

Opätovný výskyt botulotoxínového subtypu A3, ktorý spôsobil alimentárny botulizmus na Slovensku v roku 2015.

Lucia Maďarová¹, Brigitte G Dorner^{2,3}, Lars Schaade³, Vladimír Donáth⁴, Mária Avdičová¹, Milota Fatkulínová¹, Jozef Strhársky¹, Ivana Sedliačiková¹, Cyril Klement^{1,5}, Martin B Dorner^{2,3}

1. Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Slovenská republika
2. Robert Koch Inštitút, Konzultačné laboratórium pre neurotoxíny produkujúce klostrídiá (botulizmus, tetanus), Berlín, Nemecko
3. Robert Koch Inštitút, Centrum pre biologické hrozby a špeciálne patogény, Berlín, Nemecko
4. II. Neurologická klinika SZU, Fakultná nemocnica F. D. Roosevelta, Banská Bystrica, Slovenská republika
5. Slovenská zdravotnícka univerzita, Fakulta verejného zdravotníctva, Bratislava, Slovenská republika

Kľúčové slová: botulizmus; alimentárny; *Clostridium botulinum*; subtyp A3; cícery; komerčný

V roku 2015 sa na Slovensku objavil prípad alimentárneho botulizmu. *Clostridium botulinum* typu A bolo izolované z troch prázdnych komerčne vyrábaných cíceroých nátierok. Výrobok, ktorý bol predávaný na Slovensku a v Českej republike, bol stiahnutý z trhu a okamžite bolo vydané varovanie prostredníctvom systému rýchleho varovania Európskej komisie pre potraviny a krmivá (RASFF). Ďalšie vyšetrenia odhalili prítomnosť botulínového neurotoxínu (BoNT) subtypu BoNT/A3, veľmi zriedkavého subtypu, ktorý sa podieľal iba na jednom predchádzajúcom ochorení (Loch Maree Škótsko, 1922). Je to najviac divergentný subtyp BoNT/A s 15,4% rozdielom na úrovni aminokyselín v porovnaní s prototypom BoNT/A1. To spôsobuje väčšiu náchylnosť na vyhýbanie sa imunologickej detekcii a detekcii založenej na princípe PCR. Odporúča sa preto, aby sa testovacie laboratóriá informovali o tom, že tento subtyp bol druhýkrát spojený so vznikom alimentárneho botulizmu, pričom prvý výskyt bol zaznamenaný takmer pred 100 rokmi. Je vhodné validovať imunologické alebo PCR metódy aj proti tomuto subtypu.

Úvod

Botulizmus je život ohrozujúce ochorenie, ktoré spôsobuje sedem sérotypov (A-G) botulínových neurotoxínov (BoNT), avšak len sérotypy A, B, E a F spôsobujú ochorenia u ľudí. BoNT zabraňujú uvoľňovaniu neurotransmitterov a vedú k paralýze. Existujú tri hlavné formy ľudského botulizmu: potravinový, ranový a detský botulizmus [1,2]. BoNT sú produkované šiestimi fylogeneticky a fyziologicky odlišnými baktériami (*Clostridium botulinum* Skupiny I-IV a kmeňmi *C. baratii* a *C. butyricum*), ktoré sú také rozmanité, že si zaslúžia klasifikáciu ako samostatné druhy. Všetky druhy rodu *Clostridium* produkujúce BoNT majú svoje náprotivky, ktoré BoNT neprodukujú (nie sú súčasťou klastru génu BoNT), sú často priradené k rôznym názvom druhov, ako je *C. sporogenes* pre kmene *C. botulinum* skupiny I [2]. Táto rôznorodosť *C. botulinum* spolu s jeho úzkym vzťahom k netoxickým druhom môže mať za následok buď chybnú detekciu toxigénnych druhov *Clostridium* alebo jej zlyhanie.

Génový klaster BoNT sa často spája s mobilnými genetickými prvkami, čo umožňuje interkonverziu medzi toxigénnymi a netoxickými druhmi *Clostridium* a vedie k podstatným zmenám sekvencií BoNT a ich genómového pozadia [3]. Dnes sú sérotypy BoNT rozdelené na viac ako 40 subtypov vrátane BoNT/A1 až BoNT/A8 [4] a mozaiky [5]. Rozdielnosť BoNT na úrovni aminokyselín môže dosiahnuť až 36% v rámci sérotypu a odráža rozdiely v ich katalytickej aktivite, väzbe receptora alebo farmakokinetike [6]. Okrem toho, že BoNT génový klaster obsahuje gény pre BoNT, obsahuje taktiež gény pre netoxický nehemaglutinínový proteín (NTNH). Génový klaster BoNT obsahuje aj gény hemaglutinínu (HA) (*ha1*, *ha2* a *ha3*) v HA klasteri alebo v troch *orfX* génoch (*orfX1*, *orfX2* a *orfX3*) v klasteri *orfX*. Spolu s BoNT môžu tieto pomocné proteíny tvoriť komplexy rôznej veľkosti a zloženia [7]. Variabilita pozorovaná v BoNT v dôsledku existencie siedmich sérotypov, mozaikových foriem, niekoľkých rôznych subtypov a výskytu BoNT v rôznych komplexoch, ako aj ich heterogénneho genetického pozadia sú pravdepodobne hlavnými dôvodmi spektra klinických prejavov a trvania ochorenia. Botulizmus a jeho diagnostika predstavujú obrovskú výzvu pre diagnostické laboratóriá [8].

