



# Alimentárny botulizmus - naše skúsenosti s laboratórnou diagnostikou

**Strhársky, J.<sup>1</sup>, Maďarová, L.<sup>1</sup>, Dorner, M.<sup>2,3</sup>, Dorner, B.<sup>2,3</sup>, Fatkulinová, M.<sup>1</sup>, Avdičová, M.<sup>1</sup>, Sedliačiková, I.<sup>1</sup>, Klement, C.<sup>1,4</sup>, Donáth, V.<sup>5</sup>**

*<sup>1</sup> Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Oddelenie lekárskej mikrobiológie, Banská Bystrica, Slovenská republika*

*<sup>2</sup> Robert Koch Institute, Biological Toxins / Consultant Laboratory for Clostridium botulinum, Berlín, Nemecko*

*<sup>3</sup> Robert Koch Institute, Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Berlín, Nemecko*

*<sup>4</sup> Slovenská zdravotnícka univerzita, Fakulta verejného zdravotníctva, Bratislava, Slovenská republika*

*<sup>5</sup> Fakultná nemocnica F. D. Roosevelta, Oddelenie neurológie, Slovenská zdravotnícka univerzita, Banská Bystrica, Slovenská republika*

# Cieľ prezentácie

Cieľom predloženej prezentácie je snaha upriamiť pozornosť na diagnostiku tak ojedinelého ochorenia akým je alimentárny botulizmus. Ďalším z cieľov je upozorniť na nevyhnutnosť zlepšenia diagnostických postupov a najmä ich zjednotenia v rámci Slovenskej republiky v suspektných prípadoch botulizmu.



