erasmus
HOGESCHOOL BRUSSEL

Bachelorproef

Optimalisatie van een isolatieprotocol en een protocol voor het genereren van kwalitatieve DNA-extracten voor de karakterisering van *Clostridium botulinum*

Sciensano Foodborn Pathogenes, Juliette Wytsmanstraat 14
1050 Brussel, België
Ir. Julie Linussio (Mahdi Ben Salah)

Chehrazad Rahouti

Departement Gezondheid, Design & Technologie

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2023-2024

erasmus
HOGESCHOOL BRUSSEL

Bachelorproef

Optimalisatie van een isolatieprotocol en een protocol voor het genereren van kwalitatieve DNA-extracten voor de karakterisering van *Clostridium botulinum*

Sciensano Foodborn Pathogenes, Juliette Wytsmanstraat 14
1050 Brussel, België
Ir. Julie Linussio (Mahdi Ben Salah)

Chehrazad Rahouti

Departement Gezondheid, Design & Technologie

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

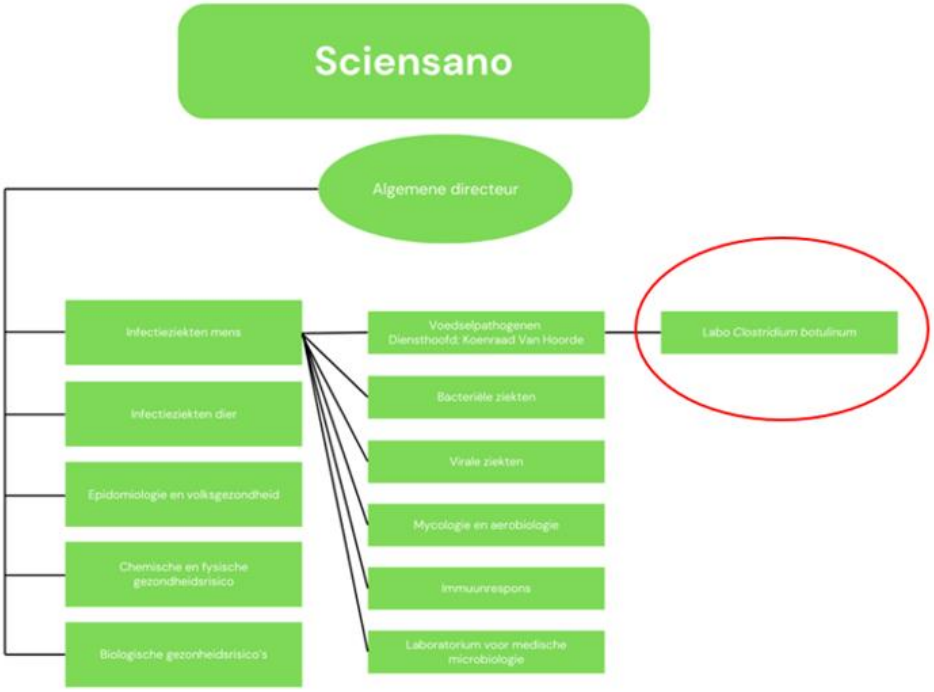
Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2023-2024

1. VOORWOORD

Het afronden van deze bachelorproef markeert een belangrijke mijlpaal in mijn academische reis, en ik ben oprecht verheugd om dit voorwoord te schrijven. Dit werk vertegenwoordigt niet alleen de afronding van mijn opleiding, maar ook een periode van intense toewijding, groei en ontdekking.

Ik kreeg de kans om mijn bachelorproef bij Sciensano uit te voeren, waarbij ik de mogelijkheid kreeg om stage te lopen bij de afdeling Voedselpathogenen in het laboratorium *Clostridium botulinum* (Figuur 1). Deze dienst bood mij de kans om mijn kennis en vaardigheden toe te passen in een professionele omgeving en tegelijkertijd bij te dragen aan belangrijk onderzoek op het gebied van voedselpathogenen. Tijdens mijn stageperiode heb ik me verdiept in diverse aspecten van voedsel microbiologie en pathogenen detectie, en heb ik kunnen samenwerken met deskundige professionals binnen het vakgebied. Deze ervaring heeft mijn passie voor het vakgebied versterkt en heeft mij waardevolle inzichten gegeven die ik zal meenemen in mijn verdere academische en professionele carrière.



Figuur 1. Organigram van Sciensano met gemarkeerd laboratorium.

Ten eerste wil ik mijn oprechte dank uitspreken aan mijn stagepromotor, Ir. Julie Linussio en aan mij co-promotor Mahdi Ben Salah, voor hun onschatbare begeleiding, ondersteuning en expertise gedurende de hele bachelorproef. Hun waardevolle inzichten, aanmoediging en kritische feedback hebben dit onderzoek gevormd en verrijkt.

Graag wil ik ook deze gelegenheid aangrijpen om mijn oprechte dankbaarheid uit te drukken aan mijn stagebegeleider, mevrouw De Goeyse, voor haar onschatbare begeleiding, mentorship en ondersteuning gedurende mijn stageperiode. Door haar inspirerende begeleiding heb ik waardevolle ervaringen opgedaan, nieuwe inzichten verworven en belangrijke vaardigheden ontwikkeld die van grote waarde

zullen zijn voor mijn toekomstige carrière. Ik ben dankbaar voor de tijd en moeite die ze heeft geïnvesteerd om mij te begeleiden.

Met trots wil ik mijn dank uitspreken aan het hele team van voedselpathogenen, Fadwa El Kahioui, Thaïs Theeten, Isabelle Rio, Celine De Sterck, Tom Van Nieuwenhuysen,… wier collectieve inspanningen en toewijding dit onderzoek mogelijk hebben gemaakt. Jullie expertise, samenwerking en toewijding hebben een onschatbare bijdrage geleverd aan elke fase van dit project.

Ik wil graag mijn dankbaarheid uitspreken aan Sciensano voor het verschaffen van de nodige middelen en faciliteiten om dit onderzoek mogelijk te maken. Daarnaast wil ik mijn dank uitspreken aan het hele team van Sciensano voor hun warme ontvangst, samenwerking en bereidheid om kennis te delen.

Ik wil graag mijn oprechte dank uitspreken aan Erasmushogeschool Brussel voor de waardevolle leerervaringen, de toegang tot hoogwaardig onderwijs en de mogelijkheden voor persoonlijke en professionele groei die zij mij hebben geboden tijdens mijn studie. Hun toewijding aan excellentie en ondersteuning heeft mijn academische reis verrijkt en mij geholpen mijn doelen te bereiken.

Ik wil ook mijn dankbaarheid uiten aan mijn medestudenten en vrienden die mij hebben gesteund tijdens deze uitdagende periode. Hun aanmoediging, discussies en samenwerking hebben mijn academische reis verrijkt en versterkt.

Mijn diepste dank gaat uit naar mijn familie voor hun onvoorwaardelijke steun, begrip en aanmoediging gedurende mijn hele studie. Hun liefde en steun hebben mij gemotiveerd om te blijven streven naar academische excellentie.

Ten slotte wil ik alle anderen bedanken die op de een of andere manier hebben bijgedragen aan dit onderzoek, groot of klein. Jullie bijdragen hebben dit werk verrijkt en versterkt. Dit werk is het resultaat van de inspanningen en toewijding van velen, en ik ben dankbaar voor de steun die ik heb ontvangen. Het is mijn oprechte hoop dat dit onderzoek bijdraagt aan het grotere academische discours en aan verdere ontdekkingen binnen dit vakgebied.

INHOUDSOPGAVE

1. Voorwoord 4
2. Afkortingslijst 8
3. Samenvatting (Nl) 10
4. Abstract (Eng) 13
5. Inleiding 15
6. Literatuurstudie 16
   6.1. Clostridium botulinum 16
      6.1.1. Classificatie 16
      6.1.2. Subclassificatie 16
   6.2. Botulisme 18
      6.2.1. Fysiopathologie van botulisme 18
      6.2.2. Meest voorkomende vormen van botulisme 20
      6.2.3. Andere varianten van botulisme 20
   6.3. Symptomatologie 22
   6.4. Procedure voor detectie en identificatie van *Clostridium botulinum* en BoNT 23
   6.5. Therapie 24
7. Isolatie van *C. botulinum* 26
   7.1. Doel en principe 26
      7.1.1. Isolatie 26
      7.1.2. DNA-extractie 27
   7.2. Materiaal en methode 29
      7.2.1. materiaal 29
      7.2.2. bereiding Media 29
      7.2.3. Verversen van een cultuur 30
      7.2.4. Onbehandelde methode 30
      7.2.5. Behandelde methode (Sporenselectie) 31
      7.2.6. Dna-extractie 31
   7.3. Resultaten en discussie 34
      7.3.1. Onbehandelde methode vs behandelde methode 34
      7.3.2. Speciale gevallen 36
      7.3.3. DNA-extractie en PCR 38

7.4. Conclusie 42
8. DNA-extractie van *C. botulinum* culturen 44
8.1. Doel en principe 44
8.1.1. DNA-extractie 44
8.1.2. Kwaliteitsbepaling van het DNA 44
8.1.3. Sequencing 45
8.2. Materiaal en methode 45
8.2.1. materiaal 45
8.2.2. Dna-extractie 46
8.2.3. Concentratie- en kwaliteitsbepaling van het DNA 46
8.2.4. Sequencing 48
8.3. Resultaten en bespreking 50
8.3.1. Concentratie- en zuiverheidbepaling 50
8.4. Conclusie 55
9. Algemene conclusie 58
10. Referenties 59
11. Bijlage 65

2. AFKORTINGSLIJST

BHI	Brain Heart Infusion
BoNT	Botulineneurotoxine
BoNT/A	Botulineneurotoxine type A
BoNT/B	Botulineneurotoxine type B
BoNT/C	Botulineneurotoxine type C
BoNT/CD	Botulineneurotoxine mozaïektype CD
BoNT/D	Botulineneurotoxine type D
BoNT/DC	Botulineneurotoxine mozaïektype DC
BoNT/E	Botulineneurotoxine type E
BoNT/F	Botulineneurotoxine type F
BoNT/G	Botulineneurotoxine type G
C. baratii	*Clostridium baratti*
C. botulinum	*Clostridium botulinum*
C. butyricum	*Clostridium butyricum*
Ct-waarde	Cyclus-Threshold waarde
DNA	Desoxyribonucleïnezuur (Engels : DeoxyriboNucleic Acid)
dH_2O	Gedemineraliseerd water
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Elektroforese
PUC	Interne Inhibitie Controle
Ref.	Referentienummer
RFU	Relative Fluorescence Unit
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SNAP	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-Attachment Protein
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-Attachment protein REceptor

TBE-buffer	Tris-Boraat EDTA buffer
TE-buffer	Tris-EDTA buffer
TPGY	Tryptone Peptone Glucose Yeast extract broth
WGS	Whole Genome Sequencing

3. SAMENVATTING (NL)

Samenvatting van

"Optimalisatie van een isolatieprotocol en een protocol voor het genereren van kwalitatieve DNA-extracten voor de karakterisering van *Clostridium botulinum*"

Chehrazad Rahouti

Ir. Julie Linussio (Mahdi Ben Salah)

Mevrouw Ine De Goeyse

Achtergrond

Clostridium botulinum (*C. botulinum*), een Gram-positieve, sporenvormende anaerobe bacterie, is berucht als een van de meest gevaarlijke voedselpathogenen vanwege zijn productie van het botulineneurotoxine (BoNT), een van de krachtigste gekende biologische neurotoxinen bij de mens. De sporen van *C. botulinum* zijn alomtegenwoordig in de omgeving en zijn bovendien gekend erg resistent te zijn. Door hun vermogen te kiemen (en toxine te produceren) in diverse voedselbronnen met een lage zuurgraad (pH>4.6) en weinig zuurstof, zoals ingeblikte voedingsmiddelen en gerookt vlees, vormt het een ernstig risico voor de volksgezondheid. Desondanks, blijft de isolatie van deze pathogeen erg moeilijk en lukt dit enkel in gespecialiseerde laboratoria. Een reden hiervoor is dat een goed selectief medium tot op dit moment nog niet gevonden werd. Dit onderzoek focust op de optimalisatie van een protocol voor de isolatie, cultivering en DNA extractie om verdere karakterisering van *C. botulinum* isolaten via WGS mogelijk te maken.

Doel

Het eerste deel van het project richt zich op het isoleren van *C. botulinum* uit bewaarde aanrijkingsculturen van positieve monsters. Het tweede deel omvat het optimaliseren van cultuurparameters voor het kweken van *C. botulinum* en vervolgens het extraheren van DNA van voldoende kwaliteit voor zowel short-read als long-read whole-genome sequencing (WGS).

Methode

Het isolatieproces van *C. botulinum* omvat ruwweg twee werkwijzen: één zonder selectie van resistente sporen en één met selectie van resistente sporen. Beide werkwijzen starten met het vernieuwen van oude aanrijkingsculturen in vers medium, gevolgd door incubatie en daaropvolgende DNA-extractie en PCR om de aanwezigheid van het bont-gen na te gaan. Optioneel, wordt de cultuur nu onderworpen aan een extra selectiestap waarbij door middel van een hitte- of ethanolbehandeling resistente sporen behouden worden en al de rest (vegetatieve cellen + minder resistente sporen) afgedood wordt. Vervolgens worden de culturen geïnoculeerd op Egg Yolk Agar (EYA) platen, waarbij gewenste kolonies na incubatie visueel geselecteerd worden op basis van hun vermogen om lipase te produceren. Deze kolonies kunnen

geïdentificeerd worden doordat ze een regenboogachtige schijn vertonen. Geselecteerde kolonies worden onderworpen aan PCR voor detectie van het bont-gen. Indien mogelijk, worden twee positieve kolonies per monster geselecteerd voor verdere cultivering en worden opnieuw geënt op EYA-platen. Ten slotte wordt nog een laatste PCR uitgevoerd op een zuivere cultuur. Indien de stam zuiver is en via PCR de aanwezigheid van het bont-gen aangetoond kan worden, wordt de stam toegevoegd aan de stammencollectie van het NRC.

In deel 2 van dit onderzoek, werd een heel aantal parameters uitgetest om een zo goed mogelijk DNA-extract te kunnen bekomen die voor WGS doeleinden gebruikt kan worden. Deze parameters omvatten groeimedia (TPGY, BHI), incubatieperiode (24 uur, 72 uur), extractievolume (1 ml, 1,5 ml) en concentratie aan lysozyme (25 mg/ml, 100 mg/ml). De Maxwell®-methode was hierbij de voorkeursmethode voor de DNA-extractie. De kwaliteit van het DNA-extract werd vervolgens beoordeeld aan de hand van zuiverheid (Nanodrop), DNA concentratie (Quantus™) en DNA fragmentering (PFGE). Tot slot, werden de DNA extracten gebruikt als input voor zowel short-read sequencing (Illumina) als long-read sequencing (MinION).

Resultaten

Uit het eerste deel van het experiment zijn diverse conclusies getrokken na de isolatie van *C. botulinum* uit 10 aanrijkingsculturen afkomstig van positieve stalen. Het isolatieprotocol werd geoptimaliseerd door verschillende parameters te evalueren. De aard van het monster, schoon of vuil, bleek cruciaal voor de keuze van de isolatiemethode, met een speciale aandacht voor sporenselectie bij vuile monsters zoals fecesstalen. Incubatie op EYA-platen vereiste meer tijd voor behandelde culturen, vooral vanwege de geselecteerde sporen. Het gebruik van een inoculum van 10 µl resulteerde in voldoende groei voor directe opslag, terwijl een inoculum van 1 µl onvoldoende groei opleverde en verdere overdracht noodzakelijk maakte. Speciale gevallen suggereerden mogelijk de isolatie van C. butyricum en benadrukten uitdagingen zoals de neiging tot het vormen van bacteriële tapijten en zuurstofreacties, die de isolatieprocedure bemoeilijken.

Het tweede deel richtte zich op het identificeren van optimale parameters voor cultivering en DNA-extractie, met variabelen zoals groeimedium, incubatietijd, extractievolume en lysozymeconcentratie. Een geoptimaliseerd werkschema (op basis van Nanodrop en Quantus™ -data) toonde aan dat TPGY een hogere DNA-opbrengst oplevert en dat een incubatieperiode van 24 uur voldoende is voor DNA van goede kwaliteit. Een extractievolume van 1,5 ml bleek gunstiger dan 1 ml, en een lysozymeconcentratie van 100 mg/ml werd verkozen boven 25 mg/ml vanwege lagere contaminatie. Tien monsters werden geselecteerd voor zowel Illumina- als MinION-sequencing. Het PFGE protocol dient nog verder geoptimaliseerd te worden aangezien er geen bruikbare resultaten gegenereerd konden worden. Er was onvoldoende tijd binnen de stageperiode om dit te kunnen afwerken.

Conclusie

Het eerste deel van het onderzoek richtte zich op het optimaliseren van het isolatieprotocol voor *C. botulinum* uit diverse aanrijkingsculturen van positieve monsters. Belangrijke parameters zoals de monstermatrix, incubatieperiode en inoculumomvang werden geëvalueerd. Het protocol werd toegepast op 11 positieve aanrijkingsculturen en bleek in 10 gevallen succesvol.

In deel 2 was het mogelijk een aantal cultuur- en DNA-extractieparameters te selecteren die goede resultaten gaven voor *C. botulinum* aan de hand van Nanodrop- en Quantus™-data. Verdere ontwikkeling van een PFGE protocol zal nog moeten gebeuren aangezien deze data binnen deze studie nog niet gegenereerd kon worden. De combinatie van een goed isolatie-, cultuur- en DNA extractieprotocol zijn enerzijds cruciaal voor de opbouw van een goed gekarakteriseerde stammencollectie maar anderzijds ook onmisbaar in het voedseluitbraakonderzoek waarbij stammen geïsoleerd uit verschillende patiënten en/of voedselmatrices aan elkaar gelinkt kunnen worden.

4. ABSTRACT (ENG)



Summary of

"Optimization of an isolation protocol and a protocol for generating high-quality DNA extracts for the characterization of *Clostridium botulinum*"

Chehrazad Rahouti

Ir. Julie Linussio (Mahdi Ben Salah)

Madam Ine De Goeyse

Background

Clostridium botulinum (*C. botulinum*), a Gram-positive, spore-forming anaerobic bacterium, is notorious as one of the most dangerous food pathogens due to its production of botulinum neurotoxin (BoNT), one of the most potent known biological neurotoxins in humans. The spores of C. *botulinum* are ubiquitous in the environment and are known to be highly resistant. Their ability to germinate (and produce toxin) in various low-acid food sources (pH>4.6) with low oxygen, such as canned foods and smoked meats, poses a serious public health risk. Despite this, the isolation of this pathogen remains very difficult and is only possible in specialized laboratories. One reason for this is the lack of a truly selective medium to date. This research focuses on optimizing a protocol for the isolation, cultivation, and DNA extraction to enable further characterization of *C. botulinum* isolates via Whole-Genome Sequencing (WGS).

Goal

The first part of the project aims to isolate *C. botulinum* from stored enrichment cultures of positive samples. The second part involves optimizing culture parameters for growing *C. botulinum* and subsequently extracting DNA of sufficient quality for both short-read and long-read WGS.

Method

The isolation process of *C. botulinum* involves two methods: one without selection for resistant spores and one with such selection. Both methods begin by refreshing old enrichment cultures in a fresh medium, followed by incubation, DNA extraction, and PCR to check for the presence of the BoNT gene. Optionally, the culture undergoes an additional selection step where heat or ethanol treatment is used to retain resistant spores while killing off vegetative cells and less resistant spores. The cultures are then inoculated onto Egg Yolk Agar (EYA) plates, where desired colonies are visually selected based on their lipase production, indicated by a rainbow-like sheen. Selected colonies undergo PCR to detect the BoNT gene. If possible, two positive colonies per sample are selected for further cultivation and re-inoculated onto EYA

plates. Finally, a last PCR is performed on a pure culture. If the strain is pure and the presence of the BoNT gene is confirmed by PCR, the strain is added to the NRC strain collection.

In the second part of this study, various parameters were tested to obtain the best possible DNA extract suitable for WGS. These parameters included growth media (TPGY, BHI), incubation period (24 hours, 72 hours), extraction volume (1 ml, 1,5 ml), and lysozyme concentration (25 mg/ml, 100 mg/ml). The Maxwell® method was preferred for DNA extraction. The quality of the DNA extract was assessed based on purity (Nanodrop), DNA concentration (Quantus™), and DNA fragmentation (PFGE). Finally, the DNA extracts were used as input for both short-read sequencing (Illumina) and long-read sequencing (MinION).

Results

From the first part of the experiment, several conclusions were drawn after isolating *C. botulinum* from 10 enrichment cultures originating from positive samples. The isolation protocol was optimized by evaluating various parameters. The nature of the sample, clean or dirty, proved crucial for the choice of the isolation method, with special attention to spore selection in dirty samples such as fecal specimens. Incubation on EYA plates required more time for treated cultures, especially due to the selected spores. The use of a 10 µl inoculum resulted in sufficient growth for direct storage, while a 1 µl inoculum yielded insufficient growth, necessitating further transfer. Special cases suggested the possibility of isolating *C. butyricum* and highlighted challenges such as the tendency to form bacterial carpets and oxygen reactions, which complicate the isolation procedure.

The second part focused on identifying optimal parameters for cultivation and DNA extraction, including variables such as growth medium, incubation time, extraction volume, and lysozyme concentration. An optimized workflow (based on Nanodrop and Quantus™ data) showed that TPGY provides higher DNA yield and that an incubation period of 24 hours is sufficient for good quality DNA. An extraction volume of 1,5 ml proved more advantageous than 1 ml, and a lysozyme concentration of 100 mg/ml was preferred over 25 mg/ml due to lower contamination. Ten samples were selected for both Illumina and MinION sequencing. The PFGE protocol needs further optimization as no usable results were generated. There was insufficient time within the internship period to complete this task.

Conclusion

The first part of the study focused on optimizing the isolation protocol for *C. botulinum* from various enrichment cultures of positive samples. Important parameters such as sample matrix, incubation period, and inoculum size were evaluated. The protocol was applied to 11 positive enrichment cultures and was successful in 10 cases.

In the second part, it was possible to select several culture and DNA extraction parameters that yielded good results for *C. botulinum* based on Nanodrop and Quantus™ data. Further development of a PFGE protocol is still required as these data could not be generated within this study. The combination of a good isolation, culture, and DNA extraction protocol is crucial for building a well-characterized strain collection and is indispensable in food outbreak investigations where strains isolated from different patients and/or food matrices can be linked.

5. INLEIDING

Clostridium botulinum (*C. botulinum*), een Gram-positieve, sporenvormende bacterie, wordt beschouwd als een van de meest gevaarlijke voedselpathogenen vanwege zijn vermogen om het botulineneurotoxine (BoNT) te produceren, een van de krachtigste neurotoxinen bij de mens. Deze bacterie kan voorkomen in diverse voedselbronnen met een lage zuurgraad (pH >4.6), zoals ingeblikte voedingsmiddelen, gerookt vlees en groenten, en vormt daarmee een ernstig risico voor de volksgezondheid.

Het hoofddoel van dit onderzoek is de isolatie en karakterisering van *C. botulinum*, met specifieke aandacht voor de ontwikkeling en optimalisatie van isolatiemethoden en moleculaire technieken voor een nauwkeurige detectie en identificatie. Dit onderzoek is van groot belang vanwege de ernstige gevolgen van door *C. botulinum* veroorzaakte voedselvergiftiging en de noodzaak van adequate monitoring en controlemaatregelen in de voedselindustrie.

Het eerste deel van dit onderzoek richt zich op de isolatie van *C. botulinum* uit verschillende aanrijkingsculturen afkomstig van monsterstalen, waarbij diverse methoden en parameters worden geëvalueerd om een geoptimaliseerd isolatieprotocol te ontwikkelen. Hierbij wordt specifiek gekeken naar de aard van de monstermatrix, de incubatieperiode, de behandelingen van de aanrijkingsculturen, het inoculumgrootte en andere factoren die de isolatie-efficiëntie kunnen beïnvloeden.

Het tweede deel van het onderzoek richt zich voornamelijk op het ontwikkelen van een gedetailleerd en betrouwbaar protocol voor het genereren van hoogwaardige DNA-extracten, die geschikt zijn voor verdere whole genome sequencing (WGS). Dit omvat een reeks zorgvuldig uitgevoerde stappen en methoden om ervoor te zorgen dat de DNA-monsters die worden verkregen van de hoogste kwaliteit zijn, met minimale contaminatie en degradatie. Het protocol zal specifiek ontworpen worden om consistentie en reproduceerbaarheid te waarborgen, waardoor de betrouwbaarheid van de daaropvolgende WGS-analyse wordt gemaximaliseerd.

Deze studie richt zich op een centrale onderzoeksvraag: "Hoe kan de isolatieprocedure van *Clostridium botulinum* worden geoptimaliseerd, en welke methoden voor DNA-extractie en cultuurparameters resulteren in de meest optimale verkrijging van kwalitatief DNA dat geschikt is voor zowel short-read als long-read sequencing?". Deze vraag beoogt de verbetering van de huidige isolatiemethoden voor *C. botulinum* en de optimalisatie van DNA-extractietechnieken en kweekparameters om DNA van hoge kwaliteit te verkrijgen voor genoomsequentiebepaling. Door deze onderzoeksvraag te beantwoorden, streeft deze studie naar een dieper inzicht in de isolatie en karakterisering van *C. botulinum*, wat kan bijdragen aan de ontwikkeling van verbeterde detectiemethoden en preventiestrategieën tegen deze belangrijke voedselpathogeen.

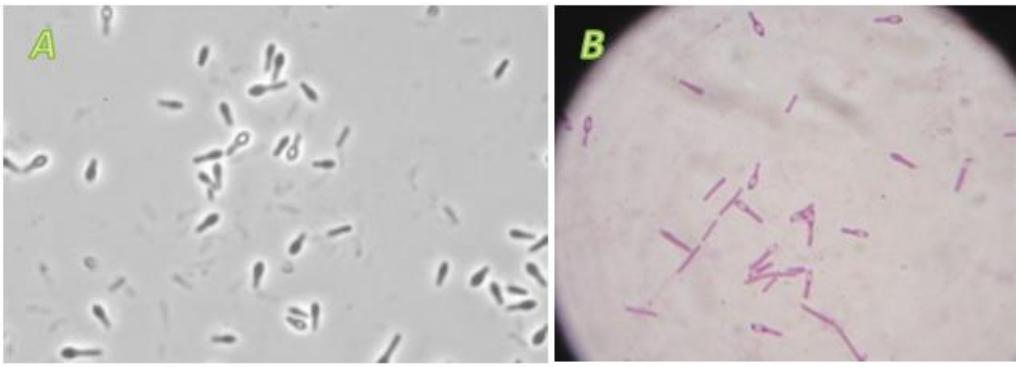
6. LITERATUURSTUDIE

6.1. Clostridium botulinum

6.1.1. CLASSIFICATIE

C. botulinum behoort tot het taxonomische fylum Firmicutes en het genus *Clostridium*. Firmicutes vertegenwoordigt een belangrijk bacterieel fylum, terwijl *Clostridium* een genus is dat diverse soorten omvat, met inbegrip van *C. botulinum.* Deze bacteriën zijn anaëroob, wat betekent dat ze gedijen in omgevingen met een beperkte aanwezigheid van zuurstof (Rawson et al., 2023; Walewski, 2019).