Botulizmus je spojený so širokou škálou potravín bohatých na bielkoviny a udržiavaných v prostredí s čiastočným vylúčením kyslíka alebo v prostredí, kde bol kyslík vyčerpaný inými baktériami. Marinované mäso, ryby, ovocie, zelenina alebo huby, ako aj domáce zavárané výrobky či výrobky z konzervy a domáce sušené alebo údené mäso alebo produkty z rýb, ktoré sú konzumované neúdené to všetko sú obzvlášť známe zdroje vzniku alimentárneho

botulizmu. BoNT sú tepelne labilné a môžu sa zničiť pri teplotách nad 70 ° C počas niekoľkých minút [9,10]. V súčasnosti je alimentárny botulizmus takmer výlučne spojený s po domácky vyrábanými potravinami, ale komerčné potraviny sa taktiež príležitostne podieľajú na jednotlivých prípadoch alebo malých ohniskách [11-13]. V rokoch 2010 - 2014 ECDC zaznamenalo 492 prípadov alimentárneho botulizmu v rámci Európy [14], pričom na Slovensku sa posledný prípad sa vyskytol v roku 2012 [15].

Udalosť

V polovici augusta 2015 (deň 0) inak zdravý dospelý človek vo veku približne 40 rokov konzumoval na večeru tri balenia (100 gramov) komerčne pripravenej cicerovej nátierky. Nátierka, ktorá bola predávaná na Slovensku a v Českej republike, bola 9 dní pred dátumom spotreby. Nasledujúce ráno (deň 1), 9-11 hodín po konzumácii cicerovej nátierky, sa u pacienta objavili nevoľnosť, vracanie, dvojité videnie, nestabilná chôdza, závrat, všeobecná slabosť a ťažkosti s prehĺtaním. Následne bol hospitalizovaný. Napriek tomu, že pacient dostal tri dávky trivalentného anti-A, B a E antitoxínu musel byť uvedený do umelého spánku a napojený na umelú pľúcnu ventiláciu. Bol prevezený na jednotku intenzívnej starostlivosti (JIS). Vzhľadom na fakt, že botulizmus patrí medzi ochorenia, ktoré na Slovensku podliehajú povinnému hláseniu, klinika hlásila prípad podozrenia na botulizmus Regionálnemu úradu verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici. Zvratky, sérum ani stolica bohužiaľ neboli odobraté. Na analýzu bol odobratý výplach žalúdka 48 hodín po objavení sa príznakov ochorenia. Nakoľko sa vyšetrenie prítomnosti toxínu na Slovensku nevykonáva, materiál bol po týždni skladovania pri 4°C odoslaný na analýzu do Zdravotného ústavu Ostrava v Českej republike, kde bol vykonaný biologický pokus na myšiach s negatívnym výsledkom. Liečba pacienta pozostávala najmä z intenzívnej symptomatickej starostlivosti a respiračnej podpory počas takmer 50 dní. Pacient bol po 78 dňoch prepustený z nemocnice, ale stále vykazuje problémy s dýchaním (máj 2017).

Metódy

Epidemiologické šetrenie

V deň 1, hneď po tom, ako bol prípad zaznamenaný klinickými lekármi, Regionálny úrad verejného zdravotníctva začal epidemiologické šetrenie. Nasledujúci deň, deň 2, bola prehlídnutá domácnosť pacienta s cieľom skontrolovať ďalšie prípady a zozbierať vzorky potravín. Tam bol vypočítaný blízky príbuzný, ktorý zdieľa s pacientom tú istú domácnosť, bol

zaznamenaný zoznam potravín spotrebovaných pacientom za posledné dni a boli zhromaždené vzorky potravín.

V spolupráci so Štátnou veterinárnou a potravinovou správou (ŠVPS) sa u výrobcu uskutočnilo vyšetrovanie zloženia a pôvodu zložiek používaných na výrobu cícerovej nátierky.

Laboratórne vyšetrovanie

Izolácia *Clostridium botulinum* z cícerovej nátierky a molekulárno-biologická analýza

Malé zvyšky cícerovej nátierky ponechané v troch takmer prázdnych obaloch boli analyzované kultiváciou na TSA agare (tryptón, sója) a Schaedler agare a podrobené anaeróbnej kultivácii pri 37°C v anaerostatoch podľa EN ISO 7937: 2005. Po kultivácii takmer všetky kolónie vykazovali rast a morfológiu typické pre klostrídie. Kmene boli testované na prítomnosť *bont* génov pomocou multiplex PCR pre *bont/A*, *bont/B*, *bont/E* a *bont/F* [16] podľa CEN ISO / TS 17919: 2013.

