

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der
Justus Liebig-Universität in Giessen. Direktor: Professor
Dr. H. Bartels.

Dr. R. Hadlok, Dr. E. Grunwald und Prof. Dr. H. Bartels, Giessen

Untersuchungen zur Abtrennung von Clostridium botulinum von
anderen Clostridienarten im Rahmen der bakteriologischen
Fleischuntersuchung.

Einleitung

Das Toxin von Clostridium botulinum Typ A, B und E führt bei
Aufnahme toxinhaltiger Nahrungsmittel zu einer Intoxikations-
erkrankung des Menschen, dem Botulismus. Seine Ursache sind
in Deutschland hauptsächlich Fleischerzeugnisse.

Der Befall des Fleisches mit Clostridium botulinum Typ A und B
kann durch Kontamination oder bei Schlachttieren, insbesondere
kranken und abgehetzten, während des Lebens und während der
Schlachtung vom Darm aus erfolgen. Es ist erwiesen, dass Clostri-
dien wie Cl. perfringens, Cl. sporogenes, Cl. bifermentans und
Cl. butyricum im Boden, in Gewürzen und in den Faeces der
Schlachttiere vorkommen. Den Literaturangaben nach konnte Cl.
botulinum aus Bodenproben, aus dem Darmkanal gesunder Schlachttiere,
aus Lebern gesunder Rinder und aus einer Muskelfleischprobe im
Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung isoliert werden.

Da nach den deutschen Ausführungsbestimmungen zum Fleischschau-
gesetz im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung die

zeitraubende Differenzierung der in der Muskulatur gefundenen Clostridien nicht vorgeschrieben ist und auch nur selten vorgenommen wird, ist es dem die Fleischuntersuchung durchführenden Tierarzt auf Grund des ihm von der Untersuchungsstelle gegebenen Befundes "Clostridien in der Muskulatur" nicht möglich, die unterschiedliche Bedeutung der Anaerobier für die menschliche Gesundheit in der Beurteilung des Fleisches zum Ausdruck zu bringen. Beurteilt er z.B. den Tierkörper beim Vorliegen des bakteriologischen Untersuchungsergebnisses "Clostridien in der Muskulatur" als tauglich, so beurkundet er damit, dass das Fleisch keine gesundheitsschädigenden Keime enthält, obwohl er das Vorhandensein von Clostridium botulinum nicht ausschliessen kann. Diese Tatsache stellt für den Gesundheitsschutz des Verbrauchers verantwortlichen Tierarzt ein schwerwiegendes Problem dar.

Um über das Ausmass des Nachweises von "Clostridien in der Muskulatur" von Schlachttieren im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung einen Überblick zu erhalten, wurden bei 18 Staatlichen Veterinäruntersuchungsämtern der Bundesrepublik Deutschland Erhebungen angestellt, die für die Jahre 1963 und 1964 folgendes Bild ergaben.⁺⁾

	1963		1964	
	Zahl	%	Zahl	%
I. Bakteriologische Fleischuntersuchungen in der Bundesrepublik Deutschland (gesamt)	270 711	100	273 608	100
II. Erfasste Bakteriologische Fleischuntersuchungen im Rahmen der Erhebung	90 520	33,44	91 524	33,45
III. Clostridienfälle zu II.	520	0,57	498	0,54

^{+) Den beteiligten Ämtern sei an dieser Stelle für ihre Mitarbeit verbindlichst gedankt.}

Von den in den Jahren 1963/1964 durchgeführten 544 319 bakteriologischen Fleischuntersuchungen wurden demnach 182 044 = 33,5% erfasst. Unter diesen 182 044 Untersuchungen befanden sich 1018 = 0,56 % Fälle, bei denen Clostridien nachgewiesen wurden.

Die Häufigkeit des Vorkommens von Clostridien, aufgeschlüsselt nach Schlachttierarten ergibt für diesen Zeitraum folgendes Bild: Schaf 1,18 %, Pferd 1,03 %, Kalb 0,72 %, Rind 0,64 %, Schwein 0,40% Ziege 0,00 %.

Von den 1018 Clostridiennachweisen wurde lediglich in 11 = 1,08% Fällen eine Differenzierung vorgenommen. Es handelte sich dabei um je 5 mal *Cl. perfringens* und *Cl. septicum* sowie 1 mal *Cl. ferri*.

Die Differenzierung isolierter Clostridien wird aufgrund ihrer Wuchsformen auf 2% igem Traubenzuckerblutagar in der Literatur beschrieben. Der Wert dieser Methode wird dadurch eingeschränkt, dass verschiedene Clostridienarten, wie z.B. *Cl. novyi*, *Cl. multifementans* und *Cl. botulinum* die gleiche Wuchsform aufweisen.

Eine Differenzierungsmöglichkeit aufgrund der Zellmorphologie entfällt, da neben grossen morphologischen Ähnlichkeiten vieler Arten untereinander auch Pleomorphismus der Erscheinungsform einer Art auftreten kann.

Die Prüfung der biochemischen Eigenschaften muss oft mehrmals sehr sorgfältig ausgeführt werden, da selbst beim Arbeiten mit reinen, bekannten Stämmen Unregelmässigkeiten auftreten können.

Bei Berücksichtigung zahlreicher morphologischer und biochemischer Eigenschaften ist eine Differenzierung nur bei entsprechendem Zeitaufwand, der günstigen Falles mit vier Tagen angegeben wird, durchführbar.

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises und der Differenzierung pathogener Clostridien, hier von Cl. botulinum, ist der Tierversuch, der sich auf die Wirkung des Cl. botulinum-Toxins stützt. Der Toxinnachweis kann dabei mit flüssigen Kulturen oder deren keimfreien Filtrat durch Beimpfen oder per os-Gabe an Meerschweinchen oder weisse Mäuse vorgenommen werden. Die Angaben über das notwendige Alter der Kulturen für den Toxinnachweis schwanken zwischen 2 und 10 Tagen, die Angaben für das Auftreten charakteristischer Symptome beim Versuchstier zwischen innerhalb 24 Stunden und 4 Tagen, in einem Fall sogar bis zu 21 Tagen. Ein Toxinnachweis in jüngeren Kulturen wird in der zugänglichen Literatur nicht beschrieben. Eine Erklärung für diese Tatsache ist darin zu suchen, dass nach 18 bis 24 Stunden in einer flüssigen Cl. botulinum-Kultur erst die Autolyse der Keime beginnt, die mit einer Erhöhung des bis dahin relativ niedrigen Toxintiters einhergeht. In 48 Stunden lang bebrüteten Kulturen war der Toxintiter 100 mal grösser als in Kulturen, die 24 Stunden lang bebrütet worden waren. Der höchste Toxintiter wird für flüssige Kultur von Cl. botulinum nach 72-stündiger Bebrütung angegeben.

Es konnte aber bei Untersuchungen mit Cl. botulinum Typ A und B gezeigt werden, dass mit Hilfe von Trypsin eine wesentliche Verstärkung der Toxizität von 12 und 8 Stunden alten Kulturen zu erreichen ist, wohingegen in Kulturen mit bereits aktiviertem Toxin eine Abschwächung eintritt.

Eigene Untersuchungen, Aufgabenstellung, Material und Methodik

Da es erwünscht erscheint, sowohl im Rahmen der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung als auch bei der Untersuchung von Fleischerzeugnissen auf pathogene Keime beim Nachweis von Clostridien möglichst schnell zur Möglichkeit der Aussage zu gelangen, ob es sich um Cl. botulinum handelt, sollte geprüft werden:

1. nach welcher Bebrütungszeit einer Cl. botulinum-Kultur kann ein Toxinnachweis mit Hilfe eines Versuchstieres erfolgen und

2. kann eine Trypsinaktivierung des Toxins junger Cl. botulinum-Kulturen die Diagnose "Clostridium botulinum" beschleunigen.