C. botulinum is een Gram-positieve, sporulerende bacterie met ovale subterminale sporen, strikt anaëroob en mobiel door peritriech flagellen (Figuur 2) (Peck, 2009; Walewski, 2019). Deze ubiquitaire bodembacterie wordt frequent aangetroffen in de vorm van sporen in bodems en mariene sedimenten (Anses, 2010). Daarnaast koloniseert ze de spijsverteringssystemen van bepaalde vogels, vissen en zoogdieren, waarbij de uitwerpselen fungeren als verspreidingsmechanisme voor de sporen in het milieu. De thermoresistente sporen van *C. botulinum* blijven levensvatbaar bij temperaturen van 100 °C gedurende ten minste zes uur, maar worden geïnactiveerd bij 120 °C gedurende vijf minuten. Deze temperatuur voor spoorvernietiging is essentieel in de conserveringsindustrie en heeft geleid tot het gebruik van snelkookpannen voor het inmaken van thuisbereide voedingsmiddelen. De sporen kiemen optimaal in anaërobe omstandigheden bij een temperatuur tussen 25 en 37 °C waarbij de actieve vegetatieve vormen neurotoxines produceren. Deze neurotoxines zijn thermolabiel en worden bij een temperatuur van 80 °C vernietigd (Walewski, 2019). Ze zijn verantwoordelijk voor botulisme, een ernstige neuroparalytische ziekte die zowel mensen als dieren treft. Het BoNT wordt geaccrediteerd als de potentieel krachtigste biologische substantie die op dit moment bekend is in de wetenschappelijke context van de mensheid (Rawson et al., 2023).



Figuur 2. A: Microscopische afbeelding van *C. botulinum* type A (Popoff, 2005); B: Microscopische afbeelding (2000x) van *C. botulinum* type A (Fankhauser, 1997).

Het verdient opmerking dat naast *C. botulinum,* atypische stammen van *Clostridium argentinense*, *Clostridium butyricum (C. butyricum)* en *Clostridium baratii (C. baratii)* ook het vermogen hebben om bepaalde BoNT's te produceren (Walewski, 2019).

6.1.2. SUBCLASSIFICATIE

C. botulinum kent zeven typen op basis van de serologische specificiteiten van de geproduceerde neurotoxines, aangeduid als types A tot G (Le Maréchal et al., 2019). Botulisme bij mensen wordt hoofdzakelijk in verband gebracht met de BoNT type A (BoNT/A), B (BoNT/B) en E (BoNT/E), en in zeldzame

gevallen ook met F (BoNT/F). Voor dieren wordt botulisme doorgaans toegeschreven aan de types C (BoNT/C), D (BoNT/D) en de mozaïektypes BoNT/CD en BoNT/DC. Over het algemeen wordt botulisme bij dieren geassocieerd met type C, CD, D, of DC, en in zeldzame gevallen ook met type A, B, of E. Pluimvee wordt hoofdzakelijk verbonden met het CD-type, soms ook met C en D. Runderen vertonen vooral het DC-type. Andere diersoorten kunnen ook gevoelig zijn voor verschillende typen botulisme, afhankelijk van de omstandigheden (Le Maréchal et al., 2019; Van Waes, 2015). Een onderverdeling van de BoNT-producerende Clostridia en hun karakteristieken wordt in tabel 1 weergegeven.

Tabel 1. Samenvatting van de belangrijkste eigenschappen van BoNT-producerende Clostridia (Anses, 2010; McCroskey et al., 1986).

	C. botulinum **Groep I**	***C. botulinum*** **Groep II**	***C. botulinum*** **Groep III**	***C. botulinum*** **Groep IV**	***C. butyricum*** **Groep V**	***C. baratii*** **Groep VI**
Proteolytisch/Niet-proteolytisch	Proteolytisch	Niet-proteolytisch	Niet-proteolytisch	Proteolytisch	/	/
Toxines	A, B, F	B, E, F	C, D, CD, DC	G	E	F
Lipase-productie	+	+	+	-	-	/
Lecithinase-productie	-	-	- (+)	-	-	/
Optimale groeitemperatuur (°C)	35 - 40	18 - 25	37 - 40	37	30 - 37	30 - 45
Minimale temperatuur voor productie toxines (°C)	10	3	15	/	12	10

De BoNT-producerende Clostridia zijn gecategoriseerd in zes groepen op basis van hun fenotypische eigenschappen. Groep I tot en met IV vertegenwoordigen verschillende groepen van *C. botulinum*, terwijl de laatste twee groepen, *C. butyricum* en *C. baratii* omvatten als BoNT-producerende Clostridia (Anses, 2010; Peck, 2009). Hoewel de meeste stammen van *C. botulinum* slechts één toxineserotype produceren, zijn er gevallen bekend waarin stammen zijn geïdentificeerd die in staat zijn om een mozaïektype te produceren, de mozaïektoxines BoNT/CD en BoNT/DC (Nakamura et al., 2012). Stammen van *C. botulinum* die BoNT/A, B en F produceren, worden hoofdzakelijk aangetroffen in bodemgebieden met minimale neerslag en gematigde klimaten. Daarentegen worden bacteriën die BoNT/E produceren aangetroffen in marien leven en sedimenten rond zoet water (Davis, 1993).

Het benodigde desoxyribonucleïnezuur (DNA) voor *C. botulinum* om toxine te produceren, kan aanwezig zijn in het gastheergenoom of afkomstig zijn van een plasmide of bacteriofaag. De genen die verantwoordelijk zijn voor de neurotoxines in *C. botulinum* van type C en D worden gedragen door bacteriofagen (Skarin et al., 2011). Het is algemeen bekend dat de lysogenie van deze BoNTX-fagen onstabiel is (Sakaguchi et al., 2005). Dit leidt tot een voortdurende uitdaging bij het isoleren van deze giftige stammen. Onder laboratoriumomstandigheden kunnen deze bacteriofagen bij stress de neiging hebben om het bacterie te verlaten en het gen met zich meenemen, waardoor de bacterie zijn toxiciteit verliest (Le Gratiet et al., 2020). Het weghalen van de faag of het plasmide kan dus leiden tot een niet-toxische bacterie (Fortier, 2017).

Groep I en IV omvatten bacteriestammen van *C. botulinum* die proteolytische activiteit vertonen. Proteolytisch verwijst naar het vermogen van organismen of enzymen om eiwitten af te breken door peptidebindingen tussen aminozuren te splitsen (Lopez-Otin & Bond, 2008). Bij *C. botulinum* speelt

proteolytische activiteit een rol bij het afbreken van eiwitten als onderdeel van het metabolisme. Deze activiteit kan een rol spelen bij de voeding van de bacterie en de omzetting van complexe eiwitten in eenvoudigere stoffen die door de bacterie kunnen worden gebruikt. Zowel proteolytische als niet-proteolytische stammen van *C. botulinum* produceren botulinetoxine (BoNT), dat specifieke eiwitten kan afbreken en de zenuwsignalering kan verstoren, wat leidt tot botulisme-symptomen (Lynt et al., 1982; National Center for Infectious Diseases (U.S.), 1998). BoNT, geproduceerd door de niet-proteolytische stammen (zoals in groep II en III), wordt geproduceerd als een inactieve vorm (protoxine) en vereist activatie door trypsine, een protease die zich in de maag bevindt, om zijn volledige toxiciteit te bereiken (Duff et al., 1956; Tjaberg, 1974). BoNT geproduceerd door proteolytische stammen is wel onmiddellijk actief en verijst geen activatie door trypsine.

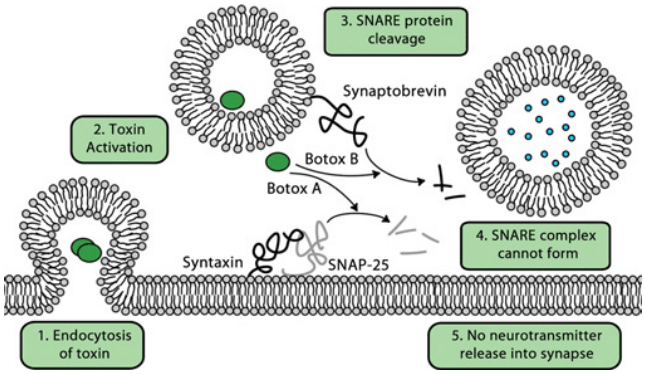
Groepen I, III, IV, V en VI omvatten stammen van *C. botulinum* (en *C. baratti* voor groep VI) die optimaal groeien bij lichaamstemperatuur en frequent geassocieerd worden met ziektegevallen bij zowel zuigelingen als volwassenen. Stammen in groep I manifesteren zich primair door de productie van BoNT type A, BoNT/B of BoNT/F. Stammen in groep III zijn bekend voor de productie van BoNT/C,D en de mozaïektypes BoNT/CD en BoNT/DC. Deze types hebben voornamelijk invloed op dieren (World Health Organisation, 2023). De stammen in groep IV manifesteren zich door de productie van BoNT/G. Groep II, daarentegen, vertoont een voorkeur voor lagere temperaturen in vergelijking met groepen I, III, VI en IV en is vaak geïmpliceerd in voedselgerelateerde botulisme-incidenten vooral wanneer de voedingsproducten die koel bewaard worden, niet voldoende verhit worden. Deze stammen, stammen vanuit groep II, manifesteren zich frequent door de productie van BoNT/B, E, of F. Stammen in groep V produceren enkel BoNT/E (Anses, 2010).

6.2. Botulisme

6.2.1. FYSIOPATHOLOGIE VAN BOTULISME

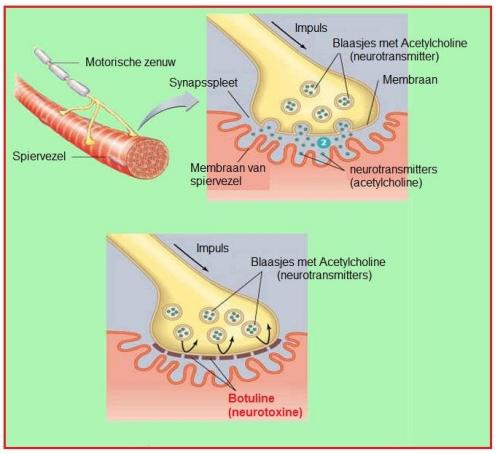
BoNT wordt geïntroduceerd in het menselijk lichaam door de inname van gecontamineerd voedsel met *C. botulinum*-bacteriën of door direct contact met het toxine (Zie sectie 6.2.2. en 6.2.3.). In gevallen van voedselvergiftiging penetreert het toxine in het lichaam via het spijsverteringsstelsel. Ongeacht de wijze van besmetting verspreidt het toxine zich hematogeen en/of lymfatisch, om vervolgens te binden aan de presynaptische neuronen op de neuromusculaire verbindingen. Het BoNT betreft een thermolabiele neurotrope polypeptide, bestaande uit een zware en een lichte keten (National Center for Infectious Diseases (U.S.), 1998). Het toxine, een relatief groot proteïne, dringt de zenuwcellen binnen door endocytose, een mechanisme waarbij het celmembraan het toxine in een vesikel opneemt (Figuur 3, punt 1) (Lagueny & Burbaud, 1996). Deze vesikel fuseert nadien met lysosomen, organellen met enzymen voor de afbraak van vreemde stoffen. Binnen de zenuwcel ondergaat het BoNT enzymatische splitsing in een lichte en zware keten, uitgevoerd door lysosomale enzymen (Figuur 3, punt 2) (Davis, 1993). De zware keten faciliteert de binding aan de membraanreceptor en draagt bij aan de translocatie van de lichte keten naar het neuronale cytosol (Jeffery & Karim, 2023; Walewski, 2019). De lichte keten, belast met de toxische functionaliteit, wordt getransloceerd naar het cytoplasma van de zenuwcel, waar het interageert met de exocytose van neurotransmitters, met name acetylcholine, in de synaptische spleet (Rao et al., 2021). Onder normale omstandigheden bevorderen eiwitten uit de soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-

attachment protein receptor-complex[1] (SNARE-complex) de fusie van blaasjes die neurotransmitters bevatten met het celmembraan, wat resulteert in de vrijgave van neurotransmitters in de synaptische spleet en het faciliteren van zenuwsignalering (Jeffery & Karim, 2023). Normaal gesproken wordt dus acetylcholine opgeslagen in blaasjes aan het uiteinde van de zenuwcel. Wanneer een zenuwimpuls de zenuwcel bereikt, wordt acetylcholine vrijgegeven in de synaptische spleet, wat leidt tot spiercontractie. BoNT vertoont echter een specifieke affiniteit voor SNARE-eiwitten (Figuur 3, punt 3). De lichte keten van het toxine fungeert als een zinkafhankelijke endoprotease en snijdt specifieke delen van de SNARE-eiwitten, wat leidt tot een verstoring van hun functionele vermogen om membraanfusie te bemiddelen (Figuur 3, punt 4) (Craik et al., 2011; Rao et al., 2021). Door dit mechanisme remt botulinumtoxine de afgifte van neurotransmitters (Figuur 3, punt 5; Figuur 4) (Craik et al., 2011).



Figuur 3. Werkingsmechanisme van het BoNT (Craik et al., 2011)

Aangezien acetylcholine cruciaal is voor de signaaloverdracht tussen zenuwcellen en spiercellen, resulteert de belemmering van de afgifte in spierzwakte en uiteindelijk in verlamming (Lagueny & Burbaud, 1996).



Figuur 4. Schematische weergave van de werking van botulisme op het zenuwstelsel (Biologielessen, z.d.).

Het verdient benadrukking dat BoNT tot de krachtigste bekende toxines behoort, en een snelle medische interventie is van essentieel belang voor het bereiken van een succesvolle behandeling (Jeffery & Karim, 2023).

[1] Het SNARE-complex is de essentiële component van het eiwitapparaat dat de fusie van synaptische blaasjes met presynaptische terminals mogelijk maakt, en daarmee de afgifte van neurotransmitters faciliteert. Binnen synapsen is de vorming van het SNARE-complex cruciaal voor elk afgifte (Chen et al., 2021).

6.2.2. MEEST VOORKOMENDE VORMEN VAN BOTULISME

6.2.2.1. Voedselgerelateerd botulisme

Voedselgerelateerd botulisme doet zich voor wanneer individuen vooraf gevormde BoNT consumeren. De groei en toxineproductie van *C. botulinum* zijn afhankelijk van specifieke omstandigheden, waaronder een anaëroob milieu, een pH lager dan 4,6, een laag zout- en suikergehalte, en een temperatuur tussen 3 °C en 121 °C (The Center for Food Security & Public Health, 2018). Sporen van *C. botulinum* kunnen overleven tijdens het kookproces, ontkiemen vervolgens en groeien in het voedsel onder geschikte omstandigheden. Enkele klinische gevallen zijn opgetreden bij het bakken van voedsel dat op kamertemperatuur of in een warme oven werd bewaard gedurende de nacht (Sobel et al., 2004). Botulisme wordt doorgaans geassocieerd met zelf ingeblikt, zuurarm (pH > 4.6) voedsel, vleesproducten zoals worsten, paté en ham, en gezouten, ingemaakte of gefermenteerde vis, zeehond en walvisvlees. Het kan echter ook worden veroorzaakt door producten zo divers als traditioneel lang gefermenteerde yoghurt, zachte kazen, knoflookolie en in folie verpakte gebakken aardappelen (Sobel et al., 2004). Zo werden in september 2023 15 gevallen van botulisme bevestigd nadat zij ingelegde sardienen consumeerden in een wijnbar in Bordeaux. Hierbij overleed één persoon (Sante Publique France, 2023).

6.2.2.2. Wondbotulisme

De intramusculaire of subcutane injectie van injecteerbare drugs, zoals black-tar heroine, vormt de primaire risicofactor voor de ontwikkeling van het wondbotulisme (Kalka-Moll et al., 2007; Passaro et al., 1998). *C. botulinum*, de bacterie die verantwoordelijk is voor de productie van BoNT, kan het lichaam binnendringen via een wond of letsel, bijvoorbeeld bij gebruik van besmette naalden of verwondingen die in contact komen met besmette aarde (The Center for Food Security & Public Health, 2018). Symptomen van wondbotulisme omvatten spierzwakte, dubbelzien, slikproblemen, spraakstoornissen en verlamming. In tegenstelling tot andere vormen van botulisme gaat wondbotulisme vaak gepaard met koorts en tekenen van infectie in het gebied rond de wond (Passaro et al., 1998).

6.2.2.3. Infantiel botulisme

Deze vorm van botulisme ontstaat als gevolg van de ingestie van *C. botulinum*-sporen door baby's. De kieming en kolonisatie van het spijsverteringskanaal gaan gepaard met de vrijgave van neurotoxinen in vivo. Infantiel botulisme en infectieus botulisme (Zie 6.2.3.3) bij volwassenen worden dus gekarakteriseerd als vormen van endogene besmetting (Anses, 2010). Deze vorm doet zich voornamelijk voor bij kinderen jonger dan 6 maanden. Er wordt verondersteld dat kolonisatie ontstaat omdat de normale darmflora, die zou kunnen concurreren met *C. botulinum*, nog niet volledig is vastgesteld. Onder de bekende bronnen van infectie vallen onder andere honing en melkpoederpreparaten voor zuigelingen. Onderzoeken hebben de consumptie van honing geïmpliceerd als een risicofactor voor de ziekte, maar honingconsumptie vertegenwoordigt slechts ongeveer 20 % van de gevallen (Spika et al., 1989).

6.2.3. ANDERE VARIANTEN VAN BOTULISME

6.2.3.1. Inhalatiebotulisme

Er zijn incidentele meldingen van besmetting van personeel in laboratoria door absorptie van botulinumtoxine via het neusslijmvlies. Het opzettelijk gebruik van aërosolen met botulinumneurotoxine als biologisch wapen (bioterrorisme) is eveneens afhankelijk van deze besmettingswijze (Arnon et al., 2001;

Chatham-Stephens et al., 2017). Zowel voedselgerelateerd botulisme als wondbotulisme en inhalatiebotulisme vertegenwoordigen vormen van exogene contaminatie.

6.2.3.2. Iatrogene botulisme

Iatrogeen botulisme is een vorm van botulisme die optreedt als gevolg van een medische ingreep, met name het gebruik van BoNT voor therapeutische of cosmetische doeleinden. Gevallen van botulisme zijn gerapporteerd als bijwerkingen na injecties met BoNT (Chertow et al., 2006).

In de cosmetische geneeskunde wordt BoNT frequent geïnjecteerd om de zichtbaarheid van rimpels en fijne lijntjes te verminderen, een behandelingsmodaliteit die algemeen bekend staat als BoNT/A (Botox®)-injecties. Voor therapeutische doeleinden wordt Bo BoNT geïnjecteerd in specifieke spieren om overmatige spieractiviteit te verminderen, wat effectief is gebleken bij diverse neurologische aandoeningen, zoals dystonie, en bij spieraandoeningen, waaronder spierspasmen. (Berntsen et al., 2022). De injecties met BoNT hebben doorgaans lokale en voorbijgaande effecten op de betrokken spieren door de afgifte van acetylcholine, een neurotransmitter die essentieel is bij spiercontractie, te remmen. Niettemin kunnen deze injecties, ondanks hun therapeutische voordelen, bijwerkingen met zich meebrengen, zoals spierzwakte, vermoeidheid, hoofdpijn en soms slikproblemen. Hoewel het risico op systemische effecten over het algemeen beperkt is bij correcte toepassing, kan onbedoelde verspreiding van het toxine leiden tot iatrogene botulisme, met name bij overdosering (Crowner et al., 2007). De effectiviteit en veiligheid van iatrogene toepassingen van het toxine zijn sterk afhankelijk van de precisie van de dosering en de bekwaamheid van de behandelaar. Het is essentieel dat medische professionelen die BoNT gebruiken, de juiste protocollen volgen en een grondige afweging maken tussen de risico's en voordelen om iatrogene botulisme te voorkomen (Chertow et al., 2006; Crowner et al., 2007).

Zo werd er op 7 maart 2023, gerapporteerd door Duitsland aan de WHO, vijf gevallen van iatrogene botulisme in Turkije, waarbij botulineneurotoxine type A tijdens medische ingrepen werd toegediend. In totaal waren er 71 gevallen gemeld. Het gebruik van gelicenseerde BoNT-producten voor andere doeleinden dan waarvoor ze waren goedgekeurd werd vastgesteld, wat leidde tot opschorting van ziekenhuisactiviteiten en lopende onderzoeken (World Health Organisation, 2023).

6.2.3.3. Intestinaal botulisme bij volwassenen

Sporen uit de omgeving kunnen door de meeste individuen, inclusief oudere kinderen en volwassenen, worden ingenomen zonder schadelijke gevolgen. De sporen passeren eenvoudigweg het spijsverteringsstelsel zonder te ontkiemen. Er zijn echter zeldzame gevallen van darmkolonisatiebotulisme bij individuen die veranderingen hebben ondergaan in de darmomstandigheden als gevolg van procedures en aandoeningen zoals gastro-intestinale chirurgie, intensieve antibioticatherapie of afwijkingen zoals achloorhydrie (onvoldoende of ontbrekend maagzuur in de maag) (Sobel, 2005).

Geïsoleerde gevallen van botulisme, waarbij klinisch onderzoek geen specifiek voedingsmiddel als oorzaak kon identificeren, werden geregistreerd als gevallen van "onbepaalde oorsprong" (Griffin et al., 1997). Zorgvuldige onderzoeken hebben aangetoond dat sommige van deze onbepaalde gevallen werden veroorzaakt door kolonisatie van het maagdarmkanaal door *C. botulinum* (of *C. baratii*) met *in vivo* productie van toxine, vergelijkbaar met de pathogenese van infantiel botulisme (National Center for Infectious Diseases (U.S.), 1998). De diagnose van botulisme als gevolg van darmkolonisatie werd

ondersteund door de aanhoudende uitscheiding van toxine en *C. botulinum* in de ontlasting, evenals de detectie van sporen van *C. botulinum* maar geen voorgevormde toxine in verdachte voedingsmiddelen (McCroskey & Hatheway, 1988). In bepaalde gevallen van botulisme, waar sterk vermoed werd dat het een darmkolonisatie betrof, hadden de patiënten een voorgeschiedenis van gastro-intestinale chirurgie of ziekten zoals inflammatoire darmziekten, wat hen mogelijk vatbaar maakte voor kolonisatie in de darm van *C. botulinum* (Griffin et al., 1997).

6.2.3.4. Botulisme bij dieren

Botulisme bij dieren wordt over het algemeen geassocieerd met de opname van vooraf gevormde toxines die een progressieve verlamming veroorzaken, resulterend in een gebrek aan spierspanning. De symptomen treden op tussen 2 uur en 2 weken na infectie, maar meestal binnen 24 uur. Klinische tekenen omvatten progressieve motorische verlamming. Bij dieren uit het zich doorgaans als een opstijgende verlamming die eerst de achterpoten beïnvloedt. Autonome disfunctie, problemen bij het kauwen en slikken, visuele stoornissen, algemene zwakte en coördinatieproblemen kunnen eveneens zichtbaar zijn (The Center for Food Security & Public Health, 2018). Verlies van spiertonus rond de ogen en mond kan resulteren in een verschijning van lethargie of slaperigheid, met hangende oogleden, verwijde pupillen en trage pupillaire reflexen. De verlamming kan uiteindelijk de spieren van het hart en de longen aantasten, met als gevolg overlijden (Critchley, 1991).

In dierlijke omgevingen zijn enkele bronnen van vooraf gevormde toxines onder andere ontbindende plantaardige materialen (zoals gras, hooi, kuilvoer, graan, bedorven kuilvoer) of hoog-eiwitafval, dierlijke weefsels (inclusief vis), ongewervelde dieren (zoals maden die zich hebben gevoed met kadavers) en verontreinigd water. Er wordt vaak vermoed dat voer voor herbivoren besmet is door het karkas van een vogel of klein zoogdier. Omdat voedsel de primaire bron van besmetting bij dieren is, omvatten preventieve maatregelen het beheersen van de contaminatie van diervoeder en het prompt afvoeren van kadavers (Anses, 2010).

Botulisme vertoont doorgaans geen frequente overdracht van dier naar mens. De voornaamste oorzaken van menselijke gevallen zijn gerelateerd aan besmet voedsel en omgevingsfactoren. Niettemin, ondanks enkele gedocumenteerde gevallen van overdracht van *C. botulinum* van dieren naar mensen, blijft het handhaven van voedselveiligheid van essentieel belang om het risico op botulisme te minimaliseren (Rasetti-Escargueil et al., 2019).

6.3. Symptomatologie

Botulisme begint doorgaans met het verschijnen van bulbaire symptomen (hersenstamsymptomen) zoals craniale zenuwverlammingen die zich ontwikkelen tot symmetrische, neerwaartse zwakte van de romp, ledematen en gladde spieren, wat uiteindelijk resulteert in een slappe verlamming (Arnon et al., 2001). Over het algemeen zijn er geen sensorische tekorten, behalve bij wazig zicht, waarbij paresthesieën (stoornis in gevoelssensaties) af en toe voorkomen (The Center for Food Security & Public Health, 2018; Zariquiey-Esteva et al.). Typerende initiële symptomen omvatten diplopie (visuele stoornissen), dysfagie (slikmoeilijkheden), dysfonie (stemverandering) en dysartrie (geslurpte spraak), wat wijst op de hoge gevoeligheid van presynaptische uiteinden van craniale zenuwen voor BoNT. Het aantasten van het middenrif resulteert in ademhalingsfalen, wat vaak leidt tot de noodzaak van intubatie en mechanische

ventilatie (Arnon et al., 2001). Verlamming van autonome gladde spieren veroorzaakt constipatie en urineretentie. Voedselgerelateerd botulisme gaat vaak gepaard met een prodroom van buikpijn, misselijkheid en braken, dat begint 12 tot 72 uur na inname van het vooraf gevormde toxine (Sciensano, z.d.).

De presentatie en ernst van infantiel botulisme variëren door verschillende inoculumgroottes (consumptiehoeveelheden), gastheer-gevoeligheden en de tijd tot presentatie. Vroege symptomen omvatten vaak constipatie, zwakte, voedingsmoeilijkheden, een zwak gehuil en kwijlen. Een 'slappe baby' met algemene hypotonie (abnormale lage spierspanning) geeft aanleiding tot onmiddellijke intubatie en mechanische ventilatie (Zariquiey-Esteva et al, 2018).

Wondbotulisme moet worden overwogen bij patiënten die zich melden met bulbaire symptomen, zoals dysfagie, dysartrie, dysfonie en faciale verlamming, en cellulitis (bacteriële infectie van de huid) als gevolg van subcutane toediening van illegale drugs (Arnon et al., 2001). De incubatietijd voor wondbotulisme varieert van 5 tot 15 dagen na introductie van sporen. Het is de enige variant die gepaard gaat met koorts en tekenen van infectie (Passaro et al, 1998).

6.4. Procedure voor detectie en identificatie van *Clostridium botulinum* en BoNT

De diagnose van diverse botulismevarianten berust hoofdzakelijk op anamnese (medische voorgeschiedenis) en klinisch onderzoek. Definitieve bevestiging van de diagnose wordt verkregen door de detectie van BoNT in serum, ontlasting, maaginhoud en/of verdachte voedingsmiddelen, of door detectie van BoNT-producerende Clostridia aan de hand van een positieve cultuur uit ontlasting, een wond of voedsel, afhankelijk van de vermoedelijke besmettingswijze (Sobel, 2005; Walewski, 2019).