Genetická analýza

Za účelom ďalších molekulárno-biologických analýz boli vykultivované kmene *C. botulinum* prepravené do Konzultačného laboratória pre klostrídiá produkujúce neurotoxíny (botulizmus, tetanus), ktoré sa predtým nazývalo Konzultujúcim laboratóriom pre *Clostridium botulinum*, do Robert Koch Inštitútu (RKI) v Berlíne v Nemecku. Izoláty sa kultivovali v médiu tryptón-peptón-glukóza-kvasnicový extrakt (TPGY) pri 32°C v anaeróbnej pracovnej stanici (MG500, Don Whitley, Shipley, Spojené kráľovstvo) a testovali sa na prítomnosť *bont/A-G* multiplexnou kvantitatívnou PCR [17]. Okrem toho sa testovala prítomnosť génu *ntnh* pomocou kvantitatívnej PCR ako náhradný marker pre *Clostridium* spp. produkujúce BoNT [18]. Na ďalšie skúmanie zloženia génového zoskupenia BoNT bola použitá skupina šiestich konvenčných PCR zameraných na tri gény *ha* a tri *orfX* gény [19]. Produkcia toxínu v supernatantoch bola potvrdená internými ELISA testami, ktoré sú popísané v predošlých publikáciách [20, 21].

Sekvencie 16S rRNA a *bont/A* boli získané Sangerovým sekvenovaním [22]. Sekvencie boli zostavené a porovnávané s databázou GenBank v Národnom centre pre biotechnologické informácie v Spojených Štátoch prostredníctvom softvérových balíkov Geneious (Biomatters Limited, Auckland, Nový Zéland) pomocou algoritmu BLAST [23]. Aminokyselinová sekvencia

BoNT bola v rámci subtypizácie porovnaná s ôsmimi známymi subtypmi BoNT/A [4]. Sekvencie subtypov BoNT/A boli odoslané do Geneious a párové identity sekvencií boli vypočítané pomocou algoritmu MAFFT [24]. Na porovnanie boli vybrané BoNT subtypy nasledujúcich kmeňov BoNT, ktoré v minulosti spôsobili alimentárny botulizmus (okrem BoNT/A4, pochádzajúceho z prípadu detského botulizmu): BoNT/A1 (HA klaster) kmeň ATCC3502 (AM412317); BoNT/A1 (orfX klaster) kmeň NCTC2916 (X52066); BoNT/A2 (orfX klaster) kmeň Mascarpone (DQ310546); BoNT/A3 (orfX klaster) kmeň Loch Maree (CP000963); BoNT/A4 (orfX klaster) kmeň 657 (EU341307); BoNT/A5 (HA klaster) kmeň 1430.11 (KC683799); BoNT/A6 (orfX klaster) kmeň CDC41370 (FJ981696); BoNT/A7 (neznámy klaster) kmeň 2008–148 (JQ954969); BoNT/A8 (orfX klaster) kmeň Chemnitz (KM233166).

Ďalšie mikrobiologické vyšetrenie

S cieľom identifikovať ďalšie potenciálne kontaminované výrobky toho istého dátumu výroby a tej istej šarže, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici (RÚVZ BB) prešetril dostupnosť produktov v niekoľkých miestnych supermarketoch a u výrobcu. Tri cícerové nátierky s rovnakým dátumom spotreby boli umiestnené do termostatu na 37 ° C na niekoľko dní, aby sa dosiahli vhodné podmienky pre rast *C. botulinum*/*C. sporogenes* a vhodné na tvorbu spór.

Epidemiologické vyšetrenie

Výsledky z rozhovoru ukázali, že v deň 0 pacient sám jedol na raňajky miešané vajcia; pacient, blízky príbuzný a priateľ konzumovali na obed rovnaké jedlo pripravené z húb v smotanovej omáčke s cestovinami; pacient sám jedol na večeru cícerovú nátierku. Rozhovor s pacientom a blízky príbuzným odhalil, že jedna nátierka pred otvorením vykazovala známky produkcie plynu nakoľko bola nafúknutá. Avšak podľa pacienta mala normálnu chuť. Epidemiológovia ohlásili prípad Štátnej veterinárnej a potravinovej správe SR a tri takmer prázdne obaly z cícerovej nátierky ako aj dve neotvorené balenia koložvárskej kapusty od rovnakého výrobcu boli odoslané na laboratórnu analýzu na RÚVZ BB. Prešetrovanie vo výrobnej spoločnosti odhalilo, že produkt pozostával z nasledujúcich zložiek: cícer, tofu, repkový olej, cibuľa, soľ, kukuričný škrob a korenie. Dodatočne bolo došetrené, že cícer pochádzal z Brazílie alebo Argentíny.

