

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Metody detekce toxinů bakterie *Clostridium botulinum*
Bakalářská práce

2020

Klaudyová Lenka

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lenka Klaudyová**
Osobní číslo: **C17174**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Metody detekce toxinů bakterie *Clostridium botulinum***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakterii *Clostridium botulinum*.
2. Vypracujte přehled toxinů tvořených bakterií *Clostridium botulinum*, vč. jejich vlastností i onemocnění, která způsobují nebo na jejichž vzniku se podílejí.
3. Z publikovaných odborných textů vypracujte rešerši k možnostem detekce vybraných toxinů, a to metodami imunochemickými, analytickými, molekulárně-biologickými, aj.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnici č. 9/2012 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu“.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. července 2020

Klaudyová Lenka

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Šilhovi Ph.D. za poskytnutí velmi cenných rad, ochotu a trpělivost při odborném vedení mé bakalářské práce.

ANOTACE

Práce pojednává o bakterii *Clostridium botulinum* a detekci toxinu produkovaného touto bakterií. Cílem práce je čtenáře v první části seznámit s charakteristikou a vlastnostmi bakterie *Clostridium botulinum*. Další část je věnována samotnému toxinu – botulotoxinu, který uvedená bakterie produkuje a jeho patogennímu účinku na zvířata i člověka. S tím souvisí i onemocnění projevující se po intoxikaci botulotoxinem zvané botulismus. Hlavní částí této bakalářské práce jsou metody detekce samotného botulotoxinu. Tato část se věnuje detailnímu popisu jednotlivým metod a jejich využití v klinické praxi.

KLÍČOVÁ SLOVA

Clostridium botulinum, botulotoxin, botulismus, metody detekce

TITLE

Methods for Detection *Clostridium botulinum* Toxins

ANNOTATION

The thesis focuses on bacteria *Clostridium botulinum* and the detection of a toxin produced by the bacteria. The aim of the thesis is to acquaint the characteristics and properties of bacteria in the first part. Next part is about toxin itself – botulinum toxin, which the bacterium produces and about its pathogenic effect on animals and humans. Related to this is diseases after botulinum toxin intoxication called botulism. The main part of this bachelor's work is about methods of detection botulinum toxin. This chapter is devoted to the detailed description of individual methods and their use in clinical practice.

KEYWORDS

Clostridium botulinum, botulinum toxin, botulism, methods of detection

OBSAH

ÚVOD.....	- 12 -
1 <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	- 13 -
1.1 Historie.....	- 13 -
1.2 Morfologie a kultivace.....	- 14 -
1.3 Výskyt <i>Clostridium botulinum</i>	- 16 -
2 TOXINY BAKTERIE <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	- 17 -
2.1 Genom toxinu <i>Clostridium botulinum</i>	- 19 -
2.2 Botulotoxin.....	- 20 -
2.2.1 Struktura botulotoxinu.....	- 20 -
2.2.2 Fyziologické fungování nervosvalového přenosu.....	- 21 -
2.2.2.1 Mechanismus neurotoxického působení botulotoxinu.....	- 22 -
2.3 Botulotoxin a klinické využití jednotlivých sérotypů.....	- 25 -
2.3.1 Botulotoxin A.....	- 26 -
2.3.2 Botulotoxin B.....	- 27 -
2.3.3 Botulotoxin C a D.....	- 27 -
2.3.4 Botulotoxin E.....	- 28 -
2.3.5 Botulotoxin G.....	- 28 -
2.4 Botulotoxin jako biologická zbraň.....	- 28 -
2.4.1 Historické milníky použití botulotoxinu jako potenciální biologické..... zbraně.....	- 29 -
3 BOTULISMUS.....	- 31 -
3.1 Léčba botulismu.....	- 33 -
4 METODY DETEKCE BOTULOTOXINU.....	- 34 -
4.1 Biologický <i>in vivo</i> test detekce BoNT prováděný na myších.....	- 35 -
4.1.1 Princip biologického <i>in vivo</i> testu prováděného na myších.....	- 36 -
4.1.2 Aplikace vzorku.....	- 36 -
4.2 ELISA test.....	- 38 -
4.2.1 Princip sendvičové ELISA metody.....	- 39 -
4.2.2 Princip kompetitivního ELISA testu.....	- 41 -
4.3 Elektrochemiluminiscenční imunotest (ECL).....	- 42 -
4.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	- 43 -
4.5 Hmotnostní spektrometrická analýza endopeptidázové <i>in vitro</i> aktivity botulotoxinu (Endopep-MS).....	- 45 -
4.6 Imunochromatografické testy.....	- 48 -

4.6.1	Laterální průtokový imunochromatografický test – LFIA	- 48 -
	ZÁVĚR	- 50 -
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 52 -

SEZNAM ILUSTACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Morfologie buňky Clostridium botulinum s endosporou	- 15 -
Obrázek 2 – Bakterie Clostridium botulinum na krevním agaru	- 15 -
Obrázek 3 – Struktura botulotoxinu.....	- 21 -
Obrázek 4 – Mechanismus působení BoNT	- 24 -
Obrázek 5 – Techniky podání toxinu.....	- 37 -
Obrázek 6 – Schéma reakce protilátky s antigenem za vzniku imunokomplexu	- 38 -
Obrázek 7 – Schéma sendvičového uspořádání ELISA testu	- 40 -
Obrázek 8 – Schéma kompetitivního uspořádání ELISA testu	- 41 -
Obrázek 9 – Schéma elektrochemiluminiscenčního imunotestu	- 43 -
Obrázek 10 – Schéma kvantitativní PCR	- 45 -
Obrázek 11 – Schéma MALDI-TOF MS	- 46 -
Obrázek 12 – Schéma imunochromatografického testu	- 49 -
Tabulka 1 – Přehled botulotoxinů.....	- 18 -
Tabulka 2 – Přehled SNARE proteinů štěpených jednotlivými sérotypy BoNT	- 25 -

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Ab	protilátka
Ag	antigen
ATCC	<i>z angl.</i> American Type Culture Collection (americká nezisková organizace, uchovávající mikrobiologické kultury)
BoNT	botulotoxin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvoušroubovice deoxyribonukleové kyseliny
ECL	elektrochemiluminiscence
ELISA	<i>z angl.</i> Enzyme linked immunosorbent assay (enzymatická imunoanalýza sloužící pro detekci a stanovení koncentrace protilátek a antigenů)
EMG	<i>z angl.</i> electromyography (elektromyografie)
ENDOPEP-MS	hmotnostní spektrometrická analýza endopeptidázové <i>in vitro</i> aktivity botulotoxinu
H řetězec	<i>z angl.</i> Heavy (těžký řetězec)
L řetězec	<i>z angl.</i> Light (lehký řetězec)
LFIA	<i>z angl.</i> Lateral Flow Immuno Assay (laterální průtokový imunochromatografický test)
MALDI-TOF MS	<i>z angl.</i> Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem)
MBA	<i>z angl.</i> Mouse bioassay (myší biotest)

PCR	<i>z angl.</i> Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
qPCR	<i>z angl.</i> Quantitative PCR (kvantitativní PCR)
SNAP	<i>z angl.</i> Synaptosome-associated protein (protein asociovaný se synaptosomem)
SNARE	<i>z angl.</i> Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (proteiny umožňující vezikulární transport)
TSC médium	médium s tryptózou, siřičitanem a cykloserinem
t-SNARE	<i>z angl.</i> Target-SNARE (cílové SNARE proteiny)
VAMP	<i>z angl.</i> Vesicle-associated membrane protein (membránové proteiny spojené s vezikuly)
v-SNARE	<i>z angl.</i> Vesicle-SNARE (vezikulární SNARE proteiny)

ÚVOD

Bakterie rodu *Clostridium* jsou volně žijící grampozitivní, sporulující tyčinky z čeledi *Clostridiaceae*. Zástupci rodu *Clostridium* produkují silně nebezpečné toxiny. Mezi nejznámější zástupce tohoto rodu patří druh *Clostridium botulinum*. *Clostridium botulinum* přežívá za různých podmínek v potravě, čímž se snadno dostává do organismu hostitele. V organismu hostitele se bakterie pomnoží a ze svých spor začne produkovat velmi toxickou látku zvanou botulotoxin. Botulotoxin se nejčastěji vyskytuje ve špatně zakonzervovaných potravinách, vinou čehož se snadno dostává do těla hostitele. V těle hostitele napadne nervový systém a způsobí závažné onemocnění zvané botulismus. Botulotoxin představuje velkou hrozbu pro populaci z důvodu jeho potenciálního využití při bioteroristickém útoku. Proti tomuto toxinu neexistuje účinná vakcína a při rozprašení botulotoxinu ve formě aerosolu by došlo k rychlému šíření v populaci.

I když má botulotoxin tak silné nežádoucí účinky na člověka, využívá se ve velmi slabých koncentracích v medicíně. Jeho mechanismus působení lze využít např. v estetické medicíně při botoxovém zákroku nebo také k léčbě řady onemocnění, která jsou provázána záškuby způsobenými nervovým poškozením nebo svalovými tonusy.

Tato bakalářská práce se především zaměřuje na různé metody detekce bakterie *Clostridium botulinum*, jimiž lze identifikovat produkovaný botulotoxin v různých matricích vzorků. Metody detekce botulotoxinu se stále inovují, řada vědců se snaží přijít na novější a lepší řešení. Za zlatý standard pro detekci botulotoxinu je považován test prováděný na myších. Mezi další metody detekce patří testy založené na imunologických metodách, využívajících reakci mezi protilátkou a antigenem. Existuje ale i spousta metod, které jsou založené na endopeptidázové aktivitě samotného botulotoxinu. Tyto metody pak mají princip odvozený od instrumentálních metod.

1 *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

1.1 Historie

První zmínka o bakterii *Clostridium botulinum* sahá do 18. století, přesněji do roku 1793, kdy německý básník a okresní lékař Justinus Christian Kerner (1786–1862) popsal první příznaky botulismu. Látku nalezenou ve zkažených klobásách nazval jako klobásový jed. V té době byly klobásy vyráběny z vnitřností vepřů, krve a masa, které byly poté vařeny ve vroucí vodě a skladovány při pokojové teplotě. Tyto podmínky vedly k dokonalému přežití spor a pomnožení bakterie *Clostridium botulinum* (Matthews a kol., 2017). V roce 1817 doktor Kerner velmi podrobně referoval v lékařských listech o smrti sedláka, která nastala po požití vyuzené, ale nepřevařené klobásy (Krhut, 2006). Avšak doktoru Kernerovi se nepodařilo prokázat podezření na biologický jed (Matthews a kol., 2017). O dvacet let později (roku 1884) došlo v belgické vesnici Ellenzells k otravě 34 lidí, z nichž tři zemřeli. Původce této otravy byl nalezen ve zbytcích uzené šunky (Adams a kol., 2016).

Poprvé byla bakterie *Clostridium botulinum* izolována v roce 1895 z domácí šunky, a to belgickým bakteriologem Émile Pierre-Marie van Ermengemem (1851–1932) na univerzitě v Gentu. Tato šunka byla ponořena do slaného nálevu, kde byly poskytnuty anaerobní podmínky pro přežití spor *C. botulinum*. Bakteriolog Ermengem jako první díky této izolaci identifikoval, že nemoc způsobená touto bakterií, je produktem intoxikace potravin spory *C. botulinum*. Název této bakterie vznikl z latinského slova „botulus“, což v překladu znamená klobása (Erbguth, 2004).

Tato bakterie však od svého prvotního popsání nespádala do rodu *Clostridium*, ale do rodu *Bacillus*. Po té co belgický lékař spatřil fylogenetické rozdíly mezi těmito dvěma rody, pojmenoval bakterii dnes již známým názvem *Clostridium botulinum* (Wareing a kol., 2010). V roce 1920 se Hermanu Sommerovi podařilo izolovat čistý BoNT typu A a roku 1949 výzkumný tým Arnolda Burgena prokázal mechanismus působení BoNT spočívající v blokování neuromuskulárního přenosu sníženým uvolňováním acetylcholinu. V klinické praxi byl poprvé BoNT využit roku 1981 anglickým oftalmologem Alanem Scottem k léčbě strabizmu (Krhut, 2006).

V 70. letech ve státě New York vypukla největší nákaza botulismu po konzumaci konzervované polévky, což vedlo k vydání dalších předpisů pro bezpečné zpracování konzervovaných potravin (Matthews a kol., 2017).

1.2 Morfologie a kultivace

Clostridium botulinum se řadí mezi Gram-pozitivní striktně anaerobní, pohyblivé a sporulující bakterie. Její velikost se pohybuje v šířce okolo 2 μm a v délce 10 μm a více. Klostridie mají rovný tyčkovitý tvar a někdy mohou mít i mírně zahnuté okraje. Tvoří oválné spory uvnitř bakteriální buňky, které vydouvají tyčinku. Spory jsou uloženy subterminálně tzn. mezi středem a koncem tyčinky (viz Obrázek 1). Proces tvorby spor se nazývá sporulace. Spory jsou rezistentní vůči vnějšímu prostředí a odolávají i několikahodinovému varu. Dále spory přežívají nepříznivé podmínky, jako je vliv UV záření, dezinfekce, kyslejší prostředí a vysychání (Adams a kol., 2016). Je-li bakterie vystavena vnějšímu stresu, pak produkuje spory, které jsou extrémně odolné vůči okolním faktorům (Cenciarelli a kol., 2019). Barvení spor se provádí metodou dle Wirtze-Conklina. Spory jsou obarveny zeleně malachitovou zelení a v mikroskopu jsou pozorovány uvnitř červeně zbarvené bakteriální buňky. *Clostridium botulinum* má na svém povrchu peritrichiální bičíky, pomocí kterých je schopna pohyblivosti. Bičíky jsou tvořeny bílkovinou zvanou flagelin. Buňky mají na svém povrchu vrstvu ochranné membrány, která má za úkol chránit bakteriální buňku. Tato ochranná vrstva také umožňuje klostridiím přežít i několik let (Wareing a kol., 2010).

