An aerial photograph of a city skyline at sunset. The sky is a mix of blue and orange, with scattered clouds. The city buildings are silhouetted against the bright horizon. A single bird is visible in flight on the right side of the skyline.

Alimentárny botulizmus: staronový problém verejného zdravotníctva

Verejná habilitačná prednáška

**RNDr. Roman Mezencev, MS, PhD.
Adjunct Professor**

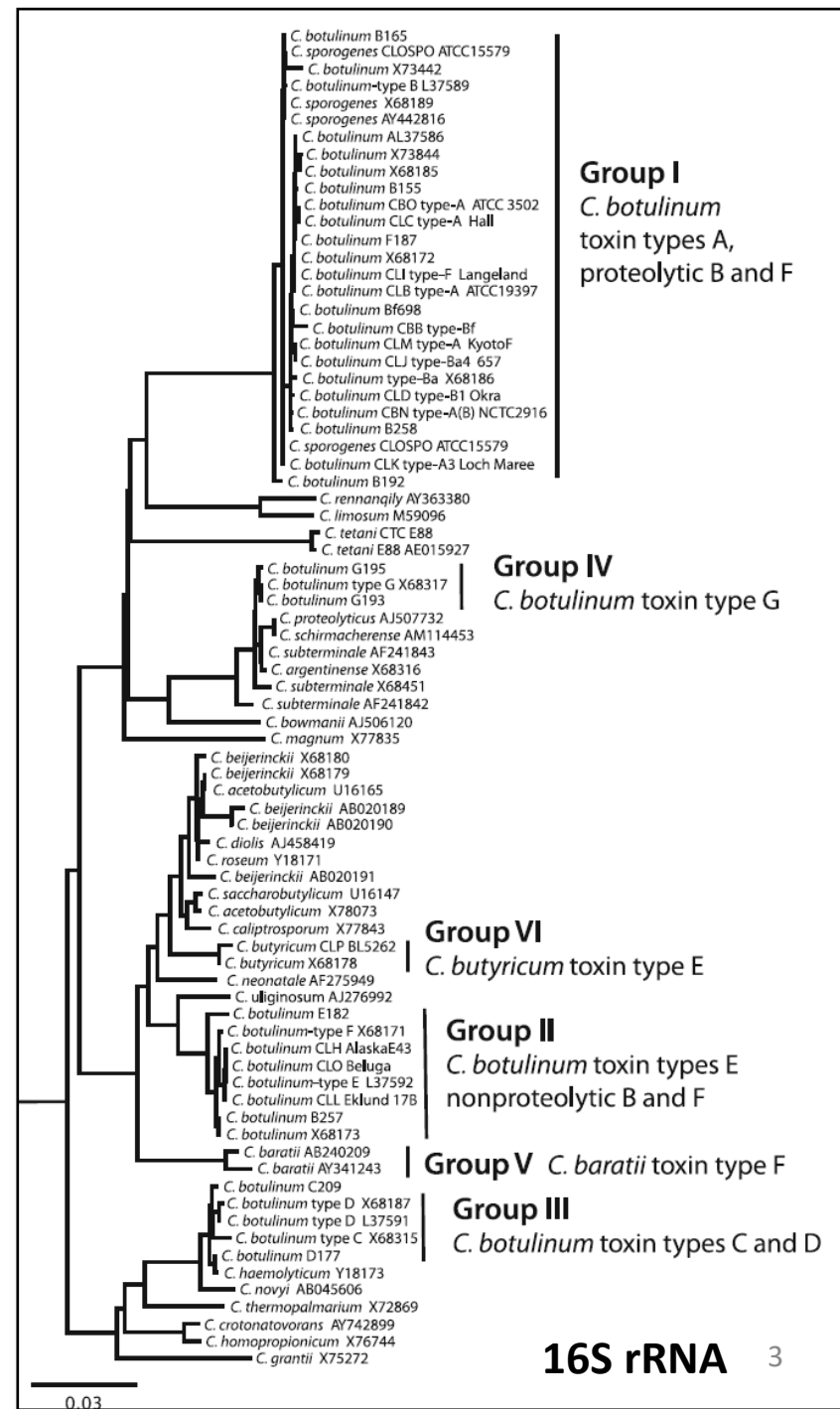
Botulizmus a jeho klinické formy

Paralytické ochorenie vyvolané botulickými neurotoxínmi:

	<u>Rok objavu</u>	
• Vytvorenými v potravinách (alimentárny botulizmus)	1817 (1897)	 <p>Počítačom vytvorená 3D vizualizácia <i>C. botulinum</i></p>
• Vytvorenými v čreve kojencov a výnimočne aj dospelých osôb (intestinálny botulizmus)	1976 1986	
• Vytvorenými v kontaminovaných ranách (traumatický botulizmus)	1943	
• Podanými pre medicínske účely (iatrogénny botulizmus)	1997	
• Aerosolizovanými úmyselne alebo pri nehodách (inhalačný botulizmus)	1963	

Pôvodca botulizmu

- 6 skupín klostrídií produkujúcich botulický neurotoxín (BoNT)
- G+ anaeróbne, pohyblivé sporulujúce tyčinky
- Vysoká genotypová a fenotypová odlišnosť medzi skupinami
- Vysoká environmentálna rezistencia spór
- Značné rozšírenie v pôde, akvatických sedimentoch a tráviacom systéme zvierat