Laboratórne vyšetovanie

Laboratóriá RÚVZ BB dostali na analýzu potraviny z pacientovej domácnosti, medzi nimi aj tri otvorené takmer prázdne cícerové nátierky. Boli z nich izolované tri kmene s morfológiou typickou pre *C. botulinum* (označené ako Banská Bystrica, RAPH1223j a RAPH1224), z ktorých každá bola z jedného obalu. Dve z nich, Banská Bystrica a RAPH1223j, boli PCR-pozitívne na prítomnosť génu *bont/A*. Koložvárska kapusta bola negatívna na prítomnosť *C. botulinum*. V deň 7, hneď ako boli k dispozícii prvé výsledky, bola cícerová nátierka stiahnutá z trhu a bolo dané varovanie prostredníctvom systému rýchleho varovania Európskej komisie pre potraviny a krmivá (RASFF). Tri neotvorené cícerové nátierky s rovnakým dátumom výroby, ktoré boli získané dodatočne, boli podrobené skladovaniu pri 37°C. Mikrobiologická analýza a PCR testy neodhalili prítomnosť *C. botulinum* alebo *C. sporogenes*, napriek niektorým príznakom tvorby plynu počas skladovania.

Molekulárno-biologická charakterizácia izolovaných kmeňov

Sekvenácia 16S rRNA, ktorá bola vykonaná v RKI, odhalila, že všetky tri izoláty (kmeňov Banská Bystrica, RAPH1223j a RAPH1224) patrili ku skupine *C. botulinum* skupiny I/*C. sporogenes* (> 99% identita), ktoré sú takmer nerozlíšiteľné na úrovni sekvencie 16S rRNA [2,25]. Prítomnosť génov *bont/A* a *ntnh* bola potvrdená kvantitatívnou PCR a expresia toxínu bola preukázaná interným ELISA postupom využívaným v RKI, pre izoláty Banská Bystrica a RAPH1223j. Z dvoch izolátov pozitívnych na BoNT/A boli získané sekvencie BoNT/A a porovnané s databázou GenBank na úrovni nukleotidov a aminokyselín. Nakoľko u toxigénnych izolátov (Banská Bystrica a RAPH1223j) bolo zistené, že obsahujú gén *bont/A* rovnakej sekvencie len sekvencia *bont/A* kmeňa „Banská Bystrica“, bola vložená do databázy GenBank pod prístupovým číslom KU376389. Ukázala najvyššiu identitu ($\geq 99,9\%$) s neobvyklým subtypom BoNT/A3. Tabuľka 1 sumarizuje percento príbuznosti s jednotlivými subtypmi BoNT/A na úrovni aminokyselín.

Tabuľka 1: Percentuálne vyjadrenie identity na úrovni nukleotidov a aminokyselín kmeňa *Clostridium botulinum* skupiny I., kmeň Banská Bystrica^a, ktorý patrí do subtypu BoNT/A3, s kmeňmi *C. botulinum*, ktoré patria do ostatných subtypov BoNT/A^b.

	Botulotoxínový subtyp								
	A1	A1(B)	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Typ klastra	HA	orfX	orfX	orfX	orfX	HA	orfX	neznámy	orfX
Kmeň	ATCC3502	NCTC2916	Mascarpone	Loch Maree	657	1430.11	CDC41370	2008–148	Chemnitz
Nukleotidová úroveň	92.0%	91.9%	96.3%	99.9%	91.5%	92.2%	92.8%	91.9%	93.1%
Úroveň aminokyselín	84.6%	84.5%	92.9%	99.8%	84.3%	85.2%	86.3%	84.9%	87.7%

BoNT: botulotoxín.

^a Nakoľko oba BoNT/A pozitívne izoáty mali identickú sekvenciu, do databázy GenBank bol vložený len izolát (kmeň) Banská Bystrica označený číslom KU376389.

^b Pre každý subtyp (alimentárny botulizmus, okrem subtypu A4, ktorý bol izolovaný z prípadu detského botulizmu) bol porovnávaný vždy len jeden príklad.

V porovnaní s prototypom BoNT/A1 vykazovali nové pozitívne izoláty BoNT/A (Banská Bystrica a RAPH1223j) na úrovni aminokyselín iba 84,6% zhodu v porovnaní s BoNT/A1 kmeňom ATCC3502, HA klastra alebo 84,5% v porovnaní s kmeňom BoNT/A1 NCTC2916 orfX klastra). Podobne nízka zhoda na úrovni aminokyselín (medzi 84,3% a 87,7%) bola zistená v porovnaní s BoNT subtypmi A4-A8, zatiaľ čo identita na úrovni aminokyselín so subtypom A2 (kmeň Mascarpone) bola 92,9%. Identity sekvencií na úrovni nukleotidov boli všeobecne vyššie, ale stále sa rozchádzali až o 8,5%. Obidva izoláty (Banská Bystrica a RAPH1223j) boli negatívne pre gény *ha1*, *ha2* a *ha3* a pozitívne na gény *orfX1* alebo *orfX2* a *orfX3* pomocou PCR; To je v súlade s kmeňom Loch Maree BoNT/A3, v ktorom je gén *bont/A* umiestnený v klasteri orfX.