Kultivace těchto mikroorganismů je náročnější. Anaerobní bakterie se množí za nepřítomnosti kyslíku, jelikož je pro ně kyslík toxický (Lawley a kol., 2012). Podmínkou pro jejich růst tedy je, aby médium mělo nízký redoxní potenciál (cca -100 až -200 mV). Nejvhodnější kultivační média pro anaerobní klostridie jsou agarové půdy bez atmosféry kyslíku nad vrstvou agaru. Toho lze dosáhnout díky zahřátí a vypuzení O_2 , přidáním redukujících látek a absorpcí O_2 , který je nahrazen N_2 . Na krevním agaru vyrůstají klostridie v kruhových, na povrchu drsných, bělavých koloniích obklopených zónou hemolýzy (viz Obrázek 2). Tato hemolýza je výraznější na agaru s králičí krví. Dalším způsobem laboratorní izolace bakterie *C. botulinum* je na růstovém médiu TSC v anaerobním prostředí s méně než 2 % kyslíku (Goering a kol., 2016).

Další charakteristikou *C. botulinum* je vztah k pH prostředí. Bakterie roste pouze v rozmezí pH 4,8–7 a nemůže využít laktózu jako primární zdroj uhlíku, což je charakteristická vlastnost důležitá pro biochemickou identifikaci těchto bakterií. Proteolytické

kmeny *C. botulinum* hydrolyzují želatinu a všechny typy klostridií, až na klostridie produkující botulotoxin typu G, produkují lipázu (Peutherer a kol., 1999).



Obrázek 1: Morfologie buňky *Clostridium botulinum* s endosporou pozorovaná v transmisním elektronovém mikroskopu při zvětšení 50 000× (Johnson, 2019)



Obrázek 2: Bakterie *Clostridium botulinum* na krevním agaru (microbe-canvas.com)

1.3 Výskyt *Clostridium botulinum*

Bakterie *Clostridium botulinum* je všudypřítomná v životním prostředí a ve formě spor se hojně vyskytuje v půdách, v prachu, mořských a sladkovodních sedimentech, ale také ve střevech různých zvířat. V přírodě se bakterie účastní hnilobných procesů, kde jsou vhodné podmínky pro život, neboť je zde minimální koncentrace O₂ (Johnson, 2019). Buňky této bakterie mohou být izolovány prakticky ze všech druhů potravin. Vhodnými substráty pro růst těchto bakterií jsou zakonzervované masné nebo zeleninové potraviny a také ryby či houby naložené ve slaném nálevu, u nichž nalézáme vypouklé víčko. Dále lze bakterii nalézt nakladené v medu nebo v pastě z lískových ořechů. K produkci toxinů potom dochází hlavně při nesprávném procesu domácího zavařování. Velké zdravotní riziko představují vakuově balené nebo čerstvé potraviny, na nichž se spory objevují nejčastěji. Největší výskyt je pak na ovoci, zelenině a houbách. Pokud je jejich výskyt zjištěn v lidském střevě, značí to zpravidla následek alimentární kontaminace. Vysokým rizikem pro výskyt klostridií jsou komerčně vyráběné potraviny, zejména vakuově balené potraviny s prodlouženou trvanlivostí, které se před samotnou konzumací již tepelně neupravují (Motarjemi a kol., 2014).

V České republice patří onemocnění způsobené bakterií *Clostridium botulinum* k velmi vzácnému onemocnění. V letech 1960-2013 bylo v České republice hlášené 119 případů nákazy touto bakterií. Největší výskyt byl hlavně v Středočeském, Severomoravském a Jihomoravském kraji. Zdrojem nákazy byly většinou masové konzervy a zeleninové konzervy domácí výroby. Až na 2 případy, kdy se jednalo o kojenecký botulismus, šlo vždy o alimentární botulismus a nejčastěji byli botulismem zasaženi muži (Ambrožová, 2019).

V USA byly opakovaně zaznamenávány intoxikace touto bakterií u vězňů po požití domácího připravovaného alkoholického nápoje z brambor. U Eskymáků v Kanadě byla nejčastěji popisována epidemie po požití ryb, mořských savců či ptáků. V mírném klimatickém pásmu Evropy se nejvíce v půdě vyskytuje BoNT typu B a BoNT typu E převládající v sedimentech. Na africkém kontinentu byla bakterie *C. botulinum* detekována v půdách oblasti Zambie a Keni s největším výskytem sérotypu BoNT A-D (Espelund a kol., 2014).

2 TOXINY BAKTERIE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Klostridie jsou anaerobní bakterie produkující neurotoxin zvaný botulotoxin. Tento neurotoxin patří mezi velmi nebezpečné mikrobiální metabolity s negativním důsledkem na zdraví člověka. Dále se botulotoxin řadí mezi toxiny s nejvyšší toxicitou. Na základě imunologické rozdílnosti se rozlišuje sedm různých sérotypů botulotoxinů, které se od sebe liší antigenní strukturou a schopností tvořit proteolytické enzymy (Carter a kol., 2015). Většina sérotypů je ještě rozdělena na základě rozdílné aminokyselinové sekvence do několika podtypů, které jsou označovány dodatečnými čísly. Biologický účinek je u všech sérotypů BoNT totožný a všechny jsou přítomny ve sporách. Z buňky jsou pak toxiny uvolňovány po jejím rozpadu. Botulotoxiny typu A, B a E jsou považovány za nejvíce nebezpečné pro člověka a u lidí svým účinkem vyvolávají humánní botulismus. Pro zvířata jsou pak toxické sérotypy C a D (Brul a kol., 2011).

Celý rod klostridií je heterogenní a je rozdělen do čtyř biologicky (fylogeneticky a fyziologicky) odlišných skupin na základě odlišné produkce jednotlivých typů BoNT. Z epidemiologického hlediska jsou důležité pouze první dvě skupiny (Slaný, 2015). První skupina zahrnuje **proteolytické kmeny**, které jsou schopny produkovat BoNT typu A, B a F. Bakterie produkující tyto sérotypy BoNT se vyskytují zejména ve střevech savců, v půdě a na rostlinách. Proteolytické kmeny mají tu schopnost, že dokážou produkovat enzymy, které štěpí proteiny. Predispoziční gen pro tvorbu botulotoxinu lze u této skupiny nalézt v bakteriálním chromozomu. Expozice sérotypů BoNT produkovaného touto skupinou způsobuje především intoxikaci člověka (Carter a kol., 2015). Optimální teplota pro růst kmenů produkujících tyto sérotypy BoNT je 37 °C, ale mohou vyrůstat i v rozmezí 10–48 °C. Inhibiční účinky pro tuto skupinu má teplota nižší než 10 °C, pH<4,6 a koncentrace soli v roztoku nad 10 % (Gupta, 2015). Pokud potravina není dostatečně tepelně zpracována, dochází k pomnožení spor. Spory kmenů vyskytujících se v této skupině mají vysokou tepelnou odolnost a jejich přítomnost je v potravině charakterizována žluklým zápachem (Adams a kol., 2016).

Další skupinou jsou **sacharolytické kmeny**, které fermentují řadu sacharidů. Do této skupiny patří kmeny, které mají predispozici k produkci BoNT typu E, B a F. Hlavním místem výskytu těchto kmenů je vodné prostředí. Tyto kmeny představují velké riziko pro chlazené potraviny a způsobují botulismus především u zvířat (Carter a kol., 2015). U těchto typů BoNT mají spory nižší tepelnou odolnost. Optimální teplota pro růst je 30 °C, ale rostou i při nižších teplotách (až 3 °C). Z tohoto důvodu je posunuta i inhibiční teplota, která je pro

tuto skupinu pod 3 °C. Dalším inhibičním faktorem je pH<5 a koncentrace soli v roztoku nad 5 % (Matthews a kol., 2008).

Do třetí skupiny se řadí kmeny produkující botulotoxiny typu C a D. Řadí se mezi **neproteolytické kmeny** a jejich optimální teplota k růstu je 40 °C. Při teplotách nižších jak 15 °C už tyto kmeny nerostou. Genomová sekvence kódující produkci botulotoxinu je u této skupiny uložena v lyzogenním bakteriofágu. Často jsou tyto kmeny spojovány s onemocněním zvířat a nezařazují se mezi toxiny způsobující lidský botulismus. (Dikeman a kol., 2014).

Poslední skupinou jsou kmeny produkující BoNT typu G. Největší výskyt klostridií produkujících tento typ BoNT je ve střevním traktu savců, ptáků a ryb. Minimální teplota pro růst těchto klostridií je 10 °C, ale optimálně rostou při 37 °C. Tento sérotyp toxinu má svou genomovou sekvenci kódovanou v plazmidu (Kaňovský, 2001).

Tabulka 1: Přehled botulotoxinů (Johnson, 2019)

Toxin	Primární hostitelé	Umístění neurotoxinového genu
A	člověk, koně	chromozom, u některých plazmidy
B	člověk, koně, prasata, primáti	chromozom, plazmidy
C	ptáci, koně, skot, norci, lišky, psi, želvy	pseudolysogenní bakteriofág, plazmidy
D	dobytek	pseudolysogenní bakteriofág u skotu, plazmidy
E	ryby, vodní ptáci	chromozom, plazmidy
F	lidé	chromozom, plazmidy
G	není známo	plazmidy

V posledních letech došlo k průlomovému objevu dalšího sérotypu BoNT. Jedná se o BoNT H, který objevili mikrobiologové Jason Barash a Stephen Arnon, spolu se svým kalifornským týmem. Tento sérotyp toxinu byl nalezen ve stolici kojence a zatím proti novému typu neexistuje žádná protilátka. V jeho genu byla totiž nalezena jiná část DNA než u ostatních sérotypů. Z bezpečnostního důvodu nebyl zveřejněn přesný popis vzniku BoNT typu H, protože pouhých 3,5 gramů by teoreticky stačilo k vyhlazení celého lidstva a mohl by být tento sérotyp H využit jako biologická zbraň (Barash a kol., 2014).

2.1 Genom toxinu *Clostridium botulinum*

Genom BoNT popisuje schopnost klostridií saprofytického způsobu života v půdě a vodním prostředí. Neurotoxinový gen charakterizující tvorbu BoNT můžeme nalézt u bakterie *C. botulinum* zakódovaný v chromozomu, plazmidu nebo také v bakteriofágu. Každý typ BoNT je kódován pomocí genu o velikosti 3,5 kb (Slaný, 2015). Dále nám genom odhaluje doposud nevysvětlitelnou schopnost klostridií degradovat chitin obsažený ve schránkách hmyzu a u půdních korýšů. Existuje domněnka, že tato schopnost je způsobena vylučováním enzymů, tzv. chitináz. Predispoziční gen pro vylučování těchto enzymů není obsažen v každém genomu klostridií nebo je obsažena pouze katalytická doména těchto enzymů. Aby bylo možné posoudit, zda se tyto enzymy zapojují do degradace chitinu, musí být proveden tzv. chitinázový test. Tento test potvrzuje např. u kmene produkujícího BoNT typu A schopnost produkovat chitinázy, tudíž tento typ dokáže degradovat chitin. Tímto lze říci, že kmen produkující BoNT A má aktivní chitinázový systém. Tohoto jevu využívají některá klostridia, žijící v mořských vodách nebo půdním prostředí, při kolonizaci různých živočichů obsahujících chitin, jako jsou korýši, hmyz a houby (Sebahia a kol., 2007).

První celá dokončená genomová sekvence *Clostridium botulinum* (*C. botulinum* ATCC 3502) byla sekvenována Sangerovou metodou a zveřejněna v roce 2007. Tato genomová sekvence náležela proteolytickému kmenu klostridie produkující BoNT A. Dalšími sérotypy spadajícími do skupiny toxinu produkovaný proteolytickými kmeny jsou BoNT B a F. Pro každý typ neurotoxinu však existuje jiná genomová sekvence a umístění této sekvence uvnitř genu není náhodné a pro každý typ BoNT specifické (Sebahia a kol., 2007). Mnoho sérotypů obsahuje několik podtypů a variant, které se od sebe liší na úrovni AMK. Srovnání sekvencí mezi kmeny u skupiny I identifikovalo chromozomální i plazmidové umístění genu, který kóduje produkci BoNT. Přesněji u této formy genomové sekvence BoNT typu A se genom skládá z plazmidu o velikosti 16 344 bp a chromozomu o velikosti 3 886 916 bp (Hill a kol., 2013).