De detectie en typering van BoNT in een staal wordt uitgevoerd aan de hand van een *in vivo* test in muizen, waarbij de letaliteitstest wordt toegepast. De muizenlethaliteitstest, gebruikt om de aanwezigheid en toxiciteit van botulinetoxine in monsters vast te stellen, betreft het injecteren van muizen met het monster, gevolgd door observatie op symptomen van botulisme. De test begint met directe injectie van het monster in de buikholte (intraperitoneaal) van twee muizen, terwijl nog eens twee muizen een mix van het monster en antitoxinen krijgen toegediend om mogelijke botulinetoxine te neutraliseren. Gedurende vijf dagen worden alle muizen nauwkeurig geobserveerd op tekenen van botulisme, waaronder spierzwakte, verlamming en ademhalingsproblemen (Gilligan et al., 1983). Als na deze periode de muizen die enkel het monster ontvingen symptomen vertonen, terwijl diegene met de mix geen tekenen van botulisme vertonen, wordt de test als positief beschouwd, wijzend op de aanwezigheid van botulinetoxine in het monster (Lindström & Korkeala, 2006). De classificatie van het toxine wordt vastgesteld middels een seroneutralisatietest, waarbij specifieke antitoxines worden geïntroduceerd (Jeffery & Karim, 2023). Voor de detectie van BoNT-producerende Clostridia wordt typisch een aanrijkingscultuur opgestart waarna via PCR de BoNT-genen gedetecteerd kunnen worden. Het monster wordt eerst in een aanrijkingsmilieu geplaatst en vervolgens onder anaerobe omstandigheden bij de juiste temperatuur geïncubeerd. Na 3 dagen incubatie wordt 1 ml van de aanrijkingscultuur overgebracht naar 9 ml vers medium voor verdere incubatie gedurende één dag. Hierna wordt een DNA-extract bereid van de aanrijkingscultuur (Grenda et al., 2014). Dit extract ondergaat vervolgens PCR, waarbij de botulinetoxine-genen worden geamplificeerd.

Voor humane monsters worden de genen BoNT/A, B, E en F getargeteerd, terwijl voor dierlijke monsters BoNT/A, B, C, CD, D, DC, E en F worden getargeteerd. In geval dat voedselgebonden botulisme verdacht wordt bij een patiënt, zal typisch een faecesstaal geanalyseerd worden voor BoNT en BoNT-producerende Clostridia en een serumstaal voor BoNT.

Voor dierlijke diagnoses kunnen ook organen zoals de lever en nieren, evenals de inhoud van de maag of pens, worden aangewend. De definitieve diagnose wordt versterkt door de vaststelling van botulinetoxines en/of neurotoxine-producerende Clostridia in verdachte voedingsmonsters (Sciensano, z.d.).

Voor de diagnose van voedselgerelateerd botulisme kan aanvullend bewijs worden verkregen door een voedselgeschiedenis van 3-5 dagen van de patiënt. Het gerapporteerde gebruik van zelfgemaakte ingeblikte voedingsmiddelen verhoogt aanzienlijk de waarschijnlijkheid van voedselgebonden botulisme. Het is tevens van belang op te merken of nauwe contacten mogelijk voedsel hebben gedeeld. Deze informatie dient vroeg in het klinische onderzoek te worden verkregen, aangezien de mogelijkheid van de patiënt om verdere informatie te verstrekken kan worden beperkt als de zaak zich ontwikkelt tot ademhalingsfalen en mechanische ventilatie, ondanks het toedienen van ondersteunende en specifieke therapie (Jeffery & Karim, 2023; Lonati et al., 2020).

Botulisme kan soms verwarring veroorzaken met andere pathologieën, waaronder Myasthenia Gravis, het Guillain-Barré-syndroom en beroertes, vanwege gedeelde symptomen van spierzwakte en neurologische disfunctie. Myasthenia Gravis is een auto-immuunziekte waarbij antilichamen de spiercellen targeten, terwijl Guillain-Barré-syndroom een auto-immuunziekte is die de zenuwen aantast. Beroerte ontstaat door een verstoorde bloedtoevoer naar de hersenen. Een nauwkeurige differentiële diagnose is van cruciaal belang vanwege de specifieke behandelingen die vereist zijn voor elke aandoening (Lonati et al., 2020).

6.5. Therapie

De behandeling van botulisme omvat het geven van antitoxine, opname in het ziekenhuis, zorgvuldige monitoring, eventueel ondersteuning bij ademhaling en het schoonmaken van wonden in combinatie met antibiotica bij wondbotulisme. Het is sterk aanbevolen om patiënten met symptomen van botulisme direct op te nemen in het ziekenhuis voor grondige observatie. De verbetering van de eliminatie van BoNT uit de bloedbaan wordt bereikt door de toediening van serotypespecifieke neutraliserende antilichamen, beter bekend als antitoxine. Op dit moment zijn er twee vormen van antitoxinetherapie beschikbaar voor zorgverleners: paardenserum-antitoxine voor patiënten ouder dan één jaar en humaan afgeleid immunoglobuline voor zuigelingen jonger dan één jaar (Sobel, 2005).

Het botulinum-antitoxine neutraliseert toxines die nog niet aan de zenuwuiteinden zijn gebonden (The Center for Food Security & Public Health, 2018). Deze interventie beperkt effectief het totale aantal gevormde SNARE-complexen. Aangezien antitoxine uitsluitend bindt aan vrij BoNT, voorkomt het de voortgang van symptomen maar herstelt het geen reeds aanwezige verlamming (Ni & Brady, 2023). Na binding met antitoxine ondergaat BoNT een isolatieproces in de lever en milt. Er is nog geen alomvattend begrip van de processen betreffende het metabolisme en de uitscheiding van het toxine. Het meest waarschijnlijke proces voor metabolisme en eliminatie betreft hepatische biotransformatie. Klievingsreacties, en wellicht ook conjugatiereacties, kunnen leiden tot de omzetting van het toxine in

inactieve metabolieten, en deze reacties zouden een voorbereiding kunnen zijn op de eliminatie van het toxine (Simpson, 2013).

Het is van cruciaal belang dat de arts niet wacht op de laboratoriumbevestiging alvorens de klinische diagnose te stellen en antitoxine toe te dienen, aangezien de laboratoriumbevestiging meerdere dagen kan duren (Jeffery & Karim, 2023). De tijdsduur tot toediening van antitoxine vertoont aanzienlijke impact op het klinische verloop. In een studie naar infantiel botulisme bleken onbehandelde zuigelingen significant langere perioden van mechanische ventilatie, ziekenhuisopname en sondevoeding te ervaren in vergelijking met behandelde zuigelingen (Payne et al., 2018). Eveneens is aangetoond dat een vroegtijdige toediening van antitoxine (binnen 12 uur) de duur van het verblijf op de intensive care vermindert, zowel bij voedselgerelateerd als wondbotulisme (Jeffery & Karim, 2023).

7. ISOLATIE VAN *C. BOTULINUM*

7.1. Doel en principe

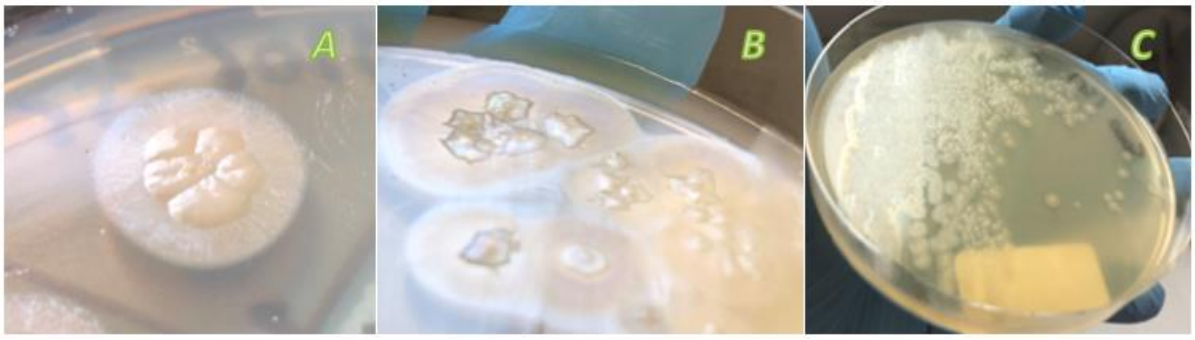
7.1.1. ISOLATIE

Het primaire doel van het eerste deel van dit project is het isoleren van *C. botulinum* van bewaarde aanrijkingsculturen afkomstig van positieve stalen. Deze culturen zijn afkomstig van zowel referentiemonsters als authentieke monsters, waarbij de complexiteit van de isolatie kan variëren. De referentiemonsters, die gebruikt worden voor referentietesten of ringtesten, zijn voornamelijk van "schone" aard, aangezien ze uitsluitend dienen als controle voor laboratoria. Met "schone aard" wordt verwezen naar een monster/aanrijkingscultuur waarbij de achtergrondflora beperkt is. Echter, de authentieke monsters, afkomstig van menselijke, dierlijke en voedselbronnen, zijn doorgaans van "vuile" aard. In tegenstelling tot de referentiemonsters, vertonen aanrijkingsculturen vanuit monsterstalen met een "vuile aard" een aanzienlijke aanwezigheid van achtergrondflora, wat de noodzaak van een extra selectiestap met zich meebrengt. Uit deze verschillende aanrijkingsculturen wordt eerst getracht om een stam te isoleren, gevolgd door het kweken van een zuivere cultuur die vervolgens kan worden geconserveerd in een stammenbibliotheek of stammencollectie. Deze zuivere culturen worden ten slotte gebruikt voor sequentieanalyse.

Er zijn twee methoden voor de isolatie van *C. botulinum*: de methode zonder behandeling en de methode met behandeling (voor de selectie van resistente sporen). Beide protocollen beginnen op dezelfde manier. Eerst worden oude aanrijkingsculturen ververst door ze opnieuw te enten in tryptoon-pepton-glucose-gistextractmedium (TPGY) (Figuur 6, stap 1). Vervolgens worden deze culturen gedurende drie of vijf dagen (afhankelijk van de toegepaste methode) geïncubeerd. Een deel van de geïncubeerde culturen wordt gebruikt voor een initiële DNA-extractie gevolgd door PCR (Figuur 6, stap 2), terwijl het andere deel wordt gebruikt voor inoculatie op een Egg Yolk Agar (EYA) plaat (Figuur 6, stap 3 blauw) of, in het geval van de stalen die behandeld worden, voor de selectie van sporen (Figuur 6, stap 3 oranje en groen). Hoewel er geen selectieve media zijn voor *C. botulinum*, waardoor andere micro-organismen op de gebruikte platen kunnen groeien, kunnen gewenste kolonies worden onderscheiden van andere kolonies door verschillende eigenschappen van *C. botulinum,* zoals lipaseproductie en in sommige gevallen lecithinaseproductie (Zie tabel 1). Het ontbreken van een selectief medium voor *C. botulinum* kan worden toegeschreven aan verschillende factoren. Ten eerste is *C. botulinum* een zeer diverse bacteriesoort met verschillende stammen die elk verschillende karakteristieke vertonen, wat het moeilijk maakt om een medium te ontwikkelen dat selectief is voor alle varianten. Daarnaast is *C. botulinum* vaak aanwezig in complexe microbiële gemeenschappen, zoals bodem- en watermonsters, waardoor het selectief isoleren ervan een uitdaging kan zijn vanwege mogelijke interferentie van andere micro-organismen. Bovendien vereist de groei van *C. botulinum* specifieke milieuomstandigheden, waaronder anaërobe omstandigheden en bepaalde voedingsstoffen, die moeilijk te repliceren zijn in een selectief medium zonder de groei van andere bacteriën te bevorderen. Ten slotte kan de variabiliteit in groeiomstandigheden en de aanwezigheid van verschillende subtypen van *C. botulinum* ook bijdragen aan de complexiteit van het ontwikkelen van een selectief medium (Johnson, 1999).

De *C. botulinum*-stammen vanuit groep I, II en III zijn lipase-positief, wat betekent dat ze in staat zijn vetten af te breken, zoals die aanwezig zijn in het eigeel van EYA, wat resulteert in een glanzende laag op het

oppervlak van de kolonie zoals op figuur 5A waarneembaar is (Dong et al., 2017); McCroskey et al., 1986) Een regenboogachtige zone rondom en op het oppervlak van de kolonie, zoals te zien is op figuur 5B, kan ook worden waargenomen als gevolg van vetafbraak. Lecithinaseproductie is optioneel voor *C. botulinum*, maar kan waargenomen worden door de aanwezigheid van een lichtere zone of halo rond de bacteriekolonie op de EYA-plaat zoals op figuur 5C waarneembaar is (Microbenotes, 2023).



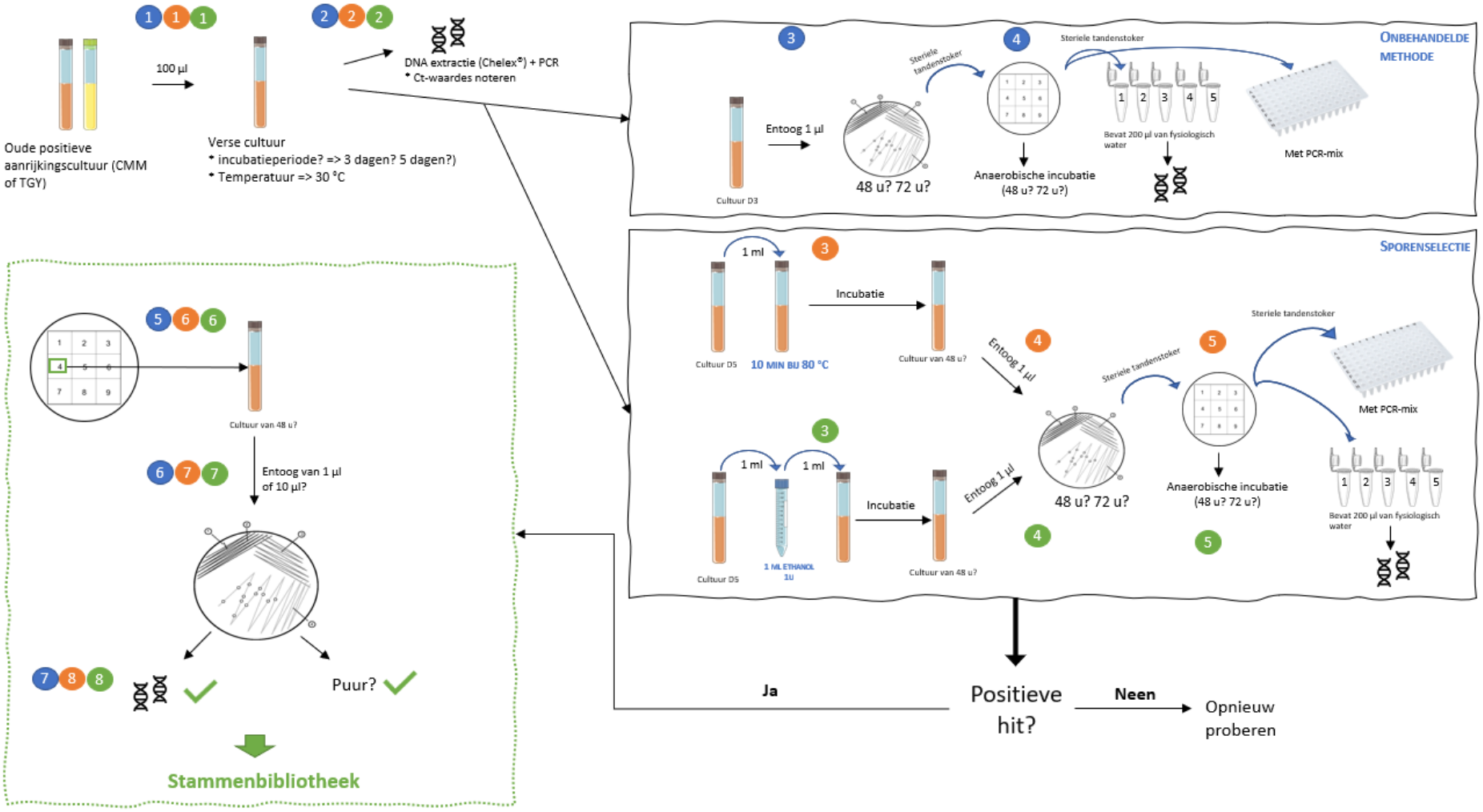
Figuur 5. A: *C.botulinum* type B op EYA-plaat waarbij glanzende laag waarneembaar is; B: *C.botulinum* type B op EYA-plaat waarbij de regenboogachtige structuur terug te vinden is; C: *C.botulinum* type B op EYA-plaat waarbij de lichtere zone rond de kolonie waarneembaar is.

Na inoculatie op een EYA-plaat worden kolonies gescreend op basis van hun visuele kenmerken volgens eerder beschreven criteria. Hierbij worden negen kolonies geselecteerd voor verdere analyse. Onmiddellijk na selectie wordt een PCR uitgevoerd om de eventuele aanwezigheid van het specifieke BoNT-gen na te gaan (Figuur 6, stap 4 blauw, stap 5 oranje en groen). De EYA-platen worden vervolgens geïncubeerd, waarna twee kolonies per monster worden geselecteerd op basis van resultaten van de PCR (Figuur 6, stap 4 blauw, stap 6 oranje en groen). Deze geselecteerde kolonies worden opnieuw in cultuur gebracht en vervolgens opnieuw geënt op EYA-platen (Figuur 6, stap 6 blauw, stap 7 oranje en groen). Ten slotte wordt een PCR uitgevoerd op de zuivere cultuur die op de EYA-plaat wordt waargenomen. Dezelfde EYA-plaat wordt gebruikt om het zuivere cultuur in de stammenbibliotheek te stockeren (Figuur 6, stap 7 blauw, stap 8 oranje en groen). Met behulp van Figuur 6 wordt de isolatieprocedure helder geïllustreerd.

7.1.2. DNA-EXTRACTIE

Drie verschillende extractie-methoden worden in het labo uitgevoerd voor het verkrijgen van DNA-extracten: een Chelex®-extractie, een lysaat of een extractie via het Maxwell®-toestel. Een vierde methode, de kolonie-PCR, zal ook worden besproken, maar hierbij worden geen aparte DNA-extracten verkregen. Voor de Chelex®-extractie omvat het proces het verwarmen van een monster in een 6 % suspensie van nuclease-vrij water en Chelex® 100. De hoge pH van de suspensie en het verhittingsproces verstoren de celmembranen, waarna de suspensie wordt gecentrifugeerd om de hars en het cel afval te scheiden van de bovenliggende vloeistof die het DNA bevat. Het verkregen DNA kan vervolgens worden gebruikt voor PCR-analyse (National Institute of Justice, 2023). Deze extractiemethode wordt toegepast op aanrijkingsculturen of vloeibare reinculturen. De tweede DNA-extractiemethode, het lysaat, wordt uitgevoerd op kolonies afkomstig van (on)zuivere cultuur op een agarplaat. Hierbij wordt gebruik gemaakt van warmte en fysiologisch water om DNA-extracten te verkrijgen waarbij de warmte fungeert als het mechanisme voor de lysis.

De procedure voor de DNA-extractie met behulp van de Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit en het Maxwell®-apparaat wordt verder uitgewerkt in sectie 8.1.1..



Figuur 6. Workflow voor de isolatie van *C. botulinum*.

7.2. Materiaal en methode

7.2.1. MATERIAAL

Het materiaal dat gebruikt werd voor zowel de bereiding van de media als voor het experimenteel deel zijn: gedemineraliseerd water (dH_2O), TPGY broth base (HiMedia; Referentienummer: M969), bacteriologisch peptoon (Oxoid, Ref. LP0037), tryptoon (Oxoid, Ref. LP0042), gistextract (Oxoid, Ref. LP0041), natriumchloride (Merck, Ref. 1.06404.1000), bacteriologische agar (Oxoid, Ref. LP0011), Egg Yolk suspension (Oxoid, Ref. SR0047C), ethanol 100 %, pipetboy, gegradueerde pipetten, micropipetten, tipjes met filter, falcontubes van 15 ml en 50 ml, cryotubes, Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Ref. PL.170C/R), (eppendorf)houder, autoclaveerbare flessen, erlenmeyer van 1 liter, petrischalen, plastieke entogen van 1 µl en van 10 µl, plastieke entnaalden, steriele tandenstokers, handschoenen, balans, vortex, warmwaterbad (bij 45 °C, 80 °C en 100 °C), incubator bij 30 °C, laminaire flowkast en een anaërobische incubatiesysteem zoals anaërobische jars of een anaërobische kast (bij 30 °C).

Voor de DNA-extracties werd er gebruik gemaakt van Chelex® 100 (Bio-Rad, Refn. 142-1253), natriumchloride (Merck, Ref. 1.06404.1000), steriel fysiologisch water 0,9 %, nuclease-vrij water (Invitrogen™, Ref. 10977-015), Ultra-Puur water, pUC19 (Sigma Aldrich, Ref. D3404), TaqMan Universal MasterMix For Real Time PCR (ThermoFisher Scientific™, Ref. 4440040) primers en probes (Integrated DNA Technologies), micropipetten, tipjes, eppjes van 2 ml en van 1,5 ml, falcontubes van 15 ml en 50 ml, 96-well platen (Greiner, Ref. 652221), zelfklevende films voor platen met 96 putjes voor PCR (Bio-Rad, Ref. MSB1001), steriele tandenstokers, plastieke entnaalden, vortex, centrifuge, warmwaterbad (56 °C en 100 °C), en PCR-toestel CFX96-Realtime PCR system (Bio-Rad, Ref. CFX96™ Optics Module).

7.2.2. BEREIDING MEDIA

Voor de bereiding van TPGY-medium werd TPGY broth base gebruikt, samen met dH_2O. Om 1 liter TPGY-medium te bereiden, werd 80 gram TPGY broth base vermengd met 1 liter dH_2O en aan de kook gebracht. Na bereiding werd de pH van het medium gecontroleerd en aangepast tot 7,0 ± 0,2. Vervolgens werd het medium verdeeld in (falcon)tubes of flessen en geautoclaveerd gedurende 15 minuten bij 121 °C. Het bereide medium kon gedurende 1 maand worden opgeslagen bij 4 °C.

De bereiding van de EYA-platen werd uitgevoerd volgens het volgende protocol. Voor elke liter werd 20 gram bacteriologisch pepton, 5 gram tryptoon, 5 gram gistextract, 5 gram natriumchloride en ongeveer 500 ml dH_2O samengevoegd in een 1 liter erlenmeyer-kolf. Het mengsel werd aan de kook gebracht. Nadat alle componenten waren opgelost, werd 20 gram bacteriologische agar aan de erlenmeyer toegevoegd en werd dH_2O toegevoegd tot een totaal volume van 1 liter werd bereikt. Nadat het mengsel opnieuw aan de kook was gebracht, werd de pH gecontroleerd en aangepast tot 7,2 ± 0,2. Vervolgens werd het mengsel verdeeld in vier flessen, elk met 225 ml van het mengsel, en werden ze geautoclaveerd. Dit bereide mengsel kon gedurende 2 maanden worden bewaard bij 4 °C. Voor het gieten van de platen werd één fles in een warmwaterbad van 100 °C geplaatst totdat het mengsel weer vloeibaar werd. Daarna werd het mengsel overgebracht naar een warmwaterbad ingesteld op 45 °C om af te koelen. In een falcontube van 50 ml werd 25 ml Egg Yolk suspension op steriele wijze overgebracht en ook in het warmwaterbad van 45 °C geplaatst gedurende 10 minuten. Onder een laminaire flowkast werd de Egg Yolk suspension aan het vloeibare agar

toegevoegd en grondig gehomogeniseerd. Door de toevoeging van de Egg Yolk suspension werd het totale volume van het mengsel op 250 ml gebracht, wat voldoende was om 10 platen met elk 25 ml uit te gieten. De gegoten platen konden maximaal 1 maand worden bewaard bij 4 °C in een plastic zakje.

7.2.3. VERVERSEN VAN EEN CULTUUR

Voor het verversen van culturen werden TPGY gebruikt voor positieve stalen waarvan *C. botulinum* afkomstig was van groep I en/of II. Voor elk monster werd een TPGY tube in het warmwaterbad van 100 °C geplaatsen om het medium te regenereren. Het koken van de milieus zorgt ervoor dat zoveel mogelijk zuurstofgas aanwezig in het milieu verwijderd wordt. Vervolgens werden de tubes afgekoeld op een werkbank of in koud water. Vanuit de oude aanrijkingscultuur werd 100 µl overgebracht naar de afgekoelde tubes. De tubes, waarbij de dop halverwege gesloten was om de uitwisseling van gas te vergemakkelijken, werden onder anaërobe omstandigheden (O_2: 0,0 %, temperatuur: 30 °C) gedurende 3 dagen voor de onbehandelde methode of 5 dagen voor de behandelde methode geïncubeerd.

7.2.4. ONBEHANDELDE METHODE

Na de incubatieperiode van 3 dagen werd op steriele wijze 1,8 ml van de cultuur gebruikt voor DNA-extractie, zoals beschreven in sectie 7.2.6.1.. Het resterende deel van de cultuur werd gebruikt voor verdere verwerking van het monster. Een EYA-plaat werd geënt met de cultuur door eerst de tube grondig te vortexen. Vervolgens werd met behulp van een entoog van 1 µl de cultuur gelijkmatig uitgestreken over de EYA-plaat. De EYA-plaat werd vervolgens gedurende 2 dagen bij anaërobe omstandigheden geïncubeerd.

De screening van kolonies werd als volgt uitgevoerd. Ten eerste werd er op de achterkant van een nieuwe EYA-plaat een raster getekend, genummerd van één tot negen. Vervolgens werden twee opties overwogen voor de DNA-extractie, namelijk via een lysaat of direct in de 96-well plaat, zoals beschreven in sectie 7.2.6.. Deze DNA-extracten werden gebruikt voor de PCR (Zie sectie 7.2.6.3.). Met behulp van een steriele tandenstoker werd een geïsoleerde kolonie, die aan de gestelde criteria van *C. botulinum* voldeed, van de EYA-plaat aangeraakt en werd de nieuwe EYA-plaat geënt op zone één van het raster door de agar één keer aan te raken. Dezelfde tandenstoker werd vervolgens overgebracht naar het bijbehorende eppendorf buisje gevuld met fysiologisch water of well in de 96-well plaat voorgevuld met PCR-mix, die beide correspondeerden met zone één. Dit proces werd herhaald totdat alle negen zones van het raster geïnoculeerd waren. De geïnoculeerde EYA-plaat werd opnieuw gedurende twee dagen geïncubeerd onder anaërobe omstandigheden.

Om de gescreende kolonies opnieuw in cultuur te brengen, werden er per monster twee kolonies geselecteerd waarvan de PCR-resultaten positief waren. De geselecteerde kolonies werden opnieuw in cultuur gebracht door eerst de TPGY-tubes te regenereren. Vervolgens werden de kolonies opgepikt met behulp van een entoog van 10 µl of een entnaald en overgebracht naar de afgekoelde tubes. Deze tubes werden gedurende drie dagen geïncubeerd onder anaërobe omstandigheden.

Vanuit de geïncubeerde culturen die gedurende 3 dagen waren geïncubeerd, werd een EYA-plaat geënt met behulp van een entoog van 10 µl. Deze plaat werd eveneens gedurende twee dagen geïncubeerd onder anaërobe omstandigheden. Na de incubatieperiode werd de zuiverheid van de plaat gecontroleerd, zowel visueel als via een PCR-analyse. Indien de plaat zuiver was en de PCR positief was voor het gezochte gen, werd het monster toegelaten tot plaatsing in de stammenbibliotheek. Het plaatsen in de

stammenbibliotheek of in de Microbank™ werd uitgevoerd door per monster één Microbank™-tube (met parels) en vier cryotubes klaar te zetten op een eppendorfhouder. Op steriele wijze werden de kolonies van de EYA-plaat weggeschraapt met behulp van een entoog van 10 µl. Vervolgens werden de Microbank™-tube met parels geïnoculeerd met de entoog, waarbij voorzichtig homogenisatie werd uitgevoerd door de Microbank™-tube te kantelen. Vortexen werd vermeden om beschadiging van de bacteriële cellen door de parels te voorkomen. Na een incubatie van ongeveer twee minuten bij kamertemperatuur werd het vloeistofmonster uit de Microbank™-tube verwijderd met een micropipet. De parels werden vervolgens verdeeld over de cryotubes. Eén cryotube werd opgeslagen bij -20 °C en de overige cryotubes werden gestockeerd bij -80 °C.