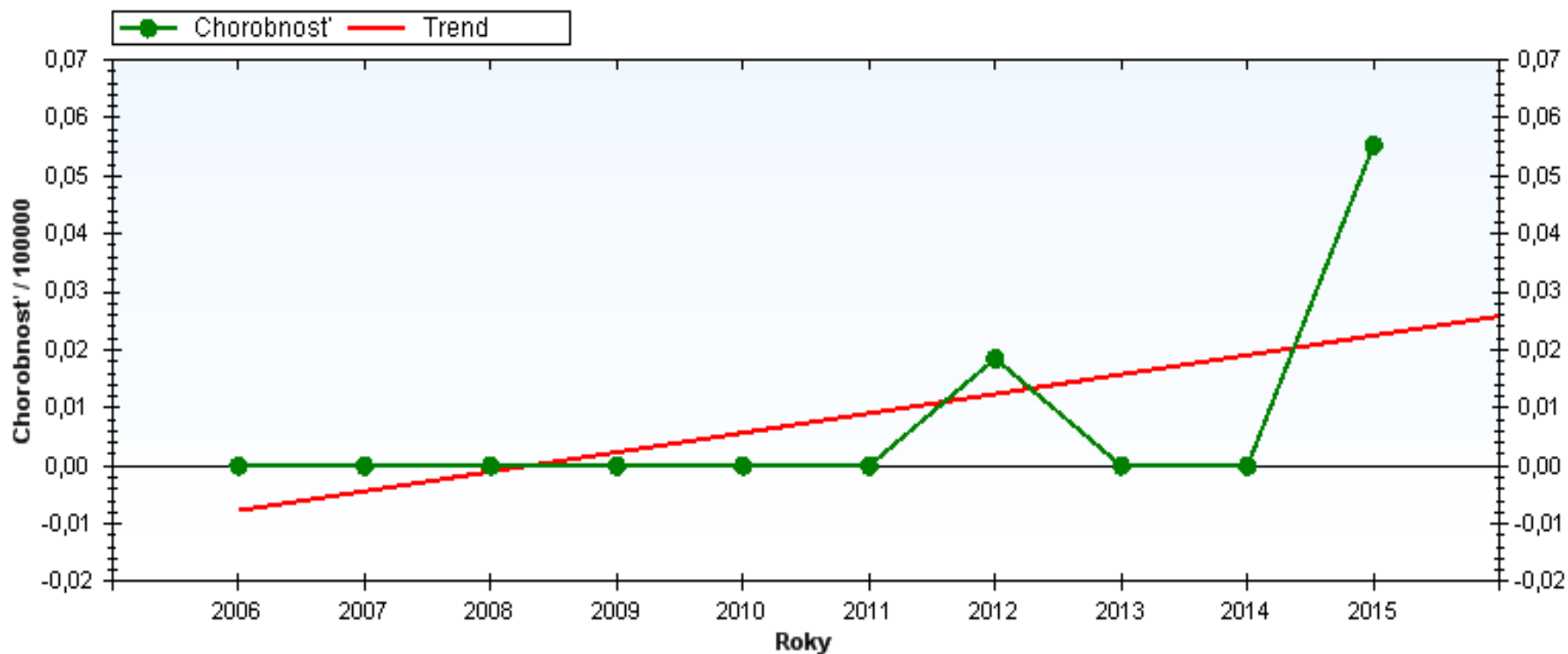
# *Clostridium botulinum*

- baktérie *Clostridium botulinum* sú grampozitívne striktné anaeróby tvoriace spóry
- rozdelené do skupín I. – IV. podľa typov toxínov, ktoré produkujú
- pre človeka predstavujú najväčšie riziko kmene zaradené do skupín I. (proteolytické) a II. (**neproteolytické**), nakoľko len u nich bola zaznamenaná **produkcia toxínov typov A, B, E a F** asociovaných s potravinovými otravami
- optimálna rastová teplota proteolytických kmeňov *C. botulinum* zaradených do skupiny I. je medzi 35 – 40°C
- teplotné optimum neproteolytických kmeňov zo skupiny II. je o niečo nižšie, konkrétne 28 – 30°C; **minimálna rastová teplota** proteolytických kmeňov bola stanovená na 10 – 12°C, u **neproteolytických kmeňov na 3,3°C!!!**

# Botulizmus

- je paralytické život ohrozujúce ochorenie spôsobené neurotoxínmi produkovanými *Clostridium botulinum* skupín I–IV, *C. baratii* a *C. butyricum*
- skoré stanovenie diagnózy závisí najmä na klinickom obraze ochorenia no laboratórny dôkaz a došetrenie epidemiologických súvislostí sú taktiež nevyhnutnosťou na potvrdenie diagnózy u suspektných prípadov
- existuje veľmi vysoká variabilita v rámci klinických prejavov ochorení, rôzna závažnosť klinického priebehu v závislosti od požitého množstva botulínového toxínu
- najzávažnejšie prípady si vyžadujú dlhodobú hospitalizáciu ako aj umelú pľúcnu ventiláciu (nie zriedka aj niekoľko mesiacov), náš pacient 1196 hod./ - cca 50 dní

## (A05.1) Incidencia botulizmu / Slovenská republika, 10 rokov



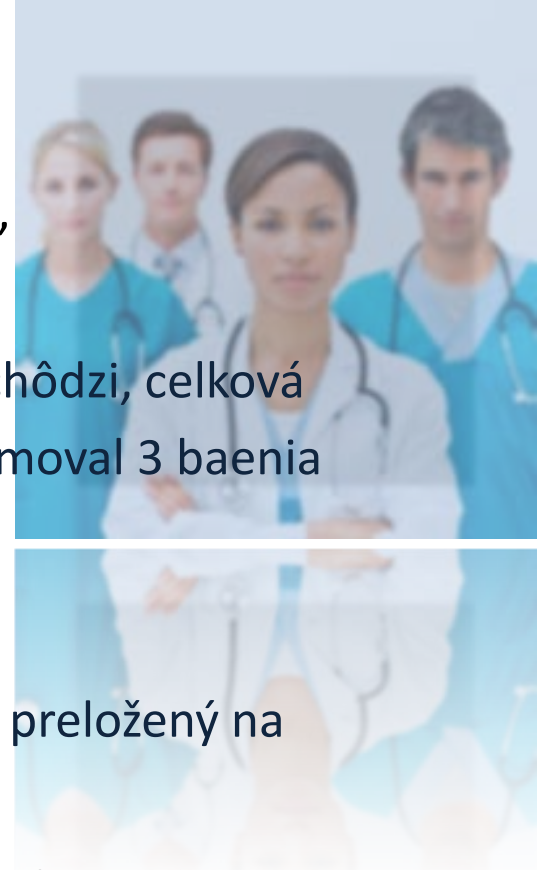
Zdroj údajov: EPIS, © ÚVZ SR

Zdroj údajov: [www.epis.sk](http://www.epis.sk)

2012 – 1 prípad Žilinský kraj  
2015 – 3 prípady, 2 x Žilinský kraj, **1 x Banská Bystrica**