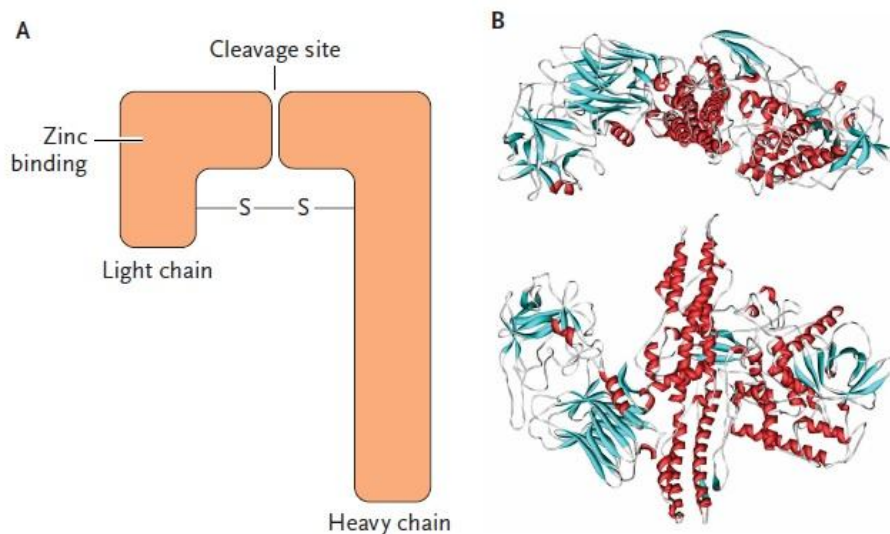
Genomy proteolytické skupiny I a neproteolytické skupiny II se od sebe liší a nevykazují žádnou homologii. U skupiny II byl nalezen podobný genom, pouze s nižším obsahem G a C bazí (Carter a kol., 2015). Porovnáním rRNA sekvencí se ukázalo, že mezi jednotlivými skupinami se vyskytují malé rozdíly z důvodu čtyř různých klastrů, které odpovídají čtyřem skupinám neurotoxinů (Fang a kol., 2010). Genomové sekvence pomohly k porozumění různých variant všech typů BoNT a poskytly informace o umístění

botulotoxinového genu v kmenech. Dnes jsou sekvence řady genomů klostridií k dispozici ve všech veřejných databázích (Hill a kol., 2013).

2.2 Botulotoxin

2.2.1 Struktura botulotoxinu

Botulotoxin zvaný také jako klobásový jed se řadí mezi termolabilní proteiny. Je produkován mikroorganismy rodu *Clostridium* a byl izolován celkem z šesti možných původců (*C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. barati* atd.). Skládá se ze dvou polypeptidických řetězců, jak lze vidět na Obrázku 3, které jsou produkovány bakterií odděleně a až účinkem klostridiových proteáz jsou spojeny disulfidickým můstkem ve vazbě na hemaglutinin a další proteiny. Těžký (H) řetězec (100 kDa) se váže na nervové buňky a lehký (L) řetězec (50 kDa) je zinková endopeptidáza pronikající do buňky (Krhut, 2006). Molekula BoNT se skládá ze tří prostorově oddělených a funkčně odlišných domén. První doména je vazebná, která se nachází na terminálním konci H řetězce a její role spočívá ve specifické vazbě toxinu k receptoru presynaptického vlákna. Toxicita BoNT je způsobena druhou doménou, kterou je katalytická aktivita L řetězce – Zn endopeptidázy. Tato doména způsobuje adhezenci toxinu k buněčné stěně a vyvolává tím aktivaci třetí – translokační domény. Translokační doména zastává funkci prostupu toxinu přes buněčnou membránu do cytosolu (Pellett a kol., 2019). BoNT je produkován v inaktivní formě jako protoxin a po požití je absorbován žaludeční sliznicí. V žaludeční sliznici je započato patogenní působení toxinu a to kvůli změně terciární struktury. Terciární struktura se mění po působení trávicích enzymů na BoNT, což vede k rozštěpení na dva řetězce (Slaný, 2015). Odtud je BoNT transportován do krevního řečiště, čímž se toxin dostává do nervového systému, kde je započat jeho účinek (Dikeman a kol., 2014).



Obrázek 3: Struktura botulotoxinu – znázornění H a L řetězce, A – zjednodušené zobrazení, B – krystalická struktura (Matthews a kol., 2017)

2.2.2 Fyziologické fungování nervosvalového přenosu

V nervovém systému je podstatný přenos vzruchu z neuronu na vlákno kosterní svaloviny. Tento přenos zprostředkovává nervosvalová ploténka, která je typem chemické synapse. Při této synapsi je mediátor uvolněn do synaptické štěrbině na popud akčního potenciálu. Nervosvalový přenos probíhá v **šesti etapách**: syntéza acetylcholinu, jeho depozice, uvolnění, vazba, degradace a recyklace. V první etapě přenosu je cholin transportován z extracelulární tekutiny do buněčného cytosolu cholinergním nervovým zakončením. Při transportu jsou využity transportní kanály určené pro sodné ionty. Poté je cholin přeměněn enzymatickou cestou pomocí acetylCo-A na acetylcholin, který je transportován do synaptických vezikul, kde je uložen. Jakmile dorazí k nervosvalové ploténce akční potenciál, otevřou se transportní kalciové kanály. To vede ke zvýšené intracelulární koncentraci vápníku, což způsobí splynutí presynaptických vezikul s presynaptickou membránou. Touto fúzí dojde k vylití obsahu vezikul do prostoru nervosvalové štěrbině. Za interakci a fúzi vezikulů s presynaptickou membránou je zodpovědný komplex tří proteinů: VAMP, SNAP-25 a syntaxin (viz Obrázek 4A). Tyto proteiny spadají do skupiny SNARE proteinů (Rich, 2006).

SNARE jsou obvykle transmembránové proteiny, které umožňují vezikulární transport uvnitř buněk. Existují dva základní typy SNARE bílkovin rozlišující se dle místa výskytu. Přítomnost na membráně váčku je přiřazována v-SNARE proteinům, t-SNARE proteiny se vyskytují na cílové membráně. Protein v-SNARE se nachází na váčku, nazývá se synaptobrevin a spadá do skupiny VAMP (Ungar a kol., 2003). Protein t-SNARE nacházející se na plazmatické membráně je syntaxin. Oba zmíněné SNARE proteiny spojuje periferní protein SNAP-25 lokalizovaný na presynaptické membráně (Wang a kol., 2017).

Při splynutí vezikul s presynaptickou membránou dochází současně ke vzájemné vazbě proteinů v-SNARE (synaptobrevin) s proteinem t-SNARE (syntaxin). Další protein, který v tomto procesu hraje roli, je synaptotagmin (Ungar a kol., 2003). Jeho funkce spočívá v bránění předčasné fúze vezikul s presynaptickou membránou, někdy se hovoří o tzv. „synaptotagminové brzdě“. Tato brzda se uvolňuje v případě zvýšené koncentrace vápenatých iontů v cytoplazmě nervových buněk z důvodu příchozího signálu akčního potenciálu (Kießling a kol., 2018). Přebytečné ionty vápníku se navážou na synaptotagmin a tím umožní vzájemnou interakci v-SNARE a t-SNARE proteinů. Důsledkem splynutí membrány vezikul a presynaptické membrány je uvolnění acetylcholinu, který volně difunduje nervosvalovou štěrbinou (Rossetto a kol., 2020). Uvolněný acetylcholin se váže na nikotinové či muskarinové receptory a způsobuje depolarizaci postsynaptického vlákna. Tato vazba spouští proces svalové kontrakce. Acetylcholin je pak rychle uvolňován z receptorů zpět do prostoru synaptické štěrbiny, kde je štěpen enzymem acetylcholinesterázou na acetát a cholin. Cholin je tak k dispozici a při poslední etapě nervosvalového přenosu se zpět zapojuje do tohoto dalšího cyklu (Krhut, 2006).

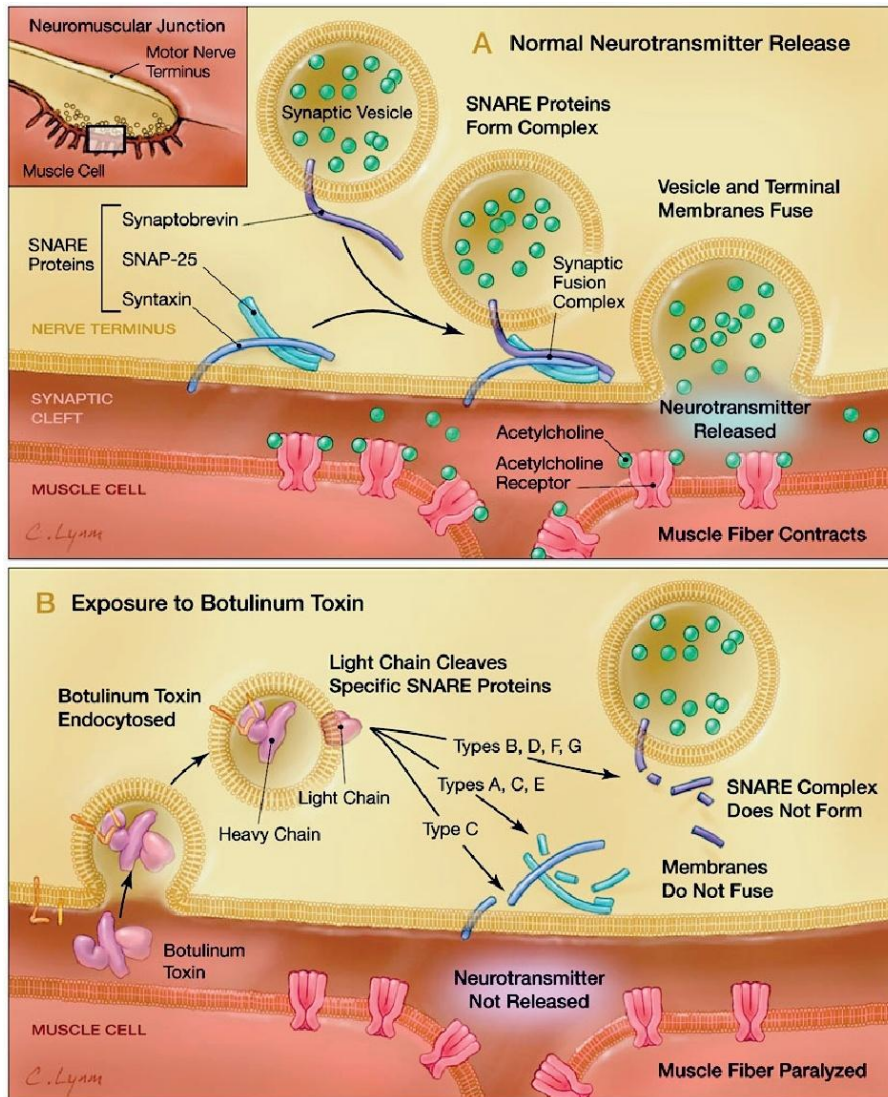
Všechny typy botulotoxinu působí na úrovni periferního nervového systému, kde způsobují poškození SNARE proteinů. Poškození těchto proteinů spočívá v jejich rozkladu, což blokuje uvolňování acetylcholinu z presynaptického nervového zakončení. BoNT působí dominantně na nervosvalovou ploténku. Může se vázat i na autonomní cholinergní ganglia, ale to pouze v případě extrémně velké dávky toxinu (Ungar a kol., 2003).

2.2.2.1 Mechanismus neurotoxického působení botulotoxinu

Neurotoxický mechanismus účinku toxinu lze rozdělit do čtyř fází. Prvním krokem je požití a absorpce toxinu ve střevě. Toxin ve střevě odolává degradaci trávicími enzymy nacházejícími se v gastrointestinálním traktu (Scarlatos a kol., 2005). Druhá fáze začíná vazbou toxinu na presynaptickou membránu nervosvalové ploténky a je startovacím

momentem efektu BoNT. Na vazebné místo, umístěné na membráně nervosvalové ploténky, které tvoří póly akceptorových molekul, se selektivně a ireverzibilně váže C-sequvence umístěná na konci H řetězce toxinu (Krhut, 2006). Tyto akceptorové molekuly mají vysokou afinitu vůči H řetězci, jelikož samotný H řetězec je zodpovědný za specifickou vazbu toxinu k receptoru buněčné stěny presynaptického vlákna, kterými jsou gangliosidy. Ve třetí fázi probíhá proces internalizace. V této fázi se BoNT dostává do nitra buňky prostřednictvím stimulované endocytózy přes buněčnou membránu. Mechanismem stimulované endocytózy proniká komplex neurotoxinu s akceptorovou molekulou postupným kapsulováním do endosomu. Výše uvedený přenos probíhá jen za určité koncentrace vápenatých iontů (Scarlatos a kol., 2005). Danou podmínku lze vysvětlit tím, že endocytóza probíhá jen tehdy, je-li vlákno drážděno. Toxin v dalším kroku přilne na endosomální membránu a celý endosom se přesunuje do cytosolu nervové buňky, čímž se deformuje jeho struktura (Kaňovský, 2001). Endosom může být také pohlcen lysozomem nebo do zvláštních vezikulárních struktur s klathrinovou membránou. Uvnitř vezikul dochází vlivem nízkého pH k acidifikaci obsahu váčku, což vede ke strukturální změně BoNT (Ehler, 2013). Během translokace BoNT se mění prostorové uspořádání molekuly a dochází tak k obnažení aktivních vazebných struktur L řetězce. Ve čtvrté fázi nastává vlastní toxická aktivita. Toxin je uvolněn exocytózou z vezikulů do cytosolu. Zde na něj působí enzymy, které chrání nervovou buňku před rozkladným působením volných radikálů. Tyto enzymy redukuje disulfidickou vazbu mezi L a H řetězcem, až dojde k oddělení obou řetězců. To vede k izolaci L řetězce, neboť pouze L řetězec je schopen enzymaticky rozštěpit vazebné interakce mezi v-SNARE a t-SNARE proteiny. Tímto krokem toxin zabrání fúzi vezikul s presynaptickou membránou a uvolnění acetylcholinu. Celý výše popsaný neurotoxický účinek BoNT je znázorněn na Obrázku 4B (Rossetto a kol., 2020).