7.2.5. BEHANDELDE METHODE (SPORENSELECTIE)

Voor de methode waarbij behandelingen werden toegepast, ondergingen de verse culturen een incubatieperiode van vijf dagen. Deze verlengde incubatie was noodzakelijk omdat een cultuur van vijf dagen meer sporen bevat dan een cultuur van drie dagen, gezien er een selectie op sporen zou plaatsvinden. Na de vijfdaagse incubatie werden de monsters op twee manieren behandeld: door ethanolbehandeling of door warmtebehandeling. Voor de ethanolbehandeling werd 1 ml 100 % ethanol vermengd met 1 ml van de 5 dagen oude cultuur in een falcontube van 15 ml. Het mengsel werd gedurende 1 uur bij 37 °C geïncubeerd, waarbij de tube elke 15 minuten werd gehomogeniseerd door te kantelen. Na deze incubatie werd 1 ml van het mengsel overgebracht naar een nieuwe geregenereerde en afgekoelde TPGY-tube. Het geheel werd gedurende twee dagen geïncubeerd onder anaërobe omstandigheden. Voor de warmtebehandeling werd eerst een nieuwe TPGY-tube geregenereerd bij 100 °C en vervolgens gedurende tien minuten geplaatst in een warmwaterbad van 80 °C. De tube werd direct gebruikt voor de sporenselectie. Onder aseptische omstandigheden werd 1 ml van de 5 dagen oude cultuur overgebracht naar de opgewarmde tube met medium. De tube werd vervolgens gedurende 10 minuten bij 80 °C geïncubeerd, waarna deze gedurende twee dagen onder anaërobe omstandigheden werd geïncubeerd. Na de incubatie van twee dagen werden 1 µl van de behandelde culturen op EYA-platen geïnoculeerd. Het vervolg van het proces was identiek aan de onbehandelde methode, inclusief een screening van kolonies (met PCR) en de selectie van kolonies voor verdere cultuur, die vervolgens opnieuw op EYA-platen werden geïnoculeerd. De criteria voor opname in de stammenbibliotheek waren gelijk aan die besproken in sectie 7.2.4..

7.2.6. DNA-EXTRACTIE

7.2.6.1. Chelex®-extractie

Voorafgaand aan de start van de extractieprocedure moest het mengsel van Chelex® 6 % worden voorbereid. Dit werd bereikt door 50 g Chelex® 100-hars op te lossen in 830 ml Ultra-Puur water. Het resulterende mengsel werd grondig gehomogeniseerd en verdeeld in falcontubes van 50 ml, die vervolgens bij 4 °C werden bewaard.

De extractieprocedure begon met het overbrengen van 1,8 ml aanrijkingscultuur naar een 2 ml eppendorf buisje. Dit werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 14000 g en 4 °C. Vervolgens werd het supernatans verwijderd en het pellet werd geresuspendeerd in 600 µl van de Chelex® 6 %-oplossing. Dit mengsel werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 56 °C in een warmwaterbad, gevolgd door een incubatieperiode van 8 minuten bij 100 °C. Na deze behandeling werd opnieuw gecentrifugeerd bij 4 °C en

14000 g gedurende 10 minuten. Ongeveer 450 µl van het supernatans werd overgebracht naar een steriel eppendorf buisje.

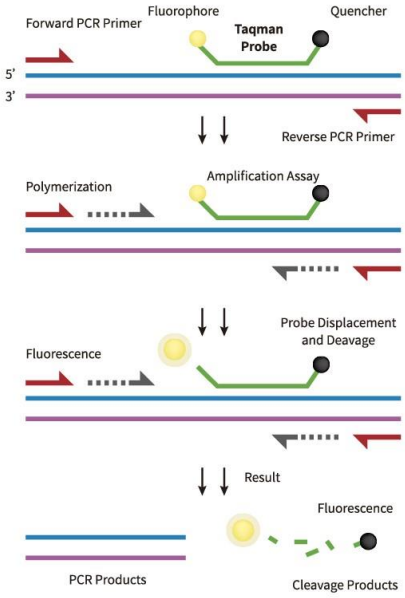
7.2.6.2. Lysaat

Voor de extractie van DNA vanuit kolonies werd een lysaatprocedure uitgevoerd. Eerst werd fysiologisch water bereid door 9 g natriumchloride op te lossen in 1 liter dH_20, gevolgd door autoclaafbehandeling gedurende 15 minuten bij 121 °C. De oplossing werd bewaard bij 4 °C.

In een eppendorf buisje van 1,5 ml werd 200 µl van het fysiologisch water (0,9 %) overgebracht. Vervolgens werd op aseptische wijze met behulp van een steriele tandenstoker of een plastic entnaald de gewenste kolonie aangeraakt. De tandenstoker/plastic entnaald werd vervolgens in het eppendorf buisje geplaatst en het mengsel werd gehomogeniseerd door de tandenstoker/plastic entnaald rond te draaien. Na sluiting van het eppendorf buisje werd het geïncubeerd in een warmwaterbad van 100 °C gedurende 15 minuten. Vervolgens volgde een centrifugatiestap bij 14000g gedurende 10 minuten bij 4 °C. Het supernatans werd overgebracht naar een steriel eppendorf buisje.

7.2.6.3. PCR

De resulterende DNA-extracten verkregen uit de Chelex®-extracties en de lysaat-extracties werden onderworpen aan realtime-PCR om de aanwezigheid van het beoogde gen (BoNT type A, B, E of F) te controleren. De Taqman™ real-time PCR-methode werd toegepast, waarbij de amplificatie van het DNA in realtime werd gevolgd door gebruik te maken van Taqman™-probes. Deze probes zijn specifieke oligonucleotiden die fluorescerende en quencher-groepen bevatten. Tijdens de PCR-reactie binden de Taqman™-probes aan het DNA-fragment dat wordt geamplificeerd. Wanneer de polymerase tijdens de amplificatie het bindingsgebied van de probe bereikt, wordt de probe gekliefd. Wanneer de Quencher zich in de nabijheid van de Fluorofor bevindt, wordt het fluorescentiesignaal onderdrukt, waardoor er geen signaal gemeten wordt. Echter, tijdens de amplificatie van de doelsequentie, als de probe wordt afgebroken, vergroot de afstand tussen de Quencher en de Fluorofor. Dit resulteert in het verschijnen van een fluorescentiesignaal dat kan worden gedetecteerd. Dit maakt een nauwkeurige monitoring van de PCR-amplificatie en kwantificering van het start-DNA mogelijk (Figuur 7) (ThermoFisher Scientific, z.d.). De gebruikte probes in dit experiment zijn specifiek gericht op de detectie van de genen die coderen voor BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E en BoNT/F.



Figuur 7. Schematische weergave van het TaqMan™-Realtime PCR-principe (Synbio Technologies, z.d.).

Voor deze extracties werden zowel een poolmix gemaakt met de primers en probe van het beoogde gen als een poolmix voor de inhibitiecontrole (PUC) bereid. De samenstelling van deze poolmixen is weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Schematische weergave van de bereiding van de poolmixen voor de PCR-analyse.

	Poolmix A,B,E en F voor 1 reactie (µl)	***Poolmix PUC voor 1 reactie (µl)***
Mastermix 2x	12,5	12,5
Forward primer (10 µM)	0,15	0,125
Reverse primer (10 µM)	0,15	0,125
Probe	0,125	0,125
Nuclease-vrij water	7,075	4,125
DNA PUC	/	3
Totaal volume	20	20

Nadat de poolmixen waren bereid, werd 20 µl van elke poolmix overgebracht naar de wells van een 96-wellplaat. Vervolgens werd 5 µl nuclease-vrij water toegevoegd aan de wells van de negatieve controles. Voor de positieve controles werd 5 µl template DNA toegevoegd aan de desbetreffende wells. Daarna werd in de wells bestemd voor de stalen ook 5 µl van de DNA-extracten toegevoegd. Tenslotte werd een afdichtende folie over de plaat aangebracht. De plaat werd vervolgens kort gecentrifugeerd gedurende enkele seconden om ervoor te zorgen dat alle vloeistof zich op de bodem bevond. Nadien werd de plaat in de PCR-thermocycler geplaatst. Het toegepaste programma staat weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. Gevolgde PCR-programma.

	Temperatuur (°C)	*Tijd (min/sec/cycli)*	*Aantal cycli*
Initiële denaturatie	95	10 min	1
Amplificatie	95	15 sec	40
	60	60 sec	

7.2.6.4. Kolonie-PCR

De integratie van kolonie-PCR in de workflow bood tijdsbesparing, aangezien er geen lysaat nodig was, wat resulteerde in het wegvallen van een incubatieperiode. Het PCR-protocol omvat een initiële verhittingsstap van 10 minuten op 95°C. Deze stap is adequaat om de cellen te lyseren en DNA vrij te geven voor PCR-amplificatie. Bij het uitvoeren van kolonie-PCR werd eerst de 96-well plaat met poolmixen voorbereid, inclusief de wells voor negatieve en positieve controles. Voor het aanbrengen van DNA vanuit de stalen werd een steriele tandenstoker gebruikt, die specifiek was toegewezen voor het screenen van kolonies of het controleren van de zuivere cultuur op plaat. De procedure omvatte het aanraken van een kolonie met de tandenstoker, vervolgens het aanraken van de agarplaat op het corresponderende nummer en ten slotte het plaatsen van de tandenstoker in het overeenkomstige well. Bij kolonie-PCR die direct voorafgaat aan het opslaan in de stammenbibliotheek, werd de tandenstoker rechtstreeks in het betreffende well geplaatst. Daarna werd een sealing-film aangebracht en werd de plaat kort gecentrifugeerd. Het gebruikte PCR-programma was identiek aan het programma in tabel 3.

7.3. Resultaten en discussie

Isolatie van *C. botulinum* was succesvol voor in totaal 10 aanrijkingsculturen afkomstig van positieve stalen. Van deze aanrijkingsculturen waren er 5 afkomstig van humane stalen, waaronder monsters van stoelgang en maaginhoud. Daarnaast waren er 3 aanrijkingsculturen gelinkt aan humane gevallen, zoals monsters van gedroogde ham en worst. Bovendien werden ook stammen geïsoleerd uit 2 ringtesten. De isolatie was niet gelukt voor één van de aanrijkingsculturen afkomstig van de positieve stalen. Dit staal was afkomstig van een rectale swab.

7.3.1. ONBEHANDELDE METHODE VS BEHANDELDE METHODE

Om de verschillen tussen de drie methoden te illustreren, wordt figuur 8 gepresenteerd. Deze figuur biedt een visuele vergelijking van de resultaten van de verschillende methoden waarbij dezelfde monster werd gebruikt. Dit resulteerde in drie EYA-platen: een EYA-plaat waarop de (onbehandelde) cultuur van 3 dagen werd geïnoculeerd (Figuur 8A), een EYA-plaat waarop de cultuur van 5 dagen die behandeld werd met hitte werd geïnoculeerd (Figuur 8B), en een EYA-plaat waarop de cultuur van 5 dagen die behandeld werd met ethanol werd geïnoculeerd (Figuur 8C). De foto's werden dus genomen voordat de screening plaatsvond (Figuur 6, stap 4 blauw, stap 5 oranje en groen).

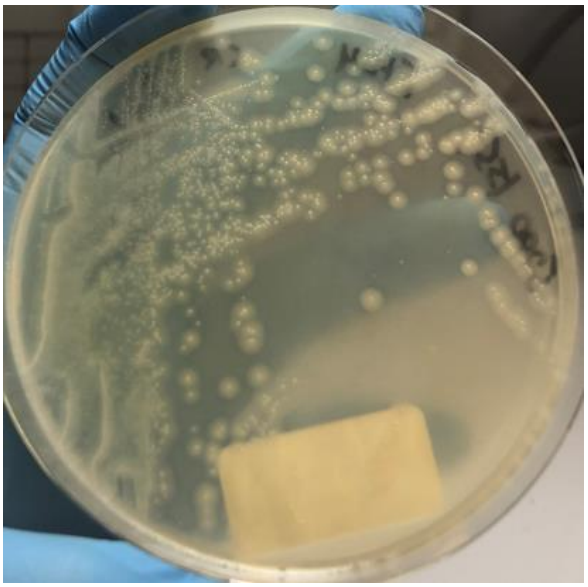


Figuur 8. A: Onbehandelde cultuur van drie dagen op EYA; B: Cultuur van vijf dagen behandeld met hitte op EYA; C: Cultuur van vijf dagen behandeld met ethanol op EYA.

Op Figuur 8A zijn meerdere soorten kolonies te zien die zijn gegroeid op de EYA-plaat. De karakteristieke kolonies kunnen echter worden onderscheiden van de andere kolonies dankzij hun visuele kenmerken, zoals de aanwezigheid van een halo. Desondanks zijn er andere kolonies aanwezig op de plaat, die behoren tot de achtergrondflora. Deze achtergrondflora is afwezig op de platen afkomstig van culturen waarvan een selectie van sporen werd gedaan. Zowel de hittebehandeling als de behandeling met ethanol heeft ervoor gezorgd dat resistente sporen in de culturen overleven en al de niet-resistente vegetatieve cellen en sporen afgedood werden. Dit resulteerde in slechts één type kolonie op de plaat. Als gevolg hiervan was de screening van de kolonies gemakkelijker op de platen met minder achtergrondflora, omdat er ook minder kans was om ongewenste kolonies te selecteren.

Belangrijk om op te merken is dat de platen op figuur 8A 48 uur nodig hadden om kolonies te vertonen, terwijl de kolonies op figuur 8B en 8C vijf dagen nodig hadden om te groeien. Dit fenomeen kan worden verklaard doordat de sporen, de inactieve vorm van de bacterie, werden geselecteerd tijdens de sporenselectie. Hierdoor moesten de sporen opnieuw "geactiveerd" worden om op de plaat te kunnen groeien. Dit zou een mogelijke verklaring kunnen zijn voor de verlengde incubatieperiode.

Figuur 9 toont een plaat waarop een onbehandelde cultuur werd uitgeplaat voordat de screening plaatsvond. Op deze plaat is de achtergrondflora beperkt, zelfs al werd de driedaagse cultuur niet behandeld. Dit kan worden verklaard door de aard van het monster. Namelijk, dit monster is afkomstig van een ringtest, die beschouwd kan worden als een "schone matrix". Het monster dat werd gebruikt en waarvan de resultaten op figuur 8 te zien zijn, is afkomstig van feces (een "vuile matrix"). Dit verschil in de aard van de monsters kan het verschil in de mate van achtergrondflora verklaren.



Figuur 9. Onbehandelde cultuur van drie dagen op EYA waarvan de staal afkomstig is van een ringtest.

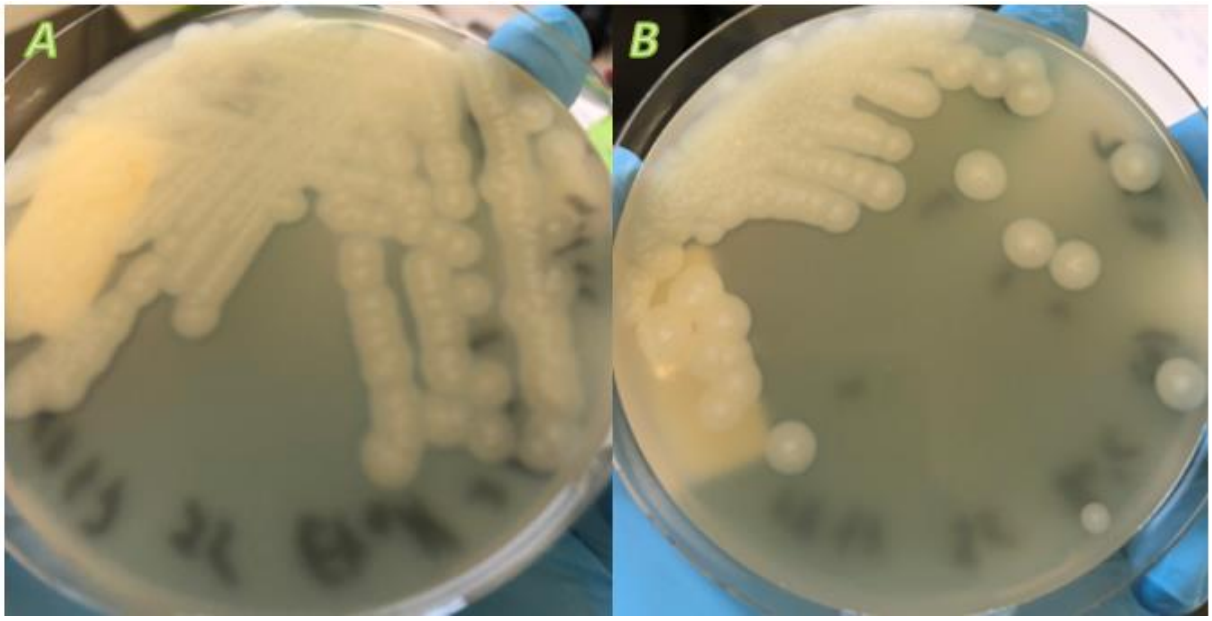
7.3.2. SPECIALE GEVALLEN

7.3.2.1. Geval 1

Het eerste speciale geval dat zich voordeed, was de isolatie van een *C. botulinum* type E. Uit de literatuur blijkt dat de sporen van *C. botulinum* type E (groep II, Tabel 1) bijna net zo gevoelig zijn voor hitte als de vegetatieve cellen van veel andere verontreinigende micro-organismen. Dit betekent dat het gebruik van hitte om de achtergrondflora te verminderen niet effectief is (Johnston et al., 1964). Daarom zou sporenselectie met behulp van hitte niet succesvol zijn, en zou ethanolbehandeling de meest geschikte methode zijn om de bacterie te isoleren. Desalniettemin werd de sporenselectie in dit geval uitgevoerd op beide manieren: ethanolbehandeling en hittebehandeling.

In theorie zou een groep II *C. botulinum* type E alleen geïsoleerd kunnen worden uit de cultuur die behandeld is met ethanol en niet uit de cultuur die behandeld is met hitte. Echter, in de praktijk werd de bacterie op beide manieren geïsoleerd (Figuur 10), wat in strijd is met de literatuur. Opmerkelijk genoeg werden de PCR-resultaten naast de visuele resultaten geplaatst. Hierbij werd opgemerkt dat de kolonies afkomstig van de tube die behandeld was met ethanol negatief testten voor het gentype E, terwijl de kolonies afkomstig van de tube die met hitte behandeld was, positief testten voor hetzelfde gentype.

Er werd gespeculeerd dat het mogelijk niet om *C. botulinum* type E ging, maar om *C. butyricum*, die ook type E kan zijn (groep V, Tabel 1). Bij deze laatste bacteriestam bevindt het BoNT/E-coderende gen zich op een plasmide. Tijdens de ethanolbehandeling zou het plasmide uit de bacterie kunnen zijn gekomen, waardoor de bacterie nog steeds visuele kenmerken vertoont maar waarvan de PCR-resultaten negatief zijn. Om deze hypothese te bevestigen, werd een matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight of MALDI-TOF-analyse uitgevoerd op de kolonies. Deze analyse gaf geen eenduidige resultaten, waardoor de bacteriën werden geselecteerd voor de sequencing.



Figuur 10. A: EYA-plaat geënt met de ethanol-behandelde cultuur; B: EYA-plaat geënt met de hitte-behandelde cultuur.

7.3.2.2. Geval 2

Het tweede speciale geval betrof de isolatie van *C. botulinum* type B, waarbij de aanrijkingsculturen afkomstig waren van twee verschillende stalen. Om een screening van kolonies uit te kunnen voeren, moeten er geïsoleerde kolonies aanwezig zijn. Echter, bij deze twee stammen werden na de inoculatie van de EYA-platen geen geïsoleerde kolonies waargenomen. In plaats daarvan was er sprake van een bacterieel tapijt (Figuur 11A en 11B), waardoor screening onmogelijk was.

Eén van de stalen had echter al een stam in de stammenbibliotheek. Om te bevestigen of de uitgroei tot een tapijt specifiek was voor deze stam, werd een EYA-plaat geënt met de stam uit de stammenbibliotheek (Figuur 11C). Hierbij werd vastgesteld dat de uitgroei inderdaad specifiek was voor deze stam, wat betekende dat de bacterie niet geïsoleerd kon worden.



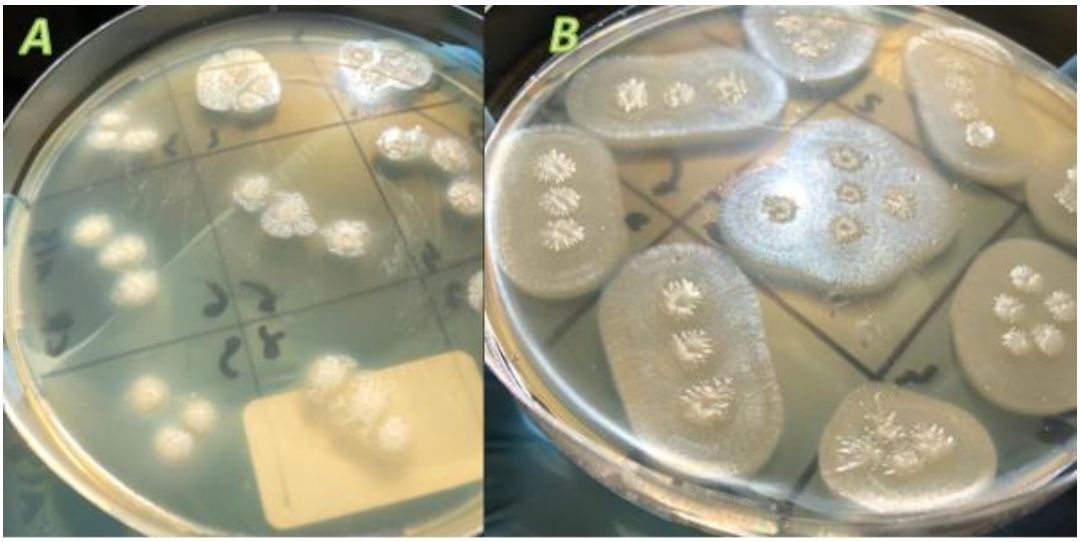
Figuur 11. A: EYA-plaat met bacteriele tapijt van aanrijkingscultuur nummer 1; B: EYA-plaat met bacteriele tapijt van aanrijkingscultuur nummer 2; C: Zone van EYA-plaat waarop de stam die zich al in de stammenbibliotheek bevond, geënt werd.

Desondanks werden de stammen van deze twee aanrijkculturen wel in de stammenbibliotheek geplaatst na PCR-analyse van het bacteriële tapijt, omdat de resultaten van deze PCR-analyse positief waren voor het betrokken gen. Er werd echter een opmerking toegevoegd aan de cryo-tube (met de stam) in de

stammenbibliotheek, waarin werd vermeld dat deze mogelijk contaminanten en ongewenste micro-organismen zou kunnen bevatten, aangezien deze niet afkomstig was van een geïsoleerde kolonie maar van een bacterieel tapijt.

7.3.2.3. Geval 3

Het derde en laatste speciale geval betrof een *C. botulinum* type B. Vanwege een gebrek aan gas voor de anaërobe kast, moest er onder een laminaire flow worden gewerkt voor sommige aanrijkingsculturen, die vervolgens werden geïncubeerd in anaërobe potten. Tijdens de verwerking van deze aanrijkingsculturen kwamen de culturen en EYA-platen dus in contact met zuurstof. Eén van de stalen reageerde op de aanwezigheid van zuurstof door na de screening van kolonies een korst te vormen op de kolonies (Figuur 12A). Dit bemoeilijkte de stappen na de screening van kolonies, omdat het oppikken van positieve kolonies moeilijker werd door de aanwezigheid van de korst. Na het verhelpen van het gastekort in de anaërobe kast werd deze aanrijkingscultuur opnieuw gestart. In tegenstelling tot de eerste run kwam de tweede run van de aanrijkingscultuur niet in contact met zuurstof. Bij de tweede run was er geen korstvorming op de kolonies (Figuur 12B), waardoor de screening van kolonies en het opnieuw in cultuur brengen van de positieve kolonies geen problemen opleverden en de stam uiteindelijk wel geïsoleerd kon worden. Het is mogelijk dat de vorming van korsten op kolonies specifiek was voor deze stam, aangezien andere stammen die ook in contact kwamen met zuurstof tijdens de eerste run, geen korst vormden.

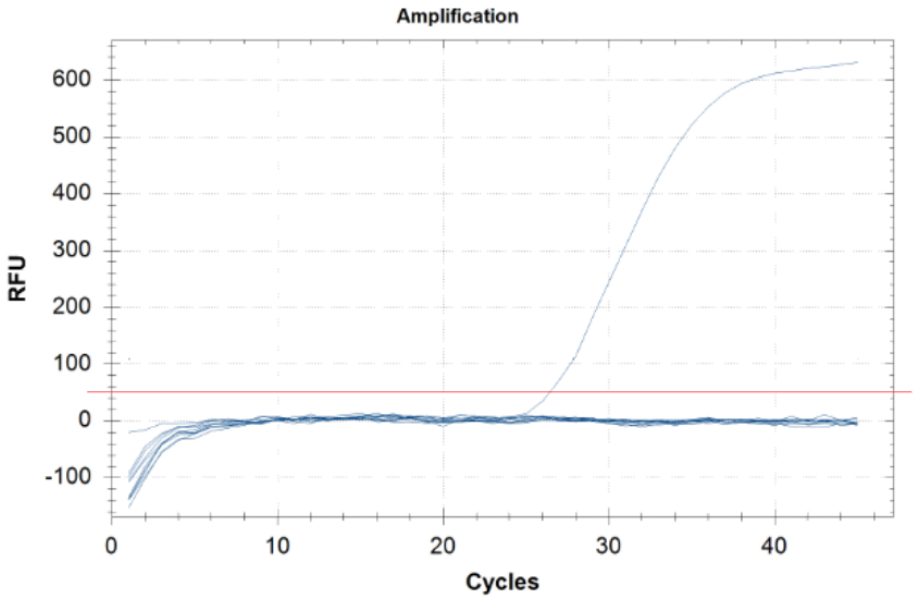


Figuur 12. A: EYA-plaat waarop screening van kolonies van de eerste run werd uitgevoerd en waarbij korst op de kolonies waarneembaar is; B: EYA-plaat waarop screening van kolonies van de tweede run werd uitgevoerd en waarbij de korst afwezig is.

7.3.3. DNA-EXTRACTIE EN PCR

DNA werd verkregen via verschillende extractiemethoden, zoals Chelex®-extractie, lysaat en kolonie-PCR, en gebruikt voor bacteriedetectie via PCR. Om PCR-resultaten te valideren, worden verschillende controles toegepast. De grenswaarde wordt op 50 relatieve fluorescente units (RFU) gezet om achtergrondsignalen te minimaliseren. Een cyclusdrempelwaarde (Ct-waarde) lager dan 40 wordt vereist voor een positieve hit, bevestiging van doel-DNA aanwezigheid. Een exponentiële amplificatiecurve geeft optimale PCR-efficiëntie en consistente amplificatie van doel-DNA aan. Als de curve niet exponentieel is, zelfs bij Ct-waarden onder de 30, kan dit duiden op technische problemen of onnauwkeurigheden, waardoor het resultaat als negatief

wordt geïnterpreteerd. Daarom is het cruciaal om zowel de Ct-waarde als de vorm van de amplificatiecurve te evalueren bij het interpreteren van PCR-resultaten.