# Klinické šetrenie

- **12.08.2015:** 42-ročný muž prijatý na oddelenie neurológie, Fakultná nemocnica F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici
- príznaky: nauzea, zvracanie, dvojité videnie, problémy pri chôdzi, celková malátnosť, závraty, ťažkosti s prehĺtaním (uviedol, že skonzumoval 3 baenia cicerovej nátierky na večeru
- vyslovené podozrenie na alimentárny botulizmus
- nasledujúci deň bol pacient v dôsledku upadnutia do kómy preložený na oddelenie JIS
- liečba pozostávala najmä z podpory dýchania a intravenózneho podania polyvalentného antobotulínového séra
- nanešťastie vzorky séra a stolice neboli odobraté
- odobratý výplach žalúdka: 48 hodín po objavení sa príznakov ochorenia, týždeň uskladnený pri teplote 4°C (pokus na myšiach bol negatívny) Státní zdravotní ústav Ostrava



# Epidemiologické šetrenie

- **13.08.2015:** epidemiológovia vykonali šetrenie v rodine pacienta
- podľa slov pacienta a jeho matky, ktorá s ním žije v jednej domácnosti, bola v uzavretých obaloch cícerovej nátierky prítomná produkcia plynu
- zároveň boli odobraté vzorky na analýzu (medzi nimi aj 3 prázdne obaly cícerovej nátierky)
- doručenie vzoriek na OLM s **požiadavkou vykonať mikrobiologické vyšetrenie zamerané na *Clostridium botulinum***
- epidemiológovia upovedomili Štátnu veterinárnu a potravinovú správu Slovenskej republiky

# Laboratórne šetrenie

- na diagnostiku *Clostridium botulinum* bola použitá kombinácia kultivačných a molekulárno-biologických metód
- kultivácia bola vykonaná podľa modifikovaného postupu popísaného v norme STN EN ISO 7937:2005 („Horizontálna metóda stanovenia počtu baktérií *Clostridium perfringens*. Metóda počítania kolónií“)
- multiplex PCR na dôkaz génov zodpovedných za produkciu toxínu A, B, E a F bola vykonaná podľa STN P CEN ISO/TS 17919:2013 („PCR reakcia na dôkaz patogénov z potravín. Dôkaz klostrídií produkujúcich botulínový neurotoxín typu A, B, E a F“)
- ďalšie molekulárno-biologické analýzy ako aj sekvenovanie boli vykonané v spolupráci s Robert Koch Institute v Berlíne, Nemecko