BoNT svým působením na synapse periferních nervů blokuje malé synaptické vezikuly, které jsou zodpovědné za uvolňování neurotransmiteru – acetylcholinu, štěpením jednoho z proteinů SNARE, kterým je SNAP-25 (Cenciarelli a kol., 2019). Důsledkem této blokády je znemožnění přenosu vzruchu na nervosvalovou ploténku a následná obrna svalů (Kaňovský, 2001).



Obrázek 4: Mechanismus působení BoNT, A – přenos neurotransmiteru bez působení BoNT, B – působení BoNT na nervosvalovou ploténku (Arnon a kol., 2001)

Intoxikace botulotoxinem se projevuje 12–36 hodin po požití neurotoxinu, v některých případech může trvat až čtrnáct dní. Čím dříve se objeví příznaky intoxikace tímto toxinem, tím závažnější je průběh onemocnění (Matthews a kol., 2008). Po této době se u člověka projevují první příznaky jako je bolest hlavy a končetin, dvojité, či rozmazané vidění, sucho v ústech, polykací a zrakové problémy. Účinkem toxinu je paralýza okohybných a lícových svalů a posléze i ostatních svalů včetně dýchacích a srdečních. V nejzávažnějším případě dochází z důvodu této paralýzy až k zástavě dýchání a srdeční činnosti, což vede ke smrti (Matthews a kol., 2017).

Botulotoxin je citlivý na teplo a var, ale jeho zničení nemusí být zcela dokonalé. Některé typy tohoto toxinu vydrží i teplotu 120 °C po dobu 2–3 minut. Nejvíce toxinu se tvoří při optimální teplotě 28 °C. Zásadní v prevenci proti BoNT je dostatečné ošetření potravin při vyšší teplotě. K jeho zničení by měla postačit teplota 80 °C po dobu 39 minut, tím se naruší vazba obou řetězců a zmizí biologická aktivita, tedy toxicita BoNT (Sharma a kol., 2005).

Smrtná dávka botulotoxinu pro člověka se při intravenózním podání pohybuje v rozmezí 0,09–0,15 µg pro člověka s hmotností 70 kg. Při inhalačním podání toxinu odpovídá smrtná dávka 0,7–0,9 µg. Smrtná dávka v podobě orálního podání BoNT je oproti předešlým způsobům vyšší a odpovídá 70 µg toxinu (Dembek a kol., 2007).

Botulinové neurotoxiny vytváří ve střevě komplexy s řadou pomocných proteinů (např. hemaglutinin) a s dalšími netoxickými proteiny. Pomocné proteiny chrání neurotoxin před působením digestivních enzymů a napomáhají jeho snadné absorpci střevní stěnou do těla (Krhut, 2006).

Tabulka 2: Přehled SNARE proteinů štěpených jednotlivými sérotypy BoNT (Sharma a kol., 2005)

Sérotyp botulotoxinu	Substrát štěpení
A	SNAP-25
B	VAMP/synaptobrevin
C	Syntaxin
D	VAMP/synaptobrevin
E	SNAP-25
F	VAMP/synaptobrevin
G	VAMP

2.3 Botulotoxin a klinické využití jednotlivých sérotypů

Botulotoxin je součástí mnoha důležitých a široce používaných léčiv, zejména v léčbě neurologických onemocnění. BoNT má terapeutické použití pro svoji schopnost blokovat cholinergní přenos a tím dokáže uvolňovat křeče při neurologických onemocněních. Vzhledem k lokální aplikaci má léčba botulotoxinem jen velmi málo závažných nežádoucích účinků (Pellett a kol., 2019). Základem úspěšné léčby je přesná aplikace optimální dávky a důsledné sledování pacienta. Při léčbě je nutné podávat co nejmenší dávku, která má ještě žádoucí efekt s cílem minimalizovat možnost vzniku nežádoucích účinků. S tím souvisí i snaha snížit antigenní zátěž organismu a riziko produkce protilátek proti BoNT (Nigam

a kol., 2010). V klinické praxi byl BoNT poprvé použit v 80. letech minulého století oftalmologem Scottem pro korekci strabismu. Velkou výhodou v tomto klinickém využití bylo lokální vpravení toxinu, kdy se účinek projevil pouze ve svalu, do kterého se lék aplikoval. Účinek byl závislý na dávce toxinu a trvání účinku bylo omezeno na tři měsíce. Od této doby bylo popsáno více jak 250 indikací BoNT při léčbě mnoha klinických poruch se zvýšenou aktivitou svalů a zvýšenou činností autonomního systému (dystonie, hemifaciální spasmus, tiky, spasticita, blefarospasmus, achalázie až po bolestivé stavy hlavy – migrény). V případě těchto onemocnění je terapie botulotoxinem hrasena pojišťovnou. Jeho indikace v léčbě uvedených onemocnění se stále zvyšuje, proto se o BoNT hovoří jako o penicilinu 21. století. Mezi nežádoucí vedlejší účinky patří přílišné oslabení svalů, bolesti a otoky v místě vpichu.

Další využití shledal BoNT také v kosmetickém průmyslu a estetické medicíně, kdy je lokálními injekcemi BoNT aplikován do obličeje pro vyhlazování vrásek. Pro tento zákrok jsou používány preparáty Dysport a Botox, které jsou sterilní a lyofilizovanou formou BoNT. Tyto dva preparáty se od sebe liší biologickou aktivitou, ale v klinické praxi jsou oba stejně účinné. Po aplikaci injekce je výsledek omezení funkce mimického svalstva, jelikož dochází k přerušení nervosvalového přenosu. Účinek tohoto estetického zákroku bývá po dobu 3–5 měsíců. BoNT se rovněž využívá k potlačení nadměrného pocení (Nigam a kol., 2010).

Botulotoxin se podává intramuskulárně nebo subkutánně v roztoku. U hlouběji položených svalů je aplikován do svalu, či podkoží za kontroly EMG signálu dutou EMG elektrodou ultrasonografií. Mezi kontraindikace podání BoNT patří laktace, těhotenství, poruchy hemokoagulace, záněty v místě podání BoNT (Ehler, 2013).

2.3.1 Botulotoxin A

Botulotoxin typu A se řadí mezi botulotoxiny způsobující alimentární botulismus. Botulotoxin A je vázán *in vitro* na hemaglutinin, s nímž vytváří komplex o hmotnosti 900 kDa (Tao a kol., 2020). Jeho funkcí je stříhat synaptosomálně asociovaný SNAP-25 na dvě inaktivní části. U BoNT A bylo nalezeno pět různých podtypů (A1–A5). Botulotoxin typu A má především využití při léčbě blefarospasmu, hemifaciálního spasmu a silných migrén. Při léčbě blefarospasmu je BoNT A aplikován do části horního i dolního víčka. Blefarospasmus se projevuje mimovolním zavíráním obou očí, zvýšenou frekvencí mrkání a svíráním víček s pocitem suchosti a dráždění očí. S tímto onemocněním souvisí další onemocnění a tím je hemifaciální spasmus. Tento typ spasmu je charakterizován

jednostrannými a tonickými kontrakcemi mimického svalstva. Při léčbě se BoNT aplikuje do dvou bodů očních víček (Kaňovský, 2001).

Botulotoxin A se využívá v centrech léčících motorické poruchy. Vyrábějí se z něho dva preparáty – Dysport (firma Ipsen) a Botox (firma Allergan). Tyto dva komerční preparáty botulotoxinu A se liší ve své relativní účinnosti navzdory společnému jednotkovému systému (Rossetto a kol., 2020). Větší relativní účinnost má přípravek Dysport, jelikož obsahuje až 300 jednotek botulotoxinu v jedné lahvičce. Na rozdíl od Dysportu obsahuje přípravek Botox pouze 100 jednotek BoNT v jedné lahvičce. Pacientům, kteří nereagují na přípravky obsahující sérotyp BoNT A je aplikován přípravek s obsahem BoNT typu B. A to z důvodu, že je lidský organismus schopen produkovat neutralizační protilátky typu IgG proti BoNT A (Aoki, 2001).

2.3.2 Botulotoxin B

Klostridiální spory produkující botulotoxin typu B se nejčastěji vyskytují v mase a člověk je infikován zpravidla alimentární cestou. Doposud bylo identifikováno osm podtypů tohoto sérotypu (B1–B8). Od předchozího typu BoNT se liší svým účinkem na proteiny v presynaptickém zakončení a to tím, že štěpí membránový protein synaptobrevin, protein skupiny VAMP, stejně jako typy BoNT D a F (Halpin a kol., 2019).

V klinické praxi je obsažen v injekčním přípravku NeuroBloc, který je vyráběný firmou Elan Pharma. Tento injekční přípravek je určen k léčbě cervikální dystonie u dospělých lidí. Při aplikaci tohoto léku je nutné brát zřetel na to, aby nedošlo k aplikaci do cévy (Dikeman a kol., 2014). V dnešní době tento produkt není povolen a byl nahrazen produktem Myobloc, který je určen výhradně k intramuskulárnímu podání (Nigam a kol, 2010).

2.3.3 Botulotoxin C a D

Tyto dvě formy botulotoxinů jsou patogenní převážně pro zvířata, a to hlavně pro drůbež (Tiwari a kol., 2019). Mechanismus působení typu C je doposud neznámý, avšak je známo, že narušuje funkční bariéru buněk (Ryazantsev a kol., 2016). Botulotoxin D byl identifikován v podestýlce kuřat (Gupta, 2015).

U této skupiny BoNT byl zaznamenán chimérismus, a to z důvodu, že některé sérotypy vykazují vlastnosti jak typu BoNT C, tak i typu BoNT D. Sérotyp C účinkuje jak na

SNAP-25, tak na syntaxin a dokáže je „přestříhnout“. BoNT D stříhá membránový protein synaptobrevin (Halpin a kol., 2019).

2.3.4 Botulotoxin E

Botulotoxin typu E se objevuje při fermentačních procesech, které způsobují anaerobní podmínky a umožňují klíčení spór, které mohou přežít zmražení až na -3 °C. Spory tvořící BoNT typu E je možné lokalizovat u mořských a vodních živočichů. Tyto potraviny jsou slané a mají kyselé pH, tudíž tvoří dokonalé podmínky pro pomnožení spór. Botulotoxin E je neproteolytický, což vysvětluje, že nenastává žádná změna zápachu nebo chuti potraviny (Brul a kol., 2011). U toho typu BoNT dochází často k včasnému zvracení, tudíž je zaznamenána nižší úmrtnost na tento sérotyp BoNT (Wareing a kol., 2010).

2.3.5 Botulotoxin G

Botulotoxin typu G se nachází především ve vzorcích půdy. Botulotoxin typu G je spojen s lidským onemocněním pouze zřídka, jelikož doposud nebyla popsána cesta nákazy, kterou by mohl toxin vstoupit do lidského oběhu. Na základě podobností v aminokyselinové sekvenci a rozpoznávání substrátu je BoNT G blízký BoNT sérotypu B. Podobnost s ostatními sérotypy je výrazně nižší. Schopnost BoNT G spočívá ve stříhání proteinu VAMP (Wang a kol., 2019).

2.4 Botulotoxin jako biologická zbraň

Jako biologická zbraň je považována látka, která má škodlivé nebo toxické účinky na člověka. Mezi biologické zbraně se řadí bakterie, viry nebo toxiny produkované mikroorganismy. Výhoda biologické zbraně spočívá v relativně nízkých výrobních nákladech ve srovnání s chemickými látkami (Cenciarelli a kol., 2019). Biologické zbraně byly v minulosti využity ve válce. Úmyslné šíření choroby tak dalo nový rozměr hrozbě, která je vyvolána infekčními a toxickými látkami. Cílem použití biologické zbraně je vyhubit co nejvíce lidstva. Podmínka pro použití látky jako biologické zbraně je tedy taková, že proti toxické látce neexistuje účinná protilátka ani vakcína, nebo je schopnost toxinu zabít lidi už při velmi nízkých koncentracích. Další vlastnost biologické zbraně spočívá v její těžké diagnostice z důvodů symptomů, které mohou napodobovat časnou fázi běžně se vyskytujících onemocnění. Faktorem, který brání použití biologické zbraně je obtížná

výroba dostatečného množství toxinu. V dnešní době je jakékoliv využití biologické zbraně celosvětově zakázáno (Arnon a kol., 2001).