Charakteristika BoNT-produkujúcich klostríí

	I	II	III	IV	Cl. butyricum	Cl. baratii
BoNT sérotyp	A, B, F Ab, Af, Ba, Bf	B, E, F	C1, D CD, DC	G	E	F
Ochorenie človeka						
-Alimentárne	+	+	-	?	+	+
-Intestinálne	+	-	-	-	+	+
-Traumatické	+	-	-	-		
Proteolýza	+	-	-	+	-	-
Rastová teplota °C						
Minimum	10	3.3	15	?	12	10-15
Optimum	35-40	18-25	40	37	30-37	35-40
Rast. pH (minimum)	4.6	5.0	5.1		4.8	
Inhib. konc. NaCl	10%	5%	5%	6.5%		
D _{100C} /min	25	<0.1	0.1-0.9	0.8-1.12	<0.1	
D _{121C} /min	0.21	<10⁻³				
Minim. aktivita vody	0.94	0.97				

Výskyt spór *C. botulinum* v pôde a sedimentoch

Miesto	% pozitívnych nálezov	Typ toxínu (% pozit. nálezov)				
		A	B	C&D	E	F
USA východné pobrežie pôda	19	12	64	12	12	0
USA západné pobrežie pôda	29	62	16	14	8	0
USA Aljaška pôda	41	0	0	0	100	0
Argentína pôda	23.5	46	38	0	0	16
Škandinávia, pobrežný sediment	100	0	0	0	100	0
UK pôda	6	0	100	0	0	0
Taliansko (Rím) pôda	?	86	14	0	0	0
Československo pôda	42	0	0	100	0	0

Hauschild: Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods. CRC Press 1992.
Multiple other sources

Botulotoxín (BoNT)

- **AB toxín:**

- 100 kDa Heavy Chain (HC)

- vázba na SV2 a gangliozid

- translokácia LC do cytosólu

- 50 kDa Light Chain (LC)

- Zn-metaloproteináza

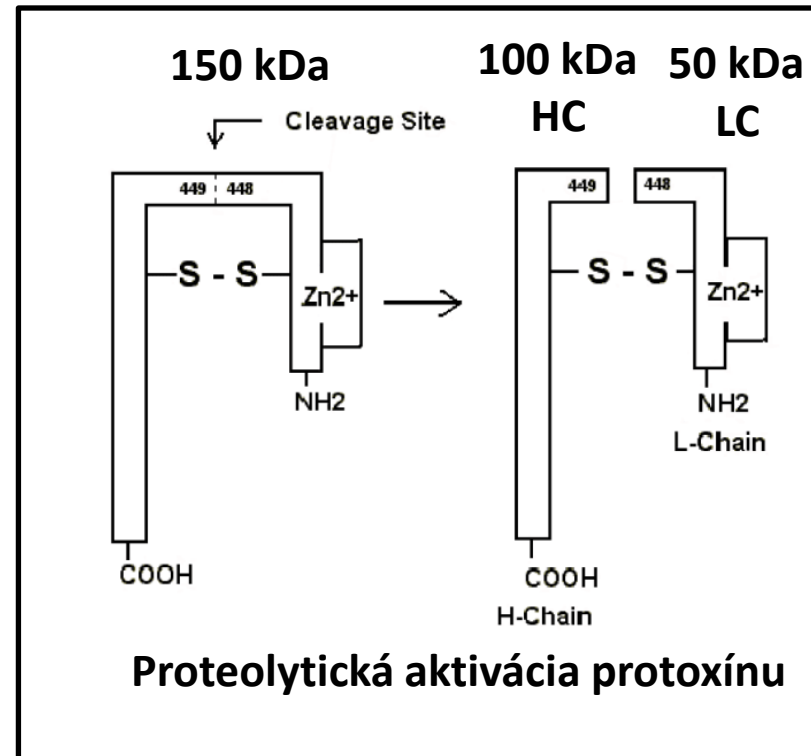
- **7 sérologických typov (A-G)**

- identita aminokyselín: 30-63%

- **>40 subtypov (napr. A1-A8)**

- identita aminokyselín: 84-97%

Typizácia BoNT je klinicky a epidemiologicky významná (prognóza, terapia a atribúcia zdroja)



Mechanizmus toxického účinku BoNT

1. Vstup do synaptickej štrbiny
2. Väzba na receptor neurónu
3. Internalizácia (endocytóza)
4. Translokácia LC z endozómu
5. Proteolýza **SNARE**