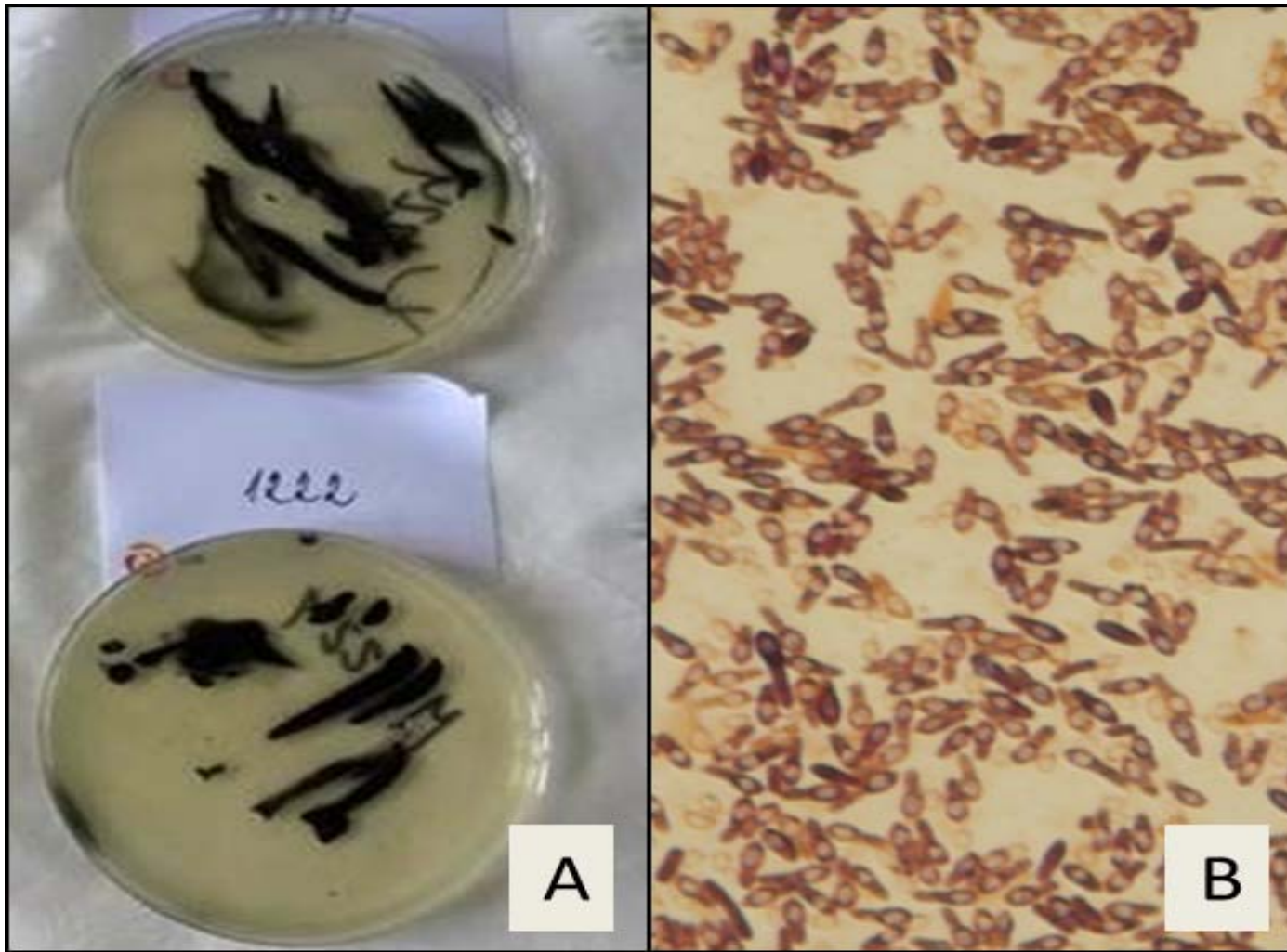


# Laboratórne šetrenie

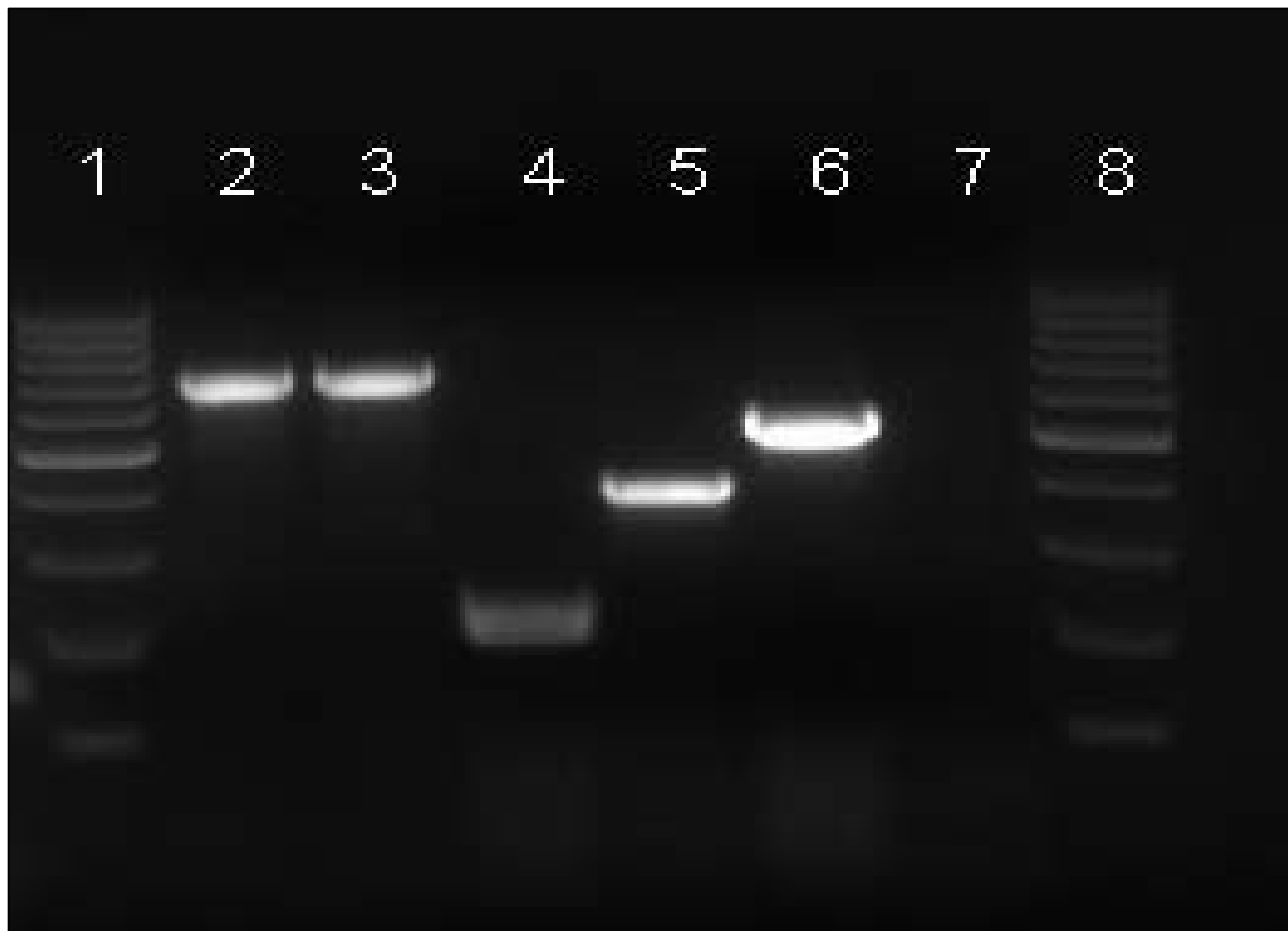
- 3 prázdne obaly z cícerovej nátierky a 9 originálnych neotvorených vzoriek
- **13.08.2015:** modifikovaná **STN EN ISO 7937:2005** na kultivačný dôkaz klostrídií
- **17.08.2015:** typická morfológia *Clostridium* spp.
- **18.08.2015:** subkultivácia, po kultivácii na TSC agare, typické subterminálne uložené spóry, farbenie podľa Grama
- na základe kultivácie, mikroskopie a klinicky stanovenej diagnózy záver: **suspektné *Clostridium botulinum***
- Kmene zamrazené na -80°C až do 28.09.2015
- **28.09.2015:** rekultivácia zamrazených kmeňov
- **1.10.2015:** multiplex PCR podľa **STN P CEN ISO/TS 17919:2013**  
**(*Clostridium botulinum* type A POZITÍVNE)**
- API 20A na detekciu anaeróbných mikroorganizmov: ***Clostridium botulinum/sporogenes***
- **29.10.2015:** kmene odoslané na ďalšiu analýzu do Robert Koch Institute



**Obr. 1:** Obaly z nátierky



**Obr. 2: A.** Kultivácia na TSC (Tryptose Sulphit Cycloserin )  
agare, typická morfológia *Clostridium* spp., **B.** Spóry po  
kultivácii na TSC agare, typické subterminálne uloženie spór,  