Für die Untersuchungen wurden jeweils ein zuvor differenzierter Stamm Cl. botulinum Typ A und B herangezogen. Die Stämme wurden dankenswerterweise von den Behringwerken/Marburg überlassen. Bei Cl. botulinum Typ A handelte es sich nach der Differenzierung (Löfflerserum) um einen proteolytischen Stamm, bei Cl. botulinum Typ B um einen nichtproteolytischen.

Als Versuchstiere dienten Weisse Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 25 g..

Die Züchtung von Reinkulturen auf festem Nährmedium wurde auf Leberagar 4 Tage lang bei + 37°C im Anaerobentopf nach Fey vorgenommen.

Die Züchtung der Reinkulturen im flüssigen Nährmedium erfolgte in Vaseline überschichteter Leberbrütewährend unterschiedlicher Zeiten bei +37°C (Zusammensetzung der Leberbrühe: 1000 ml Aqua dest., 50 g Bacto Liver, 2 g Natriumphosphat, 10 g Dextrose, pH-Wert 7,6).

Die Herstellung von Kulturfiltraten geschah mittels eines Membranfiltergerätes Membranfilter Co5 (Membranfiltergesellschaft Göttingen.).

Für die Trypsinaktivierung der flüssigen Kulturen diente Trypsin, 2 mal crist. lyophil, reinst, salzfrei, 10 000 EU/mg, frei von Chymotrypsin, der Firma Serva, Heidelberg. 2 ml einer 0,1 %igen sterilen Lösung von kristallinem Trypsin, pH-Wert 6,0 wurden der gleichen Menge Kultur bzw. Kulturfiltrat zugesetzt, dieses Gemisch wurde 2 Stunden bei + 37°C bebrütet.

Die Untersuchungen mit Cl. botulinum Typ A und B gliedern sich in drei Versuchsreihen:

In der ersten Versuchsreihe wurden als Material für die Beimpfung der flüssigen Ausgangskulturen Keimsuspensionen, in der zweiten Versuchsreihe dagegen Sporensuspensionen verwendet.

In der dritten, praxisnahen Versuchsreihe, wurde, wie in der ersten Versuchsreihe, Keimsuspension als Material für die Beimpfung der Ausgangskulturen verwendet.

Für die erste Versuchsreihe wurden Keimabschwemmungen vom festen Nährmedium auf die Dichte eines Bariumsulfatröhrchens 97:3 (97 ml 1/10 m H_2SO_4 + 3 ml 1/20 m $BaCl_2$) eingestellt. Von der Keimabschwemmung des Types A und des Types B wurden für jeden Typ 4 Röhrchen Leberbrühe mit jeweils 1 ml beimpft und für 12, 18, 24, 48, 72 und 96 Stunden bebrütet; bei Typ A wurde ausserdem noch eine Bebrütungszeit von 8 Stunden angewendet. Nach diesen Zeiten wurden die Kulturen auf Trübungsgrad, Gasund Bodensatzbildung untersucht und mittels eines nach Gramgefärbten Ausstriches auf Reinheit geprüft.

Vor der Verimpfung des Versuchsmaterials wurde aus jedem Röhrchen 1 ml Brühe entnommen und jeweils mit 1 ml Cl. botulinum Serum/Behringwerke Typ A und B vermischt. Diese Mischungen wurden nochmals 1/2 Stunde lang bei + 37°C bebrütet.

Folgende Flüssigkeiten von Cl. botulinum Typ A- und Cl. botulinum Typ B-Kulturen des erwähnten Alters kamen nunmehr zur Verimpfung: Brühkultur + Trypsinlösung, Brühkultur + Wasser (der Zusatz des Wassers erfolgte, um den Verdünnungseffekt der Trypsinlösung nachzuahmen), Kulturfiltrat + Trypsinlösung, Kulturfiltrat + Wasser. Von jeder der angeführten Flüssigkeiten wurden jeweils 3 Mäusen je 0,5 ml s.c. verabreicht. Eine 4. und 5. Maus erhielten je 1,0 ml der entsprechenden mit Serum behandelten Kontrollflüssigkeit. Ausserdem wurde 1 Maus mit 0,5 ml einer unbebrüteten mit der Keimaufschwemmung beimpften Leberbrühe s.c. geimpft.

Für die zweite Versuchsreihe wurden von *Cl. botulinum* Typ A und *Cl. botulinum* Typ B Sporensuspensionen hergestellt. Durch Abschwemmen von Eigelbagarplatten-Kulturen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung wurden Suspensionen von Keimen und Sporen der Dichte wie in Versuchsreihe 1 hergestellt. Diese Aufschwemmungen wurden zur Inaktivierung des vorhandenen Toxins und zur Abtötung der vegetativen Keime 30 Minuten im Wasserbad bei +80°C erhitzt. Danach wurden die Flüssigkeiten 3 mal je 3 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und jedesmal nach Abgiessen des Überstandes der Bodensatz wieder mit phys. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und davon wurde je 1 ml einer weissen Maus subcutan verimpft. Ausserdem wurden mit je 1 ml dieser Aufschwemmung Leberbrühröhrchen beimpft. Nach 24-stündiger Bebrütung wurden aus der *Cl. botulinum*-Kultur Typ A und B 2 mal 0,5 ml genommen und an je 2 Mäuse verimpft. Von der Typ A-Kultur wurden ausserdem nach 12- und 18-stündiger Bebrütung von der Typ B-Kultur nach 36- und 48-stündiger Bebrütung 2 mal je 1 ml in sterile Reagenzgläser abgenommen und mit 1 ml einer 0,1%igen Lösung von kristallinem Trypsin bzw. mit 1 ml sterilem aqua. dest.

versetzt und nochmals 2 Stunden im Brutschrank bei + 37°C bebrütet. Von jeder dieser Flüssigkeiten wurden jeweils 2 weissen Mäusen 0,5 ml unter die Rückenhaut appliziert.

Die dritte Versuchsreihe wurde nur mit *Cl. botulinum* Typ B ausgeführt: 6 Reagenzgläser mit 9 ml kochendheisser Leberbrühe wurden nach den Vorschriften in den Ausführungsbestimmungen A über die Untersuchung und gesundheitspolizeiliche Behandlung der Schlachttiere und des Fleisches bei Schlachtungen im Inland AB-A zum Fleischbeschaugesetz gültiger Fassung mit je einem bohnergrossen Muskelstück beschickt. Nach rascher Abkühlung wurden drei dieser Leberbrühröhrchen mit 0,1 ml einer 100-fachen Verdünnung und die anderen drei Leberöhrchen mit 0,1 ml einer 10 000-fachen Verdünnung einer bereits beschriebenen Keimaufschwemmung von *Cl. botulinum* Typ B beimpft. Von jeder Reihe wurde ein Röhrchen 24 Stunden, ein Röhrchen 48 Stunden und ein Röhrchen 72 Stunden lang bebrütet. Nach dieser Bebrütungszeit wurden die flüssigen Kulturen makroskopisch und mikroskopisch, wie bereits

oben beschrieben wurde, untersucht. Nun wurde aus jedem Röhrchen 3 mal 0,5 ml flüssige Kultur entnommen und in sterilen Reagenzgläsern mit 0,5 ml sterilem aqua dest. mit 0,5 ml einer oben beschriebenen Trypsinlösung bzw. mit 0,5 ml Botulismusserum Typ A und B vermischt und 2 Stunden (aqua dest. und Trypsinlösung) bzw. 1/2 Stunde (serum) im Brutschrank bei + 37°C bebrütet. Daran anschliessend wurden jeweils 0,5 ml der verschiedenen Gemische an je eine Maus verimpft.

