacia) weiter aufgetrennt. Elutionspuffer war in diesem Fall 50 mM Tris, pH 6,0, 2 M NaCl. Die Reinheit des Toxinpeaks wurde über eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 200, Amersham Pharmacia) sowie über einen hochauflösenden Anionenaustauscher (Mono Q, Amersham Pharmacia) und schließlich in der SDS-PAGE mit und ohne DTT-Behandlung überprüft.

2.5 Toxoidierung

Der Proteingehalt des rein dargestellten Toxins wurde bestimmt und auf eine Konzentration von 200 µg Toxin/ml eingestellt. Zur Toxoidierung wurde die Toxinlösung mit Formalin (Endkonzentration

0,4 %) versetzt und 14 d im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Die Unschädlichkeit des Toxoids wurde im Tierversuch in der Maus überprüft. Adjuvantiert wurde das Toxoid mit Al(OH)₃.

2.6 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden 2 Kaninchen und 2 Ziegen mit je 1 ml des adjuvantierten Toxoids subkutan vakziniert. Im Abstand von 3 Wochen wurde die erste Wiederholungsimpfung durchgeführt, nach weiteren 3 Wochen die zweite. Zu den jeweiligen Impfterminen sowie 3 Wochen nach der letzten Impfung wurden den Tieren Blutproben entnommen. Der spezifische Antikörpertiter wurde im ELISA bestimmt.

2.7 Reinigung der Antikörper

Nachdem ein hoher spezifischer Antikörpertiter gegen das applizierte Typ D-Toxoid nachgewiesen werden konnte, wurden die Kaninchen entblutet und den Ziegen jeweils ca. 400 ml Blut zur Serumgewinnung entnommen. Die Seren wurden

anschließend affinitätschromatographisch über Sepharose CL6B (Amersham Pharmacia) gereinigt, an die zuvor Typ D-Toxoid gebunden worden war.

Die Reinheit der gewonnenen Antikörperfraktion wurde in der SDS-PAGE gegen das ungereinigte Serum geprüft.

2.8 Testaufbau

Verschiedene Trägermaterialien mit unterschiedlichen Schichtdicken und Porengrößen für das ABICAP[®]-Teströhrchen¹ wurden mit dem gereinigten Antiserum beladen. Als nachzuweisende Substanz wurde das gereinigte Typ D-Toxin eingesetzt. Die einzelnen Reaktionsschritte im Testansatz entsprachen dem für den ABICAP[®]-Test üblichen Protokoll. Als Farbstoff wurde Abion-Schwarz verwendet.

3 Ergebnisse

Im Fermenter konnte der ausgewählte *Clostridium botulinum* Typ D-Stamm unter optimierten Bedingungen mit einer Mäuse-LD₅₀ von 10⁶/ml vermehrt werden.

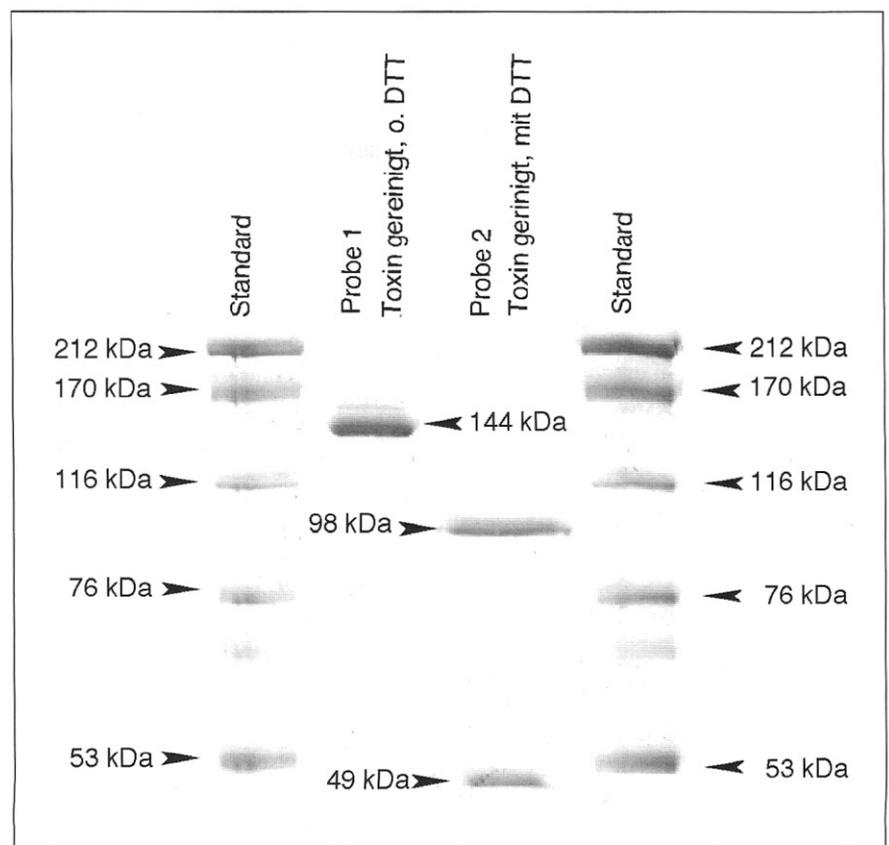


Abbildung 1: Auftrennung des gereinigten Typ D-Toxins mit und ohne DTT-Behandlung in der SDS-PAGE

Insgesamt wurden 40 l Kulturflüssigkeit geerntet. Über die Kaskadenfiltration und die drei flüssigchromatographischen Schritte konnte daraus wiederum ca. 20 mg gereinigtes Toxin gewonnen werden. In Abbildung 1 ist das Ergebnis der Auftrennung des gereinigten Toxins in der SDS-PAGE dargestellt.