farbenie podľa Grama



**Obr. 3:** Výsledok PCR 1) a 8) Molekulový štandard; 2) Vzorka; 3) - 6) Pozitívne kontroly: 3) *C. botulinum* serotype A; 4) *C. botulinum* serotype B; 5) *C. botulinum* serotype E; 6) *C. botulinum* serotype F; 7) Negatívna kontrola

# Konfirmácia laboratórnych výsledkov

- **29.10.2015:** zaslanie vzoriek na ďalšiu analýzu do Robert Koch Institute - Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Berlín
- **11.11.2015:** Potvrdenie našich výsledkov z Robert Koch Institute  
**POZITÍVNE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TYP A!!!**
- ***Clostridium botulinum* type A S DOKÁZANOU PRODUKCIOU TOXÍNU**
- **8.2.2016: *Clostridium botulinum* subtype A3 s dokázanou produkciou toxínu**



Centre for Biological Threats  
and Special Pathogens

Biological Toxins (ZBS3)

Consultant Laboratory for  
*Clostridium botulinum*

Robert Koch-Institut | Postfach 45 02 41 | 13302 Berlin | Germany  
Dr. Brigitte Dörner, ZBS3

Prof. Dr. C. Klement/Dr. L. Maďarová  
Regional Authority of Public Health BanskáBystrica  
Department of Medical Microbiology  
Cesta k nemocnici 25  
975 56 BanskáBystrica  
Slovakia

