

5 Zusammenfassung

Wurden Bakterienstämme ursprünglich allein aufgrund der Produktion von Botulinumneurotoxin (BoNT) zur Spezies *C. botulinum* zusammengefaßt, so stellen heute heterogene Eigenschaften, das Vorkommen atoxischer Stämme sowie die Entdeckung weiterer Clostridienspezies, die ebenfalls BoNT produzieren können, die bestehende taxonomische Einteilung in Frage.

Es galt daher 31 Typ- und Referenzstämme von *C. botulinum* sowie drei weitere Clostridienspezies, die u. U. BoNT bilden können, anhand von kulturell-biochemischen (konventionelle Anaerobiediagnostik, kommerziell erhältliche Schnelltestsysteme, Resistenzverhalten gegen Chemotherapeutika im F-Test[®]) und molekularbiologischen Untersuchungen (gaschromatographische Analyse längerketziger Fettsäuren, SDS-PAGE von Kulturüberständen, Plasmidanalyse) zu charakterisieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von clusteranalytischen Verfahren phänotypische Beziehungen zwischen den einzelnen Stämmen darzustellen und die Ergebnisse in einer Referenzdatenbank zu erfassen. Die Eignung der Methode zur Identifizierung von *C. botulinum* sollte anhand von zwölf vorläufig klassifizierten Feldisolaten überprüft werden. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Clusteranalyse nach der Methode „Average Linkage Pseudo“ ließ eine Unterteilung der Typ- und Referenzstämme unter Berücksichtigung der Pseudo t^2 -Statistik in vier gut abgegrenzte Cluster zu und wurde maßgeblich von den Ergebnissen der kulturell-biochemischen Untersuchungen bestimmt. Demnach wurden in Anlehnung an die biochemische Einteilung nach SMITH und HOBBS (1974) Stämme der Gruppen III und IV von Stämmen der Gruppen I und II sowie *C. baratii* unterschieden. Stämme vom Typ G konnten jedoch durch die Ergebnisse einzelner Versuche sicher abgegrenzt werden. Das vierte Cluster umfaßte zwei der drei Stämme vom Typ E - darunter auch den Typstamm - sowie *C. butyricum*. Eine weitergehende Differenzierung der Stämme war nur anhand einzelner Untersuchungen möglich, da (spezies-)typische Einzelmerkmale durch die Berechnung nicht hervorgehoben wurden. Eine Unterteilung in definierte Subtypen war genauso wenig möglich wie eine indirekte Unterscheidung von toxischen und atoxischen Stämmen.
2. In der Referenzdatenbank konnten aus mathematischen Gründen die Ergebnisse der Resistenzbestimmung und der gaschromatographischen Fettsäurenanalyse nicht berücksichtigt werden. Weitere Faktoren, die die Clusteranalyse nachhaltig beeinflussten, waren fehlende Ergebnisse in einzelnen Untersuchungen, die Belegung der Variablen sowie die computergestützte Auswertung der SDS-PAGE. Die Berechnung der Pseudo t^2 -Statistik war für die Beurteilung der Clustergrenzen besonders geeignet.

- 3 Obwohl die Referenzdatenbank eine Differenzierung in einzelne Toxintypen nur bedingt zuließ, wurden zwei atoxische Feldstämme anhand ihrer Position im Cluster und aufgrund biochemischer Ergebnisse als *C. botulinum* E identifiziert. Drei weitere Feldstämme ordneten sich den Stämmen der Gruppen I und II zu, wurden aber im Tierversuch eindeutig typisiert.

Folgende Ergebnisse konnten bei den einzelnen Untersuchungen ermittelt werden:

- Die Ergebnisse der biochemischen und morphologischen Untersuchungen ließen eine Differenzierung der Stämme der Gruppen III, IV und der Stämme des Clusters 4 zu. Eine zuverlässige Speziesdiagnose war zwar im Gesamtvergleich, nicht aber mit Hilfe von Identifizierungsschlüsseln möglich. Einzelne Reaktionen in verschiedenen Schnelltestsystemen lieferten durch von der konventionellen Methode abweichende Ergebnisse zusätzlich diskriminierende Merkmale. Im Rapid ID 32 A[®] wurden die meisten Stämme als *C. botulinum*, im API 20 A[®] als *C. sporogenes* identifiziert, wobei Stämme der Gruppe III stets ein negatives Panel zeigten. Der BBL CRYSTAL[™] Anaerobe ID war nicht zur Identifizierung der Stämme geeignet. Im E-Test[®] deutete sich eine Differenzierungsmöglichkeit der Stämme der Cluster 1 und 2 an. Stämme von *C. botulinum* B und *C. baratii* waren wenig empfindlich gegen Clindamycin, Stämme vom Typ D weniger empfindlich gegen Chloramphenicol.
- Bei den molekularbiologischen Untersuchungen war keine Zuordnung der Fettsäuremuster zu bestimmten Toxintypen möglich, allerdings wiesen *C. baratii*, *C. butyricum* und Feldstamm 2287 spezifische Fettsäuremuster auf. Hohe Anteile an unbekanntem Fettsäuren minderten die Aussagekraft der Ergebnisse. Die sehr guten Differenzierungsmöglichkeiten der SDS-PAGE konnten nur bedingt durch die Software genutzt werden. In der optischen Auswertung ermittelte Gemeinsamkeiten und das Auftreten von identischen Proteinprofilen bei unterschiedlichen Stämmen lassen auf eine Identifizierung ohne Tierversuch hoffen. Identische Plasmidprofile bei Stämmen vom Typ A lassen einen Zusammenhang zwischen Plasmidprofil und Toxintyp vermuten und lieferten wertvolle Zusatzinformationen bei der Identifizierung atoxischer Feldstämme.
- Bei der klassischen Speziesdiagnose durch den Nachweis von BoNT in der Maus waren 10 % der Referenz- bzw. Typstämme und 75 % der Feldstämme atoxisch. Ein Referenz- sowie der Typstamm von *C. botulinum* C konnten nicht neutralisiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit Hilfe der erstellten Datenbank ansatzweise eine Typisierung der Stämme möglich ist. Probleme bei der Datenverarbeitung verhindern eine optimale Nutzung zusätzlicher diskriminierender Merkmale aus der Resistenzbestimmung und der SDS-PAGE.