Diskusia

Naše laboratórne vyšetrenia podporujú klinicky stanovenú diagnózu alimentárneho botulizmu u pacienta, spôsobeného netradičným subtypom A3. Ide len o druhý prípad, kedy sa tento netradičný subtyp podieľal na vzniku alimentárneho botulizmu. V prvom prípade išlo o kontamináciu kačacej nátierky a zahynulo 8 ľudí, bolo to v Škótsku v Loch Maree (1922) [26]. Žiadny iný kmeň patriaci k tomuto špecifickému podtypu A3 nebol izolovaný ani subtypovaný takmer sto rokov, kým Lúquez a jeho kolegovia v roku 2012 neizolovali tri kmene z Argentíny (v pôde a šaláte) [27]. Zaujímavé je, že oba BoNT/A pozitívne kmene izolované z cicerovej nátierky majú identickú sekvenciu BoNT/A na úrovni aminokyselín ako jeden z kmeňov (CDC54054) izolovaných z argentínskej pôdy [27]. Zistilo sa, že cícer použitý na výrobu nátierky, ktorú pacient skonzumoval, pochádzal z Južnej Ameriky z Argentíny resp. z Brazílie.

Spočiatku nebolo možné podozrenie na botulizmus potvrdiť nakoľko výplach žalúdka bol odobratý až v deň 2. Vzhľadom na kyslosť a proteolytickú aktivitu ako aj na dĺžku skladovania pred samotným vyšetrením možno výplach žalúdka považovať za neadekvátnu vzorku. Vzorky séra a stolice, ktoré sú najoptimálnejšími vzorkami na potvrdenie ochorenia a diagnostické testovanie [28] bohužiaľ neboli odobraté, kvôli nedostatku testovacích zariadení a skúseného klinického personálu, najmä preto, že botulizmus je zriedkavé ochorenie a žiadne prípady neboli na Slovensku notifikované od roku 2012 [15]. Pre lekára je dôležité zväžiť optimálne načasovanie pri výbere vzoriek na diagnostiku botulizmu. Napriek

preukázaniu BoNT v sére ako jedného z kľúčových testov na potvrdenie botulizmu, časové obdobie, počas ktorého môže byť BoNT detekované zo séra, je zvyčajne obmedzené na prvé dni po perorálnom požití. Potvrdenie *Clostridium* spp. produkujúceho BoNT (spóry) z fekálií sa však často dá dosiahnuť počas dlhšieho obdobia (až do dvoch týždňov) [28,29]. Preto sa odporúča koproexaminácia s cieľom potvrdiť klinické prípady alimentárneho botulizmu [28-31]. Samotná detekcia *C. botulinum* zo stolice bez klinických príznakov neznamena prítomnosť botulizmu, pretože spóry *C. botulinum* sa zvyčajne nezistia v stolici zdravých ľudí. Avšak v zriedkavých prípadoch môžu byť spóry, ktoré boli požitie s prírodne kontaminovanými potravinami (napríklad med, čerstvá zelenina), zistené vo výkaloch inak zdravých ľudí [28].

V našom prípade išlo o prípad alimentárneho botulizmu s potvrdenou izoláciou *C. botulinum* v dvoch z troch spotrebovaných cicerových nátierok. Je vždy ťažké vylúčiť, že nedošlo ku skríženej kontaminácii potravín v domácnosti manipuláciou s kuchynským riadom alebo inou kontaminovanou potravinou. V tomto prípade však neexistoval žiadny náznak toho, že by mohla byť cicerová nátierka kontaminovaná. Po ukončení analýzy boli tri neotvorené nátierky s rovnakým dátumom spotreby kultivované pri 37°C a analyzované na prítomnosť *C. botulinum*, avšak bez akéhokoľvek pozitívneho výsledku. Nie je však nezvyčajné, že *C. botulinum* nie je možné zistiť zo žiadnej inej položky rovnakej šarže. V troch ohniskách v Európe v roku 2011, ktoré zahŕňali komerčnú olivovú pastu, mandľami plnené olivy a korma omáčku, boli *C. botulinum* a BoNT identifikovateľné len z jednej alebo dvoch otvorených pohárov z domácností, ale nie z neotvorených nádob tej istej šarže (pričom testovanie pozostávalo z 60, 900 resp. 1836 položiek) [11,32-34]. Tieto prípady naznačujú, že ani v modernej industrializovanej potravinárskej výrobe nemôže byť úplne vylúčená kontaminácia jedného alebo veľmi malého počtu položiek v rámci jednej šarže. Vo všetkých týchto prípadoch bola ochrana spotrebiteľa najvyššou prioritou a stiahnutie potravín z trhu bolo vydané výlučne na základe pozitívnych výsledkov z otvorených nádob z postihnutých domácností s cieľom zabrániť možnému šíreniu choroby [32-34].