synaptobrevin

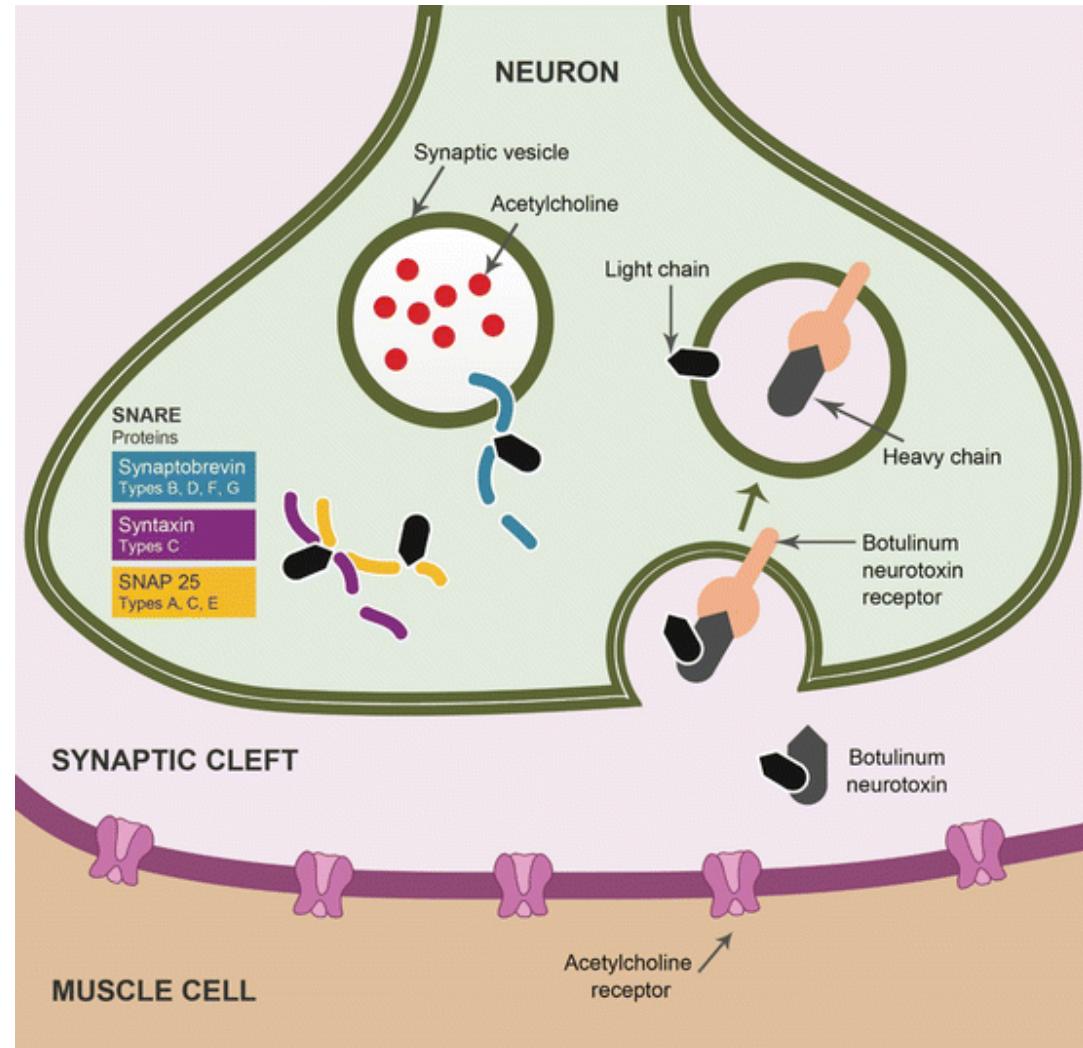
BoNT/B, D, F a G:

SNAP-25

BoNT/A, C a E:

Syntaxin

BoNT/C:



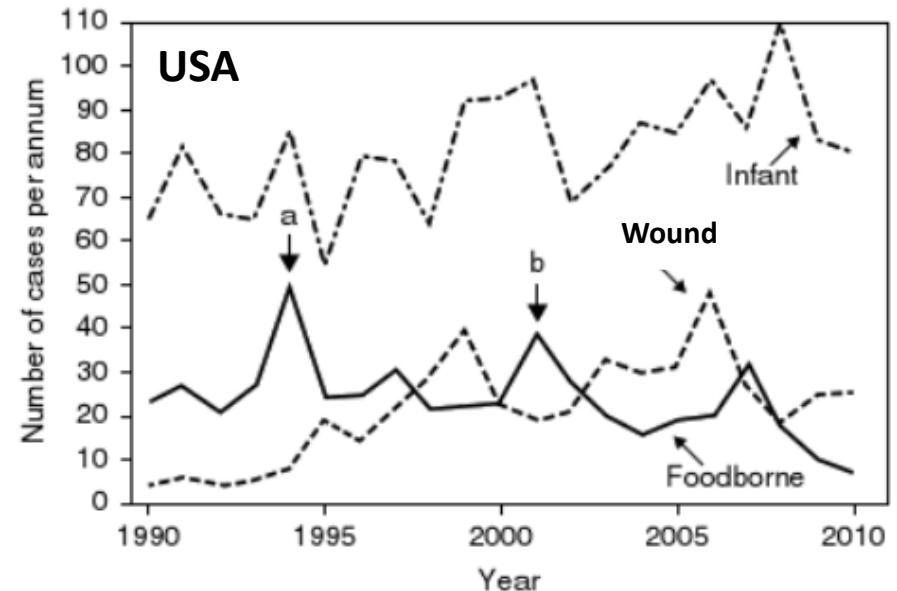
Perzistencia blokády: BoNT A > BoNT/C > BoNT/B > BoNT/F > BoNT/E