E-mail: [cyril.klement@vzbb.sk](mailto:cyril.klement@vzbb.sk); [lucia.madarova@vzbb.sk](mailto:lucia.madarova@vzbb.sk)

### Laboratory Analysis Report

#### Foodborne botulism, chickpea spread (Alfabeto)

**Sender:** Regional Authority of Public Health BanskáBystrica,  
Slovakia  
**Beneficiary:** sender  
**Diagnosis or Laboratory Service:** Confirmation of *Clostridium botulinum*

Specimen	date collected	date received at RKI	your ref.No	our ref.No
1223(isolate)		30/10/2015	1223	15-168
1223j(isolate)		30/10/2015	1223j	15-169
1224(isolate)		30/10/2015	1224	15-170

Dear Prof. Dr. Klement, dear Dr. Maďarová dear colleagues,

Please find below our laboratory analysis on the above mentioned samples.

#### Methods

Isolates were cultured in TPGY medium under anaerobic conditions at 32 °C in an anaerobic workstation (Don Whitley Scientific, UK) and checked for purity on lactose egg yolk agar plates. Typical morphology for *C. botulinum*/*C. sporogenes* was observed for all three isolates. Note that different morphology of 1223/1223j and 1224 was observed (see Appendix A below). A single colony (15-168-01, 15-169-01, 15-170-01) was selected for further characterisation.

Selected colonies were grown in TPGY medium for 16 h. Bacteria and supernatants were separated by centrifugation and DNA was isolated with Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit according to the manufacture's instruction for Gram-positive bacteria. DNA was subjected to quantitative

Date: 11/11/2015

Your Ref:

Our Ref:  
4 07 01000290002-0002

I.A.  
Dr. Brigitte Dörner  
Head ZBS3  
Tel. +49 (0)30 18714 2500  
Tel. +49 (0)30 18714 2501  
E-Mail: [Dorner@rki.de](mailto:Dorner@rki.de)

Dr. Martin Dörner  
Deputy Head ZBS3  
Tel. +49 (0)30 18714 2500  
Tel. +49 (0)30 18714 2501  
E-Mail: [Dorner@rki.de](mailto:Dorner@rki.de)

Robert Koch Institute  
Centre for Biological Threats and  
Special Pathogens  
ZBS3 – Biological Toxins  
Seestraße 10  
13353 Berlin  
Germany

[www.rki.de](http://www.rki.de)

The Robert Koch Institute is a  
Federal Institute within the  
portfolio of the Federal Ministry  
of Health



TaqMan PCR (qPCR) for *bont/A*, *bont/B*, *bont/E*, and *bont/F* genes [1] and for the *ntnh* gene [2], which serves as a surrogate marker for botulinum-neurotoxin-producing *Clostridium* spp. (*C. botulinum* Group I–IV, *C. baratii*, *C. butyricum*).

16S rRNA was partially sequenced [3] and compared to the NCBI Genbank entries.

Culture supernatants were tested by multiplex ELISA (Luminex xMAP technology, unpublished) for the expression of BoNT/A and haemagglutinins (HA33, HA70).

#### Results:

Isolate	qPCR <i>bont/A,B,E,F</i>	qPCR <i>ntnh</i>	ELISA BoNT/A	ELISA HA33	ELISA HA70	16S rRNA	Microscopy
1223	A	+	+	–	–	C. bot./ C. spor.	C. bot./ C. spor.
1223j	A	+	+	–	–	C. bot./ C. spor.	C. bot./ C. spor.
1224	–	–	–	–	–	C. bot./ C. spor.	C. bot./ C. spor.

Isolates 1223 and 1223j were found to be positive for *bont/A* and *ntnh* genes and showed toxin production. Isolate 1224 was negative in both qPCR and ELISA.

Negative ELISA data for haemagglutinins HA33 and HA70 point towards a *bont/A* located within a *ha/orfX* cluster [4] which can be found for *bont/A2*, A3, A4, A6, A8 and some A1 (including all A1(B)) strains. In here BoNT/A is released associated with the NTNH in the M-complex [5]. Whereas *bont/A5* and most A1 strains are located within the *ha/orfX* cluster and thus producing the more potent large L-complex containing NTNH and haemagglutinins [6,7].

Irrespective of its reduced oral toxicity BoNT/A from *ha/orfX* cluster strains (e.g. BoNT/A2, A3 or A8) has been involved in foodborne botulism outbreaks worldwide [8-10].