Figuur 13. Voorbeeld van grafiek die verkregen werd na de PCR-analyse.

PUC-DNA wordt gebruikt om te controleren op inhibitoren die de PCR kunnen verstoren. Verder wordt een negatieve controle (watermonster zonder DNA) gebruikt om contaminatie en vals-positieve resultaten te controleren, terwijl een positieve controle (monster met bekend doel-DNA) de PCR-efficiëntie bevestigt. Een positief resultaat wordt bevestigd als aan alle bovenstaande criteria wordt voldaan, terwijl een negatief resultaat wordt bevestigd als er geen amplificatie wordt waargenomen in monsters met Ct-waarden hoger dan 40 en de controles passend zijn. Toch zijn er gevallen waarbij een resultaat kan bevestigd worden waarbij niet alle criteria's wordt voldaan. Tabel 4 biedt een samenvatting van de interpretaties van de resultaten voor elk scenario.

Tabel 4. Interpretatie van PCR-resultaten per situatie. Het teken "+" betekent dat er een amplificatie heeft plaatsgevonden, terwijl het teken "-" aangeeft dat er geen amplificatie is opgetreden.

Geval	Ct-waarde aanrijkingscultuur	PUC-DNA	Negatieve controle	Positieve controle	Interpretatie
1	< 40	+	-	+	Positief resultaat
2	> 40	+	-	+	Negatief resultaat
3	< 40	+	+	+	Contaminatie, PCR dient herhaald te worden
4	> 40	+	+	+	Contaminatie, PCR dient herhaald te worden
5	< 40	-	-	-	Positief resultaat met inhibitie bij PUC en vermoedelijk ook bij de positieve controle
6	> 40	-	-	-	Run moet opnieuw uitgevoerd worden aangezien zowel de PUC als de positieve controle negatieve resultaten geven.
7	< 40	-	-	+	Positief resultaat (ook al is de PUC negatief)
8	> 40	-	-	+	Run moet opnieuw uitgevoerd worden, eventueel op een verdunning van het DNA extract, aangezien de PUC inhibitie aanduid

Als de PUC negatief is en de run opnieuw moet worden uitgevoerd, wordt een verdunning van het monster geanalyseerd. Als het resultaat van de herhaalde run op een verdund DNA-extract wel positief is, duidt dit erop dat er bepaalde componenten in het oorspronkelijke DNA-extract aanwezig zijn die de PCR-reactie inhiberen. Als het resultaat nog steeds negatief is, maar de PUC positief is, kan worden geconcludeerd dat er tijdens de initiële run een probleem was met de PUC en dat het monster geen DNA van de bacterie bevat. Op deze manier worden de resultaten van de PCR geïnterpreteerd.

In tabel 5 worden enkele resultaten besproken. Hierbij kan worden gezien dat staal 1 positief is voor het gen *bontA* maar negatief is voor het gen *bontF*. Voor staal 2 is zeker geweten dat gen *bontF* aanwezig is in het staal. Wat betreft gen A kan worden opgemerkt dat er iets is gedetecteerd, maar dit duidt mogelijks op een contaminatie tijdens de bereiding van de PCR-mix.

Gen B werd getest bij staal 3. Bij de eerste poging wordt het gen niet gedetecteerd, en zijn zowel de PUC als de positieve controle negatief. Daarom werd een verdunning van het staal gemaakt en werd de PCR opnieuw uitgevoerd. Bij de tweede run komen de PUC en de positieve controle positief uit, maar het gen wordt nog steeds niet gedetecteerd. Dit resultaat duidt op een negatief resultaat voor het staal. Omdat zowel de PUC als de positieve controle negatief zijn bij de eerste run, is het mogelijk dat de PCR technische problemen ondervond of dat de PCR-mixen niet nauwkeurig werden gemaakt waardoor geen enkel staal correct kon amplificeren.

Bij staal 4 is bij de eerste run geen detectie waar te nemen. Bovendien is ook de PUC negatief, wat kan wijzen op inhibitie. Daarom werd de analyse herhaald met een verdunning van het staal. Het gen wordt

bij de verdunde staal wel gedetecteerd en de PUC is positief. Dit wijst op een staal met veel inhibitoren, wat mogelijk heeft geleid tot inhibitie van de PUC bij het onverdunde monster, waardoor deze niet kon worden gedetecteerd.

Staal nummer 5 betrof het speciale geval dat eerder werd besproken (Zie 7.3.3.1), waarbij er twijfel bestond over de mogelijke aanwezigheid van *C. butyricum*. De onzekerheid over de PCR-resultaten ontstond door het ontbreken van een positieve controle, waardoor het onduidelijk was of negatieve resultaten te wijten waren aan gen-afwezigheid of PCR-inhibitie. Om dit te verifiëren, werden acht kolonies van zowel ethanol- als hitte-behandelde monsters getest. Alle ethanol-behandelde kolonies waren PCR-negatief, terwijl alle hitte-behandelde kolonies PCR-positief waren met een gemiddelde Ct-waarde van 23,77. Door standaardisatie van de PCR-procedure en het testen van meerdere kolonies werd bevestigd dat de resultaten valide waren, en mogelijke PCR-inhibitie werd uitgesloten.

Tabel 5. Voorbeelden van hoe de resultaten werden geïnterpreteerd in het laboratorium.

Staal (Targetgen)	Ct-waarde	PUC	Negatieve controle	Positieve controle	Interpretatie
Staal 1 (Ba)	18,14	+	+	+	Positief resultaat (met contaminatie bij de negatieve controle maar verwaarloosbaar aangeziend de Ct-waarde laag is)
Staal 1 (Bf)	--	+	-	+	Negatief resultaat
Staal 2 (Ba)	36,41	+	+	+	Positief resultaat met vermoedelijk een contaminatie tijdens de PCR-bereiding. De PCR moet herhaald worden aangezien de Ct-waarde hoog is.
Staal 2 (Bf)	18,66	+	-	+	Positief resultaat
Staal 3 (Bb)	--	-	-	-	Run opnieuw uitgevoerd met een verdunde staal
Staal 3 (Bb) (10x verdunning)	--	+	-	+	Negatief resultaat
Staal 4 (Bb)	--	-	+	+	Run opnieuw uitgevoerd met een verdunde staal
Staal 4 (Bb) (10x verdunning)	30,12	+	+	+	Positief resultaat (met contaminatie bij de negatieve controle)
Staal 5 (Be) (Behandeld met ethanol)	--	/	-	+	Negatief resultaat
Staal 5 (Be) (Behandeld bij 80 °C)	23,77	/	-	+	Positief resultaat

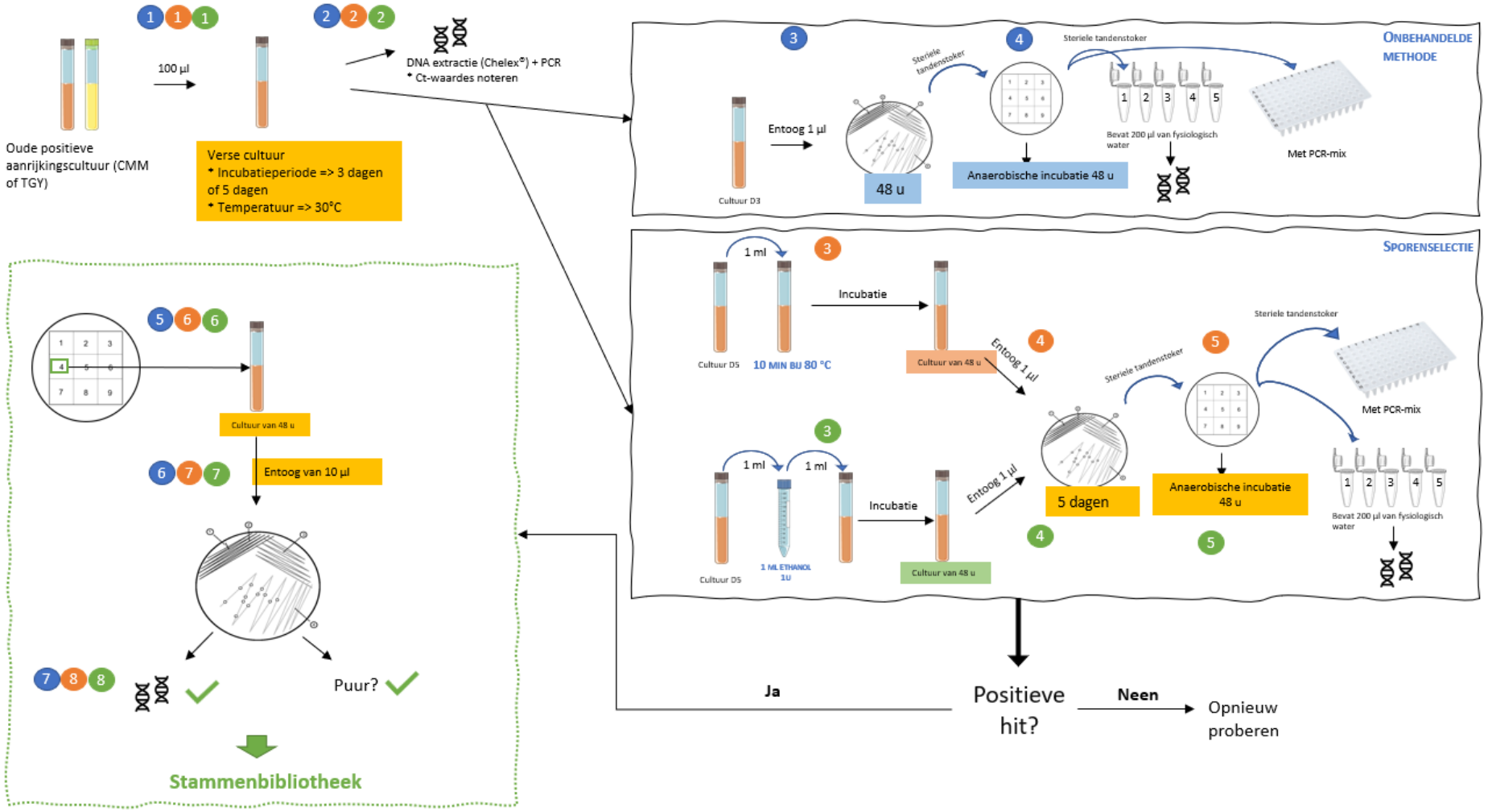
7.4. Conclusie

Uit dit eerste deel van het experiment kunnen verschillende conclusies worden getrokken dankzij de isolatie van *C. botulinum* uit in totaal 10 aanrijkingsculturen afkomstig van positieve stalen. Het protocol voor de isolatie van *C. botulinum* werd geoptimaliseerd door verschillende parameters te overwegen. Er werd vastgesteld dat de aard van de staal, of deze schoon of vuil was, belangrijk was voor de keuze van de juiste methode (wel of geen sporenselectie). Stalen met een schone matrix hadden geen behandeling nodig vanwege de beperkte aanwezigheid van achtergrondflora. Voor stalen met een vuile matrix, zoals fecesstalen, was een protocol met geïntegreerde sporenselectie meer geschikt om de stam te isoleren. Dit komt door de grotere hoeveelheid achtergrondflora, waardoor de selectie van sporen nodig was als extra stap om vervolgens de screening van kolonies te vergemakkelijken.

Wat betreft de incubatieperiodes, is opgemerkt dat de EYA-platen waarop behandelde culturen werden geïnoculeerd (Figuur 14, stap 4 oranje en groen), meer tijd nodig hadden om groei te vertonen. Dit is te wijten aan het feit dat de sporen waren geselecteerd, wat betekende dat ze opnieuw tijd nodig hadden om te ontkiemen en vervolgens te kunnen groeien op een EYA-plaat.

Bij de laatste stap van het isolatieprotocol werd ook een significant verschil waargenomen in het inoculum (Figuur 14, stap 6 blauw, stap 7 oranje en groen). Bij het gebruik van een entoog van 1 µl was de groei onvoldoende om de stam in de stammenbibliotheek op te slaan, waardoor het nodig was om deze over te brengen naar een nieuwe EYA-plaat. Daarentegen was de groei op de EYA-plaat voldoende bij het gebruik van een entoog van 10 µl, waardoor directe opslag in de stammenbibliotheek mogelijk was.

Uit de discussie van de speciale gevallen kan worden geconcludeerd dat er mogelijk een isolatie van *C. butyricum* heeft plaatsgevonden, waarvan de bevestiging kan worden verkregen door middel van sequencen. Bovendien lijkt het erop dat sommige stammen van deze bacterie de neiging hebben om uit te groeien tot een bacterieel tapijt, wat de isolatie ervan bemoeilijkt. Daarnaast kan de aanwezigheid van zuurstof reacties veroorzaken bij bepaalde stammen, zoals korstvorming.



Figuur 14. Geoptimiseerde workflow voor de isolatie van *C. botulinum*.

8. DNA-EXTRACTIE VAN *C. BOTULINUM* CULTUREN

8.1. Doel en principe

Het doel van dit tweede deel van het onderzoek is om de optimale parameters te identificeren voor de cultivering van *C. botulinum* en vervolgens het extraheren van DNA van voldoende kwaliteit voor zowel short-read als long-read WGS. Voldoende kwaliteit wordt gedefinieerd als DNA-extracten met minimale contaminanten, zoals RNA en eiwitten, en met een voldoende hoge DNA-opbrengst en lengte van DNA-fragmenten voor long-read sequencing.

8.1.1. DNA-EXTRACTIE

De DNA-extractie met behulp van de Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit en het Maxwell®-apparaat wordt toegepast op vloeibare culturen, waarbij de verkregen DNA-extracten vervolgens worden gebruikt voor WGS. Het Maxwell® RSC Instrument voert een geautomatiseerde zuiveringsprocedure uit die bestaat uit verschillende stappen. Allereerst wordt het monster gelyseerd in aanwezigheid van een lysis buffer (een mengsel van lysozyme en nuclease-vrij water). Vervolgens binden de nucleïnezuren aan de paramagnetische deeltjes. Door het wegspoelen van andere celcomponenten blijven de gebonden doelmoleculen (het DNA) over. Tijdens het elutieproces wordt het uiteindelijke product geëxtraheerd. Voor de Maxwell®-methode worden er vier condities getest. Vier verschillende condities werden getest, waarbij verschillende combinaties van parameters werden geëvalueerd. Deze omvatten twee verschillende media (TPGY en Brain Heart Infusion of BHI), twee verschillende incubatieperioden (24 uur en 72 uur), twee verschillende volumes (1 ml en 1,5 ml), en twee verschillende concentraties van lysozyme (25 mg/ml en 100 mg/ml).

8.1.2. KWALITEITSBEPALING VAN HET DNA

Extractie met Maxwell® geniet de voorkeur vanwege de significant effectievere verwijdering van contaminanten vergeleken met extractie met Chelex®. Deze zuiverheid is een cruciale factor voor het sequencen van DNA. De zuiverheid, verkregen dankzij de Nanodrop-2000, wordt beoordeeld aan de hand van twee ratios: de 260/280-verhouding en de 260/230-verhouding. De verhouding van de gemeten absorbanties bij 260 nm en bij 280 nm wordt gebruikt om de mate van eiwitverontreiniging in het DNA-extract te beoordelen, waarbij een lagere ratio wijst op meer eiwitverontreiniging (of andere contaminanten). verhouding van de gemeten absorbanties bij 260 nm en bij 230 nm geeft extra informatie over mogelijke contaminatie met organische componenten die tijdens de DNA-extractie kunnen zijn gebruikt (Koetsier & Cantor, z.d.). Voor short-read sequencing moet de 260/280-verhouding tussen 1,8 en 2,2 liggen, terwijl de 260/230-verhouding boven 2,0 moet zijn. Voor long-read sequencing moet het DNA een 260/280-verhouding hebben tussen 1,8 en 2,0 en een 260/230-verhouding tussen 2,0 en 2,2 (Michigan State University, z.d.).

De concentratie wordt gemeten aan de hand van de Quantus™ Fluorometer. De Quantus™ Fluorometer gebruikt fluorescentie-dye om nucleïnezuren te detecteren. De dye bindt aan het monster, dat vervolgens wordt belicht met specifiek licht om de dye te exciteren. De geëxciteerde dye zendt fluorescent licht uit dat wordt gedetecteerd en gemeten. De intensiteit van het licht is evenredig met de concentratie nucleïnezuren in het monster, wat wordt gebruikt om de concentratie te bepalen met behulp van een kalibratiecurve

(Promega, z.d.). Dit maakt het een zeer gevoelige en specifieke methode voor het kwantificeren van nucleïnezuren (Paul et al., 2021).

Pulsed-field gel elektroforese (PFGE) heeft als doel om grote DNA-fragmenten te scheiden op basis van grootte door middel van een periodiek afwisselend elektrisch veld, waardoor de beweging van de fragmenten wordt gereguleerd. Deze techniek maakt het mogelijk om DNA-moleculen tot honderden kilobasenparen lang te scheiden, waardoor het geschikt is voor het analyseren van zeer grote genomische DNA-fragmenten. Met PFGE wordt onderzocht of het geëxtraheerde DNA niet te sterk gefragmenteerd is voor de sequencing. Deze techniek maakt het mogelijk om de grootteverdeling van het DNA te analyseren en te beoordelen of het DNA voldoende intact is voor succesvolle sequencing.

8.1.3. SEQUENCING

Short-read sequencing, bijvoorbeeld Illumina, genereert korte DNA-fragmenten die ideaal zijn voor analyses met een hoog doorvoervermogen zoals genoom-hersequencing[2] en transcriptomics[3]. Long-read sequencingtechnologieën, zoals MinION, produceren langere DNA-lezingen, waardoor een betere resolutie van complexe genomische regio's mogelijk is en nauwkeurige identificatie van structurele variaties, zij het met hogere kosten en foutenpercentages. Short-read sequencing is kosteneffectief en geschikt voor routinematige analyses, terwijl long-read sequencing verbeterde genoomassemblage en detectie van structurele varianten biedt (Illumina, z.d.).

8.2. Materiaal en methode

8.2.1. MATERIAAL

Voor de DNA-extracties werd er gebruik gemaakt van nuclease-vrij water (Invitrogen™, Ref. 10977-015), Ultra-Puur water (Invitrogen™, Ref. 10977-015), Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit (Promega, Ref. AS1620), Tris-EDTA buffer (TE-buffer) (Invitrogen™, Ref. AM9849), gevriesdroogde lysozymen van kippeneiwit (Sigma, Ref. L4919), micropipetten, tipjes, eppjes van 2 ml en van 1,5 ml, falcontubes van 15 ml en 50 ml, vortex, centrifuge, thermoshaker (37 °C) en een Maxwell® RSC Instrument (Promega, Ref. AS4500).

Het deel van kwaliteitscontrole vereiste een Nanodrop-2000 (ThermoFisher Scientific™, Ref. ND-2000), Quantus™ Fluorometer (Promega, Ref. E6150), PCR-tubes (ThermoFisher Scientific™, Ref. E4942), de kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega, Ref. E2670), sterile dH_2O, 10X Tris-Borate EDTA buffer (TBE-buffer) in poeder (Ambion®, Ref. AM9864), Seakem® Gold Agarose (Lonza®, Ref. 50150), HDGreen® Plus DNA Stain (Intas Science Imaging, Ref. ISII-HDGreen Plus), Bleu/Orange 6X loading dye (Promega, Ref. G1881), CHEF DNA Size Standards 8-48 kb ladder (Bio-Rad, Ref. 170-3707), CHEF Mapper® XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad, Ref. 170-3670) en het toestel Proxima-2500 (Isogen Life Science).

Voor Illumina-sequencing werden DNA-extracten gebruikt samen met nucleasevrij water (Invitrogen™, Ref. 10977-015). Voor sequencing via de MinION werd de Rapid Barcoding Kit 96 V14 (Oxford Nanopore

[2] Genoom-hersequencing omvat het opnieuw bepalen van de volledige genetische sequentie van een organisme, waardoor variaties, mutaties en andere genetische eigenschappen nauwkeurig kunnen worden geïdentificeerd.
[3] Transcriptomics is het onderzoek naar alle RNA-transcripten die in een cel of weefsel aanwezig zijn, om inzicht te krijgen in genexpressie en regulerende mechanismen.

Technologies™, Ref. SQK-RBK114.96), een magnetische rek en de MinION Mk1C Sequencing Device (Oxford Nanopore Technologies™, Ref. MIN-101C) gebruikt.

8.2.2. DNA-EXTRACTIE

8.2.2.1. Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit

De DNA-extractie met behulp van de de Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit en het Maxwell®-apparaat werd uitgevoerd voor DNA-extracten die werden gebruikt tijdens de sequencing. Voorafgaand aan het experiment werden enkele oplossingen bereid. De stockoplossing van lysozyme werd verkregen door 500 mg van het gevriesdroogde lysozyme op te lossen in 5 ml nuclease-vrij water. Vanuit deze stockoplossing, met een concentratie van 100 mg/ml, kon een werkoplossing worden bereid met een concentratie van 25 mg/ml. Deze werkoplossing werd verkregen door 250 µl van de stockoplossing te mengen met 750 µl nuclease-vrij water. Beide oplossingen werden bewaard bij -20 °C en vlak voor gebruik ontdooid bij 4 °C.

In een eppendorf buisje van 2 ml werd 1 ml of 1,5 ml van het aanrijkingscultuur overgebracht, waarna het werd gecentrifugeerd bij 5000 g en 4 °C gedurende 10 minuten. Het supernatans werd verwijderd en het pellet werd geresuspendeerd in 300 µl TE-buffer. Vervolgens werd 100 µl van de lysozyme-oplossing (25 mg/ml of 100 mg/ml) toegevoegd aan het mengsel, waarna het geheel werd geïncubeerd op een thermoshaker bij 37 °C gedurende 30 minuten. Tijdens de incubatiestap werd het benodigde materiaal op de rek van het Maxwell®-toestel voorbereid, inclusief een cartridge met een tipje en een Maxwell®-eppendorf buisje met 80 µl elutiebuffer, zoals opgenomen in de Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit. Na de incubatieperiode werden de eppendorf buisjes grondig gevortexed en het mengsel werd overgebracht naar het eerste putje van de cartridge op het Maxwell®-rek. Het rek werd teruggeplaatst in het toestel en de DNA-extractie werd gestart. De extractie, uitgevoerd door het toestel, duurde ongeveer 45 minuten. Na deze tijd werden de Maxwell®-eppendorf buisjes onmiddellijk gesloten om materiaalverlies te voorkomen. Vervolgens ondergingen ze een laatste centrifugatiestap en het supernatant werd overgebracht naar een steriel eppendorf buisje.

8.2.3. CONCENTRATIE- EN KWALITEITSBEPALING VAN HET DNA

8.2.3.1. Nanodrop-2000

Het Nanodrop-protocol begon met het inschakelen van het apparaat. Vervolgens werd het meetstation of de optische unit van de Nanodrop gereinigd met een zachte doek en nucleasevrij water om eventuele verontreinigingen te verwijderen. Daarna werd 1-2 µl nucleasevrij water of elutiebuffer (voor de extracten afkomstig van de extractie met het Maxwell®-toestel) toegevoegd als blanco op het meetstation, en werd het deksel gesloten. Na de blancometing werd het deksel geopend. Het oppervlak van de optische unit van de Nanodrop werd vervolgens afgeveegd met het vochtige doekje, gevolgd door het aanbrengen van een druppel van het DNA-monster (1-2 µl). Het deksel werd opnieuw gesloten en de meting werd gestart. De meting werd tweemaal uitgevoerd om een gemiddelde waarde te verkrijgen. Nadat de meting was voltooid, werden de gemeten concentratie en zuiverheid van het monster opgeslagen op de server van Sciensano. Ten slotte werd het meetstation grondig gereinigd met nucleasevrij water en droog geveegd voor toekomstig gebruik.

8.2.3.2. Quantus™ Fluorometer

Eerst werd de werkoplossing, de standaard (en de blanco) bereid. Hiervoor was 1X TE-buffer vereist. 1X TE-buffer werd bereid door 20X TE-buffer (pH 7.5) te verdunnen met nucleasevrij water. Dit gebeurde door 200µl van 20X TE-buffer te combineren met 3,800µl nucleasevrij water om 4 ml 1X TE-buffer te verkrijgen. De werkoplossing van de QuantiFluor®-kleurstof werd bereid met 1X TE-buffer door een verdunning van 1:400 te maken. Om dit te doen werd 10µl QuantiFluor® dsDNA Dye gecombineerd met 3,990µl 1X TE-buffer en gemengd.

In een PCR-tube werd voor de blanco 200 µl van de werkoplossingen overgebracht. De standaard werd bereid door 200 µl van de werkoplossing te vermengen met 1,5 µl lambda DNA standaard. Voor de monsters werden in PCR-tubes telkens 200 µl van de werkoplossing vermengd met 1,5 µl DNA-monster. Alle tubes werden gedurende 5 minuten in het donker, bij kamertemperatuuur geïncubeerd. Nadien werd het toestel met behulp van de blanco en de standaard, gekalibreerd door eerst de blanco te meten en nadien de standaard. De PCR-tubes met de stalen werden nadien gemeten en de waarde werd opgeschreven.

8.2.3.3. PFGE

Als eerste werd TBE-buffer bereid door de inhoud van het zakje 10X TBE-bufferpoeder op te lossen in een fles met 2 l steriel dH_20. Hierdoor ontstond een 5X TBE-buffer. Vervolgens werd deze oplossing tien keer verdund om een 0,5X TBE-buffer te verkrijgen, waarmee verder werd gewerkt. Er werd ongeveer 2 l 0,5X TBE-buffer in de elektroforesekamer gegoten, en de pomp werd geactiveerd om te controleren of de vloeistof goed door het apparaat kon circuleren.

Voor het bereiden van een 1 % agarosegel, werd 100 g agarosepoeder vermengd met 100 ml 0,5X TBE-buffer en vervolgens gedurende 90 seconden verwarmd in de microgolf. Na verwarming werd 6 ml HDGreen® Plus DNA stain toegevoegd. Het mengsel werd enkele minuten afgekoeld op de bench voordat het in een gelmal met een kam werd gegoten. Tegelijkertijd werd een tweede gel voorbereid en werden de DNA-stalen en de ladder in tubes geprepareerd. De concentraties van de stalen werden verkregen tijdens de Quantus™-meting, waarbij werd gestreefd naar ongeveer 200 à 300 ng DNA om in de gel te laden. Om een gestandaardiseerde run te garanderen, werd telkens een totaal volume van 10 µl gebruikt. De aanlenging van de stalen gebeurde met een 1X Loading Dye (verdund van de 6X Loading Dye). Bovendien werd 10 µl van de ladder in de gel geladen door 1 µl ladder te combineren met 9 µl 1X Loading Dye. De praktische uitvoering wordt geïllustreerd in tabel 6.

Tabel 6. Overzicht van de berekening van de staalverdunningen voor de PFGE.