Závažnosť intoxikácie a horšia prognóza: BoNT/A > BoNT/B ~ BoNT/E

Rekonvalescencia po ťažkom priebehu: BoNT/A: 5 rokov , BoNT/B: 2 roky 7

Zastúpenie jednotlivých klinických foriem botulizmu

Klinická forma	Priem. počet prípadov/rok	
	USA 1976-2006	Taliansko 1986-2015
Intestinálny u kojencov	71 (72.5%)	1.2 (8%)
Alimentárny	24 (24.5%)	14 (91%)
Traumatický	3 (3%)	0.2 (1%)



Intestinálny botulizmus kojencov

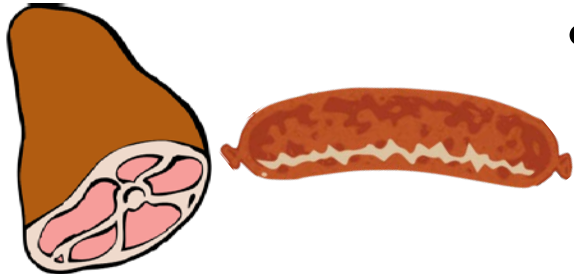
---USA (1976-2006): 2419 prípadov (IR=2.03/100 000xrok)

---Taliansko (1984-2008): 29 prípadov (IR= 0.21/100000xrok)

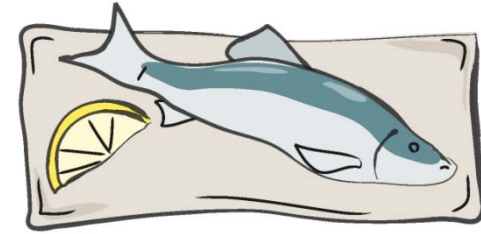
---Európa (1976-2013): 96 prípadov 13 krajinách (2.6/rok)

Uvažuje sa o poddiagnostikovaní alebo nedostatočnom hlásení ochorenia, ktoré je zodpovedné aj za niektoré prípady SIDS.

Alimentárny botulizmus



- **Toxikóza** po požití potravín obsahujúcich BoNT
- Široký okruh potravín (rozšírenie BoNT-klostrídií a často aj permissívne podmienky pre ich rast)
- Stačia aj nepatrné množstvá BoNT po pomnožení baktérií za suboptimálnych podmienok
- Potravina nemusí mať zmenené organoleptické vlastnosti



Alimentárny botulizmus – podmienky vývoja ochorenia

Podmienky	C. botulinum	
	Skupina I Proteolyt.	Skupina II Neproteolyt
Potravina (surovina) obsahuje spóry BoNT klostrídií	Zelenina, Mäsové výrobky	Ryby (E), Mäsové výrobky (B)
Spóry nie sú pri tepelnom spracovaní v dostatočnom rozsahu zničené	121 °C/ 3min	90 °C/ 10 min
Nízka acidita Vysoká aktivita vody Nízky obsah soli	pH > 4.6	pH > 5
Permisívna teplota pre rast klostrídií	> 10 ⁰ C	> 3.3 ⁰ C
Preformovaný BoNT v potravine nie je zničený tepelnou úpravou pred podávaním	79° C / 20 min 85° C / 5 min	
Anaeróbne prostredie (vákuové balenie, modifikovaná atmosféra) Neprítomnosť konzervačných látok (sorbát, parabeny, dusitany)		

Diagnostika alimentárneho botulizmu

- **Klinická**

nauzea/vomitus, dysfágia, diplopia, mydriáza, xerostómia

Senzitivita pre 3/5 symptómov: 93%

Diferenciálna diagnóza (GBS, LES, MG, CMP, KE, PSP, fugu)

- **Neurofyziologická**

- **Laboratórna**

----**Baktérie: kultivácia** (stolica, potraviny)

Senzitivita =51.3% (žalúdočný obsah, CDN, 1985-2005)

40.3% (stolica), 83.3% (potraviny)

----**PCR /BoNT gén** (aj nemé gény a neviabilné spóry!)

----**Toxín: test na myšiach** (10 pg/mL)

(sérum, stolica, žalúdočný obsah, potraviny)

Senzitivita =20.4% (sérum, IT, 1986-2015)

30.5% (sérum, CDN, 1985-2005)