Cícer sa aj v minulosti podieľal na vzniku alimentárneho botulizmu, pravdepodobne kvôli nesprávnej skladovacej teplote [35]. To, či sa to stalo v tomto prípade nebolo možné určiť, v každom prípade pacient si všimol, že výrobky vykazovali tvorbu plynu. To môže naznačovať kazenie a rast *C. botulinum* v produktoch, ktorý je často spojený s produkciou plynu, napr.

peniace a vypuklé konzervy resp. víčka [36]. Na rozdiel od kmeňov skupiny II. *C. botulinum*, ktoré môžu rásť pri nižších teplotách, kmene skupiny I (ku ktorým patria aj nami izolované kmene) vyžadujú rastové teploty nad 10°C [2]. To naznačuje, že cícerová nátierka mohla byť čiastočne skladovaná pri teplotách vyšších ako sú v chladničke.

V porovnaní so známymi podtypmi BoNT/A (BoNT/A1 až BoNT/A8 [4]) je subtyp A3 veľmi vzácny a najviac odlišný od prototypu BoNT/A1 (tabuľka 1) pričom vykazuje až 15,4%nú odlišnosť na úrovni aminokyselín a 8%nú odlišnosť na úrovni nukleotidov. Najmä kvôli rozdielnosti na úrovni aminokyselín je známe, že BoNT/A3 je menej účinne neutralizovaný polyklonálnymi protilátkami generovanými proti BoNT/A1 [37]. To nás vedie ku záverom, že dlhodobé neurologické príznaky pozorované u pacienta napriek podaniu troch dávok trivalentného antitoxínu môžu byť aspoň čiastočne spôsobené suboptimálnou neutralizáciou antitoxínom, ktorá je zameraná proti BoNT/A1.

Ojedinelosť a rozdielnosť subtypu BoNT/A3 predstavuje riziko, že sa nedá zistiť pomocou imunologických alebo sekvenčných diagnostických testov, ktoré proti nemu neboli vyvinuté. V skutočnosti sa už ukázalo, že jedna metóda ELISA ho nedokáže rozpoznať [38]. Okrem toho v jednej [39] zo štyroch spomínaných metód PCR v ISO /TS 17919: 2013 sekvencia primeru a sondy obsahuje jednu nezhodu so všetkými sekvenciami BoNT/A3. Tieto nezhody by mohli obmedziť identifikáciu kmeňov patriacich ku subtypu A3 zodpovedajúcou PCR [40,41]. Skúšobné laboratóriá by si mali byť vedomé toho, že kmene, ktoré majú tento vzácny subtyp, sa môžu vyskytnúť v európskych krajinách a odporúča sa, aby zodpovedajúcim spôsobom validovali svoje metódy. Bohužiaľ, výmena kmeňov produkujúcich BoNT a v niektorých prípadoch aj zdieľanie ich sekvencií sú veľmi obmedzené z dôvodu ich povahy a možnosti ich zneužitia za účelom bioterorizmu (dvojaké použitie) [42,43].

Záver

Zriedkavé a nové varianty sekvencie BoNT môžu zvlášť ľahko uniknúť detekcii pomocou sekvenčných alebo imunologických metód. Vzhľadom na fakt, že sú k dispozícii ďalšie sekvencie, napriek určitým obmedzeniam, diagnostické zariadenia by mali skontrolovať svoje metódy PCR, aby sa zabezpečilo zahrnutie všetkých známych sekvenčných variácií.

Vzhľadom na veľkú ojedinelosť týkajúcu sa výskytu botulizmu ako takého, mnohé laboratóriá nemajú žiadne alebo len individuálne testy na detekciu tohto agens. Špecializované

laboratóriá (napríklad Národné referenčné laboratóriá alebo Konzultačné laboratóriá) schopné uplatňovať širší rozsah metód by mohli pomôcť týmto laboratóriám, ale laboratóriá zodpovedné za testovanie vzoriek ich často nevedia ľahko identifikovať.

PodĎakovanie

Ďakujeme: Ewa Schlereth a Kathrin Grunow za vynikajúcu technickú pomoc. Ďakujeme: Ursula Erikli a Rebecca Surtees za kopírovanie. Ďakujeme: laboratóriu Zdravotného ústavu Ostrava za vyšetrenie prítomnosti botulotoxínu pokusom na myšiach.

Konflikt záujmov

Neboli deklarované žiadne konflikty záujmov.

Príspevky autorov

Lucia Madarová: laboratórne vyšetovanie, prehľad literatúry, návrh rukopisu.

Brigitte G Dorner: Kritické preskúmanie rukopisu.