Die Versuchstiere wurden in Käfigen zu je 2 oder 5 Stück gehalten und rund 10 Tage in anfangs kleinen später grösseren Zeitabständen beobachtet.

Ergebnisse

1) Versuchsreihe 1

In der ersten Versuchsreihe zeigten die Versuche mit Cl. botulinum Typ A, dass bereits die unbebrütete, mit der Aufschwemmung beimpfte Leberbrühe in der Lage war, beim Versuchstier nach 6 Stunden die Krankheitserscheinungen des Botulismus hervorzurufen und innerhalb 16 Stunden den Tod des Tieres herbeizuführen. Die mit einer 8-Stunden-Kultur geimpften Tiere waren nach 13 Stunden, die mit einer 12-Stunden-Kultur geimpften nach 10 Stunden und die mit 24 Stunden alter Kultur behandelten Mäuse nach 7 Stunden tot. Die mit 2,3 und 4 Tagen alten Kulturen geimpften Tiere starben nach 4 Stunden . . .

. . . Das

Krankheitsbild begann mit einer leichten Ataxie der Hintergliedmassen, die sich über eine Lähmung bis zur völligen Unbeweglichkeit der Hinterbeine steigerte. Weiterhin wurden bei den typisch erkrankten Versuchstieren stets Atembeschwerden beobachtet, ein krummer Rücken, hundesitzige Stellung und ein eingeschnürtes abdomen.

Bei den Versuchen mit Kulturfiltrat wirkte die Applikation des Materials bei den Versuchstieren ebenfalls in allen Fällen tödlich. Gegenüber den Versuchen mit unfiltrierter Kultur war jedoch - allerdings nur bei den kürzeren Bebrütungszeiten - eine deutliche

Verzögerung der Reaktion des Tieres zu beobachten.

Bei den Versuchen mit trypsinbehandelter Kultur von Cl. botulinum Typ A. wurde festgestellt, dass die Behandlung des Versuchsmaterials mit Trypsinlösung die Toxizität desselben abschwächt. Dies trat besonders bei den nur kurz bebrüteten Kulturen in Erscheinung. So trat bei der Verimpfung der 8 Stunden alten unbehandelten Kultur nach 13 Stunden der Tod der Versuchstiere ein, während die mit Trypsin behandelte Kultur erst nach 42 Stunden den Tod bewirkte.

Ein Wirkungsunterschied zwischen Kulturfiltrat und trypsinbehandeltem Kulturfiltrat war nicht offensichtlich.

Die Versuche mit Cl. botulinum Typ B. zeigten, dass die unbebrütete, mit der Aufschwemmung beimpfte Leberbrühe für Mäuse nicht toxisch war. Die 12 Stunden alte Kultur wurde reaktionslos von den Versuchstieren vertragen. Die mit 18 Stunden altem Kultur-material erzielten Ergebnisse sind abweichend und können nicht im Gesamtbild betrachtet werden. Die 24 Stunden alte Kultur rief nur bei einem Versuchstier vorübergehende Krankheitserscheinungen hervor. Bei den 2, 3 und 4 Tage alten Kulturen traten die ersten Krankheitserscheinungen 30 bis 40 Stunden und der Tod 45 bis 48 Stunden nach Applikation des Versuchsmaterials auf. Die Filtration des Kulturmaterials schwächte, ebenso wie bei Typ A die Toxizität ab.

Trypsinbehandelte Kultur wurde nach 12 Stunden Bebrütungszeit reaktionslos vertragen. Bei der 24 Stunden alten Kultur wurde der Trypsin-Effekt besonders deutlich. Während die mit Kulturmaterial geimpften Mäuse keine bzw. ein Tier erst nach 3 Tagen mässige Krankheitserscheinungen zeigte, rief die trypsinbehandelte Kultur bereits nach 19 Stunden schwere Botulismussymptome und nach 22 Stunden den Tod hervor. Bei der 2 Tage lang bebrüteten Kultur betrug die zeitliche Differenz zwischen dem Auftreten der schweren Krankheitssymptome, hervorgerufen durch die verschiedenen behandelten Kulturen, 14 Stunden.

Bei der Verimpfung der 3 und 4 Tage alten Kultur zeigten sich die ersten Krankheitserscheinungen bei den mit trypsinbehandelter Kultur geimpften Mäusen 33 bzw. 24 Stunden eher als bei den mit unbehandelter Kultur geimpften Tieren.

Bei den mit Trypsinlösung behandelten Kulturfiltraten zeigte sich die gleiche Verstärkung der Toxizität im Vergleich mit den unbehandelten Filtraten wie bei den Kulturen.

2) Versuchsreihe 2.

Da in Versuchsreihe 1 festgestellt werden konnte, dass die Filtration eine Toxizitätsabschwächung bewirkte, wurde in dieser Versuchsreihe nur mit unfiltriertem Kulturmateriel gearbeitet.

Die Versuche mit Cl. botulinum Typ A und Typ B, bei denen das Ausgangsmaterial für die Tierversuche mit Sporensuspensionen der beiden Stämme beimpft worden war, hatten im wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie die Versuche, bei denen das Ausgangsmaterial für die Impfung der Mäuse mit Keimsuspension beimpft worden war. Die lediglich mit Sporensuspension von Cl. botulinum Typ A und B geimpften Tiere zeigten während einer 12-tägigen Beobachtungszeit keine Krankheitserscheinungen.

Bei den Versuchen mit Typ A konnte gegenüber der Versuchsreihe 1 eine Verzögerung der Reaktionen bei den Versuchstieren verzeichnet werden. So traten nach Verabreichung der 24 Stunden alten Kultur erst nach 7 Stunden typische Botulismussymptome auf, während dies bei Versuchsreihe 1 bereits nach 4 1/2 Stunden der Fall war. Auch bei der Verabreichung trypsinbehandelter Kulturen war eine ähnliche Verzögerung der Reaktion der Versuchstiere, die auf der Verwendung von Sporenmaterial für die Ausgangskulturen und auf einer Abschwächung der Toxizität durch den Trypsinzusatz beruhte, gegenüber der Versuchsreihe 1 zu erkennen.

Die Verimpfung der mit Sporensuspension angesetzten Kulturen von Cl. botulinum Typ B zeigte sehr ähnliche Ergebnisse wie die entsprechenden Versuche der Versuchsreihe 1. Bei der 24 Stunden alten Kultur war bei den mit unbehandelter Kultur geimpften Tieren keine Reaktion festzustellen. Bei der 36 Stunden alten Kultur waren die Tiere nach 46 Stunden gestorben und bei der 48 Stunden alten Kultur trat der Tod nach 40 Stunden ein; bei Versuchsreihe 1 war dies nach 45 Stunden der Fall.

Die Gleichartigkeit der Toxizität der entsprechenden, mit verschiedenem Material beimpften Kulturen im Gegensatz zu Typ A ist aus den bei Typ B für die Toxinbildung notwendigen längeren Bebrütungszeit erklärbar. Die Behandlung der Kulturen mit Trypsinlösung hatte bei Typ B wieder den gleichen Erfolg wie in Versuchsreihe 1, nämlich eine deutliche Verstärkung der Toxizität des Impfmateri als. Die mit 24 Stunden alter Kultur geimpften Tiere zeigten am 6. Tag nach der Impfung nur einen aufgebogenen Rücken und leichte Lähmung der Hintergliedmassen. Die Tiere, denen 36 Stunden alte behandelte Kultur verabreicht wurden, waren nach 25 Stunden, also 21 Stunden eher als die mit unbehandelter Kultur geimpften Mäuse, tot. Die Tiere, der 48 Stunden lang bebrüteten und dann behandelten Kulturen waren nach 16 Stunden gestorben.