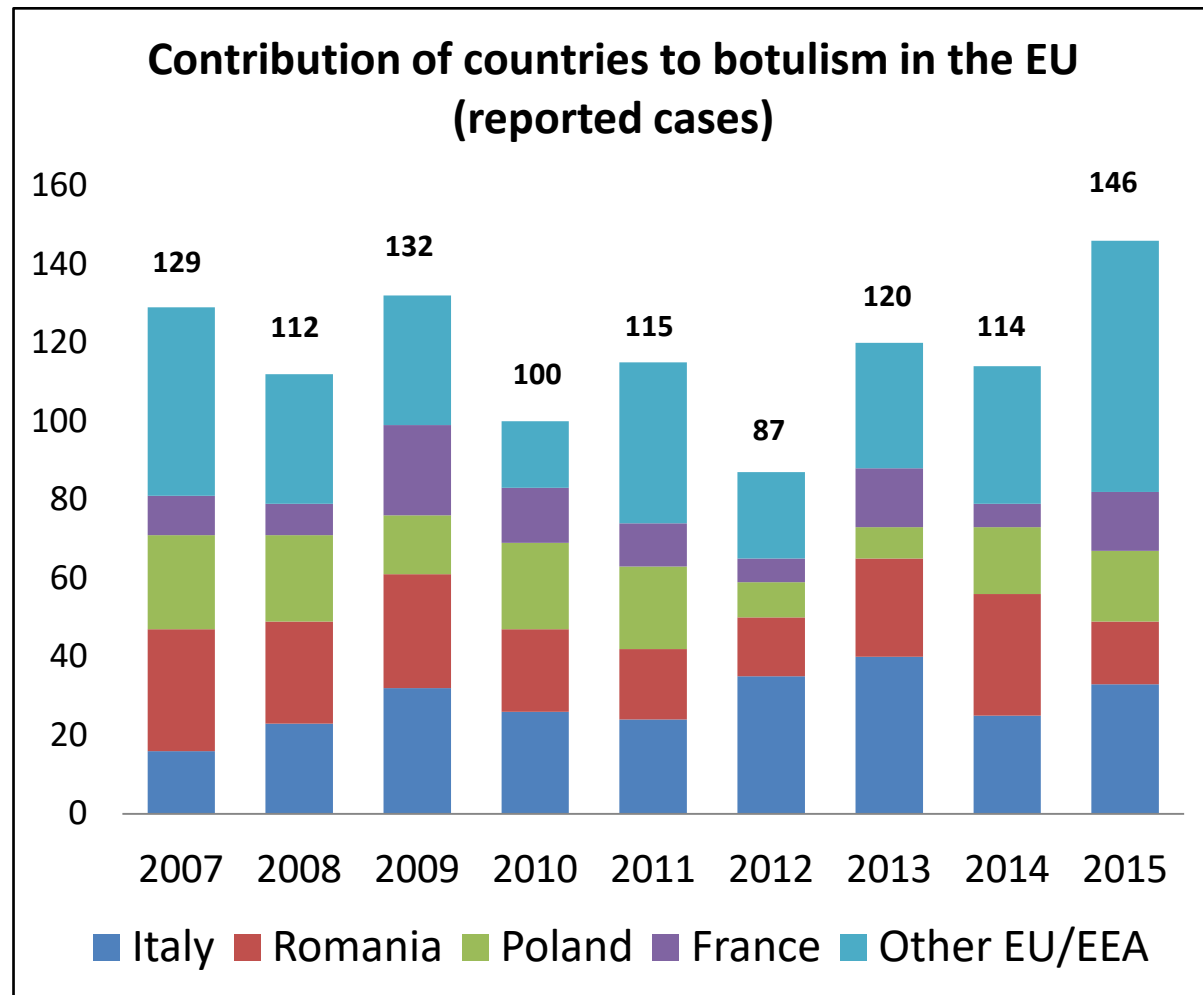
11% (žalúdočný obsah), 34.5% (stolica), 78.3% (potraviny)



(CDC, 1976)

Botulizmus v EU

- Za obdobie 2007-2015
EU medián = 115/rok
- EU (2007) = $0.026/10^5 \times \text{rok}$
USA (2007) = $0.048/10^5 \times \text{rok}$
RR = 0.54 (CI₉₅ = 0.43-0.69)
- Bez evidentného
monotónneho trendu
- 70% prípadov 4 krajiny
 - Taliansko
 - Rumunsko
 - Poľsko
 - Francúzsko



Alimentárny botulizmus

EU (2007): >90%: IR = $0.023/10^5 \times \text{rok}$

USA (2007): 18%: IR = $0.009/10^5 \times \text{rok}$

RR = 2.7 (CI₉₅ = 1.8-4.2)

Botulizmus v EU

Dlhodobý zostup: PL

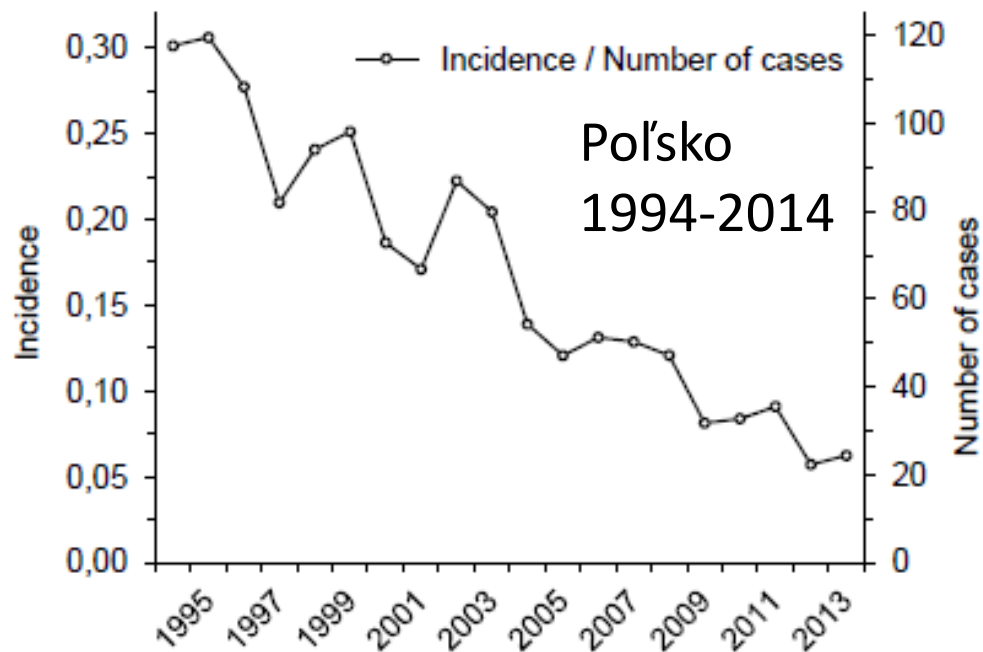
IR(1971-2000) \approx 0.86 307/rok (!)