Botulinové neurotoxiny jsou zařazeny do skupiny nejjedovatějších látek a pouhý 1 g BoNT postačí, po rozprášení a inhalaci, k zabití milionu lidí. Proto se touto svojí extrémní toxicitou řadí mezi jednu z variant pro využití při bioteroristickém útoku. Dalšími vlastnostmi, které přispívají k jeho využití při teroristickém útoku, jsou jeho snadná výroba, velmi jednoduchý přenos a především symptomy vyskytující se po intoxikaci tímto toxinem. Jelikož symptomy jsou nesprávně interpretovány už v počátečních stádiích a jsou velmi podobné symptomům nasvědčující onemocněním, která se vyskytují běžně v lidské populaci. Botulotoxin lze přenášet hlavně alimentární cestou, vodou nebo ve formě aerosolu (Wang a kol., 2019). Letální dávka tohoto jedu je extrémně nižší než u jakékoliv jiné látky podobného typu. Díky svým vlastnostem, kdy je BoNT ve vodném roztoku bezbarvý, bez zápachu a bez chuti je považován za ideální použití při „tichém útoku“. Použití BoNT je pro útok ve velkém měřítku nepravděpodobné, pokud se nepoužije ke kontaminaci injekčních látek, jako jsou různé vakcíny a léky (Cenciarelli a kol., 2019).

Proti tomuto toxinu účinkuje antitoxin, ale pouze v případě včasného podání. Pozdní podání antibotulinního séra je neúčinné. V případě použití BoNT při bioteroristickém útoku by léčba nakažené populace znamenala velký tlak na zdravotní systém. Hlavně z důvodu náročné léčby a nízké dostupnosti antitoxinu (Prakash a kol., 2010).

Jednou z řady nevýhod použití BoNT jako biologického činitele, je jeho složité zpracování pro útok ve větším měřítku. To může být náročné z hlediska požadované technologie a kvůli vysoké rychlosti rozkladu toxinu v životním prostředí. Řada studií uvádí, že v posledních letech byly hlášeny případy držení, zájmu o získání BoNT a také k pokusům použití BoNT jako biologické zbraně (Prakash a kol., 2010).

2.4.1 Historické milníky použití botulotoxinu jako potenciální biologické zbraně

V 80. letech byla v Paříži odhalena tajná laboratoř, kde červená armáda kultivovala bakterie *Clostridium botulinum* pro teroristické účely. Na konci války v Zálivu v roce 1991, po zničení Saddáma Husajna našla skupinka vědců injekční lahvičku s bakteriemi rodu *Clostridium botulinum*. Irák v té době tvrdil, že byl připraven použít BoNT při útoku a vyrobil 19 000 litrů toxinu, což by stačilo k vyhubení celé populace lidstva. Botulotoxin byl také

v minulosti využit k teroristickému útoku v Tokiu, kdy byl aerosol tohoto toxinu rozptýlen v centru Tokia náboženskou sektou v čele s Aum Shinrikjo v roce 1995. Naštěstí byl tento teroristický útok bez úspěchu a nikdo při tomto pokusu o útok nebyl zraněn. Proč, ale tyto útoky selhaly, už nikdo nezjistil. Existovaly domněnky, že to mohlo být způsobeno použitím kmene, který produkoval neúčinný sérotyp BoNT nebo nastala závada na zařízení generující aerosol. Spojené státy vyráběly BoNT za 2. světové války a označovaly jej jako „Agent X“. Vojenské jednotky Spojených států chtěly BoNT využít při invazi do Normandie v den D. Spojené státy byly na toto použití biologické zbraně připraveny, a proto měly k dispozici 1 milion dávek antitoxinu pro své vojenské jednotky (Patočka a kol., 2005). V roce 2005 byla zaznamenána úmyslná kontaminace botulotoxinem v USA u mléka v cisternách. Model BoNT při této úmyslné kontaminaci mléka měl zohledněné vlastnosti pro přežití v cisternách při dalším zpracování mléka. Tato kontaminace mohla vést k otravě až půl milionu lidí (Prakash a kol., 2010).

3 BOTULISMUS

Botulismus je závažné paralytické onemocnění způsobené jedním z nejsilnějších neurotoxinů, který je produkován bakterií *Clostridium botulinum*. Tento toxin se dostává do krevní cirkulace, kde působí na cholinergní synapse, čímž zabraňuje přenosu acetylcholinu. Jedná se o onemocnění, které vzniká po konzumaci kontaminované a nedostatečně zpracované potravy. Kontaminace potravy je způsobena spory anaerobní bakterie *C. botulinum*, kterou můžeme nalézt např. v půdě. K nákaze může také dojít při pozření produkčního organismu, kontaminací rány klostridii nebo při vdechnutí spor *C. botulinum* (Robinson a kol., 1999)

Dle způsobu nákazy rozlišujeme šest klinických forem tohoto onemocnění. První formou je **alimentární**, neboli **potravinový botulismus**. Tato forma je nejběžnější a má nejvíce fatální následky. Ohnisko vzniku této formy vzniká nejčastěji při špatné fermentaci nebo nedokonalém zpracování potravin, jako je např. domácí konzervování (Gupta, 2015). Potravinový botulismus způsobují hlavně typy BoNT A, B a E. Inkubační doba tohoto typu botulismu je obvykle v rozmezí 8–36 hodin, ale může se pohybovat i okolo 4–10 dní (Cenciarelli a kol., 2019).

Druhou formou je **kojenecký botulismus**, který se nejčastěji vyskytuje u kojenců do dvanácti měsíců života z důvodu pomnožení spor klostridií v tlustém střevě. Dětský botulismus je spojován s intoxikací BoNT ze včelího medu a sirupů, protože u takto malých dětí není ještě dostatečně vyvinutá střevní mikroflóra. Z kontaminovaného medu se spory usadí v tlustém střevě, kde začínají klíčit a tím se z nich stávají buňky produkující toxin (Lawley a kol., 2012). Ve chvíli, kdy dítě začne konzumovat tuhou stravu, dochází ke změnám v jeho střevní mikroflóře, která je potom schopna inhibovat růst těchto bakterií (Motarjemi a kol., 2014). Klinické příznaky kojeneckého botulismu jsou letargie, nízký krevní tlak a ochablost svalů. U kojeneckého botulismu se inkubační doba pohybuje v rozmezí 3–30 dnů (Cenciarelli a kol., 2019).

Třetí formou je **traumatický botulismus nacházející se v ráně**. Tento typ botulismu vzniká po kolonizaci rány klostridii z důvodu zanesení kontaminace z půdy, vody nebo prachu. Traumatický botulismus může také nastat po pomnožení sporotvorných buněk při užívání drog, atp. (Carter a kol., 2015). Spory se v anaerobním prostředí rány množí a jsou absorbovány do krevního řečiště, kde putují a vážou se na nervová zakončení, čímž dochází k zablokování přenosu podnětů. Ještě donedávna byla tato nemoc velmi vzácná, až do doby,

kdy bylo hlášeno několik případů, které byly spojeny s intravenózním užíváním drog. Ve Spojeném Království nebyl do roku 2000 zaznamenán ani jeden případ nakažení tímto toxinem. Až v letech 2000-2005 bylo hlášeno celkem 112 případů podezřelých na botulismus, z nichž všechny případy se týkaly injekčního podávání heroinu (Sebahia a kol., 2007). První příznaky po kontaminaci tímto toxinem lze zpozorovat po 7–14 dnech (Cenciarelli a kol., 2019).

Dalšími a méně významnými typy botulismu jsou např. inhalační, iatrogenní a střevní botulismus. **Inhalační typ botulismu** je způsobem vdechnutím spor klostridií, které toxin později uvolňují do dýchacích cest. Touto cestou toxin vstupuje do oběhového systému přes slizniční membrány. Tento typ však není přirozeným způsobem intoxikace a byl popsán pouze v případě náhodné laboratorní expozice. **Iatrogenní botulismus** je způsoben injekčním podáním neschváleného zdravotnického přípravku obsahujícího BoNT. Poslední formou je **střevní botulismus**, který je způsoben požitím samotných spor. Střevní botulismus je identifikovatelný u dětí starších dvanácti měsíců a u dospělých jedinců (Cenciarelli a kol., 2019).

Botulismus není přirozeně se vyskytující nemoc. Samotnou nemoc nelze šířit stykem mezi lidmi a není nakažlivá. Typické potíže při botulismu lze shrnout do symptomu „čtyř D“: diploidie, dysartrie, dysfonie a dysfagie. Nákaza bakterií, která toto onemocnění vyvolává, avšak není příliš častá (Duarte-Davidson a kol., 2019).

V dřívějších dobách byla smrtelnost na botulismus vyšší, pohybovala se okolo 30–65 %. V dnešní době není smrtelnost zdaleka tak vysoká a sahá pod 10 % z důvodu včasné léčby, která spočívá v podání polyvalentního antiséra a podpoře dýchání prostřednictvím plicních ventilátorů. Pokud otrava toxinem není fatální, může zotavení trvat několik měsíců nebo dokonce roků (Lawley a kol., 2012).

3.1 Léčba botulismu

V současné době neexistuje žádná licencovaná vakcína k ochraně proti botulismu. Dříve byla ve Spojených státech používána inaktivní vakcína, která sloužila k očkování osob s vyšším rizikem nákazy, jako jsou pracovníci laboratoří a výzkumných zařízení. V roce 2011 bylo používání této vakcíny přerušeno, a to z důvodu nízké imunogenicity některých sérotypů toxinu. Onemocnění způsobené bakteriemi *C. botulinum* má velmi dobrou prognózu, pokud je pacient včas diagnostikován a léčen (Dembek a kol., 2007). Základem terapie je včasné intravenózní podání polyvalentního imunoglobulinu obsahujícího antitoxiny A, B a E na bázi koňského séra. Trivalentní antitoxin je nutné podat do 72 hodin od nástupu příznaků, jelikož pouze cirkulující BoNT lze zneutralizovat. Jakmile se toxin naváže na nervová zakončení, nemá podání antitoxinu již žádný význam. Antitoxin se podává 2–3× denně do vymizení příznaků (Tiwari a kol., 2019). U postižených pacientů je nutné po nález intoxikace BoNT zabezpečit také intenzivní podpůrnou léčbu v podobě plicní ventilace, pokud se objeví respirační paralýza. Tato podpůrná léčba musí probíhat po dobu 2–4 měsíců. Úplné zotavení z botulismu může trvat několik týdnů až měsíců (Scarlatos a kol., 2005)

Léčba kojeneckého botulismu je náročná z důvodu obtížné diagnostiky a často je zotavení tohoto typu botulismu zdlouhavé. To je způsobeno nízkým množstvím toxinu vyvolávající onemocnění ve srovnání s dospělým jedincem. Dalším omezujícím faktorem je malé množství vzorku, které lze bezpečně odebrat na potřebné laboratorní testy (Rosen a kol., 2017). Kojenecký botulismus se léčí podáním anti-botulotoxinu BabyBIG, který obsahuje protilátky lidského původu (Halpin a kol., 2019).

4 METODY DETEKCE BOTULOTOXINU

Laboratorní diagnostika BoNT se používá především k průkazu onemocnění způsobovanému bakteriemi *Clostridium botulinum*. Průkaz BoNT a kultivaci *C. botulinum* provádí referenční laboratoře. Botulotoxin představuje velkou hrozbu v případě ohrožení veřejného zdraví nebo v potravinářském průmyslu z důvodu potenciální kontaminace potravin a rychlého rozšíření botulismu. Proto je spolehlivá a rychlá kvantitativní analýza BoNT nezbytnou součástí laboratorních systémů. Tato analýza má také prvořadý význam při klinickém výzkumu léčiv (Pellett a kol., 2019). Detekce neurotoxinu produkovaného bakterií *C. botulinum* je velmi náročná kvůli složité povaze toxinu a jeho vysoké toxicitě. Z důvodů extrémní toxicity toxinu je nutné testování na laboratorních zvířatech, ale také existují rychlé screeningové metody pro včasné odhalení kontaminovaných vzorků (Sharma a kol., 2005).

Při výběru metody detekce BoNT je důležité brát v úvahu konečný cíl laboratorní diagnostiky. Každá metoda má své specifické potřeby a požadavky. Diagnóza BoNT zahrnuje klinickou prezentaci a laboratorní identifikaci BoNT v klinických vzorcích nebo v podezřelých potravině. Klinickým materiálem pro diagnózu BoNT může být sérum, žaludeční aspirát, vomitus, výtěr z nosu, stolice nebo vzorky infikované potraviny. Tento materiál je důležité přepravovat do laboratoře v chladu. Většina imunologických testů nerozlišuje aktivní toxin od neaktivního nebo částečně degradovaného toxinu (Pellett a kol., 2019). Pro stanovení biologické aktivity BoNT lze využít pouze test, který zahrnuje všechny kroky procesu intoxikace. Tímto testem je biologický test detekce BoNT prováděný na myších, jenž bohužel postrádá citlivost k detekci velmi nízkých koncentrací BoNT. Některé *in vitro* testy s vyšší citlivostí jsou vhodnými metodami pro detekci ve vzorcích s nízkou koncentrací toxinu. Tyto testy však nemusí detekovat nové typy BoNT, na které nebyl test validován. *In vitro* testy se využívají také k vývoji nových léků pro léčbu botulismu. Diferenciální diagnostika spočívá v detekci BoNT z různých typů vzorků. Poté lékaři dle získaných výsledků stanoví diagnózu onemocnění. Mezi onemocnění vzniklá intoxikací botulotoxinem patří řada neuromuskulárních chorob či poruch nervového systému. Těmito onemocněními mohou být cerebrovaskulární příhoda, myasthenia gravis, Lambert-Eatonův syndrom, mozková příhoda a spousta dalších onemocnění (Cenciarelli a kol., 2019).