3) Versuchsreihe 3

Die in der Versuchsreihe 3 mit Cl. botulinum Typ B durchgeführten Untersuchungen sollten durch wesentlich schwächere Beimpfung der Leberbrühröhrchen den praktischen Verhältnissen der bakteriologischen Fleischuntersuchung nahe kommen.

Im Versuch mit der 24 Stunden alten Kultur wurde die Verstärkung der Toxizität der Leberbrühkultur durch die Trypsinanwendung am anschaulichsten verdeutlicht. Sowohl die mit 100-facher als auch die mit 10 000-facher Verdünnung beimpfte, unbehandelte Kultur rief bei den jeweiligen Versuchstieren keine bzw. nur unbedeutende Krankheiterscheinungen vor, während die mit trypsinbehandelten Kulturen geimpften

Mäuse nach 8 Stunden (100-fache Verdünnung) bzw. nach 50 Stunden (10 000-fache Verdünnung) starke Vergiftungserscheinungen zeigten und nach 20 Stunden bzw. 56 Stunden der Intoxikation erlagen.

Die Applikation der 48 Stunden alten Kulturen verursachte bei beiden Ausgangsverdünnungen nach 27 Stunden schwere Symptome und nach 33 Stunden den Tod, während der Trypsinzusatz nach 9 Stunden die Symptome und nach 19 Stunden den Tod bewirkten.

Besprechung der Ergebnisse und Schlussfolgerung

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren die der Literatur zu entnehmenden Untersuchungsergebnisse, wonach in Filtraten 12 Stunden alter Cl. botulinum-Kulturen durch Zusatz von Trypsin eine ungefähr 15-fache Verstärkung der Toxizität erzielt werden konnte und noch bessere Ergebnisse bei dem Filtrat einer 8 Stunden alten Kultur zu verzeichnen waren, während eine Verstärkung des Toxins von 96 Stunden alten Kulturfiltraten auf die gleiche Art nicht mehr möglich waren; diese alten Kulturfiltrate zeigten eher einen Toxizitätsverlust. Bei den in drei eigenen Versuchsreihen unter verschiedenen Voraussetzungen durchgeführten Untersuchungen konnte Folgendes festgestellt worden:

Die Toxizität einer jungen Cl. botulinum-Kultur, die durch diffuse Trübung und Gasbildung eine gute Keimvermehrung zu erkennen gibt, hängt vom Eiweisspaltungsvermögen des jeweiligen Stammes ab. Während eine 24 Stunden alte Kultur von Cl. botulinum Typ A (proteolytisch) innerhalb 7 Stunden bei den geimpften Versuchstieren zu charakteristischen Symptomen des Botulismus führte, vertrugen die Versuchstiere eine Kultur gleichen Alters von Cl. botulinum Typ B (nicht proteolytisch) reaktionslos. Der Zusatz von Trypsin zu der Kultur eines proteolytischen Clostridium botulinum Stammes bewirkt, auch bei jungen Kulturen, eine Abschwächung der Toxizität, während bei einem nicht proteolytischen Stamme eine wesentliche Steigerung der Toxizität hervorgerufen werden kann. Während bei der Verimpfung einer 12 Stunden alten Kultur von Cl. botulinum Typ A die mit Trypsin behandeltem Material geimpften -13-

Tiere nach 21 Stunden leichte Erscheinungen des Botulismus zeigten, die im Laufe von 18 Tagen wieder abklangen, waren bei Versuchstieren, die mit unbehandeltem Kulturmateriel geimpft wurden nach 21 Stunden typische Botulismussymptome ausgeprägt und nach 35 Stunden trat der Tod ein.

Bei der Verimpfung einer 36 Stunden alten Kultur von Cl. botulinum Typ B (nicht proteolytisch) waren Tiere, die mit trypsinbehandeltem Material geimpft wurden 25 Stunden nach der Applikation tot, während Tiere mit unbehandeltem Material geimpft 25 Stunden nach der Impfung noch ein ungestörtes Allgemeinbefinden zeigten.

Aus den Untersuchungen ergibt sich, dass innerhalb 48 Stunden, also im zeitlichen Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung, durch Verimpfung einer 24 Stunden alten unbehandelten Leberbrühkultur, in der Clostridien gewachsen sind, die Diagnose "Clostridium botulinum" nicht in jedem Falle gestellt werden kann. Da die Typen nicht von vornherein bekannt sind, muss auch mit den nicht proteolytischen Stämmen gerechnet werden, für die eine 24-Stündige Bebrütung der Kultur nicht ausreicht, um eine für den Tierversuch genügende Menge Toxins bereitzustellen. Während in den vorliegenden Versuchen ein Nachweis von Cl. botulinum Typ A möglich war, konnte ein negativer Nachweis von Clostridium botulinum das Vorliegen von Cl. botulinum Typ B nicht ausschliessen.

Eine Behandlung der Kulturen mit Trypsinlösung brachte jedoch bei Typ B eine so wesentliche Aktivierung des Toxins mit sich, dass bei einer 24 bis 36 Stunden alten Kultur nach 20 bis 25 Stunden mit Sicherheit die Diagnose "Clostridium botulinum" gestellt werden kann. Bei Typ A wurde durch den Trypsinzusatz zu den Kulturen jedoch eine Verminderung ihrer Toxizität festgestellt. Trotz dieser Abschwächung sind die entsprechenden Kulturen von Typ A jedoch noch so toxisch, dass die Zeit, in der die Versuchstiere auf ihre Applikation hin typische Botulismusercheinungen zeigen, bei dem trypsin-abgeschwächten Typ A immer noch kürzer ist als bei dem trypsin-aktivierten Typ B.

Die im Rahmen der vorgenommenen Untersuchungen mit Reinkulturen erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mit Hilfe der Trypsinbehandlung von Anaerobenkulturen bei der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung eine Diagnose "Clostridium botulinum nachgewiesen" mit Hilfe des Tierversuchs (weisse Maus) im Bereich der Möglichkeit liegt. Der gesamterforderliche Untersuchungszeitraum von rund 60 Stunden überschreitet damit um 12 Stunden die erfahrungsgemäss 48 Stunden dauernde Untersuchungszeit bei der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung. In Anbetracht der Schwere der Erkrankung und der hohen Letalitätsrate bei einer Intoxikation mit Cl. botulinum-Toxin

erscheint es vertretbar, im Falle eines Nachweises von Clostridien in der Muskulatur die Untersuchungszeit für die amtliche bakteriologische Fleischuntersuchung um 12 Stunden zu erhöhen, also auf rund drei Tage auszudehnen.

Die Ergebnisse sind darüber hinaus für die Untersuchung von Fleischerzeugnissen auf pathogene Keime, hier Cl. botulinum, von Interesse, da sie die Möglichkeit der Verkürzung der Untersuchungszeiten bieten.

Zusammenfassung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen hatten das Ziel, zu prüfen, ob es möglich ist, in kürzerer Zeit als bisher im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung und bei der Untersuchung von Fleischerzeugnissen beim Nachweis von Clostridien die Diagnose "Clostridium botulinum" zu stellen.