16S rRNA sequence (partial, 950–1000 nt) was in agreement (>99%) with *C. botulinum* Group I or *C. sporogenes*, which are almost indistinguishable [4], for all three isolates (incl. 1224!).

Taken together, isolates 1223 and 1223j are confirmed as *C. botulinum* type A strains presumable in an *ha/orfX* cluster.





Whereas isolate 1224 has to be considered as a *C. sporogenes* strain.

Please don't hesitate to contact me for any further information.

Responsible scientist:  
Dr. Martin Dörner

Yours sincerely,

i.A. Dr. Martin Dörner  
Deputy Head ZBS3

#### References:

- Kirchner, S.; Krämer, K.M.; Schulze, M.; Pauly, D.; Jacob, D.; Gessler, F.; Nitsche, A.; Dörner, B.G.; Dörner, M.B. Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76, 4387–4395.
- Raphael, B.H.; Andreadis, J.D. Real-time PCR detection of the nontoxic nonhemagglutinin gene as a rapid screening method for bacterial isolates harboring the botulinum neurotoxin (A-G) gene complex. *J Microbiol Methods* 2007, 71, 343–346.
- Hill, K.K.; Smith, T.J.; Helma, C.H.; Ticknor, L.O.; Foley, B.T.; Svensson, R.T.; Brown, J.L.; Johnson, E.A.; Smith, L.A.; Okinaka, R.T., et al. Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* 2007, 189, 818–832.
- Hill, K.K.; Smith, T.J. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013, 364, 1–20.
- Gu, S.; Rumpel, S.; Zhou, J.; Strotmeier, J.; Bigalke, H.; Perry, K.; Shoemaker, C.B.; Rummel, A.; Jin, R. Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* 2012, 335, 977–981.
- Benefield, D.A.; Dessain, S.K.; Shine, N.; Ohi, M.D.; Lacy, D.B. Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110, 5630–5635.
- Lee, K.; Gu, S.; Jin, L.; Le, T.T.; Cheng, L.W.; Strotmeier, J.; Krueel, A.M.; Yao, G.; Perry, K.; Rummel, A., et al. Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog* 2013, 9, e1003690.
- Franciosa, G.; Floridi, F.; Maugliani, A.; Aureli, P. Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 7192–7199.
- Kull, S.; Schulz, K.M.; Strotmeier, J.W.; Kirchner, S.; Schreiber, T.; Bollenbach, A.; Dabrowski, P.W.; Nitsche, A.; Kalb, S.R.; Dörner, M.B., et al. Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. *PLoS One* 2015, 10, e0116381.



- Leighton, G. *The Loch Maree tragedy*. W.Collins Sons & Co: London, UK, 1928.

#### Appendix A:

Colony morphology on lactose egg yolk agar

1223



1223j



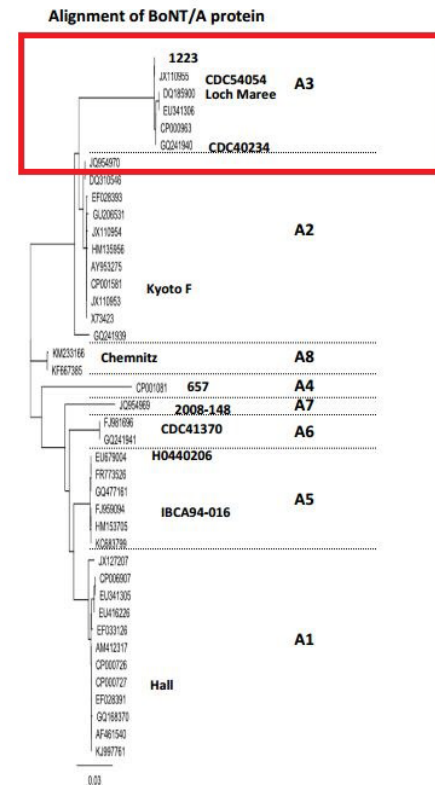
1224





- porovnanie sekvencie s databázou NCBI Genbank database (*National Center for Biotechnology*).
- Sekvencia aminokyselín: **100 % identická s kmeňom** BoNT/A3 CDC54054 (JX110955), **pôvodom z Argentíny**
- Lúquez, C.; Raphael, B.H.; Joseph, L.A.; Meno, S.R.; Fernández, R.A.; Maslanka, S.E: Genetic diversity among *Clostridium botulinum* strains harboring bont/A2 and bont/A3 genes. Appl Environ Microbiol 2012, 78, 8712-8718.