4.1 Biologický *in vivo* test detekce BoNT prováděný na myších

Biologický test prováděný na myších (MBA) byl vyvinut společností Johna Trevana v roce 1921. Tento test byl přijat odborníky a zařazen jako standardní test pro testování toxicity BoNT. Neutralizační test prováděný na myších se řadí mezi jednu z nejstarších a nejvhodnějších metod pro stanovení alimentárního BoNT z důvodu přímého sledování účinku od vpichu toxinu do krevního oběhu laboratorní myši (Scarlatos a kol., 2005). Před schválením testu využívajícího neurony nebo modifikované buněčné linie odvozené od pluripotentních kmenových buněk, byl MBA jediným schváleným testem pro kontrolu potravin a léčiv před intoxikací botulotoxinem v USA. V dnešní době se metoda využívá k diagnostice botulismu u lidí (Wilder-Kofie a kol., 2011). Myší biotest je jedinou detekční metodou, která zahrnuje všechny kroky intoxikace botulotoxinem. Myší biotest funguje na principu *in vivo* testu, čímž umožňuje detekovat pouze biologicky aktivní toxin a k detekci mohou být využity matrice z různých materiálů (Hatheway a kol., 1988). Množství BoNT je měřeno v jednotkách – LD50, které jsou definovány jako množství BoNT potřebné k usmrcení 50 % myši během 96 hodin (Pellett a kol., 2019). Test je stále považován za zlatý standard pro laboratorní testování, díky svému detekčnímu limitu, který je 10–20 pg (Cenciarelli a kol., 2019). Na úkor své citlivosti má ale také řadu nevýhod. Těmi mohou být časová náročnost, vysoké náklady na provedení testu, dále vyžaduje větší množství vzorku (4 ml) než ostatní metody, vyškolený personál a v neposlední řadě její etický důsledek, kvůli používání velkého množství živých zvířat k laboratorním testům (Wang a kol., 2017). Další nevýhodou je také neselektivnost testu, proto jsou z tohoto důvodu zařazeny další testy pro určení sérotypu BoNT. Test má také z důvodu *in vivo* provedení různou účinnost mezi laboratořemi a výsledek může být navíc ovlivněn falešnou pozitivitou nebo negativitou myšího biotestu (Schantz a kol., 1978). Vzhledem k výše uvedenému byl zaveden toxinový standard používaný napříč laboratořemi, který významně snižuje chybu stanovení. Dalším faktorem ovlivňujícím laboratorní vyšetření může být použitý druh myši k diagnostice, jejich hmotnost a věk (Pellett a kol., 2019). V neposlední řadě není vhodné používat MBA pro vyšetřování vzorků obsahující jiné smrtící látky než je BoNT. Tyto látky by mohly totiž způsobit usmrcení myši, anebo by mohlo dojít vlivem jejich účinku k zneutralizování BoNT (Scarlatos a kol., 2005).

4.1.1 Princip biologického *in vivo* testu prováděného na myších

Principem biologického *in vivo* testu na myších je kontakt testovaného vzorku s detekčním systémem (myši) a sledování nástupu příznaků botulismu od doby aplikace vzorku. Z reakce myši se usuzuje, zda testovaná látka obsahovala toxin. Eluát z potraviny je připraven smícháním s fosfátovým pufrem v poměru 1:2 (Johnson a kol., 2016). Použití pufru poskytuje stabilitu BoNT ve vzorku. Vzorek je v dalším kroku injekčně podán skupině myši v přítomnosti nebo nepřítomnosti monovalentního antitoxinu. Při klasické cestě MBA je potravinový extrakt podáván intraperitoneálně, což má za následek rychlou distribuci toxinu do těla myši. Při testu může být také využito intravenózní, intramuskulární, orální nebo subkutánní podání. Po injikování potravinového extraktu je přítomnost funkčně aktivního neurotoxinu rozpoznávána charakteristickými příznaky, které jsou nejrychleji pozorovány při intravenózním podání (Pellett a kol., 2019). Nástup příznaků je závislý na dávce toxinu a v prvních třiceti minutách po aplikaci injekce je zapotřebí sledovat symptomy nasvědčující botulismu. Za typické příznaky botulismu u myši můžeme pokládat postupné naježení kožešiny, namáhavé dýchání až lapání po dechu, slabost končetin až jejich postupné ochabnutí. Nakonec nastává smrt v důsledku selhání dýchacích cest. V případě přítomnosti toxinu ve vzorku myši hynou během 96 hodin, avšak u většiny myši nastává smrt během dvou dnů (Sharma a kol., 2005). Myši, kterým je aplikován vzorek ošetřený antitoxinem přežívají (Dembek a kol., 2007).

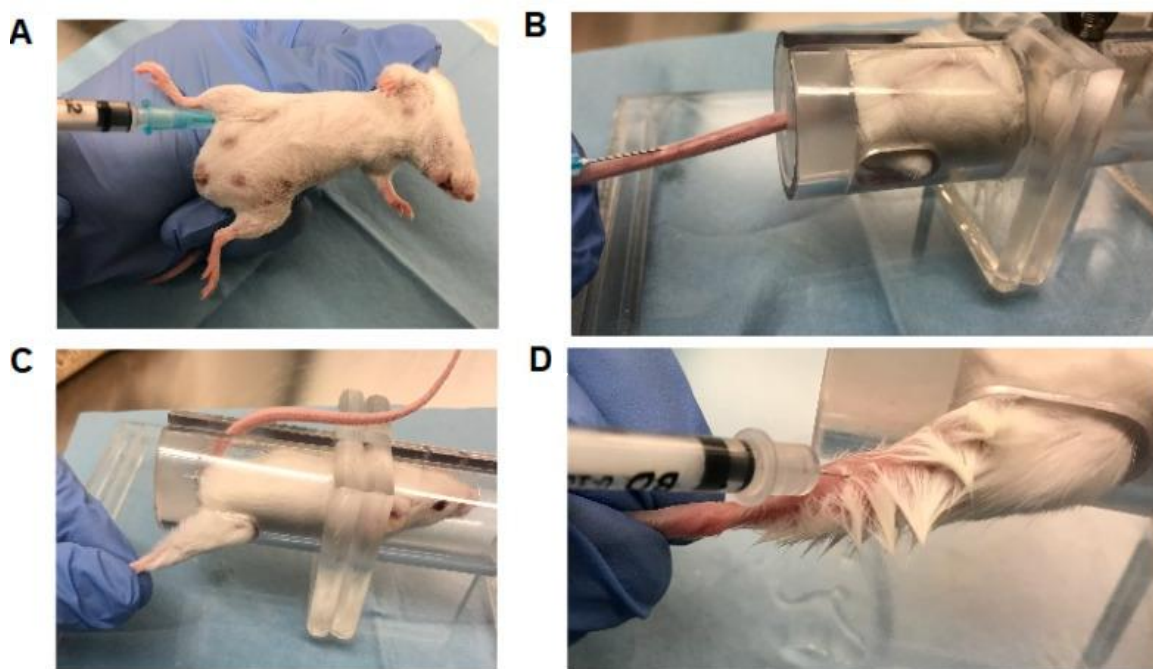
Myší biotest má časté využití v hodnocení účinnosti antitoxinu. V případě, kdy se jedná o inhalační typ botulismu, není možné stanovit BoNT ve vzorcích stolice či séra, je potřeba citlivější metody, např. ELISA test (Wilder-Kofie a kol., 2011).

4.1.2 Aplikace vzorku

Během aplikování vzorku je nutná všestranná injekční technika. Mohou se totiž vyskytnout chyby při injekčním podání vzorku, které poté zkreslují výsledek detekce. Při intraperitoneálním podání se myš pevně uchopí, znehybní, a jehla se zavede do pravého dolního kvadrantu pobřišnice pod úlem 30–45° (viz Obrázek 5A). Myši je injikován vzorek o objemu 0,5 ml pomocí 1 ml injekční stříkačky. Chybné umístění jehly by mělo za následek poškození střev nebo jater, což by vedlo k jejich krvácení a následné nepřesnosti testu. U intravenózního podání vzorku je myš upevněna do zádržného zařízení a ocas je jemně držen směrem dozadu. Díky tomuto držení je snadno viditelná boční ocasní žíla, do které je bez aspirace pomalu vpraven materiál (viz Obrázek 5B). Při podání injekce by neměl být

pociťován žádný odpor a ani otok žíly. Pro intramuskulární podání je myš upevněna do zařízení s otvorem pro pravou zadní končetinu (viz Obrázek 5C). Po vytažení končetiny otvorem se zadní končetina jemně natáhne a do svalu se injikuje objem 10 μ l pomocí injekční stříkačky Hamilton (viz Obrázek 5D). Jelikož je pro tento způsob podání využíváno malého objemu, je důležité zajistit, aby nedocházelo k úniku vpravovaného materiálu z místa aplikace.

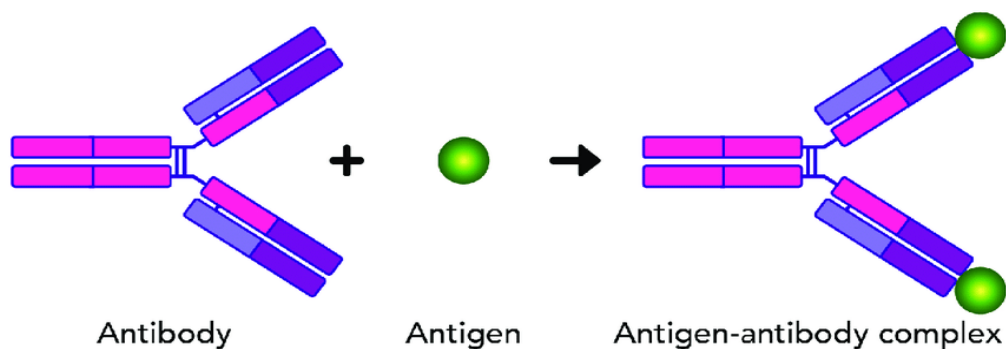
Koncentrace obsaženého toxinu ve vzorku by se měla bez ohledu na použitou injekční techniku odhadovat pomocí sériového ředění. Do výsledku by se měli zahrnout všechny myši, které test podstoupily a také jejich příznaky. Pokud některé myši trvale nevykazují žádné příznaky i během vysoké koncentrace toxinu ve vzorku, je pravděpodobně chyba v podání a test by měl být zopakován (Pellett a kol., 2019).



Obrázek 5: Techniky podání toxinu, **A**: intraperitoneální podání – sérum se vstříkne do pravého dolního kvadrantu pobřišnice, **B**: intravenózní podání – myš upevněna v zádržném zařízení a sérum je vpraveno do ocasní žíly, **C**: upevnění myši do zařízení pro intramuskulární podání, **D**: intramuskulární podání – do trojhlavého lýtkového svalu (Pellett a kol., 2019)

4.2 ELISA test

Jedná se o imunoanalytickou metodu založenou na vysoce specifické interakci antigenu diagnostikovaného patogenu a protilátky za vzniku imunokomplexu. Schéma reakce je znázorněno na Obrázku 6. Vytvořené množství imunokomplexu pak přímo úměrně koreluje s množstvím výchozí látky. Metody ELISA se rozdělují do dvou skupin dle typu uspořádání. Probíhá-li reakce antigenu s protilátkou a indikátorem v kapalném prostředí, hovoříme o tzv. homogenním uspořádání. Je-li však jedna z reagujících složek vázána na pevnou fázi, jedná se o heterogenní uspořádání testu. Dalším kritériem, podle kterého se tyto metody třídí, je skutečnost, zda reakce mezi Ab a Ag probíhá současně s indikátorem v jednom reakčním kroku (**kompetitivní uspořádání**) nebo ve více reakčních krocích (**nekompetitivní – sendvičové uspořádání**). Při detekci toxinů produkovaných bakterií *C. botulinum* je využíváno kompetitivního a sendvičového uspořádání ELISA testu (Lequin, 2005).



Obrázek 6: Schéma reakce protilátky s antigenem za vzniku imunokomplexu (Salazar a kol., 2017)

Protilátky používané při imunoanalytickém testu mohou být polyklonální nebo monoklonální. Monoklonální protilátky se na rozdíl od polyklonálních vyznačují homogenitou v parametrech specifity a afinity. Vhodným výběrem monoklonálních protilátek lze dosáhnout reakční rovnováhy ve velmi krátkém čase, řádově se jedná o minuty. Výroba polyklonálních protilátek pro tento test je ve srovnání s monoklonálními protilátkami levnější. V některých testech se polyklonální protilátky používají záměrně tak, aby byl zajištěn průkaz antigenu ve více strukturních izoformách. Doba ustavení rovnováhy v případě polyklonálních protilátek se pohybuje v rozmezí několika desítek minut (Scarlatos a kol., 2005).

Tento test je prováděn ve velmi malých objemech. K měření se využívají 96-jamkové mikrotitrační destičky, ve kterých probíhá celá reakce a na jejichž povrch snadno přilnou reagentie (Sharma a kol., 2005). V porovnání s předchozí metodou jde o metodu časově méně náročnou a poměrně levnou. Metody ELISA jsou široce používány pro detekci potravinářských patogenů, především jsou využívány v klinické praxi k diagnostice infekčních onemocnění člověka.

ELISA je pro průkaz BoNT rychlejší a levnější metodou oproti biologickému testu prováděného na myších, avšak nejedná se o test popisující toxickou schopnost BoNT. ELISA test rozpoznává pouze proteinová antigenní místa a obecně je poněkud méně citlivou metodou než biologický test prováděný na myších. ELISA se v současné době používá jako technika rychlého screeningu a výsledky se v některých případech ověřují MBA (Scarlatos a kol., 2005).