Tube nummer	Beginconcentratie (ng/µl)	Volume (µl) om tussen 200 ng en 300 ng te hebben	Volume (µl) 1X Loading Dye	Eind-concentratie (ng)	Eindvolume (µl)
1	140	2	8	280	10
2	129	2	8	258	10
3	194	1,5	8,5	291	10
4	114	2	8	128	10
5	169	1,5	8,5	253,5	10
6	158	2	5	316	10
7	209	1	9	209	10
8	211	1	9	211	10
9	92	3	7	276	10
10	152	2	8	204	10

Nadat de agarosegel was gestold en de stalen waren voorbereid, werd de kam voorzichtig verwijderd en werd de ladder geladen in slot 1 en 12. Vervolgens werden de stalen geladen in de slotjes tussen 1 en 12. Daarna werd de tweede gel gebruikt om de slotjes af te sluiten door langzaam vloeibare en afgekoelde agarosegel in de slotjes te pipetteren. Zodra alles volledig was gestold, werd de gel in de elektroforesekamer geplaatst. Twee runs werden uitgevoerd als gevolg van onbespreekbare resultaten bij de eerste run (Zie sectie 8.3.2.3.). Tabel 7 presenteert de twee verschillende toegepaste programma's.

Tabel 7. Overzicht van de gebruikte programma's voor de twee runs van PFGE.

	Eerste run	***Tweede run***
Mode	Auto-algorithme	Fige
Molecular weight	Low: 19 kb, High: 600 kb	Low: 19 kb, High: 600 kb
Calibration factor	'No Change'	'No Change'
Physical parameters	0,5X TBE, 14 °C, 1 % PFC agarose	0,5X TBE, 14 °C, 1 % PFC agarose
Run time	19 h	24 h
Initial Switch Time	2,16 seconds	Logarithmically from 0,22 seconds to 0,92 seconds with rampfactor of 0,357

Na de run, werd de gel in de Proxima-2500 geplaatst om de resultaten te kunnen visualiseren.

8.2.4. SEQUENCING

8.2.4.1. Bereiding voor Illumina-sequencing

De sequencing met behulp van Illumina-technologie werd uitgevoerd buiten de faciliteiten van Sciensano, bij het bedrijf Eurofins. Om de monsters naar Eurofins te kunnen verzenden, waren bepaalde criteria vereist. Dit omvatte een minimale hoeveelheid van 200 ng DNA per monster, met een maximale monsteromvang van 200 µl en een minimale concentratie van 1 ng/µl. Als extra voorzorgsmaatregel werd getracht om 300 ng DNA per monster te verzenden.

Na de verdunningen werden de stalen doorgestuurd naar Eurofins. Dit deel bevat geen analyse van de resultaten, de gegevens worden echter later ontvangen door Sciensano.

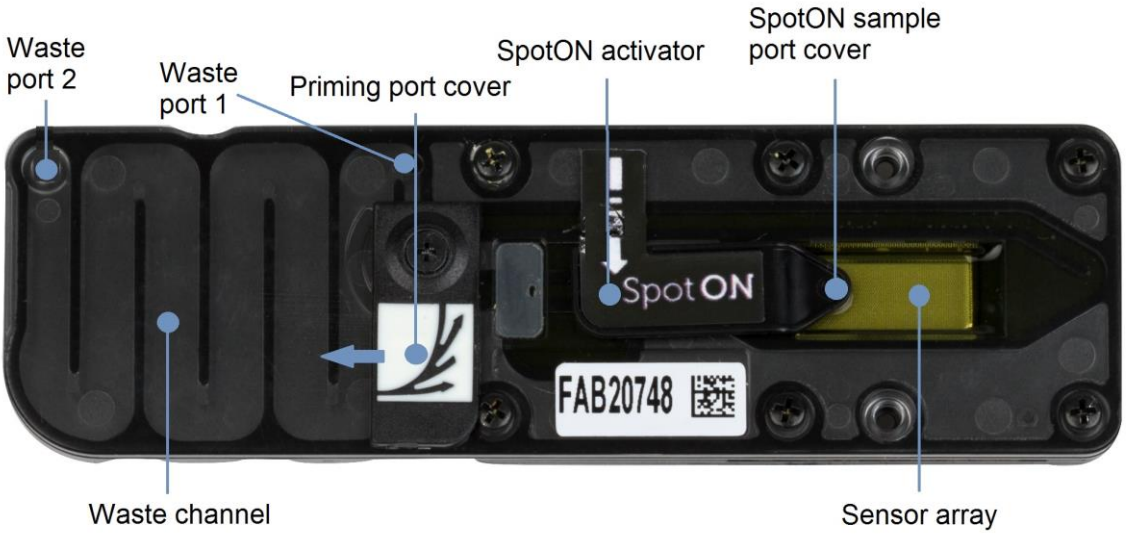
8.2.4.2. MinION

Barcoding bij de MinION heeft als doel verschillende DNA-monsters te identificeren tijdens het sequentieerproces door elk monster te voorzien van een unieke barcode. Deze barcodes worden gekoppeld aan het DNA van de monsters voordat de sequentieerprocedure begint. Tijdens het sequencen worden de barcodes gelezen samen met de DNA-sequenties, waardoor elke sequentie kan worden toegewezen aan zijn oorspronkelijke monster. Dit maakt het mogelijk om meerdere monsters tegelijkertijd te sequencen en hun genetische informatie nauwkeurig te onderscheiden en te analyseren (Srivathsan et al., 2021).

50 ng genomisch DNA werd per monster overgebracht naar PCR-tubes. Het volume werd aangepast tot 9 µl met nuclease-vrij water. Daarna werd 1 µl Rapid Barcodes toegevoegd per tube. De tubes werden gemengd door voorzichtig te schudden. Vervolgens werden de tubes gedurende twee minuten bij 30 °C geïncubeerd en daarna gedurende twee minuten bij 80 °C in een thermocycler. Nadien werden ze op ijs gebracht om DNA-fragmentatie te voorkomen.

De inhoud van alle buisjes werd overgebracht naar één 1,5 ml Eppendorf-tube. De AMPure XP Beads werden grondig gevortexed om alle beads te hersuspenderen. Vervolgens werd 10 µl van deze beads overgebracht naar de Eppendorf-tube die het DNA en de rapid barcoding bevatte. Het geheel werd gedurende vijf minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd op de thermoshaker. Tijdens deze incubatieperiode werd 3 ml vers ethanol 80 % bereid door 2,4 ml ethanol 100 % te vermengen met 0,6 ml nuclease-vrij water. Na de incubatieperiode werd de tube op het magnetisch rek geplaatst totdat een pellet werd gevormd. Vervolgens werd de vloeistof verwijderd en werd het pellet geresuspendeerd in 1,5 ml ethanol 80 %. Dit proces werd herhaald, waarbij de vloeistof opnieuw werd verwijderd na pelletvorming en het pellet werd geresuspendeerd in ethanol 80 %. De tube werd opnieuw op het magnetisch rek geplaatst en op gelaten om de resterende ethanol te laten verdampen. Na enkele minuten werd de tube weggenomen van het magnetisch rek en werd het pellet geresuspendeerd in 15 µl elutiebuffer. Dit mengsel werd gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens werd de tube opnieuw op het magnetisch rek gezet en werd het eluaat zorgvuldig overgebracht naar een steriele 1,5 ml Eppendorf-tube, zonder de beads mee te nemen. Van dit mengsel werd 1 µl gebruikt voor een Quantus™-meting. De gewenste concentratie voor de MinION was maximaal 200 ng/µl in het eluaat, en de gemeten concentratie was 35 ng/µl, waardoor geen verdunning vereist was en er verder kon worden gewerkt zonder extra stappen te integreren. Na de Quantus™-meting werd 11 µl barcoded DNA en 1 µl Rapid Adapter F toegevoegd aan het eluaat. Door voorzichtig te schudden werd het mengsel gehomogeniseerd. Vervolgens werd het geheel gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd. Tijdens de incubatietijd werd de priming mix bereid door 30 µl Flush Tether over te brengen naar de tube van Flush Buffer en grondig te vortexen.

De voorbereiding van het MinION-toestel verliep als volgt. Als eerste stap werd de priming poort van de flowcel (Figuur 15) geopend en werd ongeveer 20 tot 30 µl buffer uit het toestel via de priming poort verwijderd om eventuele luchtbellen te verwijderen. Vervolgens werd 800 µl van de zojuist bereide priming mix voorzichtig in de flowcel gebracht via de priming poort. Deze priming mix maakte het mogelijk om het aantal beschikbare nanoporen dat op de flowcel aanwezig is, te tellen.



Figuur 15. Flowcel van het MinION-toestel waarbij de verschillende componenten aangeduid worden. (Oxford Nanopore Technologies, z.d.).

Tijdens het controleren van de nanoporiën werd het staal verder verwerkt. Het controleren van de beschikbare nanoporen in de MinION-sequencer is van cruciaal belang voor het waarborgen van een succesvolle sequencing run. Dit proces beïnvloedt direct de kwaliteit en betrouwbaarheid van de verkregen sequentiedata. Door te verifiëren dat voldoende nanoporen actief en functioneel zijn, kunnen potentiële problemen zoals lagere nauwkeurigheid of mislukte runs worden voorkomen. Allereerst werden de sequencing buffer II en de loading beads II grondig gevortexed. Vervolgens werd 37,5 µl sequencing buffer II gemengd met 25,5 µl loading beads II en 12 µl van de DNA-bibliotheek. Nadat de controle van de poriën was voltooid, werd de SpotOn-poort geopend en werd nog eens 200 µl priming mix in de priming poort gebracht. Vervolgens werd het mengsel, de bibliotheek voor laden, in de flowcel geladen via de SpotOn-poort door het mengsel eerst grondig op en neer te pipetteren en vervolgens 75 µl op de flowcel te laden in druppels. Beide poorten werden gesloten en de sequencing werd gestart. De sequencing duurde ongeveerd 72 uur.

De resultaten van de MinION worden in dit verslag niet verder besproken.

8.3. Resultaten en bespreking

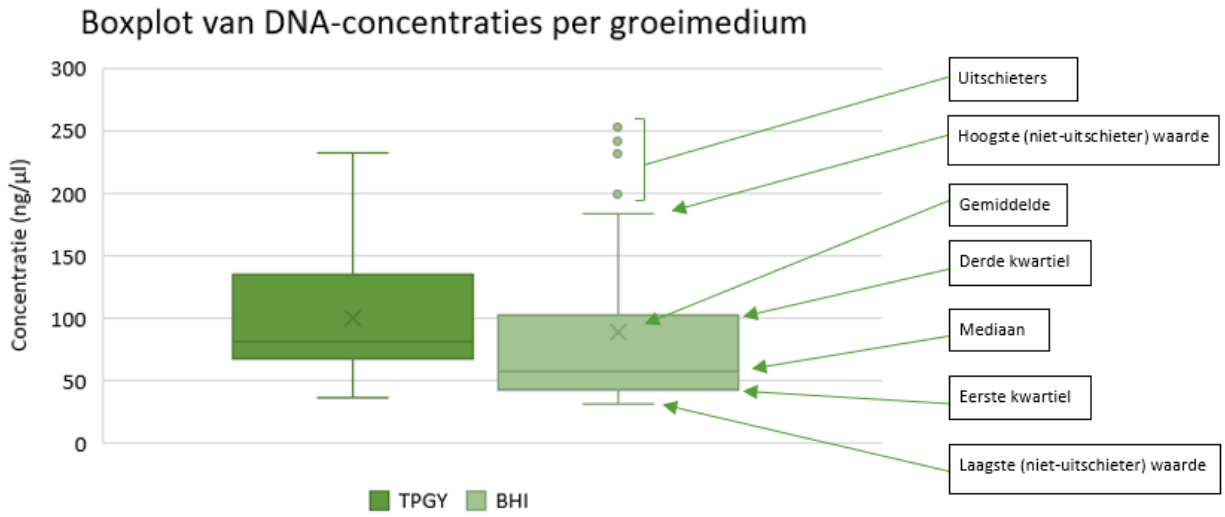
8.3.1. CONCENTRATIE- EN ZUIVERHEIDBEPALING

8.3.1.1. Nanodrop-2000

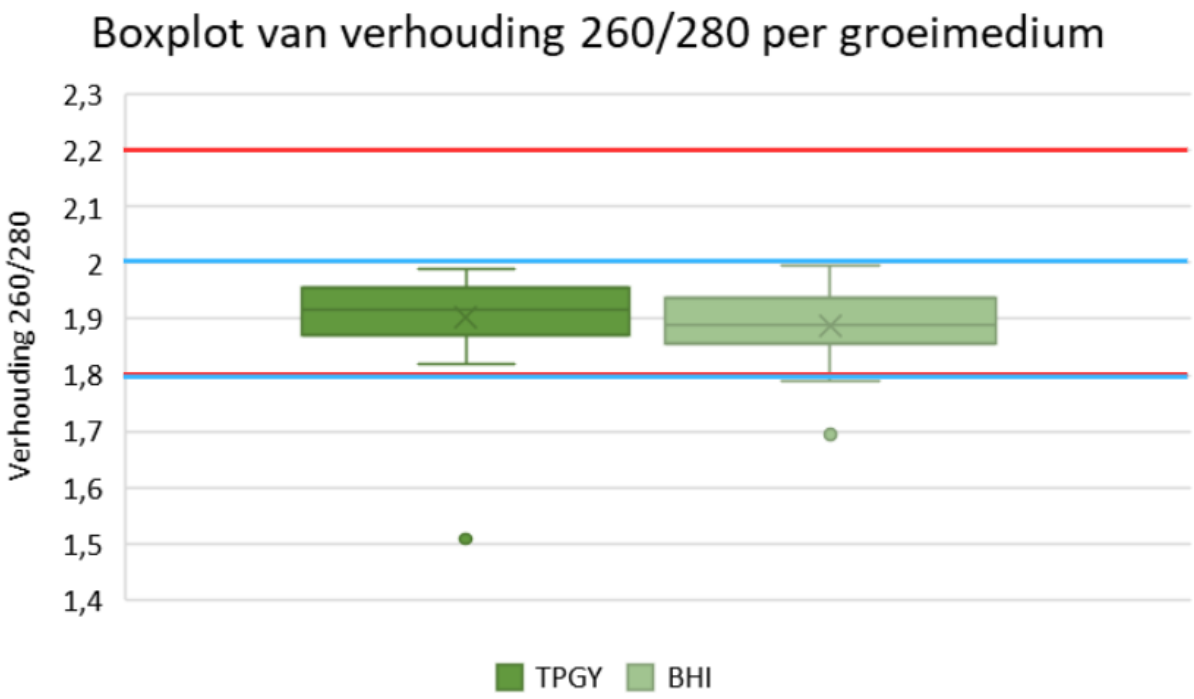
Om de meest gunstige condities te identificeren, zijn boxplots gemaakt voor elke parameter, waarbij concentratie en zuiverheid tegenover elkaar zijn geplaatst. Figuur 16 toont de verkregen grafiek van de concentraties per groeimedium in boxplots. Hierbij worden verschillende statistieken geëxtraheerd, zoals minimum, eerste kwartiel, mediaan, gemiddelde, derde kwartiel, maximum en eventuele uitschieters. Deze statistieken worden vergeleken tussen de boxplots om de optimale conditie te bepalen. Dankzij de berekende gemiddelden weergegeven in figuur 16, blijkt het groeimedium TPGY een hogere DNA-opbrengst te hebben dan BHI.

Omdat zowel DNA-concentratie als zuiverheid van belang zijn, worden zowel de 260/230- als de 260/280-ratio's in overweging genomen. Hiervoor zijn grafieken gegenereerd (Figuur 17 en Figuur 18). De rode lijn in deze grafieken vertegenwoordigt de criteria voor short-read sequencing, terwijl de blauwe lijn de criteria voor long-read sequencing aangeeft (Zie sectie 8.1.2). Dankzij deze boxplots kan worden geconstateerd dat TPGY een hogere DNA-opbrengst heeft en dat het verschil in 260/280-verhouding verwaarloosbaar is. De 260/230-metingen suggereren dat de DNA-extracten van de TPGY-culturen een lagere mate van organische verontreiniging vertonen dan die van de BHI-culturen.

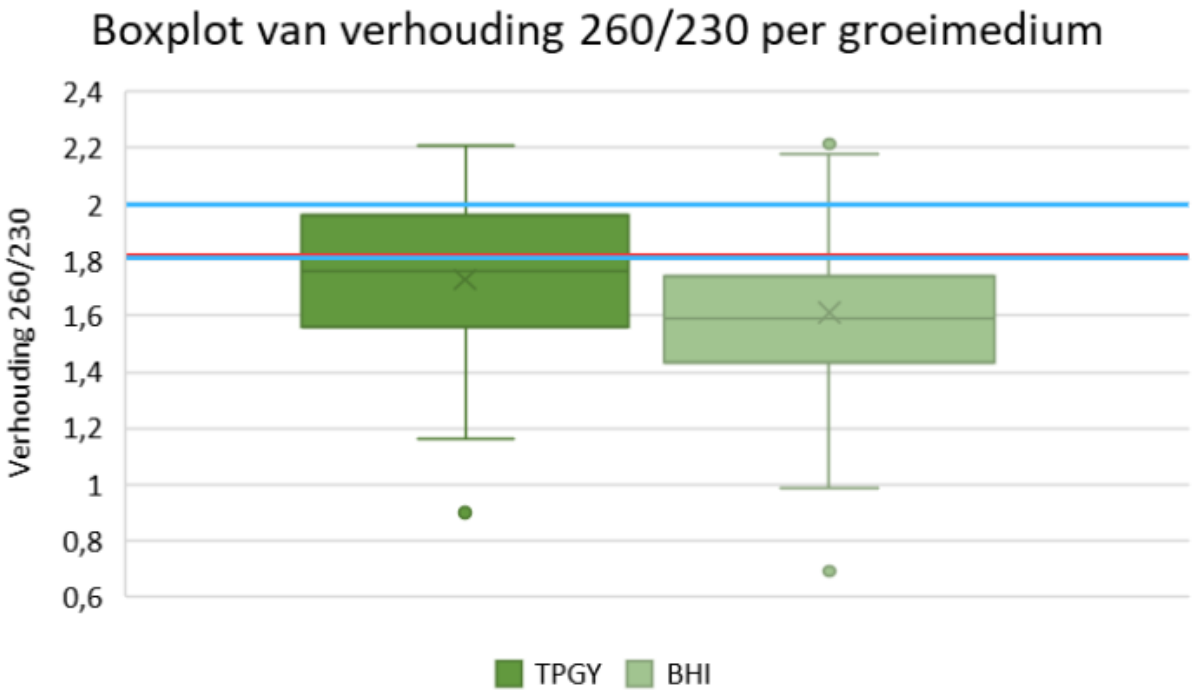
Deze interpretatiemethode is toegepast op andere geteste parameters, waarbij ook boxplots zijn gemaakt en vergeleken (Zie bijlage). Hieruit blijkt dat TPGY het beste groeimedium is, een incubatieperiode van 24 uur voldoende is, een volume van 1,5 ml voor extractie wordt aanbevolen vanwege een hogere DNA-opbrengst en betere zuiverheid bij 260/230. Ten slotte heeft de lysozymeconcentratie een minder duidelijk effect, maar vertoont toch een lichte verhoging in zuiverheid bij 260/230.



Figuur 16. Grafiek met boxplot van DNA-concentratie per groeimedium.



Figuur 17. Grafiek met boxplot van de ratio 260/280 per groeimedium.



Figuur 18. Grafiek met boxplot van de ratio 260/230 per groeimedium.

Door de aanzienlijke verscheidenheid aan geanalyseerde parameters, is een alomvattend overzicht van de ruwe resultaten van de concentratie- en zuiverheidsbepalingen samengevat in tabel die als bijlage is toegevoegd (Tabel 9).

8.3.1.2. Quantus™ Fluorometer

Tien stalen werden geselecteerd voor zowel Illumina-sequencing als MinION-sequencing (Tabel 8). Bovendien werden ze onderworpen aan PFGE, omdat MinION-sequencing een aanvullende kwaliteitscontrole van het DNA vereist.

Met behulp van de resultaten van de Quantus™ en de Nanodrop-2000 werden de stalen geselecteerd voor sequencen. Deze selectie is gebaseerd op de oorsprong van de stalen (humane of niet-humane oorsprong), de DNA-concentratie gemeten tijdens de Quantus™-meting, en de zuiverheid bepaald door de Nanodrop-2000. Er wordt voorrang gegeven aan monsters die verband houden met een uitbraak van botulisme. Deze monsters kunnen afkomstig zijn van menselijke bronnen, zoals feces of maaginhoud, maar ook van niet-menselijke bronnen, zoals geconsumeerd voedsel. Enkele stalen die niet van humane oorsprong zijn maar wel gerelateerd zijn aan humane casussen, zoals staal vier, vijf en zes, worden echter ook gesequenced. Zowel humane als niet-humane stalen worden geselecteerd, waarbij een tiental stalen wordt gekozen met de hoogste gemeten DNA-concentratie volgens de Quantus™. De meeste stalen hebben een DNA-concentratie boven de 100 ng/µl, met uitzondering van staal nummer acht. Opvallend is dat de gemeten DNA-concentraties door de Nanodrop-2000 bijna altijd hoger zijn dan die gemeten door de Quantus™, vanwege het feit dat de Nanodrop-2000 alle nucleïnezuren meet, terwijl de Quantus™ alleen het gewenste DNA meet, wat een nauwkeuriger meting oplevert.

De kwaliteitscontrole omvat ook een controle op de zuiverheid van de stalen. Staal nummer één wordt niet geschikt geacht voor zowel short-read sequencing (Illumina) als long-read sequencing (MinION). Ondanks dit, wordt staal nummer één toch gesequenced om ervaring op te doen met het MinION-protocol, aangezien het protocol voor de DNA-extractie nog wordt geoptimaliseerd. De overige stalen zijn hoofdzakelijk geschikt voor Illumina-sequencing, maar voldoen niet aan de strengere criteria vereist voor MinION-sequencing. Desondanks worden ze toch gesequenced om ervaring op te doen met het MinION-protocol en het MinION-toestel.

Tabel 8. Resultaten van de geselecteerde stalen gebruikt voor zowel de Illumina-sequencing als de MinION-sequencing (en PFGE).

Staal	Oorsprong	Nanodrop-2000 – DNA-concentratie (ng/µl)	Nanodrop-2000 - 260/280	Nanodrop-2000 - 260/230	Quantus™ – DNA-concentratie (ng/µl)	Kwaliteitscontrole voor de sequencing
Staal 1	Humane faeces	129,75	1,825	1,875	140	Illumina: Niet OK MinION: Niet OK
Staal 2	Humane maaginhoud	136,8	1,87	2,02	129	Illumina: OK MinION: OK
Staal 3	Humane faeces	188,05	2,005	2,185	114	Illumina: OK MinION: Niet OK
Staal 4	Worst	201,8	1,915	2,25	169	Illumina: OK MinION: Niet OK
Staal 5	Worst	201,9	1,935	2,275	158	Illumina: OK MinION: Niet OK
Staal 6	Gedroogde ham	248,8	1,93	2,87	209	Illumina: OK MinION: Niet OK
Staal 7	Humane faeces	321,65	1,95	2,11	211	Illumina: OK MinION: OK
Staal 8	Humane faeces	170,15	2,02	2,16	92	Illumina: OK MinION: Niet OK
Staal 9	Humane faeces	239,15	1,99	2,24	152	Illumina: OK MinION: Niet OK
Staal 10	Rectale swab	670,55	1,985	2,17	194	Illumina: OK MinION: OK

8.3.1.3. PFGE

De resultaten van de PFGE vertoonden in dit geval geen zichtbare bandjes, zoals waarneembaar op figuur 19 wat aangeeft dat de analyse niet succesvol was. Deze onzichtbare bandjes kunnen verschillende oorzaken hebben, maar een mogelijke verklaring is dat de instellingen van de PFGE niet geschikt waren voor deze specifieke analyse. PFGE vereist nauwkeurige instellingen van parameters zoals spanning, looptijd en pulsduur om optimale scheiding van DNA-fragmenten te bereiken. Als deze parameters niet correct zijn ingesteld, kan dit leiden tot problemen zoals slechte resolutie of onvoldoende scheiding van fragmenten, wat resulteert in niet-detecteerbare bandjes op de gel.

Het verwachte resultaat omvat duidelijke banden bij de ladder, die dienen als referentiepunten. Voor de DNA-extracten wordt geen duidelijk afgebakende banden verwacht, maar eerder een "smear" patroon. Het doel is om te onderzoeken binnen welk bereik deze "smear" zich bevindt voor elk monster, met de vraag of het boven de 30 kb of daaronder valt.



Figuur 19. Resultaten van de tweede PFGE. Slot 1 en 12 bevatten de ladder terwijl slot 2 tot en met 11 de stalen bevatten.

Het niet kunnen visualiseren van bandjes op de gel belemmert de interpretatie van de resultaten en maakt het onmogelijk om conclusies te trekken over de grootte van de DNA-fragmenten. De aanwezigheid van een vaag signaal aan het einde van de gel kan duiden op verschillende mogelijke problemen, waaronder contaminanten of een slechte scheiding van de DNA-fragmenten of kan de eigenlijke “smear” zijn die eerder werd besproken. Het feit dat zelfs de ladder, die als referentie dient, geen duidelijk gescheiden banden vertoont, benadrukt de urgentie van verdere optimalisatie van de PFGE-omstandigheden. De lijn die opvalt in slots 5 en 6 van de gel correspondeert met een haar dat tijdens het experiment in de gel is aangetroffen.

Om dit probleem aan te pakken, is het noodzakelijk om de PFGE-instellingen nog verder te optimaliseren voor de specifieke eigenschappen van het DNA en de beoogde toepassing. Dit kan het herzien van de spanning, het aanpassen van de looptijd en het verfijnen van de pulsduur omvatten. Daarnaast kan het gebruik van andere gelmatrixen of verbeterde kleurstoffen helpen bij het verbeteren van de visualisatie van de DNA-banden.

8.4. Conclusie

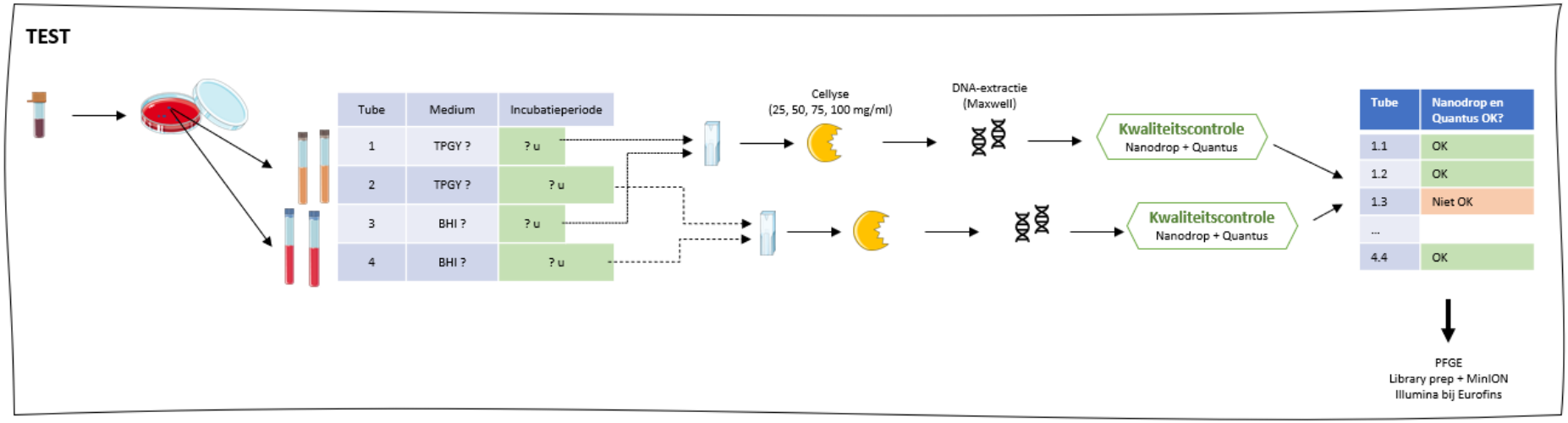
In dit tweede deel van het experiment werd getracht de beste parameters te identificeren voor het extraheren van hoogwaardig DNA geschikt voor sequencing. Een werkschema (Figuur 20) werd gebruikt om dit visueel te verduidelijken, met verschillende vraagtekens zoals:

- Welk groeimedium is het meest geschikt? TPGY of BHI?
- Hoe lang moet een cultuur worden geïncubeerd om voldoende DNA te verkrijgen?
- Is een extractievolume van 1 ml voldoende, of is 1,5 ml beter?