5 Summary

Petra Vera Loch (2000)

Morphological, biochemical and molecularbiological investigations in combination with screening for toxin production of *C. botulinum* strains – A contribution to taxonomy

Originally, bacterial strains were classified with the species *C. botulinum* solely because of their capability to produce botulinum neurotoxin (BoNT). Heterogeneity, the occurrence of non-toxic strains as well as the detection of further clostridial species which might also have the ability to produce BoNT, question the existing taxonomical classification.

The objective was to characterize 31 reference and type strains of *C. botulinum* and another three clostridial species that might produce BoNT. This was to be achieved by using morphological, biochemical (testing for biochemical characteristics using conventional techniques and various commercial microsystems, susceptibility testing by E-Test[®]) and molecularbiological (gaschromatographic analyses of long-chain fatty acids, SDS-PAGE of soluble proteins, plasmid isolation) investigations. The aim of this study was to reveal phenotypic relations between the strains using cluster analysis and to establish a reference database. Its usefulness for identification of strains of *C. botulinum* was to be investigated by screening twelve preliminarily identified field strains. The following results were obtained:

1. Cluster analysis performed using the average linkage pseudo method in correlation with the results of pseudo t^2 -statistics suggested a separation of reference and type strains in four different clusters mainly based upon morphological and biochemical properties. Therefore it was possible to differentiate strains of groups I and II according to SMITH and HOBBS (1974) from strains of groups III and IV and from *C. baratii*. With the results obtained in some of the tests, strains of *C. botulinum* G could be distinctly separated. Cluster no. 4 comprises two out of three strains of *C. botulinum* E – including the type strain – and *C. butyricum*. Further differentiation of the strains could only be achieved by means of individual testing, because characteristics typical for the species were not emphasized by computation. Division into defined subtypes was as impossible as indirect differentiation between toxic and non-toxic strains.
2. For mathematical reasons neither the results of susceptibility testing nor of gaschromatographic analyses were taken into account in the reference database. Other facts influencing the cluster analyses were missing values, the choice of values for variables as well as computerized interpretation of SDS-PAGE. The calculation of pseudo t^2 -statistics was found to be very helpful for revealing well separated clusters.

3. Although the reference database permitted only a conditional differentiation into toxin types, two non-toxic field strains were identified as being strains of *C. botulinum* E by their position in the dendrogram and by biochemical properties. Another three field strains were joined to strains of group I and II but were definitely identified in the mouse bioassay.

The following results were obtained in the individual investigations:

- The results of morphological and biochemical testing allowed the distinction between strains of groups III, IV and of cluster no. 4. A reliable identification of the species was only possible by matching all morphological and biochemical characteristics but not by using species keys. Testing for biochemical characteristics using various commercial microsystems gave results which differed from those obtained using the conventional method but revealed additional differentiating characteristics. Rapid ID 32 A[®] identified most of the strains as *C. botulinum*; with API 20 A[®] strains were mainly identified as being *C. sporogenes* whereas strains of group III always gave negative results when tested. BBL CRYSTAL[™] Anaerobe ID was not suitable for the identification of *C. botulinum*. Susceptibility testing by E-Test[®] indicated another way of differentiating between strains of clusters no. 1 and 2. Strains of *C. botulinum* B and *C. baratii* revealed conspicuous resistance against clindamycin, strains of *C. botulinum* D seemed to be less susceptible to chloramphenicol.
- Molecular investigations in the form of gaschromatographic analyses of long-chain fatty acids did not allow an association of patterns obtained to particular toxin types. However, *C. baratii*, *C. butyricum* and field strain 2287 showed specific patterns. A high portion of unknown fatty acids reduced the meaningfulness of the results. SDS-PAGE proved to be a powerful differentiation tool but the software was not able to utilize it fully. Optically identified common and identical protein patterns in different strains point to the possibility of identification without experiments on animals. Results from plasmid isolation showing identical patterns of strains of *C. botulinum* A suggest a correlation between plasmid profiles and toxin type and provide valuable additional information for the identification of non-toxic strains.
- The mouse bioassay, the conventional method for species identification by detecting BoNT, revealed non-toxicity in 10 % of the reference/type strains and in 75 % of the field strains. Toxin neutralisation was not successful in the case of one reference strain nor for the type strain of *C. botulinum* C.

The results of this study show that a classification into toxin types is partly possible with the aid of the reference database as described. Problems in processing the data prevent the optimum utilization of further differentiating characteristics obtained by susceptibility testing and SDS-PAGE.