4.2.1 Princip sendvičové ELISA metody

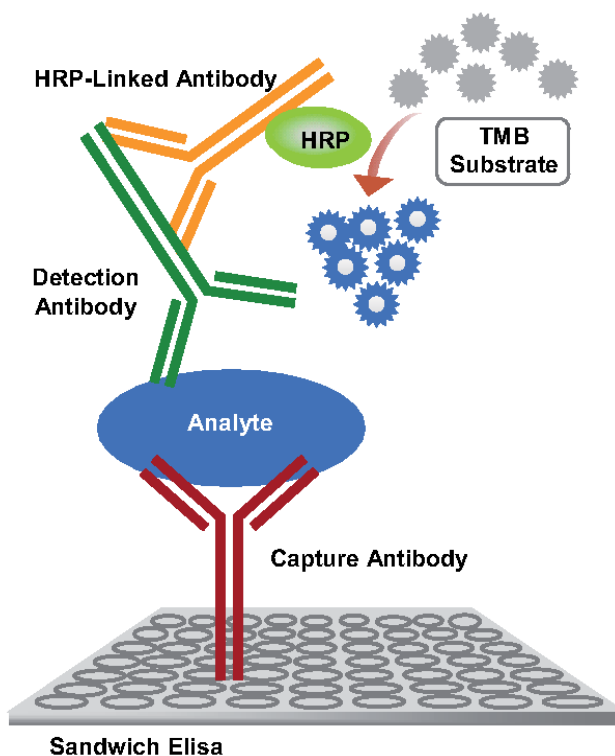
Sendvičová ELISA je nekompetitivní metoda a nejjednodušší komerčně dodávaná sestava testu. Metoda je založena na principu uchycení antigenu, kterým je v tomto případě BoNT, mezi dvě protilátky. Pro určení imunokomplexu po dosažení rovnovážného stavu slouží sekundární protilátka značená indikátorem (enzymem). Tato sekundární protilátka se specificky váže na imobilizovaný toxin a indikátor poté konvertuje chromogenní substrát (viz Obrázek 7) na barevný produkt (McCarthy, 2003). Vzniklý barevný produkt je pak spektrofotometricky kvantifikován (Grenda a kol., 2014).

Nejvhodnějšími enzymy, používanými při této metodě, jsou křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza, především díky jejich nízké molekulární hmotnosti. Tyto enzymy jsou na molekulu protilátky navázány kovalentně a v určitém množství. Po proběhnutí reakce značené protilátky s antigenem substrátu je substrát změněn v barevný produkt, a poté je jeho intenzita zbarvení změřena spektrofotometricky (Lequin, 2005).

K vyšetření je potřebná mikrotitrační destička se specifickými protilátkami namířenými proti toxinu, které jsou absorbované na dně jamek destičky. Do takto připravených jamek je přidán vzorek a celá destička se inkubuje při 37°C po dobu 30 minut. Neurotoxin obsažený ve vzorku se váže na předem absorbované záchytné protilátky. Následně se mikrotitrační destička 4× promyje promývacím roztokem. Promytím se odstraní nenavázané antigeny a přebytečné množství vzorku. Je-li antigen (BoNT) obsažený ve

vzorku, pak po jeho navázání na protilátku nelze promytím odstranit. Po promývacím kroku jsou do jamek přidány sekundární protilátky. Tyto protilátky mají na sobě navázaný enzym a díky své specifitě jsou schopny se navázat na antigen – BoNT. Touto vazbou vznikne tzv. „sendvič“. Po inkubaci následuje další krok promývání, který slouží k odstranění všech nenavázaných sekundárních protilátek. Přítomny zůstanou pouze protilátky, jež se navázaly na příslušný toxin. Aby bylo možné enzymatickou aktivitu odhalit, je po promytí přidán bezbarvý substrát, který je enzymem změněn na barevný produkt. Reakce je ukončena přidáním blokovacího činidla, kterým je kyselina sírová. Zbarvení poukazuje na pozitivní výsledek (Rivera a kol., 2006). Celá mikrotitrační destička je proměřena na spektrofotometru při definované vlnové délce a výsledek je porovnán se standardní kalibrační křivkou, z níž je vypočteno množství BoNT obsažené ve vzorku, které je přímo úměrné intenzitě vzniklého zbarvení. Společně se vzorky jsou do mikrotitrační destičky pipetovány i pozitivní a negativní kontroly pro ověření správnosti testu (Sharma a kol., 2006).

Celková doba testování se pohybuje v rozmezí 2–3 hodin. Tato forma ELISA testu je nejvíce využívána pro průkaz a kvantifikaci potravinářských patogenů (Rivera a kol., 2006). Dále bylo prokázáno, že sendvičová ELISA je 2–5× citlivější než všechny ostatní typy ELISA testu (McCarthy, 2003).

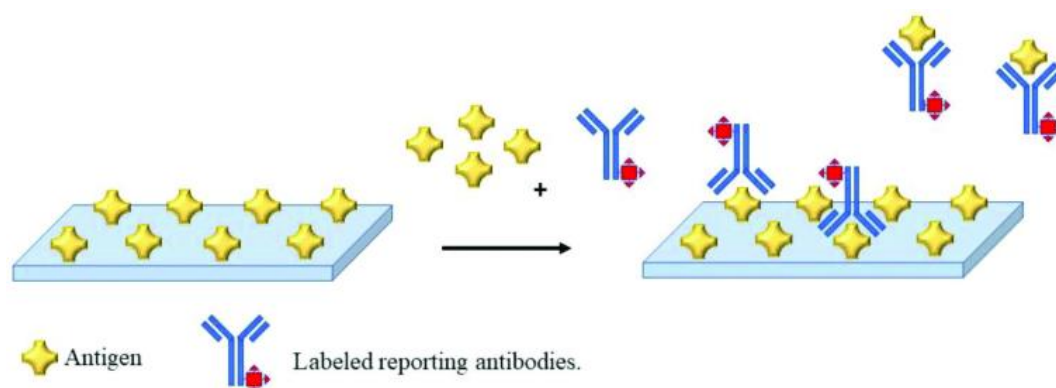


Obrázek 7: Schéma sendvičového uspořádání ELISA testu (Kappel a kol., 2017)

4.2.2 Princip kompetitivního ELISA testu

Kompetitivní uspořádání ELISA testu slouží k detekci menších molekul. V tomto případě ELISA testu jsou na dně jamek mikrotitrační destičky absorbovány antigeny. Po navázání antigenů je do jamek přidán vzorek společně se značenými protilátkami. Jsou-li ve vzorku přítomny cílové antigeny, tedy BoNT, nastává pak tzv. soutěžení o vazebná místa (McCarthy, 2003). Značené protilátky se přednostně vážou na toxin obsažený ve vzorku a menší část protilátek se může vázat i na antigeny uchycené na dně jamek (viz Obrázek 8). Čím větší je koncentrace toxinu ve vzorku, tím menší množství značených protilátek se bude vázat na antigeny uchycené v jamkách. Během promývacího kroku jsou vzniklé imunokomplexy cílového toxinu se značenou protilátkou z jamek odstraněny (Bursová a kol., 2014). Po promývacím kroku je do jamek přidán barevný substrát, který se účinkem enzymu mění v barevný produkt. V případě obsaženého toxinu ve vzorku byly značené protilátky z jamek vymyty, nedochází tedy k barevné změně přidaného substrátu. Pokud vzorek neobsahuje BoNT, navážou se značené protilátky na antigen absorbovaný na dně jamek destičky a barevný substrát je díky enzymu změněn (Rivera a kol., 2006).

Barevná reakce je tedy způsobena vzniklým imunokomplexem imobilizovaného antigenu na dně jamek s protilátkou. Tato skutečnost vypovídá o tom, že při pozitivním průkazu BoNT je výsledné zbarvení velmi slabé nebo zcela bezbarvé. Lze tedy říct, že kompetitivní uspořádání ELISA testu dává opačné výsledky než sendvič ELISA (McCarthy, 2003).



Obrázek 8: Schéma kompetitivního uspořádání ELISA testu (Reynoso a kol., 2019)

4.3 Elektrochemiluminiscenční imunotest (ECL)

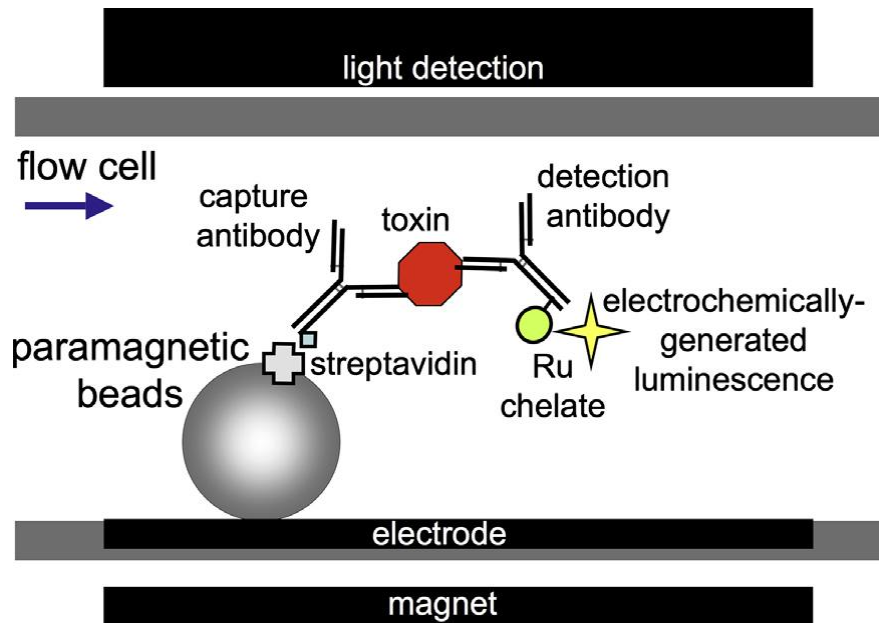
Elektrochemiluminiscenční imunotest spadá do skupiny imunoanalytických metod a je to technika podobná ELISA testu. Od předešlé metody se liší použitou protilátkou, která má na svém povrchu elektrochemiluminiscenční značku. Tato značka v přítomnosti elektrického potenciálu vyzařuje luminiscenční záření (Grenda a kol., 2014).

Metodika využívá anti-sérotypové protilátky značené ruthenium (II) tris-bipyridylovým komplexem, který slouží pro kvantifikaci vznikajícího imunokomplexu. Další využívané protilátky či antigeny mají na svém povrchu navázaný biotin. Protilátky značené rutheniem po přivedení do blízkosti elektrod vyzařují světlo. Další komponentou testu jsou paramagnetické mikročástice na povrchu potažené streptavidinem, které slouží jako pevný nosič k zachycení BoNT (Cheng a kol., 2013).

Paramagnetické mikročástice zajišťují uchycení imunokomplexu na povrch elektrody, jak si lze všimnout na Obrázku 9. Imunokomplex tvoří BoNT a chelátem ruthenia značená protilátka. Afinita komplexu biotin-avidin je extrémně vysoká, tudíž dochází k pevnému navázání imunokomplexu na mikročástice. Po proběhlé imunoanalytické reakci se z reakční směsi promytím odstraní nenavázané reagenty. Působením magnetu se mikročástice s navázaným imunokomplexem při promývání přidrží na stěně reakční nádoby (Ju a kol., 2017). Po vložení elektrického napětí na platinovou elektrodu (oxidace na anodě) dochází v průtokové měřicí cele k elektrochemiluminiscenci. Elektrochemiluminiscence vzniká po reakci imunokomplexu značeného chelátem ruthenia s trypropylaminem vázaným na povrchu elektrody. Vznikající luminofory produkují světlo a signál je zachycen pomocí analyzátoru BioReris M-Serie M1R (Guglielmo-Viret a kol., 2005).

Množství toxinu přítomného v potravinách a sérových matricích je stanoveno porovnáním s toxinovými standardy zahrnutými do stanovení v každé mikrotitrační destičce. Procentuální výtěžnost BoNT v potravních matricích je stanovena porovnáním neznámého signálu se standardem pufru pomocí softwarového programu MSD Discovery Workbench (Grate a kol., 2010).

Výhodou ECL je využití malého množství vzorku a jeho rychlá příprava. Velkou předností testu je jeho vysoká rychlost stanovení, která se pohybuje řádově v rozmezí několika minut. Použití ECL testu má však některá omezení. Tato omezení se týkají zkřížené reaktivity mezi jednotlivými sérotypy BoNT. Dalším omezením této metody je potřeba dražší testovací destičky a vybavení oproti ELISA testu (Grenda a kol., 2014).



Obrázek 9: Schéma elektrochemiluminiscenčního imunotestu (Grate a kol., 2010)

4.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Polymerázová řetězová reakce se řadí mezi molekulárně biologické metody, které byly vyvinuty na základě sekvenčně specifických hybridizačních sond. Vývoj molekulárně biologických metod výrazně zlepšil přímou detekci bakterie *Clostridium botulinum* a umožňuje tak rozpoznání specifické cílové DNA sekvence popisující BoNT. Princip polymerázové řetězové reakce je založen na zmnožení specifických úseků DNA, typického pro BoNT do početných kopií, které pak lze vyhodnotit (Yoon a kol., 2005).