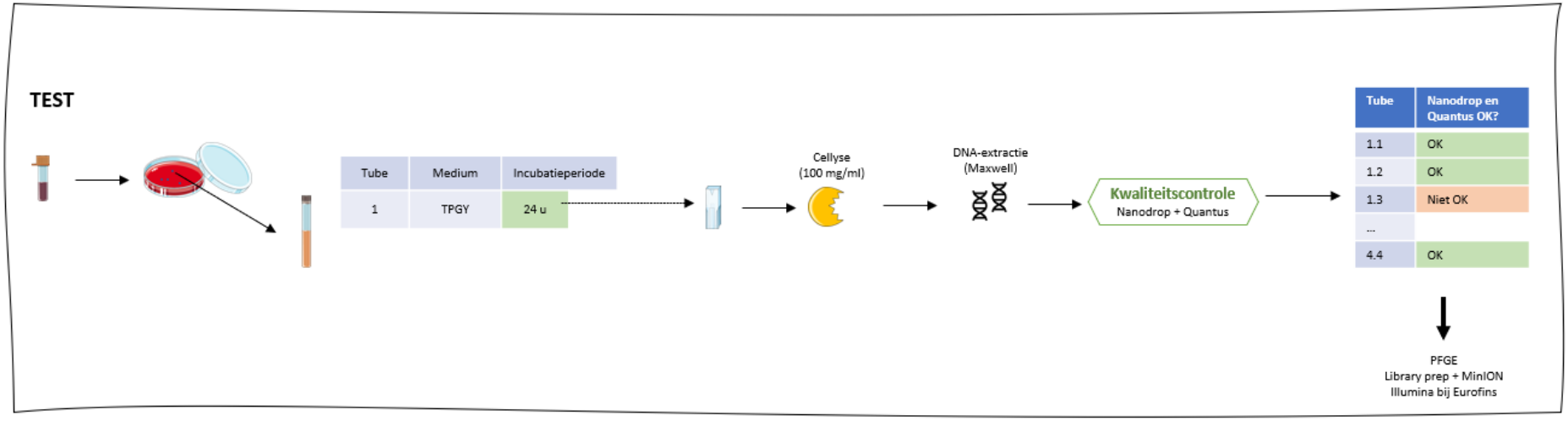
- Heeft de concentratie aan lysozyme effect op de DNA-opbrengst? Zo ja, welke concentratie heeft de voorkeur? 25 mg/ml of 100 mg/ml?

Dankzij de verschillende uitgevoerde testen, waarbij het groeimedium, de incubatieperiode, het extractievolume en de concentratie aan lysozyme werden getest, kon een geoptimaliseerd werkschema worden opgesteld (Figuur 21). Door middel van boxplots, waarbij gekeken wordt naar de DNA-opbrengst, de verhouding 260/280 en de verhouding 260/230, kan worden vastgesteld dat TPGY een hogere DNA-opbrengst oplevert, wat meer geschikt is voor sequencing. Bovendien blijkt een incubatieperiode van 24 uur voldoende te zijn om DNA van de gewenste kwaliteit te verkrijgen. Uit de boxplots wordt ook geconcludeerd dat een extractievolume van 1,5 ml een hogere DNA-opbrengst en een betere 260/230-verhouding oplevert dan 1 ml. Ten slotte werd opgemerkt dat de concentratie aan lysozyme minder effect had op de kwaliteit van het DNA, met alleen een lichte verhoging in contaminanten bij het gebruik van 25 mg/ml, waardoor 100 mg/ml de voorkeur kreeg.

Door middel van deze analyse werden een selectie van tien monsters gekozen die voldoen aan de vereisten voor zowel Illumina- als MinION-sequencing. Voorafgaand aan het MinION-sequencingproces was een bijkomende kwaliteitscontrole van het DNA vereist via PFGE. De PFGE-resultaten bleken echter niet interpreteerbaar te zijn, waardoor geen definitieve conclusies kunnen worden getrokken met betrekking tot de kwaliteit van het DNA. Het is vastgesteld dat de gebruikte programma's niet geoptimaliseerd zijn voor deze specifieke analyse, aangezien zelfs de ladder, die als interne controle kan fungeren, niet of nauwelijks zichtbaar is. Om deze reden is het noodzakelijk om een nieuwe PFGE-analyse uit te voeren, waarbij alternatieve instellingen wordt toegepast. Het onvermogen om bandjes te detecteren benadrukt het belang van zorgvuldige methodische planning en optimalisatie om betrouwbare en reproduceerbare resultaten te verkrijgen bij genetische analyses zoals PFGE. Het vereist ook een iteratieve aanpak waarbij verschillende experimentele parameters worden getest en aangepast om de prestaties van de techniek te verbeteren en de gewenste resultaten te verkrijgen.



Figuur 20. Gevolgde protocol voor DNA-extractie ter voorbereiding op sequencing.



Figuur 21. Geoptimaliseerde protocol voor DNA-extractie ter voorbereiding op sequencing.

9. ALGEMENE CONCLUSIE

Het eerste deel van het onderzoek richtte zich op de isolatie van *C. botulinum* (uit groep I en II van BoNT-producerende clostridia) uit diverse aanrijkingsculturen afkomstig van positieve monsters. Het isolatieprotocol werd uitgebreid geoptimaliseerd door verschillende parameters te evalueren. De aard van de monstermatrix, of deze al dan niet verontreinigd was, bleek een cruciale rol te spelen bij de keuze van de meest geschikte isolatiemethode. Voor monsters met een verontreinigde matrix werd een extra selectiefase toegepast vanwege de aanwezigheid van achtergrondflora. Bovendien werden de duur van de incubatieperiode en de omvang van het inoculum geïdentificeerd als belangrijke factoren die de groei van *C. botulinum* beïnvloeden en bijdragen aan de succesvolle opslag ervan in de stammenbibliotheek. Deze bevindingen benadrukken het belang van een zorgvuldig geoptimaliseerd isolatieproces voor het uitbreiden van de stammencollectie en de karakterisering ervan via WGS. Vervolgens zullen de stammen die uit patiënten zijn geïsoleerd, worden gekoppeld aan de stammen die uit voeding zijn geïsoleerd. Hierdoor was het mogelijk om ongeveer tien stammen te isoleren uit positieve monsters. Deze protocol zal verder moeten worden getest door het op een groter aantal positieve culturen, evenals op positieve culturen van andere groepen (groep III, IV, V) te testen.

Het tweede deel van het onderzoek heeft als hoofddoel het vaststellen van de optimale kweekparameters voor deze bacterie voor het verkrijgen van DNA-extracten van voldoende kwaliteit voor WGS. Verschillende methoden voor DNA-extractie zijn geëvalueerd, waarbij de Maxwell®-methode de voorkeur genoot vanwege haar effectieve verwijdering van PCR-inhibitoren, wat essentieel is voor kwalitatieve sequentieresultaten. De kwaliteitscontrole van het DNA via PFGE bleek echter een uitdagende opgave, waar verdere optimalisatie nodig was. Zowel short-read sequencing (Illumina) als long-read sequencing (MinION) zijn toegepast voor de analyse van het genoom, wat een uitgebreid inzicht biedt in de genetische kenmerken van de bacterie. Dit onderzoek benadrukt het kritieke belang van grondige optimalisatie van methoden en zorgvuldige kwaliteitscontrole in elke fase van de detectie en sequencing van voedselpathogenen, om betrouwbare en reproduceerbare resultaten te waarborgen.

Er werd slechts een beperkt aantal DNA-extracten getest, namelijk 11 waarvan 10 succesvol waren, en er werden geen duplicaten uitgevoerd. De data van de PFGE kon nog niet worden meegenomen omdat het protocol eerst nog moet worden geoptimaliseerd. Daarnaast wordt de analyse van de sequencing data hier nog niet in rekening gebracht, omdat deze data nog niet beschikbaar is. De conclusie is dus uitsluitend gebaseerd op de Nanodrop-2000 en Quantus™-data en op een beperkt aantal monsters. Desondanks geeft deze data al een eerste indicatie van welke cultuurcondities en DNA-extractieparameters verder gebruikt kunnen worden voor *C. botulinum*.

De conclusie van dit onderzoek wijst op een veelbelovend perspectief voor toekomstig onderzoek dat gericht is op de verdere karakterisering van deze belangrijke pathogene bacterie.

10. REFERENTIES

Anses. (2010). *Clostridium botulinum*, and neurotoxigenic Clostridia. Geraadpleegd op 15 januari 2024, https://www.anses.fr/en/system/files/MIC2010sa0234FiEN.pdf;

Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Swerdlow, D. L., Tonat, K., & Working Group on Civilian Biodefense (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA, 285(8), 1059–1070. https://doi.org/10.1001/jama.285.8.1059;

Berntsen, M., Bøgevig, S., Høgberg, L. C. G., & Barnung, S. K. (2022). Ugeskrift for laeger, 184(7), V07210574. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35179113/;

Biologielessen. (z.d.). Neurotoxinen. Geraadpleegd op 25 januari 2024, https://biologielessen.nl/index.php/a-9/1893-botuline-2;

Bonventre, P. F., & Kempe, L. L. (1960). Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B. IV. Activation of the toxin. Journal of bacteriology, 79(1), 24–32. https://doi.org/10.1128/jb.79.1.24-32.1960;

Chatham-Stephens, K., Fleck-Derderian, S., Johnson, S. D., Sobel, J., Rao, A. K., & Meaney-Delman, D. (2017). Clinical Features of Foodborne and Wound Botulism: A Systematic Review of the Literature, 1932-2015. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 66(suppl_1), S11–S16. https://doi.org/10.1093/cid/cix811;

Chen, F., Chen, H., Chen, Y., Wei, W., Sun, Y., Zhang, L., Cui, L., & Wang, Y. (2021). Dysfunction of the SNARE complex in neurological and psychiatric disorders. Pharmacological Research, 165, 105469. https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2021.105469;

Chertow, D. S., Tan, E. T., Maslanka, S. E., Schulte, J., Bresnitz, E. A., Weisman, R. S., Bernstein, J., Marcus, S. M., Kumar, S., Malecki, J., Sobel, J., & Braden, C. R. (2006). Botulism in 4 adults following cosmetic injections with an unlicensed, highly concentrated botulinum preparation. JAMA, 296(20), 2476–2479. https://doi.org/10.1001/jama.296.20.2476;

Craik, C. S., Page, M. J., Madison, E. L. (2011). Proteases as therapeutics. The Biochemical journal. 435. 1-16. 10.1042/BJ20100965. https://www.researchgate.net/publication/50398117_Proteases_as_therapeutics;

Critchley, E. M. (1991). A comparison of human and animal botulism: a review. Journal of the Royal Society of Medicine, 84(5), 295–298. https://doi.org/10.1177/014107689108400516;

Crowner, B. E., Brunstrom, J. E., & Racette, B. A. (2007). Iatrogenic botulism due to therapeutic botulinum toxin a injection in a pediatric patient. Clinical neuropharmacology, 30(5), 310–313. https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e31804b1a0d;

Davis, L. E. (1993). Botulinum toxin. From poison to medicine. The Western journal of medicine, 158(1), 25–29. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8470380/;

Dong, Y. P., Wang, W., Jiang, T., Xu, J., Han, C. H., Yan, S. F., Fanning, S., Li, Y., Ma, X. C., Zhang, D., Zhao, Y., Zeng, B., & Li, F. Q. (2017). Molecular and Epidemiological Characterization of Infant Botulism in Beijing, China. Biomedical and environmental sciences : BES, 30(6), 460–464. https://doi.org/10.3967/bes2017.061;

Duff, J. T., Wright, G. G., & Yarinsky, A. (1956). Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. Journal of bacteriology, 72(4), 455–460. https://doi.org/10.1128/jb.72.4.455-460.1956;

Fankhauserblog. (1997). Bacteria on prepared slides. Lab protocols – Lectures Notes. Geraadpleegd op 20 februari 2024, https://fankhauserblog.wordpress.com/1997/07/

Felske-Zech, H., Edler, K. S., Martytschan, I., Gruber, C., & Heidorn, F. (n.d.). The Maxwell® Low Elution Volume System for Forensic Casework: Routine Use in a Forensic Laboratory. Department of Legal Medicine, Division Forensic DNA Services, Justus-Liebig University, Giessen, Germany. https://www.promega.jp/-/media/files/resources/conference-proceedings/ishi-19/oral-presentations/felskezech.pdf?la=en;

Fortier, L. C. (2017). The Contribution of Bacteriophages to the Biology and Virulence of Pathogenic Clostridia. Advances in applied microbiology, 101, 169–200. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.05.002;

Gilligan P.H., Brown L., Berman R.E. (1983). Differentiation of *Clostridium difficile* Toxin from *Clostridium botulinum* Toxin by the Mouse Lethality Test. Appl Environ Microbiol45. https://doi.org/10.1128/aem.45.1.347-349.1983;

Grenda, T., Kukier, E., & Kwiatek, K. (2014). Methods and difficulties in detection of *Clostridium botulinum* and its toxins. Polish journal of veterinary sciences, 17(1), 195–205. https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0029;

Griffin, P. M., Hatheway, C. L., Rosenbaum, R. B., & Sokolow, R. (1997). Endogenous antibody production to botulinum toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Crohn's disease. The Journal of infectious diseases, 175(3), 633–637. https://doi.org/10.1093/infdis/175.3.633;

Illumina.com. (z.d.). Deeper insights into complex regions of the genome - Long-read sequencing helps resolve challenging regions of the genome. https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/long-read-sequencing.html#:~:text=While%20short%20reads%20can%20capture,in%20areas%20like%20genetic%20disease;

Jeffery, I. A., & Karim, S. (2023). Botulism. In StatPearls. StatPearls Publishing. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29083673/;

Johnson, E.A. (1999). *Clostridium – Clostridium botulinum*. Encyclopedia of food microbiology, 458-463. https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0395;

Johnston, R., Harmon, S., & Kautter, D. (1964). METHOD TO FACILITATE THE ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TYPE E. Journal of bacteriology, 88(5), 1521–1522. https://doi.org/10.1128/jb.88.5.1521-1522.1964;

Kalka-Moll, W. M., Aurbach, U., Schaumann, R., Schwarz, R., & Seifert, H. (2007). Wound botulism in injection drug users. Emerging infectious diseases, 13(6), 942–943. https://doi.org/10.3201/eid1306.061336;

Koetsier, G., & Cantor, E. (z.d.). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mvs_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb;

Lagueny, A., & Burbaud, P. (1996). Mécanisme d'action, indication et résultats des traitements par la toxine botulinique. Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology, 26(4), 216–226. https://doi.org/10.1016/S0987-7053(96)85003-9;

Le Gratiet, T., Poezevara, T., Rouxel, S., Houard, E., Mazuet, C., Chemaly, M., & Maréchal, C. L. (2020). Development of An Innovative and Quick Method for the Isolation of *Clostridium botulinum* Strains Involved in Avian Botulism Outbreaks. Toxins, 12(1), 42. https://doi.org/10.3390/toxins12010042;

Le Maréchal, C., Hulin, O., Macé, S., Chuzeville, C., Rouxel, S., Poëzevara, T., Mazuet, C., Pozet, F., Sellal, E., Martin, L., Viry, A., Rubbens, C., & Chemaly, M. (2019). A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak. Animals : an open access journal from MDPI, 9(12), 1025. https://doi.org/10.3390/ani9121025;

Lindström, M., & Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. Clinical microbiology reviews, 19(2), 298–314. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006;

Lonati, D., Schicchi, A., Crevani, M., Buscaglia, E., Scaravaggi, G., Maida, F., Cirronis, M., Petrolini, V. M., & Locatelli, C. A. (2020). Foodborne Botulism: Clinical Diagnosis and Medical Treatment. Toxins, 12(8), 509. https://doi.org/10.3390/toxins12080509;

López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. The Journal of biological chemistry, 283(45), 30433–30437. https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200;

Lynt, R. K., Kautter, D. A., & Solomon, H. M. (1982). Differences and Similarities Among Proteolytic and Nonproteolytic Strains of *Clostridium botulinum* Types A, B, E and F: A Review. Journal of food protection, 45(5), 466–474. https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.5.466;

McCroskey, L. M., Hatheway, C. L., Fenicia, L., Pasolini, B., & Aureli, P. (1986). Characterization of an organism that produces type E botulinal toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. Journal of clinical microbiology, 23(1), 201–202. https://doi.org/10.1128/jcm.23.1.201-202.1986;

McCroskey, L. M., & Hatheway, C. L. (1988). Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract. Journal of clinical microbiology, 26(5), 1052–1054. https://doi.org/10.1128/jcm.26.5.1052-1054.1988;

Michigan State University. (z.d.). Research Technology Support Facility – Oxford Nanopore Sample Requirements. https://rtsf.natsci.msu.edu/genomics/sample-requirements/oxford-nanopore-sample-requirements.aspx#:~:text=DNA%20should%20have%20a%20260,DNA%20sample%20is%20truly%20pure ;

Microbenotes. (2023). Lecithinase Test (Nagler's Reaction): Principle, Procedure, Results. Geraadpleegd op 27 februari 2024, https://microbenotes.com/lecithinase-test-objectives-principle-procedure-and-results/;

Nakamura, K., Kohda, T., Shibata, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Hayashi, M., Mukamoto, M., Sasakawa, N., & Kozaki, S. (2012). Unique biological activity of botulinum D/C mosaic neurotoxin in murine species. Infection and immunity, 80(8), 2886–2893. https://doi.org/10.1128/IAI.00302-12;

National Center for Infectious Diseases (U.S.), Division of Bacterial and Mycotic Diseases. (1998). Botulism Santin the United States, 1899-1996; handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Geraadpleegd op 16 januari 2024, https://www.cdc.gov/botulism/pdf/bot-manual.pdf;

National Institute of Justice. (2023). DNA Extraction and Quantitation for Forensic Analysts – Chelex® 100 Extraction Process. Geraadpleegd op 1 maart 2024, https://nij.ojp.gov/nij-hosted-online-training-courses/dna-extraction-and-quantitation-forensic-analysts/chelexr-100-extraction/chelexr-100-extraction-process#:~:text=The%20extraction%20process%20involves%20boiling,proteins%2C%20and%20denatures%20the%20DNA.;

Ni, S. A., & Brady, M. F. (2023). Botulism Antitoxin. In StatPearls. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534807/#article-37505.s3;

Oxford Nanopore Technologies. (z.d.). Flushing a MinION/GridION Flow Cell. Geraadpleegd op 9 mei 2024, https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/flow-cell-wash-kit-exp-wsh004/v/wfc_9120_v1_revq_08dec2020/flushing-a-minion-gridion-flow-cell?devices=minion;

Passaro, D. J., Werner, S. B., McGee, J., Mac Kenzie, W. R., & Vugia, D. J. (1998). Wound botulism associated with black tar heroin among injecting drug users. JAMA, 279(11), 859–863. https://doi.org/10.1001/jama.279.11.859;

Paul, P., Rajput, S., Joshi, P., Naithani, M., Chowdhury, N., Rao, S., & Pai, M. O. (2021). Comparison of Fluorometric and UV Spectrophotometric Findings for DNA Isolated From Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks, Fine Needle Aspiration Cytology Smears, and Blood. Cureus, 13(11), e19583. https://doi.org/10.7759/cureus.19583;

Payne, J. R., Khouri, J. M., Jewell, N. P., & Arnon, S. S. (2018). Efficacy of Human Botulism Immune Globulin for the Treatment of Infant Botulism: The First 12 Years Post Licensure. The Journal of Pediatrics, 193, 172–177. https://doi.org/10.1016/J.JPEDS.2017.10.035;

Peck, M.W. (2009). Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. Advances in microbial physiology, 55, 183–320. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9;

Popoff, M.R. (2005). *Clostridium botulinum* – Institut Pasteur. https://phototheque.pasteur.fr/fr/asset/fullTextSearch/WS/HOME_MENU/node/136/slug/bacteries-anaerobies-et-du-botulisme-clostridium/nobc/1/page/1/sorting/mostviewed;

Promega. (z.d.). Quantus™ Fluorometer and NGS Starter Package. https://be.promega.com/products/microplate-readers-fluorometers-luminometers/fluorometers/quantus-fluorometer/?catNum=E6150;

Rao, A. K., Sobel, J., Chatham-Stephens, K., & Luquez, C. (2021). Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism, 2021. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports, 70(2), 1–30. https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7002a1;

Rasetti-Escargueil, C., Lemichez, E., & Popoff, M. R. (2019). Public health risk associated with botulism as foodborne zoonoses. Toxins, 12(1). https://doi.org/10.3390/TOXINS12010017;

Rawson, A. M., Dempster, A. W., Humphreys, C. M., & Minton, N. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridium botulinum*. Virulence, 14(1), 2205251. https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2205251;

Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., & Oguma, K. (2005). The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(48), 17472–17477. https://doi.org/10.1073/pnas.0505503102;

Sante Publique France. (2023). Cas de botulisme alimentaire à Bordeaux : 15 cas recensés, dont 10 hospitalisés et 1 décès. Point de situation au 14 septembre 2023. Geraadpleegd op 25 februari 2024, https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2023/cas-de-botulisme-alimentaire-a-bordeaux-15-cas-recenses-dont-10-hospitalises-et-1-deces.-point-de-situation-au-14-septembre-2023#:~:text=Au%2014%20septembre%202023%2C%2015,Une%20personne%20est%20d%C3%A9c%C3%A9d%C3%A9e.;

Sciensano. (z.d.). Botulisme. Geraadpleegd op 14 januari 2024, https://www.sciensano.be/nl/gezondheidsonderwerpen/botulisme;

Simpson L. (2013). The life history of a botulinum toxin molecule. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 68, 40–59. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.014;

Skarin, H., Håfström, T., Westerberg, J., & Segerman, B. (2011). *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. BMC genomics, 12, 185. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-185;

Sobel, J., Tucker, N., Sulka, A., McLaughlin, J., & Maslanka, S. (2004). Foodborne botulism in the United States, 1990-2000. Emerging infectious diseases, 10(9), 1606–1611. https://doi.org/10.3201/eid1009.030745;

Sobel, J. (2005). Botulism. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 41(8), 1167–1173. https://doi.org/10.1086/444507;

Spika, J. S., Shaffer, N., Hargrett-Bean, N., Collin, S., MacDonald, K. L., & Blake, P. A. (1989). Risk factors for infant botulism in the United States. American journal of diseases of children (1960), 143(7), 828–832. https://doi.org/10.1001/archpedi.1989.02150190078026;

Srivathsan, A., Lee, L., Katoh, K., Hartop, E., Narayanan Kutty, S., Wong, J., Yeo, D., Meier, R.. (2021). ONTbarcoder and MinION barcodes aid biodiversity discovery and identification by everyone, for everyone. BMC Biol 19, 217 (2021). https://doi.org/10.1186/s12915-021-01141-x;

Synbio Technologies. (z.d.). Precision and Accuracy with TaqMan Probes. https://synbio-tech.com/precision-and-accuracy-with-taqman-probes/;

The Center for Food Security & Public Health (2018). Botulisme. The Center for Food Security & Public Health. https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/botulism.pdf;

ThermoFisher Scientific. (z.d.). Real-Time PCR basics - How TaqMan assays work. https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html;

Tjaberg T. B. (1974). Proteases of *Clostridium botulinum*. VI. The role of trypsin, *Clostridium botulinum* proteases and protease inhibitors in the formation and activation of toxin in growing cultures of *Clostridium botulinum*. Acta veterinaria Scandinavica, 15(4), 487–506. https://doi.org/10.1186/BF03547221;

Van Waes, D. (2015). Botulisme bij hond en kat. https://libstore.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/216/089/RUG01-002216089_2015_0001_AC.pdf;

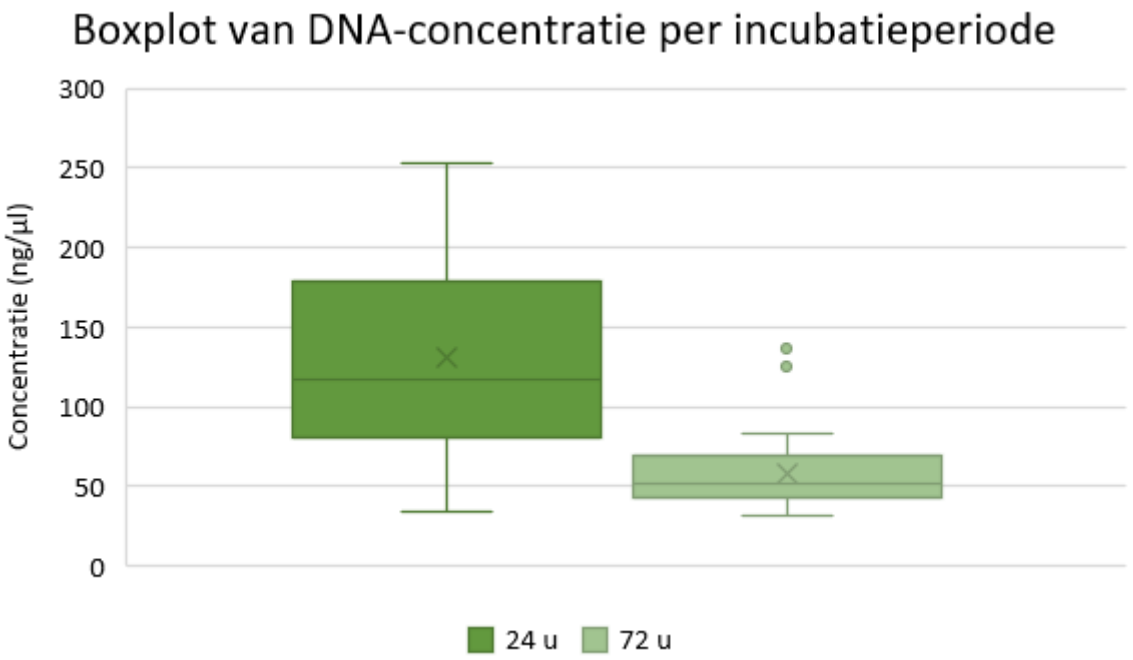
Walewski, V. (2019). *Clostridium botulinum*. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_Clostridiumbotulinum.pdf;

World Health Organisation. (2023). World Health Organisation – Botulism. Geraadpleegd op 29 januari 2024, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism;

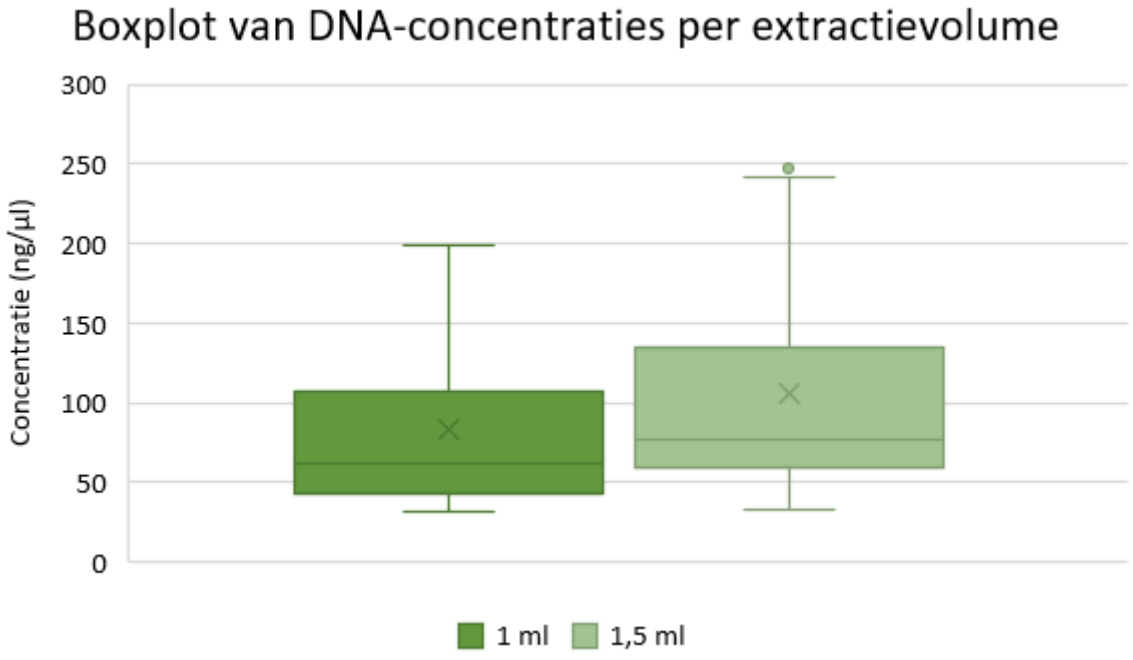
World Health Organisation. (2023). World Health Organisation – Iatrogenic botulism – European region. Geraadpleegd op 25 februari 2024, https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON450#:~:text=As%20of%2017%20March%202023,Medicines%20and%20Medical%20Devices%20Agency.;

Zariquiey-Esteva, G., Galeote-Cózar, D., Santa-Candela, P., & Castanera-Duro, A. (2018). Botulism in the ICU: Nursing care plan. Botulismo en la UCI: proceso de cuidados. Enfermeria intensiva, 29(2), 86–93. https://doi.org/10.1016/j.enfi.2017.07.003.