Lars Schaade: dohľad nad laboratórnymi výsledkami a kritické preskúmanie rukopisu.

Vladimír Donáth: dohľad nad liečbou pacienta a kritická kontrola rukopisu.

Mária Avdičová: epidemiologické vyšetovanie.

Milota Fatkulínová: laboratórne vyšetovanie.

Jozef Strhársky: laboratórne vyšetovanie.

Ivana Sedliačiková: epidemiologické vyšetovanie.

Cyril Klement: dohľad nad laboratórnymi výsledkami a kritickým preskúmaním rukopisu.

Martin B Dorner: mikrobiologické a molekulárne biologické vyšetovanie, prehľad literatúry, návrh rukopisu.

Zoznam použitej literatúry

1. Johnson EA, Montecucco C. Botulism. *Handb Clin Neurol*. 2008;91:333-68. DOI: 10.1016/S0072-9752(07)01511-4 PMID: 18631849
2. Peck MW. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Adv Microb Physiol*. 2009;55:183-265, 320. DOI: 10.1016/S0065-2911(09)05503-9 PMID: 19573697
3. Williamson CH, Sahl JW, Smith TJ, Xie G, Foley BT, Smith LA, et al. Comparative genomic analyses reveal broad diversity in botulinum-toxin-producing *Clostridia*. *BMC Genomics*. 2016;17(1):180. DOI: 10.1186/s12864-016-2502-z PMID: 26939550
4. Kull S, Schulz KM, Weisemann J, Kirchner S, Schreiber T, Bollenbach A, et al. Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116381. DOI: 10.1371/journal.pone.0116381 PMID: 25658638
5. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins (Basel)*. 2017;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038 PMID: 28106761
6. Montecucco C, Rasotto MB. On botulinum neurotoxin variability. *MBio*. 2015;6(1):e02131-14. DOI: 10.1128/mBio.02131-14 PMID: 25564463
7. Rummel A. The long journey of botulinum neurotoxins into the synapse. *Toxicon*. 2015;107(Pt A):9-24. DOI: doi: 10.1016/j.toxicon.2015.09.009 PMID: 26363288

8. Dorner MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG. Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;364:219-55. DOI: 10.1007/978-3-662-45790-0_11 PMID: 23239356
9. Siegel L. Destruction of Botulinum Toxins in Food and Water. In: Hauschild A, Dodds K, editors. *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. New York: Marcel Dekker Inc; 1992. p. 323-41.
10. Weingart OG, Schreiber T, Mascher C, Pauly D, Dorner MB, Berger TFH, et al. The case of botulinum toxin in milk: experimental data. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(10):3293-300. DOI: 10.1128/AEM.02937-09 PMID: 20363798
11. Cowden J. Food-borne Clostridium botulinum intoxication from mass produced foodstuffs in Europe. *Euro Surveill*. 2011;16(49):20033. PMID: 22172328
12. Peck MW, Stringer SC, Carter AT. Clostridium botulinum in the post-genomic era. *Food Microbiol*. 2011;28(2):183-91. DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.005 PMID: 21315972
13. Lindström M, Vuorela M, Hinderink K, Korkeala H, Dahlsten E, Raahenmaa M, et al. Botulism associated with vacuum-packed smoked whitefish in Finland, June-July 2006. *Euro Surveill*. 2006;11(7):E060720.3. PMID: 16966764
14. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Table 1. Reported confirmed botulism cases: number and rate per 100 000 population, EU/EEA, 2010–2014. Stockholm: ECDC. [Accessed 13 Jul 2017]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/table-1-reported-confirmed-botulism-cases-number-and-rate-100-000-population>
15. Public Health Authority of the Slovak Republic (UVZSR). Analýza epidemiologickej situácie a činnosti odborov epidemiológie v Slovenskej republike za rok 2012. Z poverenia hlavného hygienika SR vypracovali pracovníci RÚVZ so sídlom v Banskej Bystrici. [Analysis of epidemiological situation and the activities of the departments of epidemiology in Slovak Republic in 2012. Drafted by the epidemiologists on behalf of Chief Public Health Officer of Slovak Republic]. Bratislava: UVZSR. [Accessed 20 Jul 2017]. Slovak. Available from: www.epis.sk/InformacnaCast/Publikacie/VyrocneSpravy/Files/VS_SR_2012.aspx
16. De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, Lindström M, Messelhäuser U, Aldus CF, et al. Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(20):6457-61. DOI: 10.1128/AEM.00805-09 PMID: 19684163
17. Kirchner S, Krämer KM, Schulze M, Pauly D, Jacob D, Gessler F, et al. 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(13):4387-95. DOI: 10.1128/AEM.02490-09 PMID: 20435756
18. Raphael BH, Andreadis JD. 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(3):343-6. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.09.016 PMID: 17961766
19. Jacobson MJ, Lin G, Raphael B, Andreadis J, Johnson EA. Analysis of neurotoxin cluster genes in Clostridium botulinum strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(9):2778-86. DOI: 10.1128/AEM.02828-07 PMID: 18326685
20. Pauly D, Kirchner S, Stoermann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, et al. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst (Lond)*. 2009;134(10):2028-39. DOI: 10.1039/b911525k PMID: 19768210
21. Simon S, Fiebig U, Liu Y, Tierney R, Dano J, Worbs S, et al. Recommended immunological strategies to screen for botulinum neurotoxin-containing samples. *Toxins (Basel)*. 2015;7(12):5011-34. DOI: 10.3390/toxins7124860 PMID: 26703727
22. Hill KK, Smith TJ, Helma CH, Ticknor LO, Foley BT, Svensson RT, et al. Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol*. 2007;189(3):818-32. DOI: 10.1128/JB.01180-06 PMID: 17114256
23. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2 PMID: 2231712
24. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-80. DOI: 10.1093/molbev/mst010 PMID: 23329690
25. Weigand MR, Pena-Gonzalez A, Shirey TB, Broeker RG, Ishaq MK, Konstantinidis KT, et al. Implications of genome-based discrimination between Clostridium botulinum Group I and Clostridium sporogenes strains for bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(16):5420-9. DOI: 10.1128/AEM.01159-15 PMID: 26048939