Nach eingehender Literaturlauswertung wurde durch Versuche mit Cl. botulinum festgestellt, dass 24 Stunden alte Kulturen eines proteolytischen Cl. botulinum-Typ-A Stammes bei weissen Mäusen bereits nach 7 Stunden typische Botulismuserscheinungen hervorriefen. Gleichaltrige Kulturen eines nicht proteolytischen Cl. botulinum-Typ-B-Stammes erzeugten jedoch bei den Versuchstieren nur leichte oder

220

gar keine Krankheitssymptome.

Durch die Behandlung der Kulturen mit Trypsin wurde zwar die Toxizität der Typ-A-Kulturen abgeschwächt, die der Typ-B - Kulturen jedoch so weit aktiviert, dass bei Verabreichung einer 24 bis 36 Stunden alten Typ-B-Kultur innerhalb von 20 bis 25 Stunden die typischen Krankheiterscheinungen bei den Versuchstieren auftraten. Die Abschwächung der Toxizität der Kulturen von Typ A war allerdings nicht so stark, dass auf ihre Verimpfung hin keine Botulismussymptome bei den Versuchstieren mehr aufgetreten wären. Die Zeit, in der die Versuchstiere auf die Applikation der Typ-A-Kulturen hin typische Botulismuserscheinungen zeigten, war trotz der Abschwächung der Toxizität durch Trypsin sogar noch kürzer als bei Typ B.

Die Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen mittels einer Trypsinbehandlung der in der Leberbrühe gewachsenen und 24 bis 36 Stunden bebrüteten Clostridienkultur, die durch diffuse Trübung des Nährmediums und Gasbildung eine gute Keimvermehrung zu erkennen gibt, eine Diagnose Clostridium botulinum innerhalb von etwa 60 Stunden im Bereich der Möglichkeit liegt.

Literaturverzeichnis

1. Anderton, J.J.: Pathogenic Organismus in Relation to Pasteurized Cured Meats. Scientific and Technical Surveys, Nr. 40 (1963)
2. Angelotti, R.: Detection of Microbial Pathogens in Foods. Microbiological Quality of Foods: Herausgeg. v. Slanetz, Chichester, Ganfin, Ordal, Academic Press, New York, London 1961.
3. Animal Health Yearbook: FAO - WHO - OIE 1963
Food and Agricultural Organization World Health Organization.
4. Bäumer, J.: Beschleunigung der Abtötung von Sporen des Cl. tetani und Cl. botulinum durch Kochen unter Zusatz von Korsyl-Bacillol, Sporil bzw. Zephirol. Med. vet. Diss. Gießen 1956
5. Bartels, H., Hadlok, R., F. Käferstein: Die Bedeutung der Trennung von Schlachträumen und Fleischbearbeitungsräumen. Fleischwirtschaft 44, 1203 (1964)
6. Behringwerke AG, Marburg/L.: Botulismus-Serum Behringwerke
Gebrauchsanweisung zu Botulismus-Serum Behringwerke, Originalpackung.
7. Bell, Frederick, J., Farrell, Keith, R., J. Gorham: Ein polyvalentes Toxoid gegen den Botulismus der Nerze. Amer. J. Vet. Res. 18, 167 (1957)
8. Bellinger, H., Körnlein, M., A. Lembke: Das Verhalten des Toxins von Clostridium botulinum und Salmonella enteritidis gegenüber Chemotherapeutica, Antibiotica und Farbstoffen. Zbl. Bakt. Orig. 156, 430 (1950-51)
9. Berger, U. und K. Hummel: Einführung in die Mikrobiologie und Immunologie unter besonderer Berücksichtigung der Mundhöhle. Verlag Urban und Schwarzenberg, München Berlin. 2. Aufl., 1964

10. Bitter, .: Über Botulismus. Münch. med. Wschr. 66, 1455 (1919)
11. Bohrer, C.W.: Microbial Spoilage of Canned Foods. Microbiological Quality of Foods Herausgeg. v. Slanez, Chichester, Ganfin, Ordal, Academic Press, New York, London 1963 S. 199.
12. Bonventre, P.F., L.L. Kempe: Toxicity Enhancement of Cl. bot. Type A and B. Culture Filtrates by Proteolytic Enzymes. J. Bact. 78, 892 (1959)
13. Bonventre, P. und Kempe, L.: Physiology of Toxinproduction by Clostridium botulinum Types A and B. I) Growth, Autolysis and Toxin Production. J. Bact. 79, 18 (1960)
14. Bonventre, P., Kempe, L.: Physiology of Toxin Production by Clostridium botulinum Typ. A u. B. IV) Activation of the Toxin. J. Bact. 79, 24 (1960)
15. Boroff, D.A.: Untersuchungen über Toxine des Clostridium botulinum. III) Beziehungen der Autolyse zur Toxinbildung. J. Bact. 70, 363 (1955)
16. Bowers, L.E. und O.B. Williams: Effect of Arginine on Growth and Lysis of Clostridium botulinum. J. Bact. 85, 1175 (1963)
17. Bowmer, E.J.: Preparation and Assay of the International Standards for Cl. botulinum Types A, B, C, D and E Antitoxins. Bull. World Health Org. 29, 701 (1963)
18. Breed, R., Murray, E., A. Hitchens: Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 6. Aufl. The Williams and Wilkins Company 1948, Baltimore.
19. Breed, R., Murray, E., N. Smith: BERGEYs Manual of Determinative Bacteriology. 7. Aufl. The Williams and Wilkins Company 1957, Baltimore.
20. International BULLETIN of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy. Official Organ of the judicia commission and of the international committee of bacteriological nomenclature. Iowa State college press, press Building Iowa State College, Ames, Iowa, USA 6-8, (7), 121, 1956-58 (1957)

21. Bundesgesundheitsblatt: "Botulismus". Bundesgesundheitsblatt 3, Nr. 20 vom 23.9.1960.
22. Bundesgesundheitsblatt: "Botulismus in den USA" Bundesgesundheitsblatt 6, Nr. 23 vom 15.11.1963
23. Bundesgesundheitsblatt: "Botulismus in den USA im Jahre 1963" Bundesgesundheitsblatt 7, Nr. 3, 43 (1964)
24. Bundesseuchengesetz: Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung übertragbarer Krankheiten beim Menschen. Bundesseuchengesetz vom 18. Juli 1961 (BGBl. I S. 1012, ber. am 9.8.1961, BGBl. I S. 1300 mit Änderung durch Ändg. vom 23.1.1963, BGBl. I, S. 57).
25. Buss, W.: Eine Übersicht über die Ergebnisse der bakteriologischen Fleischuntersuchung aus den Jahren 1948-1951. Lebensmitteltierarzt 3, 34 (1952)
26. Coretti, K.: Der Keimgehalt von Gewürzen. Fleischwirtschaft 7, 305 (1955)
27. Dack, G.M.: "Problems of Foodborne Diseases", aus Microbiological Quality of Foods. Herausgeg. v. Slanez, Chichester, Ganfin, Ordal, Academic Press, New York, London 1963 S. 42/43.
28. Dehmel, H.: Über Botulismus-Impfstoff. Arch. exper. Veterinärmedizin, 14, 576 (1960)
29. Dinter, Z.: Zur Differenzierung von Anaerobierinfektionen. Z. Fleisch- Milchhyg. 53, 120 (1943)
30. Dolman, C.E., Tomsich, M., Campbell, C. C. R., W.B. Laing: Fish Eggs as a Cause of Human Botulism. J. Infect. Diseases 106, 19 (1960)
31. Dräger, K., Schindler, R., Vocke, G.: Immunisierungsversuche gegen Staupe und Botulismus an Nerzen. Tierärztl. Umschau 12, 136 (1957)
32. Evans, F., R. Curran: Influence of preheating, pH, and holding temperature upon viability of bacterial spores for long periods in butter substrates. J. Bact. 79, 361 (1960)
33. Farleigh, E.A.: Botulismus bei Wildvögeln. Vet. Bull. 21, 353 (1951)