29x EU(2007), 11x PL (2013)

Význam priemyselných potravín

12/35 (2011) a 12/24 (2013)

BoNT/B: >80%



Dlhodobý vzostup: RO

IR (2007) = 0.18

6x EU (2007)

9x RO (1983)

Letalita:

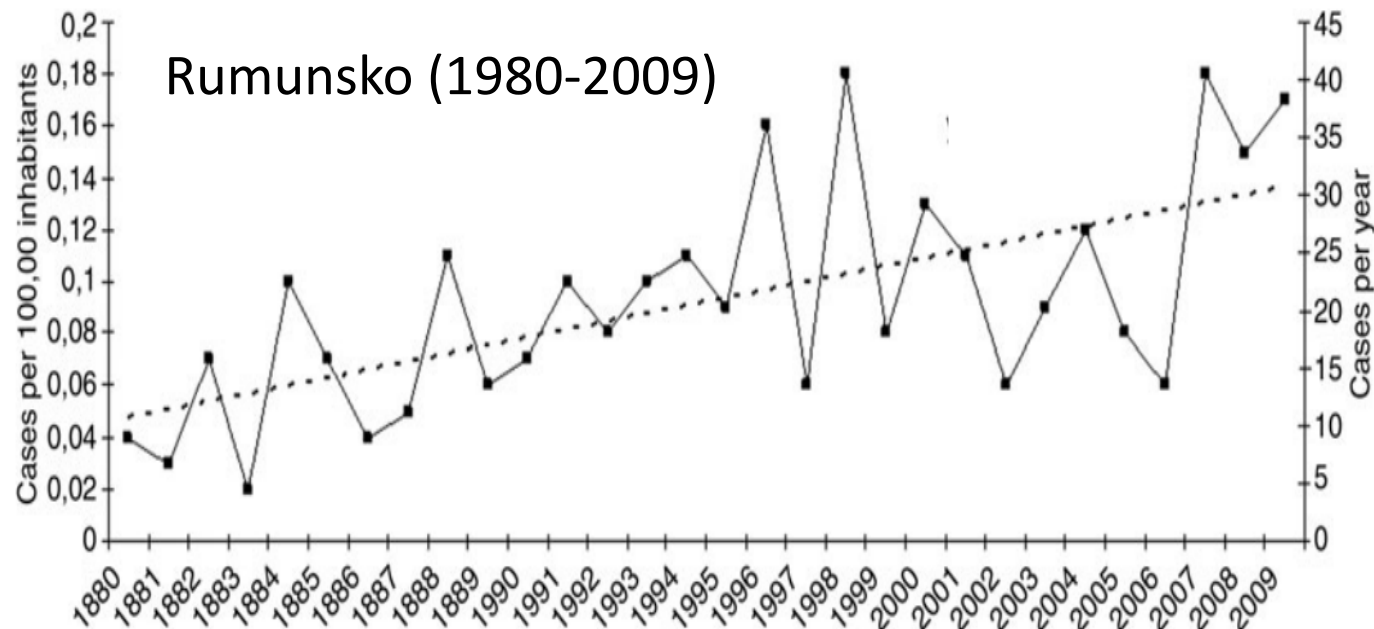
--12% (1999-2009)

--60% (do 1995)

BoNT/B: 99%

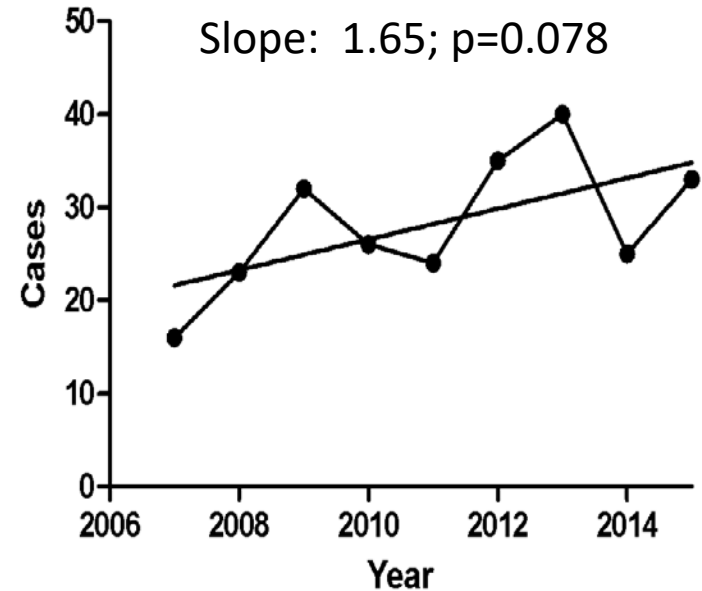
Zdroj: mäsové

domáce výrobky



Botulizmus v EU – Taliansko (1986-2015)