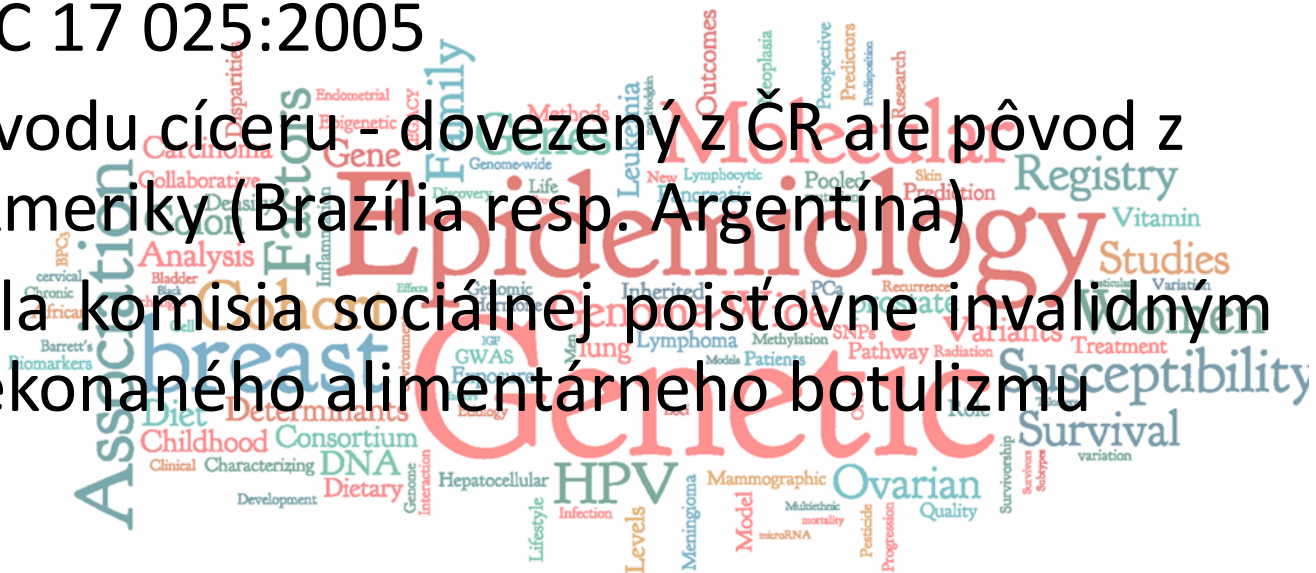
Isolates 1223 and 1223j were found to have the identical *bont/A* sequence. The sequence was 100% identical to BoNT/A3 of strain CDC54054 (JX110955) from Argentinian soil [2] and closely related to other BoNT/A3 sequences like the one of strain Loch Maree. The strain Loch Maree resulted from an outbreak at Loch Maree, Scotland in 1922 involving wild duck pate [3]. It was so far the only outbreak involving BoNT/A3. All other published BoNT/A3 sequences originate from Argentina [2]. Figure 1 shows the Neighbor-joining Tree for BoNT/A3 sequences (incl. Genbank No), subtypes and selected strain names.





# Závery

- na základe našich skúseností s diagnostikou prípadu alimentárneho botulizmu chceme zdôrazniť nevyhnutnosť zjednotiť a zlepšiť diagnostiku a interpretáciu laboratórnych výsledkov na národnej úrovni
- nevyhnutnosťou je zlepšenie spolupráce medzi rezortmi
- akreditácia laboratórnych postupov STN EN ISO/IEC 17 025:2005
- došetrenie pôvodu cíceru - dovezený z ČR ale pôvod z krajín Južnej Ameriky (Brazília resp. Argentína)
- pacienta uznala komisia sociálnej poisťovne invalidným na základe prekonaného alimentárneho botulizmu



A scanning electron micrograph (SEM) showing a dense network of thin, interconnected fibers forming a mesh-like structure. Several thick, rod-shaped bacterial cells are visible, some appearing to be attached to or embedded within the mesh. The bacteria have a textured, slightly irregular surface. The overall color palette is a mix of light blue, green, and yellow, typical of SEM images.

**Ďakujem za pozornosť**