34. Fey, H.: Ein neuer Anaerobentopf. Zbl. Bakt., Orig., I
193, 114 (1964)
35. Fortner, J.: Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung
strenger Anaerobier (anaerobe Bazillen, -filtrierbare
anaerobe Bakterien, Spirochaeta pallida). Zbl. Bakt. Orig. I
108, 155 (1928)
36. Foter, M.J.: Microbiological Quality of Foods. Herausgeg.
v. Slanez, Chichester, Ganfin, Ordal, Academic Press, New
York, London 1963 S. 94
37. Frazier, W.C.: "Food Microbiology" Mac Fraw Hill Book
Company INC, New York, Toronto, London, 1958.
38. Gordon, Fiock, Yarinsky, Duff: Studies on Immunity to Toxins
of Clostridium botulinum. III. Preparation, purification
and detoxification of type E toxin. J. Bact. 74, 533 (1957)
39. Greenberg, R.A., Sillicker, J.H., Nauk, W.K., C.F. Schmidt:
Toxin Production and Organoleptic Breakdown in Vacuum-
packaged Fresh Meats Inoculated with Clostridium botulinum.
Food Res. 23, 656 (1958)
40. Grewing, J., Dolman, C., D. Arnott: Purification and
Activation of Cl. botulinum Type E Toxin. J. Bact.
81, 819 (1961)
41. Grewing, J., Dolman, C., D. Arnott: Activation Phenomenon
of Clostridium botulinum Type E Toxin. J. Bact. 84,
302 (1962)
42. Grewing, J., Dolman, C., H. Brains: Isolation and
characterisation of a Toxic Moiety of a Low Molecular Weight
from Cl. botulinum Type A. J. Bact. 89, 1383 (1965)
43. Grewing, J., Dolman, C., A. Ko: Mechanism of Tryptic
Activation of Cl. botulinum, Type E Toxin. J. Bact. 89,
1176 (1965)
44. Grumbach, A. und W. Kikuth: Die Infektionskrankheiten des
Menschen und ihre Erreger. Verlag Georg Thieme, Stuttgart,
Bd. II S. 973 (1958)
45. Grunwald, E.: Untersuchungen zum Nachweis von Clostridium
botulinum im Rahmen der Fleischhygiene. Med. Vet. Diss.
Gießen 1967

46. Guthof, O.: Anaerobier-Züchtung im Vakuum-Plattenverfahren. Zbl. Bakt. 161, 298 (1954)
47. Hadlok, R.: Bakteriologische Untersuchungen von Roh- und Fertigerzeugnis bei der Konservenherstellung. Fleischwirtschaft 12, 1035 (1960)
48. Hakioglu, F.: Darmentzündung bei Botulismus des Rindes. Dtsch. tierärztl. Wschr. 64, 421 (1957)
49. Hall, J.C.: The Occurrence of Bacillus botulinus, Types A and B, in Accidental Wounds. J. Bact. 50, 213 (1945)
50. Halliwell, G.: The Action of Proteolytic Enzymes on Clostridium botulinum Type A Toxin. Biochemical Journal 58, 4 (1954)
51. Hallmann, L.: Bacteriologie und Serologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Aufl. S. 290 ff. (1950)
52. Hampson, C.R.: A Case of Probable Botulism Due to Wound Infection. J. Bact. 61, 647 (1951)
53. Hartwigk, H., P. Tzimas: Die Züchtung von Anaerobiern auf Traubenzuckerblutagar mit "Anoxydator"-Scheiben. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 70, 537 (1963)
54. Haupt, H.: Medizinisch bakteriologische Diagnostik für Ärzte und Tierärzte. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1964
55. Hepp, L.: Zur Frage des Anaerobennachweises bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Zbl. Vet. med. 3, 88 (1956)
56. Hohenstatt, H.: Zur Gewinnung der Innereien von Rindern. Med. Vet. Diss. München 1962.
57. Holzer, E.: Botulismus durch Inhalation. Med. Klinik 57, 1735 (1962)
58. Hübener: Bakterielle Nahrungsmittelvergiftungen. aus: Handbuch d. Inneren Medizin, herausgeg. v. Bergmann u. Staehelin. Springer Verlag Berlin. Band IV, Teil 2, S. 1915 (1927).
59. Hutyra, Marek, Manninger, Moczy: Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. G. Fischer-Verlag, Jena, 1954, II, S. 751 (1954)
60. Jawetz, E., Melnick, J.L., E.A. Adelberg: Medizinische Mikrobiologie. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1963.

61. Johannsen, A.: Botulismus bei einem Menschen mit tödlichem Verlauf. Nord. vet. med. 14, 780 (1962)
62. Johannsen, A.: Botulismus und Fischwaren. Die Feinkostwirtschaft 5, 25 (1964)
63. Kamphans, S.: Über das Verhalten der Sporen obligat anaerober Bazillen (Bombageerreger bei Fleischkonserven) unter dem Einfluß der Temperaturen von 100-110°C. Med. vet. Diss. Hannover 1956.
64. Kaufman, L., R.H. Weaver: Rapid Methods for the Identification of Clostridia. J. Bact. 79, 119 (1960)
65. Kaufman, L., R.H. Weaver: Use of Neutral red Fluorescence for the Identification of Colonies of Clostridia. J. Bact. 79, 292 (1960)
66. Kawabata u. Sakaguchi: The problem of Type E Botulism in Japan. aus Microbiological Quality of Foods. Herausgeg. v. Slanez, Chichester, Ganfin, Ordal. Academic Press, New York, London 1963, S. 71/72.
67. Kelch, F.: Über den Nachweis anaerober Bazillen in einem flüssigen Nährsubstrat. Arch. Lebensmittelhyg. 6, 263 (1955)
68. Kelch, F.: Ein neuer Nährboden für die Züchtung obligat anaerober Bazillen. Arch. Lebensmittelhyg. 7, 127 (1956)
69. Kelch, F.: Über den Nachweis von Anaerobiern bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Arch. Lebensmittelhyg. 7, 25 (1956)
70. Kelch, F.: Differenzierung von Clostridien aus Fleischkonserven. Zbl. Veterinärmedizin 4, 721 (1957)
71. Kelch, F.: Neue Erkenntnisse und Probleme der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 11, 354 (1959)
72. Kelch, F. und R. Hadlok: Untersuchungsmethodik für Fleischkonserven. Fleischwirtschaft 12, 157 (1960)
73. Keller, H.: Die Hauptursache der Keimhaltigkeit des Schlachtblutes und des Fleisches gesunder Schlachttiere. Fleischwirtschaft 22, 39 (1942)