- IR = 0.03 /100 000xrok
- Alimentárny botulizmus: 90% prípadov (421 / 466 potvrdených prípadov)
- Alimentárny botulizmus: \approx 40% EU
- Infant botulism: 50% prípadov EU
- Letalita: 3.8%
- BoNT/B (alim) = 79.1%
- BoNT/A (alim) = 9.7% (často BoNT/A2)
- BoNT/F (alim) = 0.3%



- Zdroj: jedlá konzervované doma (95 incidentov) a priemyselne (23)

Epidémia vo Francúzsku (August 2008)

- **Zdroj:** priemyselne vyrobené placky „enchilada“ s kuracím mäsom, syrom a zeleninou
- **Prípady:** 2 ženy (60+ a 20+ rokov), spoločne konzumovali potravinu
- **Priebeh:** Po iniciálnych GIT symptómoch rýchly vývoj paralytického ochorenia, ktoré si vyžiadalo mechanickú ventiláciu; antitoxín-ABE z mimoriadneho dovozu (vo Francúzsku nedostupný a neregistrovaný)
- **Laboratórna diagnostika:** BoNT/A pozitívny
 - (i) v sére obidvoch pacientiek
 - (ii) v kuracom mäse so zeleninou: 280k MLD/g*C. botulinum* pozitívny kultivačne

Ilustračný obrázok: enchilada z mäsom, syrokrémom a zeleninou
Ingrediencie dodávané zvlášť v spoločnom obale, odporúčané skladovať v chlade, pred podaním zohriať v mikrovlnnej rúre



Epidémia vo Francúzsku (August 2008)

- **Verejnozdravotnícke opatrenia:** 2d po manifestnom ochorení stiahnuté všetky výrobky „enchilada“ a „fajita“ toho istého výrobcu; verejnosť informovaná cestou tlačových výstupov a letákov; aktivovaný Early Warning and Response System, Rapid Alert System for Food and Feed.
- **Epidemiologické vyšetrenie:** jedlo skladované 2 týždne pri izbovej teplote (výrobca odporúčal uskladniť v chlade); konzumované 1 deň po dobe spotreby; ďalšie prípady neboli hlásené; vzorky z tej istej šarže u výrobcu negatívne
- **Záver:** Pasteurizácia 85°C/2h nestačila na elimináciu spór proteol. C. botulinum; **skladovanie v chlade absolútne nutné**; označenie skladovania výrobku nebolo dostatočne viditeľné.

Skladovanie pri izbovej teplote umožnilo rast baktérií vo výrobku pravdepodobne zo zeleniny alebo z kontaminácie pri výrobe.

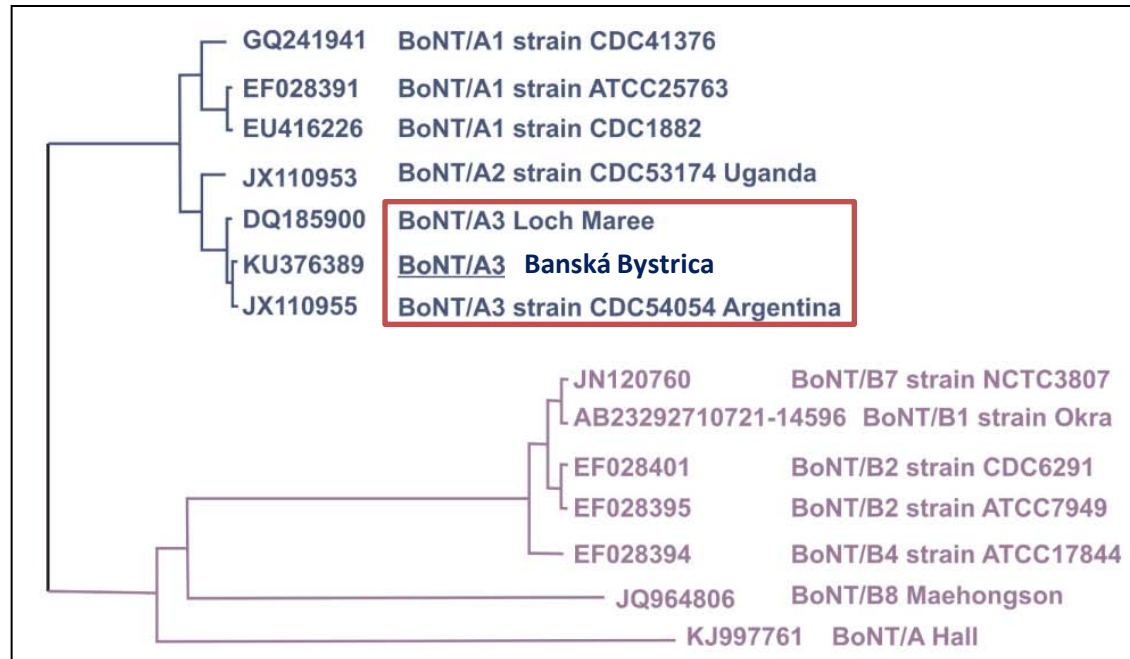
Dôležitosť viditeľného značenia, dodržania skladovania a informovanosti verejnosti