Das Toxin konnte als einzelne Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 144 kDa nachgewiesen werden. Durch Dithiothreitol-Behandlung wurde die Disulfidbrücke und damit das Neurotoxin in die schwere und leichte Kette gespalten, die bei 98 kDa bzw. 49 kDa als Bande zu erkennen waren.

Da das Toxoid in der Überprüfung keine pathogene Wirkung gezeigt hatte, konnte es zur Immunisierung der Kaninchen und Ziegen eingesetzt werden. Bei allen vier Tieren konnte im ELISA 3 Wochen nach der letzten Antigenapplikation ein hoher, spezifischer Titer nachgewiesen werden, so daß die Tiere unmittelbar, nachdem die Ergebnisse der Serologie vorlagen, geblutet wurden.

Die affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren wurde zunächst mit dem Ziegenserum durchgeführt, da mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. In der SDS-PAGE konnte die Reinigung der Globulinfraction demonstriert werden. Innerhalb der verschiedenen Trägermaterialien des Teströhrchens bewährten sich schmale, ca. 1,7 mm hohe, feinporige Membranen. Mit diesem Testaufbau konnte noch 1 ng Typ D-Toxin in 750 µl Probe detektiert werden. Dieses Ergebnis ist auch in Abbildung 2 veranschaulicht.

In dem Röhrchen auf das 1 ng Toxin in 750 µl Puffer aufgegeben wurde ist im Vergleich zur Negativkontrolle die positive Farbreaktion der Membran zu erkennen. Besonders deutlich ist die Schwarzfärbung der Membran bei dem Testansatz mit 50 ng/750 µl Puffer zu sehen.

4 Diskussion

Mit dem dargestellten Testaufbau konnte bei dem Ansatz mit *Clostridium botulinum* Typ D-Toxin eine Nachweisgrenze von 1

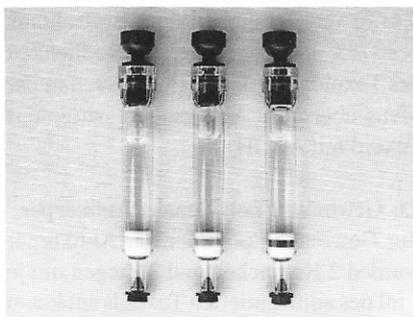


Abbildung 2: ABICAP-Teströhrchen: Negativkontrolle, 1 ng bzw. 50 ng D-Toxin, jeweils aufgetragen in 750 µl Puffer (v. l. n. r.)

ng in 750 µl Probenmaterial erzielt werden. Das entspricht beim Typ D einer Konzentration von ca. 10-20 LD₅₀-Maus. Wird berücksichtigt, daß auf die Teströhrchen ein wesentlich höheres Probenvolumen aufgetragen werden kann, wäre die Nachweisempfindlichkeit der Maus bei einem Probeneinsatz von ca. 10 ml rein rechnerisch erreicht. Dennoch muß das Testverfahren noch weiter optimiert werden, insbesondere im Hinblick auf die Sensitivität, um das Toxin auch in kleineren Volumina detektieren zu können. Aber auch Untersuchungen zur Spezifität müssen noch durchgeführt und statistisch abgesichert werden. Parallel zu dem beschriebenen Testansatz für den Toxintyp D werden die anderen Toxintypen aufbereitet und auch monoklonale Antikörper auf ihre Eignung im skizzierten Testverfahren untersucht.

Literatur

Böhnel, H. (1995). Botulismus. In H. Blobel und T. Schließer (Hrsg.). *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II/4 Clostridiosen* (89-153). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Hartmann, H., Stelling, O. and Schell, D. (1993). Rapid and highly sensitive quantification of mouse IgG combining chromatographic and immunanalytic procedures. *Proceedings of MoBBEL*, 7, 107-110.

Lamanna, C. and Sakaguchi, G. (1971). Botulinal toxins and the problem of nomenclature of simple toxins. *Bact. Rev.* 32, 242-249.

Loch, P. (in Vorbereitung). Kulturell-biochemische und molekularbiologische Untersuchungen sowie Pathogenitätsprüfung von *Clostridium botulinum*-Stämmen - ein Beitrag zur Taxonomie. *Dissertation vet.-med.*, Hannover.

Schell, D., Erhardt, C. and Erhardt, U. (1991). A new method for the fast quantification of monoclonal antibodies. *Proceedings of MoBBEL*, 6, 91-93.

Schiavo, G. and Montecucco, C. (1997). The structure and mode of action of Botulinum and Tetanus Toxins. In I. Rood, B. McClane, J. Glenn Songer und R. Titball (Hrsg.). *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis* (295-322). San Diego, London: Academic Press.

Terajima, J., Syuto, B., Ochanda, J. O. and Kubo, S. (1985). Purification and characterization of neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type C 6813. *Infect. Immun.* 48, 312-317.

Danksagung

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wird mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie unter dem Förderkennzeichen 0311128/890 gefördert.

Für die Bereitstellung von toxischen *Clostridium botulinum*-Stämmen danken wir insbesondere Herrn Prof. S. Kozaki, Osaka Prefecture University, Japan.

Korrespondenzadresse

Dr. Frank Gessler
 Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen,
 Bereich Tierhygiene
 Georg-August-Universität
 Kellnerweg 6
 D-37077 Göttingen
 Tel.: +49-551-393393
 Fax: +49-551-393408
 E-mail: fgessle@gwdg.de

¹ABICAP ist ein eingetragenes Warenzeichen der Fa. Abion, Jülich.