74. Keller, H.: Noch einmal - zur Feststellung von Anaerobiern bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70, 216 (1957)
75. Keller, Buss, Raschke: Zur Prüfung auf obligate Anaerobier bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Arch. Lebensmittelhyg. 6, 166 (1955)
76. Kempe, L.L. und J.T. Graikoski: Metals for Food Containers: The Electromotive Series and Clostr. botulinum. Food Techn. 18, 102 (1964)
77. Kietzmann, U.: Beobachtungen beim Tierversuch zum Nachweis von Botulinus-Toxin. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70, 366 (1957)
78. Kiyoshi Tsuji, W.E. Perkins: Sporulation of Cl. botulinum. I. Selection of an aparticulate sporulation medium. J. Bact. 84, 81 (1962)
79. Kley, M.: Infektionsversuche mit Clostridium botulinum. (Cl. parobotulinum Typ B-Bengtson 1924). Med. vet. Diss. München 1962.
80. Kolle-Hetsch (Schloßberger): Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten. 11. Aufl., Urban und Schwarzenberg 1952, S. 336 ff.
81. Korkhaus: Referat über Dinter, Z., Kull, K.E.: Einiges über den Botulismus beim Nerz. Vet. Med. 8, 360 (1955)
82. Lamanna, C.: The Most Poisonous Poison. Science 130, 763 (1959)
83. Lamanna, C., Jensen, W.T., J. Bross: Körpergewicht als Faktor bei der Reaktion von Mäusen auf die Botulinustoxine. Am. J. Hyg. 62, 29 (1955)
84. Lamanna, C., Meyer, C.E.: Influence of Ingested Foods on the Oral Toxicity in Mice of Crystalline Botulin Type A-Toxin. J. Bact. 79, 406 (1960)
85. Leistner, L.: Anaerobe Gelatinekeimzählung. Fleischwirtschaft 7, 725 (1955)

86. Leistner, L.: Ein einfaches Verfahren zur Zählung und Züchtung von Anaeroben. Fleischwirtschaft 7, 109 (1955)
87. Leistner, L.: Die Anaeroben im Fleisch verarbeitenden Betrieb. Fleischwirtschaft 8, 255 (1956)
88. Leistner, L.: Persönliche Mitteilungen
89. Lemetayer, E., Nicol, L., Girard, O., Corvazier, R., M. Cheyroux: Untersuchungen über den experimentellen Botulismus beim Pferd. Bull. l'Acad. vét. 26, 391 (1953)
90. Lerche, M.: Bombagen in Dosenfleischwaren. Fleischwirtschaft 21, Nr. 18 (1941)
91. Lerche, M., Bartels, H., F. Kelch: (Schroeter/Hellich): Das Fleischbeschaugesetz. Paul Parey, Berlin und Hamburg, 7. Aufl. 1960.
92. Lerche-Goerttler-Rievel: Lehrbuch der Tierärztlichen Lebensmittelüberwachung. Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 3. Aufl. 1957.
93. Lorenzen, P., H. Gemmer: Bakteriologische Untersuchungsergebnisse von Fleisch und Wurstkonserven und deren Auswertung für die Beurteilung. Arch. Lebensmittelhyg. 12, 97 (1961)
94. Lubertino, J.: Clostridium botulinum Type A found in food preserved in curing Brine. aus The Microbiology of Fish and Meat Curing Brines. - Proceedings of the second international symposium on food microbiology, 1957. London, Her Majesty's Office, 1958, S. 283.
95. Mager, J., Kindler, S.H., N.G. Rossowicz: Nutritional Studies with Cl. parobotulinum Type A. J. Gen. Microbiol. 10, 130 (1954)
96. Mager, J., Kindler, S.H., N. Grossowicz: Toxin Production by Cl. parobot. Type A. J. Gen. Microbiol. 15, 394 (1956)
97. Magoley, Josef: Biochemische Reaktionen an Überständen von Hitchens Agar, auf dem anaerobe Bakterien gewachsen waren. Med. vet. Diss. Gießen 1961
98. Martin, Lieselotte: Vorkommen obligater Anaerobier im Fleisch von Schlachttieren und Wege zur Feststellung. Med. Vet. Diss. Hannover 1959

99. Mc Clung, L.S., R. Roabe: Die Eigelb-Plattenreaktion für die Wahrscheinlichkeitsdiagnose von *Cl. sporogenes* und gewisse Spezies der Gangraen- und Botulinusgruppe. J. Bact. 53, 139 (1947)
100. Mc Kee, M.T., Bell, J.F., H. Hoyer: Cultures of *Clostridium botulinum* Type C with Controlled pH. J. Bact. 75, 135 (1958)
101. Meyer, K.F.: "Botulismus". aus Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. G. Fischer Verlag, Jena, 3. Aufl. IV, 2, 1269 (1928)
102. Meyer, K.F.: The Status of Botulism as a World Health Problem. Bull. World Health Organisation. 15, 281 (1956)
103. Meyer, E.A., Lamanna, C.: Activity of type A Botulinal Toxin and Hemmagglutinin Exposed to Protolytic Enzyme. J. Bact. 78, 175 (1959)
104. Meyn, A., R. Vierling: Über die Stabilisierung des Botulintoxins. Zbl. Bakt. I, Orig. 183, 167 (1961)
105. Michalka, J.: Zur Pathogenese der bakteriellen Lebensmittelvergiftungen. Wiener Tierärztl. Mschr. 34, 249 (1947)
106. Moeller, J.: Zur Behandlung des Botulismus. Deutsche Med. Wschr. 74, 1538 (1949)
107. Moschell, J.: Ein Beitrag zur Bestimmung obligater Anaeroben in Fleisch und Fleischwaren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 71, 29 (1958)
108. Mossel, A.A., B. Krol: Die selektive Zählung von proteolytischen Clostridien in Lebensmitteln mit Hilfe der Drei-Schicht-Platte nach Leistner. Arch. Lebensmittelhyg. 7, 193 (1956)
109. Müggenburg, H.: Verderbnisgefahren durch Zusatzstoffe. Jahresbericht 1956 der Bundesanstalt für Fleischforschung S. 58
110. Müller, R.: Medizinische Mikrobiologie. Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1950, 4. Aufl., S. 306.
111. Nicodemusz, J., Csaba, K., L. Ormay: Über einen mit Laboratoriumsmethoden verifizierten Botulismus-Fall. Zbl. Bakt., Ref. 183, 205 (1962)
112. Nicodemusz, J., I. Felix: Über das Vorkommen von Clostridien in Lebensmittelprodukten und ihre Rolle bei Lebensmittelschädigungen. Zbl. Bakt., I. Orig., 177, 403 (1960)

113. Nörr: Referat über Bianchi, E.: Botulismus bei Rindern in Italien. La Clin. vet. 73, 120 (1950) in Vet. Med. 3, 221 (1950)
114. Ostertag, R.: Handbuch der Fleischbeschau. 2. Aufl. 1959, Verlag F. Enke, Stuttgart
115. Ott, H.: Eine vereinfachte Methode zur Kultivierung anaerober Mikroorganismen mit dem Symbiose-Verfahren nach Fortner. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 73, 451 (1960)
116. Pedersen, H.O.: Botulisme. Nord. Vet. Med. 5, 700 (1953)
117. Pedersen, H.O.: The Survival of Clostridium botulinum in Curing Brines. aus The Microbiology of Fish and Meat Curing Brines. - Proceedings of the second international symposium on food microbiology. London, Her Majesty's Stationary Office 1958, S. 289
118. Pelczar, M.J., Reid, R.D.: Microbiology. McGraw-Hill Book Company, INC, New York, Toronto, London 1958, S. 353 ff.
119. Perkins, W., K. Tsuji: Sporulation of Clostridium botulinum. II. Effect of Arginine and its degradation products on sporulation in a synthetic medium. J. Bact. 84, 86 (1962)
120. Polson, A., M. Sterne: Production of Potent Botulinum Toxins and Formol-Toxoids. Nature 158, 238 (1946)
121. Prevot, A.-R.: Recherches sur la toxine, l'anatoxine et l'antitoxine de Cl. botulinum D. Bull. l'Acad. Vét. 21, 390 (1948)
122. Prevot, A.-R.: Manuel de Classification et de Determination des Bactéries Anaerobies. 3. Ausgabe. Masson et Cie., Paris, 1957
123. Prevot, A.-R., E.R. Brygoo: Nouvelles recherches sur le botulisme et ses cinq types toxiques. Annales de l'Institut Pasteur 85, 544 (1953)
124. Puschner, J.: Untersuchungszahlen und Ergebnisse der Bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle am Schlachthof München für die Jahre 1962 bis 1964. Die Fleischwirtschaft 45, 1459 (1965)