“Sandwich Disaster” alebo “Loch Maree Tragedy” (1922)

- **Zdroj:** nátierka z mäsa divokej kačice s BoNT/A3
- Ochorenie 8 osôb (6M/2F) (všetci zomreli do 5 dní)
- Alimentárny botulizmus v tom čase v Škótsku neznámy; incident vyšetrovaný ako úmyselná otrava
- **Botulotoxín bol izolovaný z vyhodeneého zvyšku potravy!**
- BoNT/A3 gén na plazmide; produkované veľmi nízke množstvá BoNT v porovnaní s inými subtypmi Clostridium botulinum A



Idylické miesto rekreácií lepšej londýnskej spoločnosti



Fylogenetická analýza BoNT/A a BoNT/B CDS z vybraných kmeňov C. botulinum. Roman Mezencev¹⁷



Vyšetovanie hromadnej smrti v Loch Maree

Sheriff Court, Dingwall

September 1922

Zdroj: Gairloch Heritage Museum

SCOTTISH BOARD OF HEALTH.

REPORT

4

of the circumstances attending
THE DEATHS OF EIGHT PERSONS
from
BOTULISM AT LOCH MAREE
(ROSS-SHIRE).

By GERALD R. LEIGHTON, O.B.E., M.D., F.R.S.E.,
Medical Officer (Foods), Scottish Board of Health.



“Sandwich Disaster” alebo “Loch Maree Tragedy” (1922)

- Kľúčová stopa: zvyšok sendviča zahrabaný v zemi
- Nátierka vyrobená 4 mesiace pred incidentom, skladovaná 6 týždňov. Do incidentu spotrebovaných 6 fliaš. V deň incidentu servírovaný obsah 2 fliaš. Fľaše a viečka nepoškodené. Farba, zápach a konzistencia údajne nesvedčili o skazenej potravine.
- Laboratórna diagnostika: *Bacillus botulinum* a BoNT/A
pozitívne: zvyšok sendviča, 1 z 2 prázdnych nádob po kačacej nátierke
- Vyšetrovanie u výrobcu: vyrábal 1000000 fliaš nátierok /rok,



- Záver vyšetrovania: “...no fault could be inputed to anyone concerned..”(?)
- Opatrenie: Circular 342 (Ministry of Health) – zabezpečená dostupnosti antiséra v 17 mestách UK

Botulizmus z hromadne vyrobených potravín v EU (2011)

Fínsko	Škótsko	Francúzsko
Jedna domácnosť (2)	Jedna domácnosť (2)	Dve domácnosti (9)
Olivy (sklená konzerva)	Zeleninová omáčka (sklená konzerva)	Olivy (sklená konzerva)
Import (pôvod z Talianska)	Vnútroštátna distribúcia	Vnútroštátna distribúcia
BoNT/B	BoNT/A	BoNT/A
Nález defektných uzáverov	Moderná prevádzka Zdroj kontaminácie sa nezistil	Nález defektných uzáverov Nesprávna sterilizácia
Kontaminovaná jediná nádoba z 900 importovaných	Kontaminovaná jediná nádoba z 1863 nádob z tej istej šarže	Kontaminované pravdepod. iba 2 nádoby z celej šarže (60 hrncov)

ZÁVER I

- Alimentárny botulizmus - toxikóza z BoNT v potravinách kontaminovaných BoNT-klostrídiami a držaných v permissívnych podmienkach
- Výrazné epidemiologické odlišnosti botulizmu v rôznych krajinách,
- V poslednom čase rastie význam priemyselne vyrobených potravín u alimentárneho botulizmu
- Okruh rizikových potravín je široký.
- Riziko určuje záťaž spór, teplota/čas pri spracovaní a uschovávaní pO_2 , pH, obsah soli, vody a obsah konzervačných látok
- **U nesterilizovaných potravín kontaminovaných spórami C. botulinum skupiny I dôjde po porušení chladového reťazca k tvorbe BoNT v potravinách, ak nie sú použité ďalšie bariéry**

ZÁVER II

- **C. botulinum II** : bežné chladenie spomalí ale nezastaví produkciu BoNT! Miernejšie tepelné spracovanie (6D) podstatne znižuje riziko, ale o ochrane spotrebiteľa rozhodujú aj ďalšie bariéry: teplota/doba skladovania, pH, NaCl, konzervačné prísady. **Význam realistického stanovenia a dodržania doby spotreby potravín!**
- Sterilizácia vs. pasteurizácia! Niektoré zložky potravín zvyšujú tepelnú odolnosť spór! Ďalšie bariéry! **Primerané varovanie spotrebiteľov!**
- Dlhšia latencia, sporadický výskyt, pohyb osôb a tovaru sťažujú epidemiologické vyšetovanie. Laboratórna diagnostika je časovo náročná a má nízku klinickú senzitivitu (pre BoNT)
- Liečba i opatrenia na ochranu verejného zdravia musia byť energické ešte pred potvrdením diagnózy. **Každý prípad je mimoriadna verejno-zdravotnícka udalosť, ktorá si vyžaduje intervenciu vo vzťahu k distribúcii potravín, zabezpečenie informovanosti spotrebiteľov, pripravenosti zdravotníckych zariadení a laboratórnych kapacít.**