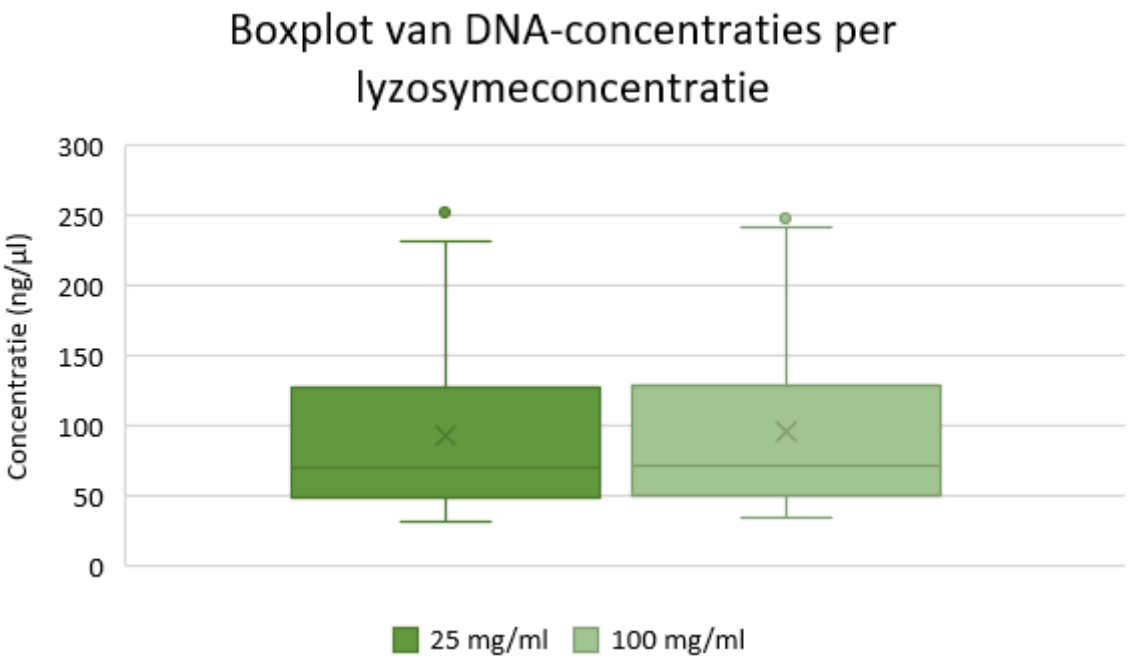
11. BIJLAGE



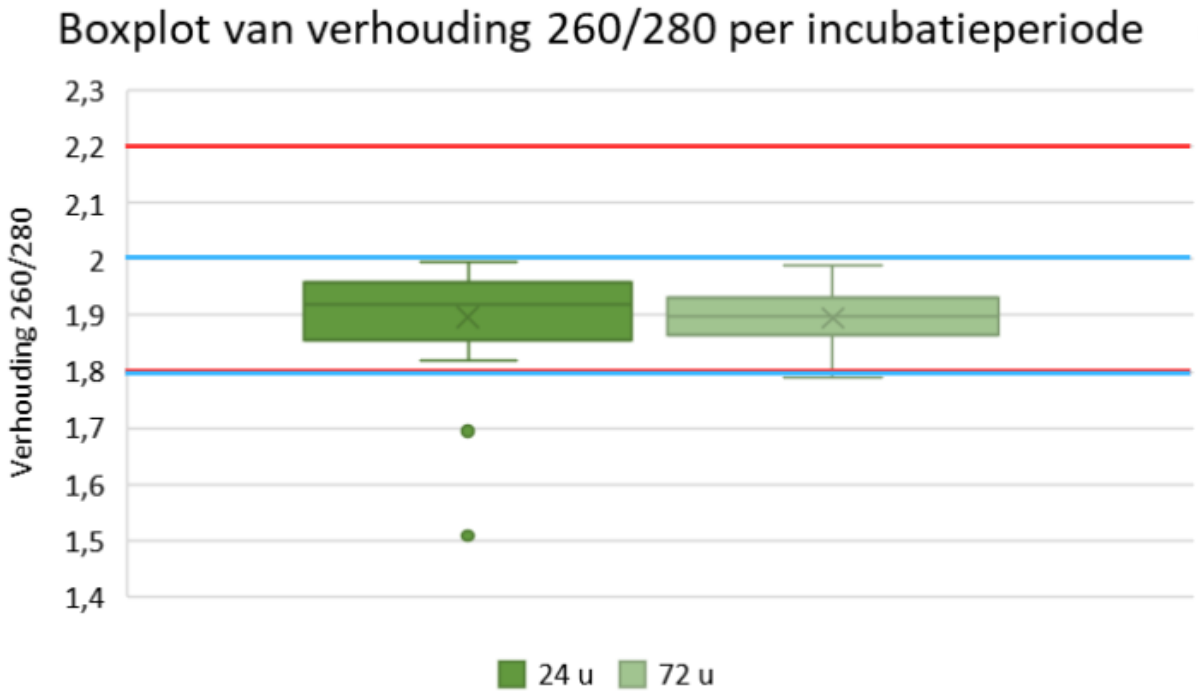
Figuur 22. Grafiek met boxplot van de DNA-concentratie per incubatieperiode.



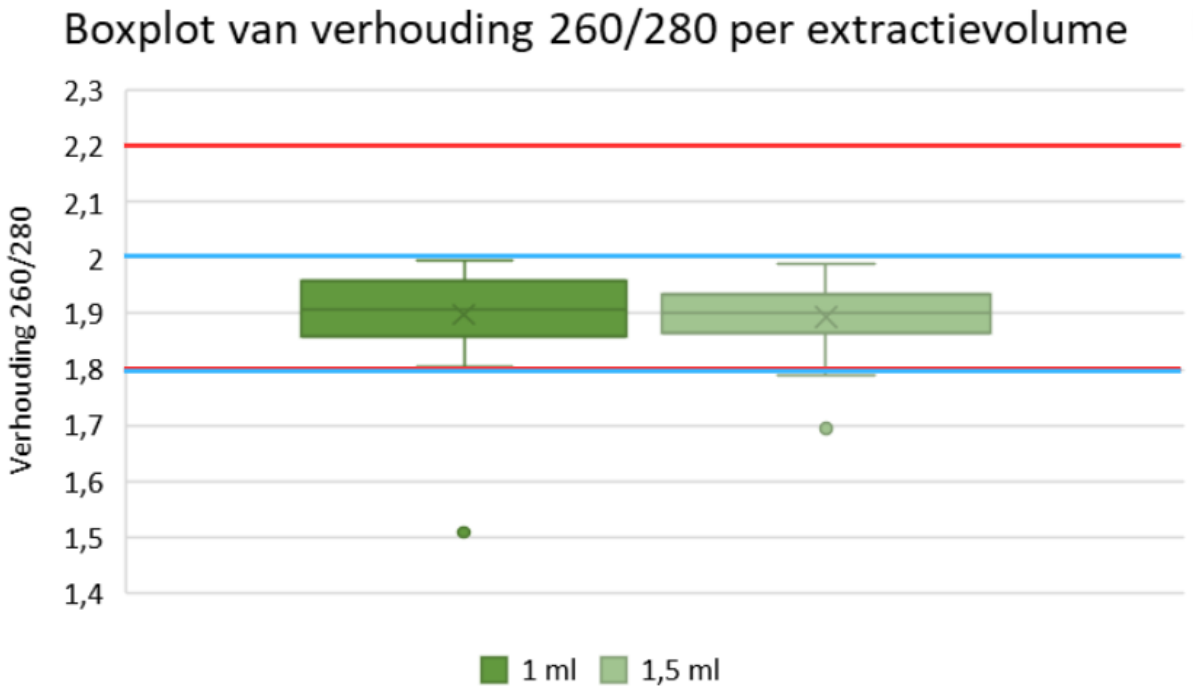
Figuur 23. Grafiek met boxplot van de DNA-concentratie per extractievolume.



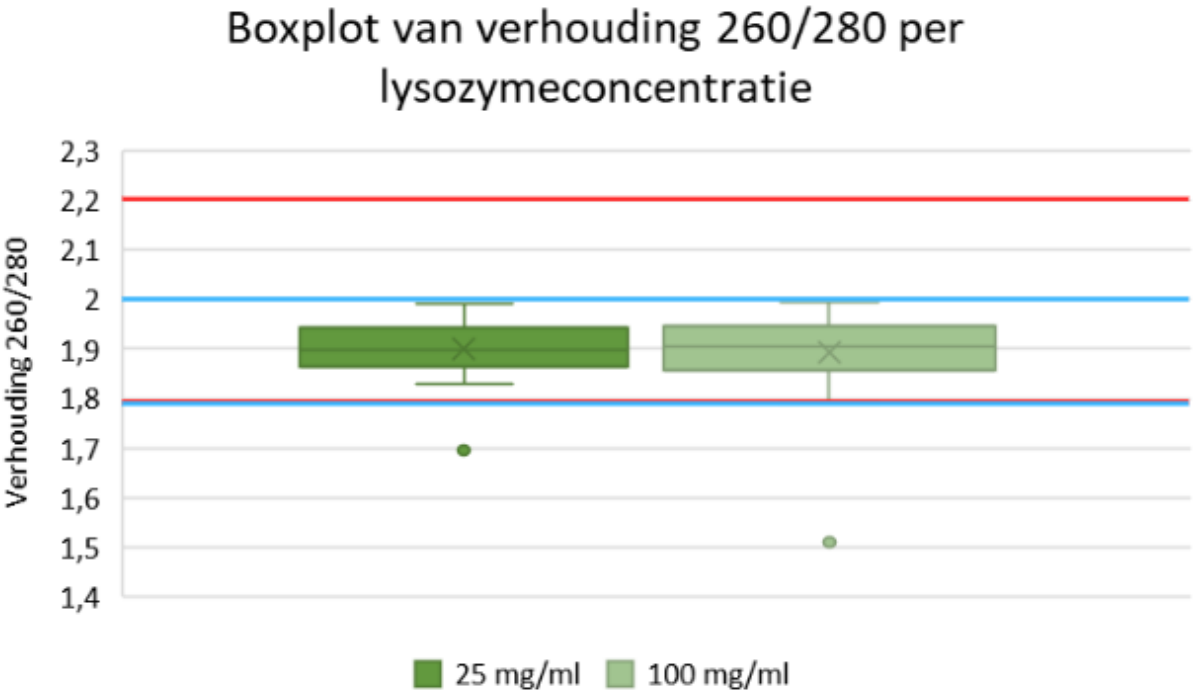
Figuur 24. Grafiek met boxplot van de DNA-concentratie per lyzosymeconcentratie.



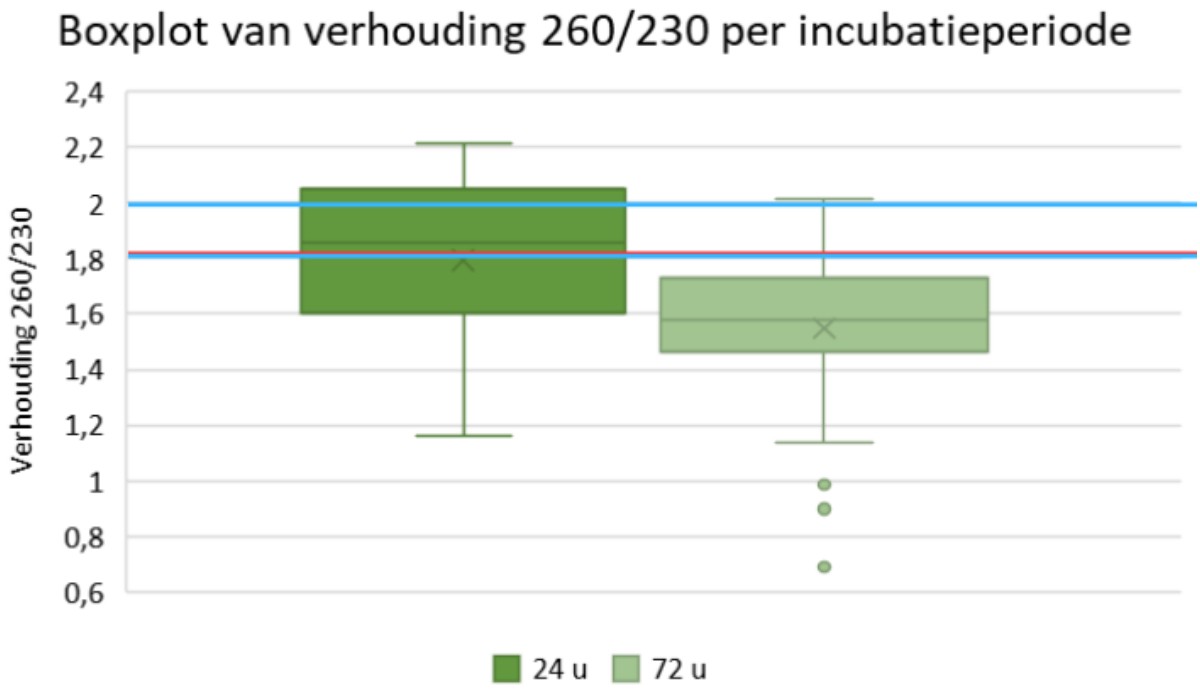
Figuur 25. Grafiek met boxplot van de ratio 260/280 per incubatieperiode.



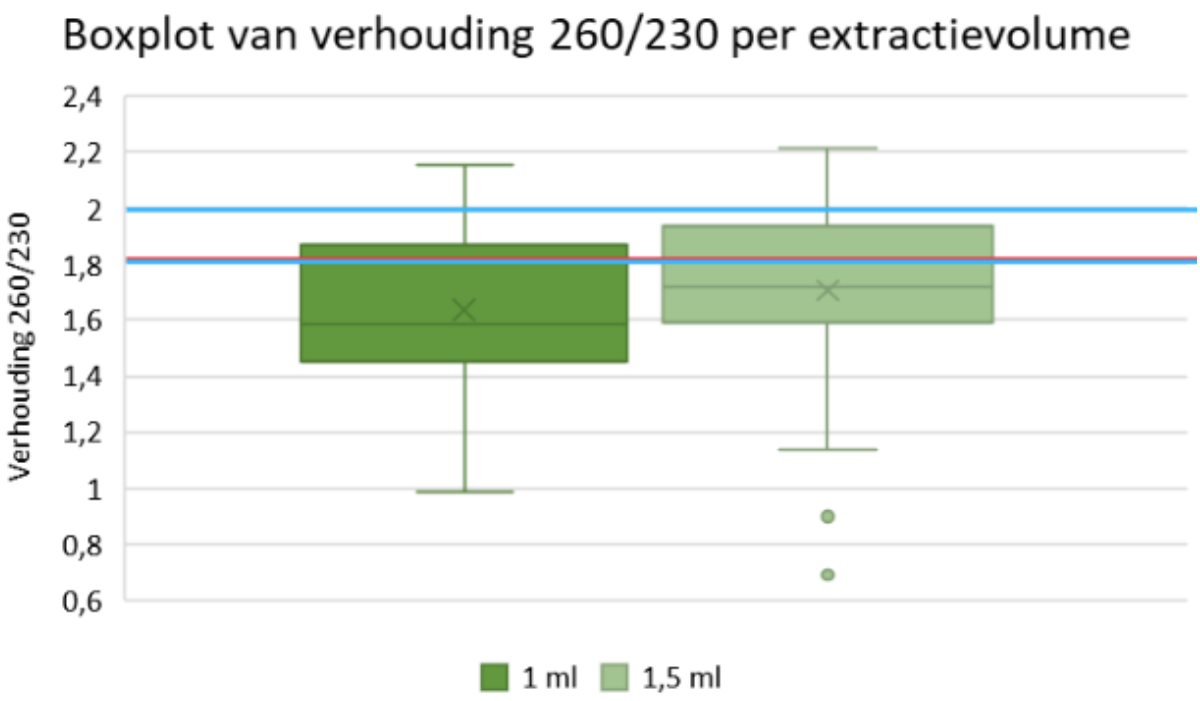
Figuur 26. Grafiek met boxplot van de ratio 260/280 per extractievolume.



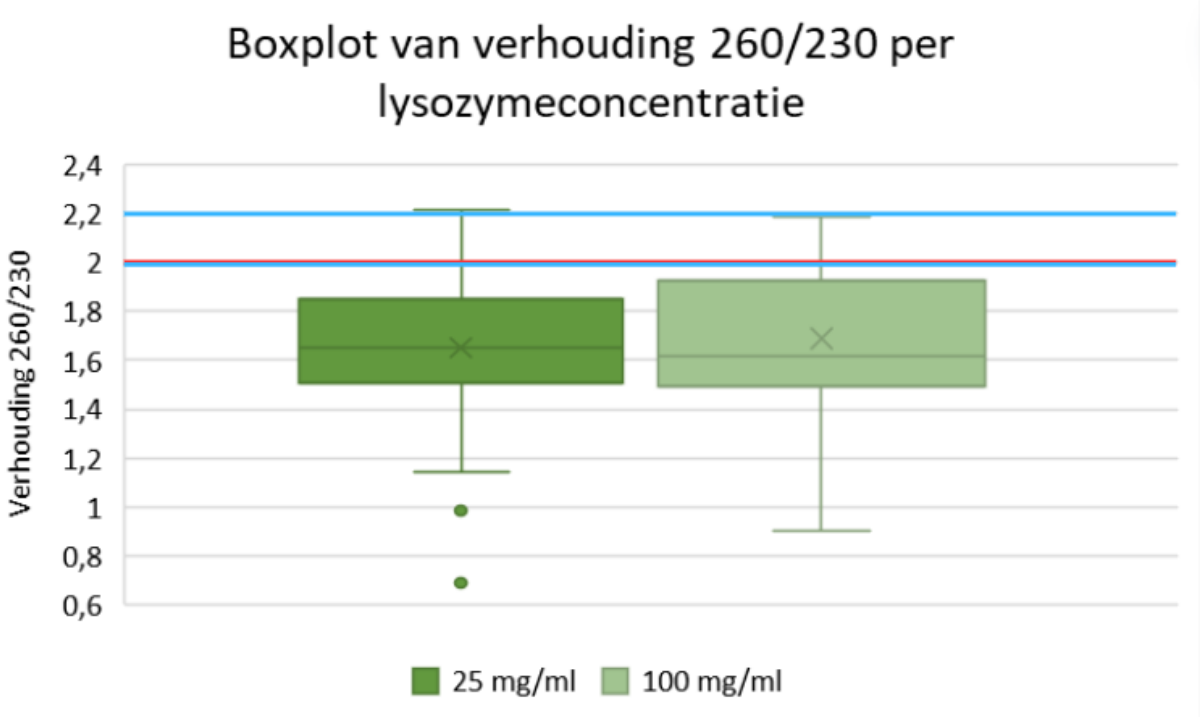
Figuur 27. Grafiek met boxplot van de ratio 260/280 per lysozymeconcentratie.



Figuur 28. Grafiek met boxplot van de ratio 260/230 per incubatieperiode.



Figuur 29. Grafiek met boxplot van de ratio 260/230 per extractievolume.



Figuur 30. Grafiek met boxplot van de ratio 260/230 per lysozymeconcentratie.

Tabel 9. Overzicht van de ruwe resultaten van de concentratie- en zuiverheidsbepalingen.

Staalnaam	Groeimedium	Incubatieperiode (u)	Volume (ml)	Concentratie Lysozyme (mg/ml)	Nanodrop-2000 – DNA-concentratie (ng/µl)	Nanodrop-2000 - 260/280	Nanodrop-2000 - 260/230	Quantus™ – DNA-concentratie (ng/µl)
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	24	1	25	191,3	1,965	2,08	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	24	1	100	162,75	1,975	2,06	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	24	1,5	25	232,5	1,95	2,205	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	24	1,5	100	227,4	1,955	2,185	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	72	1	25	45,85	1,955	1,565	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	72	1	100	50,35	1,965	1,465	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	72	1,5	25	50,45	1,99	1,18	--
CbA D5 (ATCC3505)	TPGY	72	1,5	100	55,65	1,985	1,92	--
S22FP05000	TPGY	24	1	25	68,6	1,925	1,655	70
S22FP05000	TPGY	24	1	100	60,75	1,82	1,35	58
S22FP05000	TPGY	24	1,5	25	87,4	1,87	1,86	95
S22FP05000	TPGY	24	1,5	100	74,7	1,885	1,67	71
S22FP05000	TPGY	72	1	25	49,15	1,895	1,555	27
S22FP05000	TPGY	72	1	100	52,25	1,91	1,46	27
S22FP05000	TPGY	72	1,5	25	67,9	1,935	1,74	36
S22FP05000	TPGY	72	1,5	100	68,15	1,92	1,365	45
S22FP05001	TPGY	24	1	25	131	1,965	1,96	64
S22FP05001	TPGY	24	1	100	141,55	1,97	1,995	71

S22FP05001	TPGY	24	1,5	25	118,7	1,98	1,935	57
S22FP05001	TPGY	24	1,5	100	180,25	1,95	2,005	72
S22FP05001	TPGY	72	1	25	72,75	1,945	1,815	39
S22FP05001	TPGY	72	1	100	83,3	1,96	2,015	48
S22FP05001	TPGY	72	1,5	25	137,05	1,935	1,815	79
S22FP05001	TPGY	72	1,5	100	124,75	1,935	0,9	41
S22FP06223	TPGY	24	1	25	88,4	1,845	1,74	77
S22FP06223	TPGY	24	1	100	99,25	1,835	1,85	80
S22FP06223	TPGY	24	1,5	25	146,7	1,84	1,95	133
S22FP06223	TPGY	24	1,5	100	129,75	1,825	1,875	140
S22FP06223	TPGY	72	1	25	43,65	1,855	1,445	30
S22FP06223	TPGY	72	1	100	36,35	1,92	1,58	19
S22FP06223	TPGY	72	1,5	25	69,25	1,89	1,73	50
S22FP06223	TPGY	72	1,5	100	67,7	1,905	1,78	46
S22FP05783	TPGY	24	1	25	84,45	1,865	1,715	74
S22FP05783	TPGY	24	1	100	142,8	1,51	1,165	75
S22FP05783	TPGY	24	1,5	25	136,8	1,87	2,02	129
S22FP05783	TPGY	24	1,5	100	116,8	1,855	1,965	111
S22FP05783	TPGY	72	1	25	76,5	1,875	1,59	61
S22FP05783	TPGY	72	1	100	71,1	1,905	1,885	51
S22FP05783	TPGY	72	1,5	25	78,15	1,875	1,5	69
S22FP05783	TPGY	72	1,5	100	72,9	1,895	1,63	68
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	24	1	25	183,25	1,94	2,1	--
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	24	1	100	198,5	1,965	2,15	--
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	24	1,5	25	253,1	1,94	2,21	--
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	24	1,5	100	241,65	1,96	2,13	--

CbA D5 (ATCC3505)	BHI	72	1	25	38,7	1,88	1,4	--
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	72	1	100	40	1,94	1,41	--
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	72	1,5	25	43,85	1,9	1,595	--
CbA D5 (ATCC3505)	BHI	72	1,5	100	50,1	1,915	1,59	--
S22FP05000	BHI	24	1	25	163,7	1,945	2,145	110
S22FP05000	BHI	24	1	100	172,5	1,94	1,605	111
S22FP05000	BHI	24	1,5	25	231,25	1,915	1,75	149
S22FP05000	BHI	24	1,5	100	247,8	1,935	2,175	145
S22FP05000	BHI	72	1	25	31,75	1,86	0,985	15
S22FP05000	BHI	72	1	100	35,1	1,885	1,48	14
S22FP05000	BHI	72	1,5	25	33,2	1,905	1,54	16
S22FP05000	BHI	72	1,5	100	42	1,905	1,595	20
S22FP05001	BHI	24	1	25	102,75	1,99	1,59	43
S22FP05001	BHI	24	1	100	108,75	1,995	1,87	49
S22FP05001	BHI	24	1,5	25	78,75	1,855	1,565	73
S22FP05001	BHI	24	1,5	100	85,35	1,875	1,605	67
S22FP05001	BHI	72	1	25	37,85	1,88	1,53	17
S22FP05001	BHI	72	1	100	40,05	1,895	1,58	20
S22FP05001	BHI	72	1,5	25	51,65	1,905	1,14	24
S22FP05001	BHI	72	1,5	100	48,1	1,865	1,71	20
S22FP06223	BHI	24	1	25	61,85	1,965	1,385	34
S22FP06223	BHI	24	1	100	57,4	1,93	1,305	30
S22FP06223	BHI	24	1,5	25	86,05	1,905	1,645	63
S22FP06223	BHI	24	1,5	100	101,1	1,865	1,725	62
S22FP06223	BHI	72	1	25	45,65	1,84	1,575	45
S22FP06223	BHI	72	1	100	43,45	1,82	1,605	42
S22FP06223	BHI	72	1,5	25	53,35	1,865	0,69	49

S22FP06223	BHI	72	1,5	100	57,75	1,79	1,59	52
S22FP05783	BHI	24	1	25	42,75	1,875	1,25	22
S22FP05783	BHI	24	1	100	34,7	1,86	1,235	23
S22FP05783	BHI	24	1,5	25	66,4	1,695	1,42	50
S22FP05783	BHI	24	1,5	100	76,8	1,835	1,6	70
S22FP05783	BHI	72	1	25	56,65	1,845	1,77	61
S22FP05783	BHI	72	1	100	58,3	1,805	1,525	55
S22FP05783	BHI	72	1,5	25	66,95	1,83	1,715	78
S22FP05783	BHI	72	1,5	100	72	1,82	1,93	68