125. Pulat, H.: Beitrag zum Anaerobennachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Med. Vet. Diss. Gießen 1956
126. Raschke, E.: Zur Differenzierung der anaerob wachsenden Sporenbildner bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 63, 189 (1956)
127. Reploh, H., H.J. Otte: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie und Infektionskrankheiten. G. Fischer Verlag Stuttgart 1961, S. 271
128. Reuter, H., J. Trukenbrod: Welche Keimgruppen kommen im Kniekehllymphknoten frisch erschlachteter und tauglich beurteilter Rinderhinterviertel vor? Fleischwirtschaft 16, 310 (1964)
129. Riemann, H.: Anaerobe toxins. Publication Nr. 38. Danish Meat Research Institute.
130. Rolle, M.: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. Ferd. Enke Verl., Stuttgart 1958, 2. Aufl., S. 243.
131. Roots, E.: Die Begünstigung des Anaerobenwachstums durch Hinzufügen von Leberbestandteilen zum Zeißlerschen Blutnährboden. Zbl. Bakt., I, Orig. 149, 251 (1943)
132. Rossi, P., J. Berujon: Botulismus bei Enten und seine Behandlung. Bull. L'Acad. Vét. 23, 365 (1950)
133. Salle, A.J.: Fundamental principles of Bacteriology. McGraw-Hill Book Company, 5. Aufl., 1961, S. 712
134. Scheibner, G.: Der Einfluß von Ultraschallwellen auf das Botulinustoxin. Tierärztl. Umschau, 10, 364 (1955)
135. Scheid, G.: Schinken und Rauchfleisch als Infektionsquelle für Botulismus. Med. Mschr. 2, 312 (1948)
136. Schellner: Referat über Özgen, H., Özcan, C.: Eine Botulismusepidemie bei Rindern in der Türkei. Vet. Med. 8, 360 (1955)
137. Schneider, M.D., Grexz, N., A. Anellis: Sporulation of Clostridium bot. Types A, B and E, Cl. perfr. and putrefactive Anaerobe 3679 in Dialysis Saes. J. Bact. 85, 126 (1963)

138. Wundram-Schönberg: Tierärztliche Lebensmittelüberwachung. Paul Parey in Berlin und Hamburg, 6. Aufl. 1953.
139. Schoop, G.: Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ C bei Rindern. Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 71 (1961)
140. Schoop, G.: Untersuchungen über den Botulismus des Nerzes. Dtsch. tierärztl. Wschr. 61, 228 (1954)
141. Schulte: Reifungsfehler bei Rohwurst (Fachfrage). Fleischwirtschaft 13, 327 (1961)
142. Schulze: Referat über Scheibner, G.: Untersuchungen über die Empfänglichkeit des Nerzes für die Botulinustoxine Typen A bis D und die Toxinbildung im Nerzfutter. Vet. Med. 8, 361 (1955)
143. Seidel, G.: Zur Beweglichkeitsprüfung von Anaerobiern. Monatshefte Veterinärmed. 10, 325 (1955)
144. Seitz, W.: Botulismus. Dtsch. Med. Wschr. 83, 2344 (1958)
145. Shvedov, L.M.: Observations on the Formation of a Toxin in the Digestive Tract of Animals Infected Orally with a Type A Strain of *Clostr. botulinum*. J. Microb. Epid. Immunol. 31 (I), 126 (1960)
146. Skulberg, A.: Durch *Clostr. bot.* Typ E bei Nerzen verursachter Botulismus. Zbl. Bakt. I. Ref. 183, 206 (1962)
147. Slocum, G.G.: Problems from the Federal Regulatory Standpoint. aus: Microbiological Quality of Foods. Herausgeg. v. Slanez, Chichester, Ganfin, Ordal. Academic Press, New York, London, 1963.
148. Smith, L.: *Cl. perfringens* Food Poisoning. aus: Microbiol. Quality of Foods. Herausgeg. v. Slanetz, Chichester, Ganfin, Ordal. Acad. Press, New York, London 1963.
149. Society of American Bacteriologists: Manuell of Microbiology. Microbiological Methods. McGraw Hill Book Company INC, New York, Toronto, London, 1957.
150. Standfuss, R.: Bakteriologische Fleischschau. Verlagsbuchhandlung R. Schoetz, Berlin, 4. Aufl., 1952, S. 89.

151. Takagi, Kawata, Yamamoto: Electron microscope Studies of Ultrathin Sections of Spores of the Clostridium Group, with Special Reference to the Sporulation and Germination Process. J. Bact. 80, 37 (1960)
152. Thier, H.: Untersuchungen über den Keimgehalt des Schlacht-tierblutes und seine Ursachen. Med. vet. Diss. Gießen 1941
153. Verge, J., Ch. Poggioli: Ein Herd von Pferdebotulismus im Departement Oise. Bull. L'Acad. Vét. 24, 509 (1951)
154. Vierling, R.: Der Einfluß verschiedener Antibiotika auf Morphologie und Toxinbildung von Clostridium botulinum Typ A. Zbl. Bakt. I Orig. 185, 195 (1962)
155. Walz, E.: Ein eindrucksvolles Beispiel von Verkeimung (Bacillen und Schimmelpilzbehaftung) in der Fleischwirt-schaft verwendeter Gewürze. Arch. Lebensmittelhyg. 7, 138 (1956)
156. Weiser, Harry, H.: Practical Food Microbiology and Tech-nicology. The AVI Publishing Company, Westport, Connecticut (1962), S. 305.
157. Wilson, G.S. and Miles, A.A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Edward Anold (Publishers) LTD, London, 4. Aufl., 1961
158. Winkle, S.: Mikrobiologische und serologische Diagnostik. G. Fischer Verl., Stuttgart, 2. Aufl., 1955, S. 99
159. Zaun, W.: Lebensmittelvergiftungen und andere Intoxi-kationen durch das Clostridium botulinum. Kasuistik für die Jahre 1935-1950. Med. Vet. Diss. Gießen 1951
160. Zeissler, M.: Die Diagnostik der anaeroben Sporenbildner. Zbl. Bakt., I Orig. Beiheft zu 89, 117 (1923)
161. Zeissler, J.: Anaerobenzüchtung. aus: Handbuch der Patho-genen Mikroorganismen von Kolle, Kraus, Uhlenhuth. Fischer und Schwarzenberg, Berlin, Jena 1930, Band X, S. 35
162. Zeller, M.: Zur Frage des Anaerobiernachweises bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Arch. Lebensmittel-hyg. 6, 146 (1955)

163. Zeller, M.: Ein Beitrag zur Botulismusdiagnose. Arch. Lebensmittelhyg. 10, 265 (1959)
164. Zeller, M.: Eine einfache Methode zum Nachweis von Botulinustoxin und Bazillen. Arch. Lebensmittelhyg. 15, 84 (1964)
165. Zinsser, H.: Microbiology. Herausgeg. von Smith und Conant. Appleton-Century-Crofts, INC New York 1960, 12. Aufl..