26. Scottish Board of Health. Botulism at Loch Maree. *Analyst (Lond)*. 1923;48(564):118-20. DOI: 10.1039/an9234800118
27. Lúquez C, Raphael BH, Joseph LA, Meno SR, Fernández RA, Maslanka SE. Genetic diversity among *Clostridium botulinum* strains harboring bont/A2 and bont/A3 genes. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(24):8712-8. DOI: 10.1128/AEM.02428-12 PMID: 23042179
28. Dowell VR, McCroskey LM, Hatheway CL, Lombard GL, Hughes JM, Merson MH. Coproexamination for botulinal toxin and *Clostridium botulinum*. A new procedure for laboratory diagnosis of botulism. *JAMA*. 1977;238(17):1829-32. DOI: 10.1001/jama.1977.03280180033021 PMID: 333132
29. Caya JG, Agni R, Miller JE. *Clostridium botulinum* and the clinical laboratorian: a detailed review of botulism, including biological warfare ramifications of botulinum toxin. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(6):653-62. PMID: 15163234
30. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):298-314. DOI: 10.1128/CMR.19.2.298-314.2006 PMID: 16614251
31. European Commission. Commission Decision 2002/253/EC of 19 March 2002 laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 03.04.2002: L 086. Available from: <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/253/oj>
32. Browning LM, Prempeh H, Little C, Houston C, Grant K, Cowden JM, United Kingdom Botulism Incident Management Team. An outbreak of food-borne botulism in Scotland, United Kingdom, November 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(49):20036. PMID: 22172331
33. Jalava K, Selby K, Pihlajasaari A, Kolho E, Dahlsten E, Forss N, et al. Two cases of food-borne botulism in Finland caused by conserved olives, October 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(49):20034. PMID: 22172330
34. Pingeon JM, Vanbockstael C, Popoff MR, King LA, Deschamps B, Pradel G, et al. Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France, September 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(49):20035. PMID: 22172329
35. Peck MW, Goodburn KE, Betts RP, Stringer SC. Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. *Trends Food Sci Technol*. 2008;19(4):207-16. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.12.006
36. Lindström M, Korkeala H. Food-borne Pathogenic Clostridia. In: Tham W, Danielsson-Tham ML, editors. *Food Associated Pathogens*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2013. p. 67-87
37. Tepp WH, Lin G, Johnson EA. Purification and characterization of a novel subtype A3 botulinum neurotoxin. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(9):3108-13. DOI: 10.1128/AEM.07967-11 PMID: 22367089
38. Gibson AM, Modi NK, Roberts TA, Shone CC, Hambleton P, Melling J. Evaluation of a monoclonal antibody-based immunoassay for detecting type A *Clostridium botulinum* toxin produced in pure culture and an inoculated model cured meat system. *J Appl Bacteriol*. 1987;63(3):217-26. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1987.tb04939.x PMID: 3323154
39. Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP, Popoff MR. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(1):389-92. PMID: 7887623
40. Boyle B, Dallaire N, MacKay J. Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnol*. 2009;9(1):75. DOI: 10.1186/1472-6750-9-75 PMID: 19715565
41. Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(5):1660-3. DOI: 10.1128/AEM.02403-07 PMID: 18192413
42. Bhattacharjee Y. Biosecurity. Panel selects most dangerous select agents. *Science*. 2011;332(6037):1491-2. DOI: 10.1126/science.332.6037.1491 PMID: 21700845
43. Hooper DC, Hirsch MS. Novel *Clostridium botulinum* toxin and dual use research of concern issues. *J Infect Dis*. 2014;209(2):167. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit528> DOI: 10.1093/infdis/jit528 PMID: 24106293