Kvantitativní PCR v reálném čase je technika založená na klasické PCR, ovšem s použitím fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence. Intenzita fluorescence je permanentně snímána a analyzována speciálním přístrojem, ve kterém zároveň probíhá PCR, tudíž amplikony nemusí být detekovány elektroforeticky, jak je tomu u klasické PCR metody (Ryazantsev a kol., 2016).

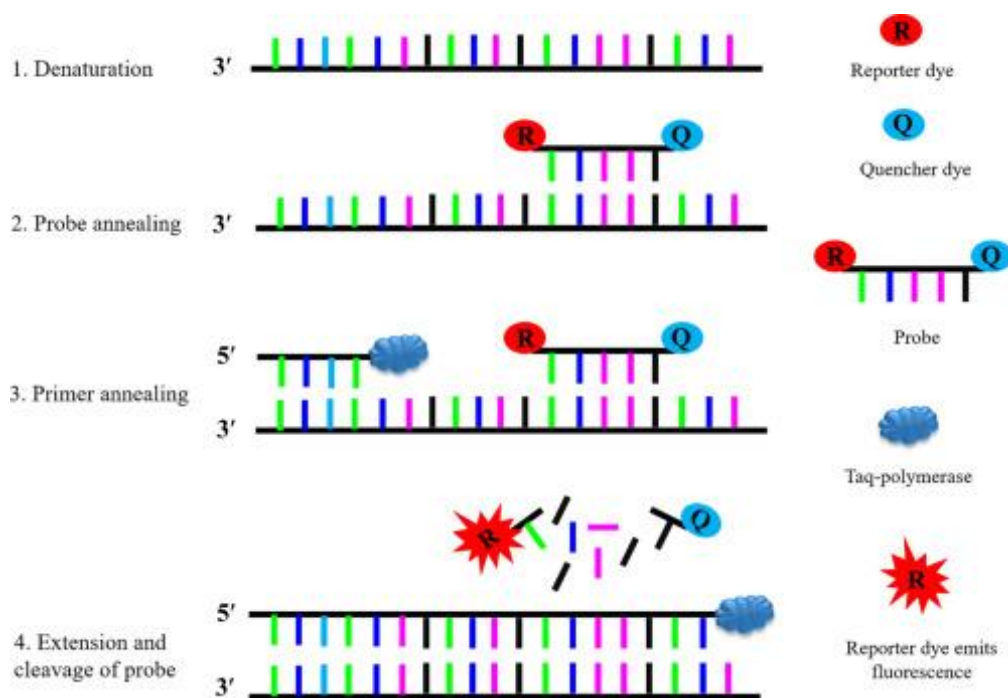
DNA sekvence popisující BoNT je izolována ze vzorku a po získání amplifikované DNA dochází ke stanovení. Stanovení probíhá po přidání DNA botulotoxinu do reakční směsi, která obsahuje fluorescenční substrát. Tento substrát se váže na přítomnou DNA, se kterou následně interaguje (viz Obrázek 10). Aktivita substrátu je detekována příslušným detektorem a odráží množství přítomné DNA botulotoxinu ve vzorku. Jednotlivé sérotypy lze odlišit použitím sedmi různých hybridizačních sond (Tao a kol., 2020).

Kvantitativní PCR se obvykle provádí v 96-ti jamkových destičkách. Úroveň fluorescence je pak zaznamenávána v jednotlivých jamkách. Každý vzorek se analyzuje v dupletu (dvakrát). Správný průběh reakce se sleduje systémem kontrol. Ty napomáhají identifikovat kontaminaci PCR komponent nebo funkčnost měřicího zařízení (Grenda a kol., 2014).

Kvantitativní PCR je spolehlivý test, který nevyžaduje žádnou produkci neurotoxinu ve vzorku. Polymerázová řetězová reakce je stále více využívána pro mikrobiální detekci, jelikož poskytuje rychlou, specifickou a citlivou reakci (Tao a kol., 2020). Metoda PCR velmi zkrátila dobu analýzy, čímž umožnila včasné určení vhodných terapeutik pro infikované pacienty (Hill a kol., 2010). Tento vysoce výkonný test je prospěšný v potravinářském průmyslu, kde je použití velkého množství myší je nepraktické (Grenda a kol., 2014). Metody PCR však mají určitá omezení, například neschopnost rozlišovat mezi biologicky aktivními a neaktivními toxinovými geny. Toto omezení detekce toxinu představuje hlavní hrozbu pro člověka, protože pro člověka je nebezpečný toxin než jeho DNA (Tao a kol., 2020).

Využití PCR metody v klinické praxi

PCR metoda je v praxi využívána hlavně pro určení přesného sérotypu BoNT. V klinické praxi to probíhá následovným postupem. Vzorek pro stanovení výskytu toxinu či bakterie *C. botulinum* je nanesen na imunochromatografický proužek, který informuje o pozitivním výsledku. V případě pozitivního výsledku je vzorek pacienta zpracován pro PCR metodu a vyšetřen. Další využití má metoda při výskytu BoNT v potravinách či fekálních vzorcích. Fekálním vzorkem může být např. znečištěná voda. Znečištěná voda kontaminovaná klostridií se v předešlých letech objevila ve Finsku, kde se u ryb, především u okouníků, pomocí PCR metody prokázal BoNT typu E. Ve stejných letech byl zaznamenán výskyt bakterie ve finských konzervách jeleního masa (Lindström a kol., 2001).



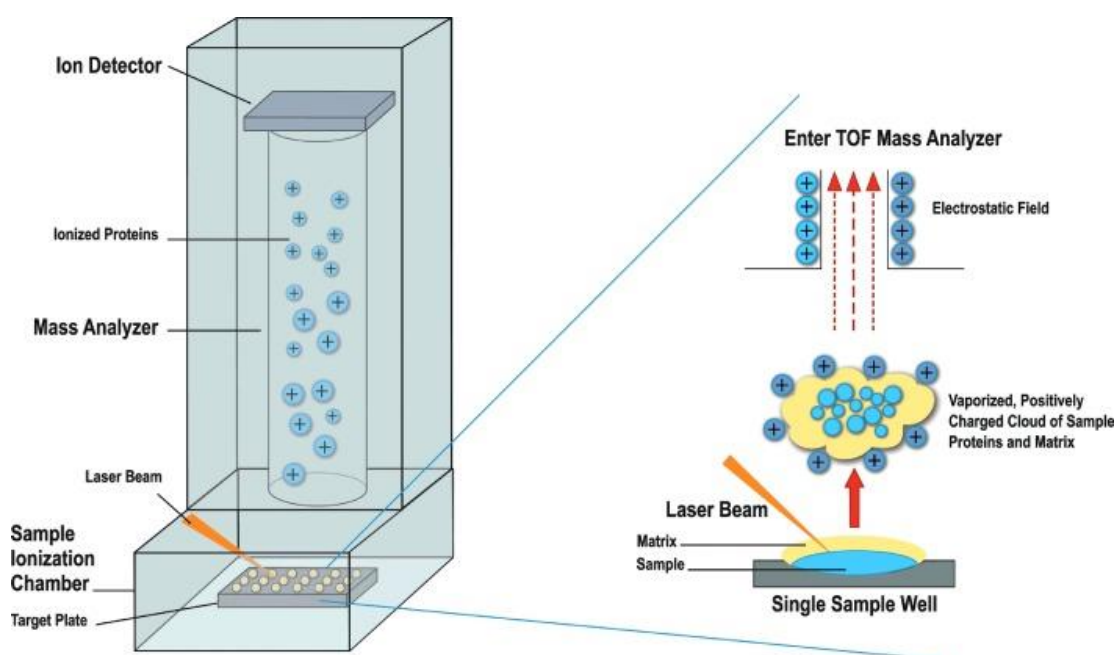
Obrázek 10: Schéma kvantitativní PCR (Roy a kol., 2019)

4.5 Hmotnostní spektrometrická analýza endopeptidázové *in vitro* aktivity botulotoxinu (Endopep-MS)

Endopep-MS je *in vitro* test spadající do skupiny instrumentálních metod a je vyvinut pro detekci a diferenciaci aktivních sérotypů BoNT, způsobujících alimentární botulismus (Pellet a kol., 2019). Metoda je založena na detekci specifické endopeptidázové aktivity L řetězce toxinu, která spočívá ve štěpení substrátů obsahujícího SNARE proteiny. Vhodnými vzorky pro detekci BoNT jsou sérum, stolice, potravin, mléko, atd. Z těchto typů vzorků je toxin extrahován s použitím sérotypově specifických protilátek. Poté je vzorek s botulotoxinem inkubován se selektivním peptidovým substrátem. Akumulace produktů štěpení účinkem BoNT se pak měří hmotnostní spektrometrií (Rosen a kol., 2017).

V metodě Endopep-MS se využívají substrátové peptidy, které jsou vyvinuty z nativních sekvencí SNARE proteinů tak, aby představovaly co nejdůvěryhodnější napodobeniny. Substrátové peptidy, které jsou specifické pro každý sérotyp, jsou inkubovány společně se vzorkem obsahujícím BoNT. Každý sérotyp BoNT štěpí jeden nebo více ze specifických SNARE proteinů a produkty štěpení peptidových substrátů jsou purifikovány

protilátkou afinitní povahy (Barr a kol., 2005). Jednotlivé nastříhané peptidy, specifické pro daný sérotyp BoNT, jsou následně detekovány pomocí hmotnostního spektrometru s laserovou desorpční ionizací (MALDI-TOF MS), jehož schéma je znázorněno na Obrázku 11. K uvolnění iontů ze vzorku jsou využity krátké pulzy laserového záření. Průletový analyzátor pak měří dobu letu částice plynné fáze z ionizačního zdroje k detektoru, která je charakteristická pro každý ion (Grenda a kol., 2014). Detektor je propojen s počítačem a pomocí softwaru jsou data zpracována. Vlastní identifikace pak spočívá v porovnání hmotnostního spektra izolátu se spektry referenčních kmenů v databázi MALDI Biotyper (Bursová a kol., 2014). Reakce se provádí při teplotě 37 °C po dobu 1–4 hodin. Vzorky jsou na destičku nanášeny v tzv. tripletech, poté je destička se vzorky vložena do přístroje MALDI-TOF MS. Do testu jsou zahrnuty i kontroly a standardy toxinů. U negativní kontroly nejsou detekovány žádné píky z důvodu deficitu toxinu (Scarlatos a kol., 2005).



Obrázek 11: Schéma MALDI-TOF MS (Caulfield a kol., 2016)

U kojenců je diagnostika velmi náročná, hlavně proto, že se očekává velmi nízká hladina BoNT a také z důvodu značně malého množství krve, které lze kojencům odebrat. Podezřelý vzorek séra musí být alikvotován pro každý jednotlivý test sérotypu BoNT. To snižuje objem vzorku, který je k dispozici pro každý test (Rosen a kol., 2017). Z důvodu

rozdílného působení jednotlivých typů BoNT na SNARE proteiny, nelze provádět test současně pro všechny sérotypy. Při stanovení více sérotypů najednou by totiž mohlo dojít k interferenci jednoho sérotypu s aktivitou druhého sérotypu (Wang a kol., 2017).

Metoda má řadu silných stránek, mezi které se řadí rychlost, citlivost a specifická testu. Tyto tři parametry velmi usnadňují diagnostiku botulotoxinu a následnou léčbu botulismu (Rosen a kol., 2017). Tato metoda nejen že detekuje přítomnost toxinu, ale také určuje, zda je toxin stále aktivní nebo ne. Největší předností této metody detekce je její citlivost. Ta je mnohdy vyšší než citlivost biologického testu prováděného na myších a přímo koreluje s množstvím BoNT. Selektivita Endopep-MS je dosažena ve dvou úrovních. Jako první úroveň selektivity je použití sérotypově specifických protilátek namířených proti BoNT. Druhou úrovní selektivity je použití specifického substrátu pro každý sérotyp (Björnstad a kol., 2014). Vzhledem ke své citlivosti a specifické je tato metoda implementována v několika národních a mezinárodních laboratořích veřejného zdraví (Wang a kol., 2019). Nevýhody Endopep-MS testu jsou vysoké pořizovací náklady a potřeba optimální úrovně technických znalostí pro provoz. Metoda musí být stále testována v široké škále klinických a potravinových vzorků (Grenda a kol., 2014).

Metoda Endopep-MS má mnoho dalších aplikací. Kromě použití metody Endopep-MS pro identifikaci sérotypu BoNT v klinickém, potravinovém nebo environmentálním vzorku může být možná standardizace BoNT ve vzorcích používaných pro klinické ošetření nebo výzkumné činnosti (Barr a kol., 2005).

Využití metody Endopep-MS v praxi

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF se v praxi nejvíce využívá pro taxonomické zařazení daných izolovaných kmenů. Dříve byla metoda Endopep-MS využívána pro detekci a diferenciaci BoNT v klinických vzorcích a kultivačních médiích. V dnešní době lze metodu použít i na identifikaci BoNT obsaženého v potravinách, a to z důvodu přesného určení sérotypu BoNT. Svou užitečností se Endopep-MS dále využívá hlavně při diagnostice kojeneckého botulismu, kvůli relevantně rychlému získání výsledku. Nejvíce je Endopep-MS test využíván ve Spojených státech, jelikož zde bylo v letech 1990-2000 nahlášeno 263 případů alimentárního botulismu (Kalb a kol., 2015).

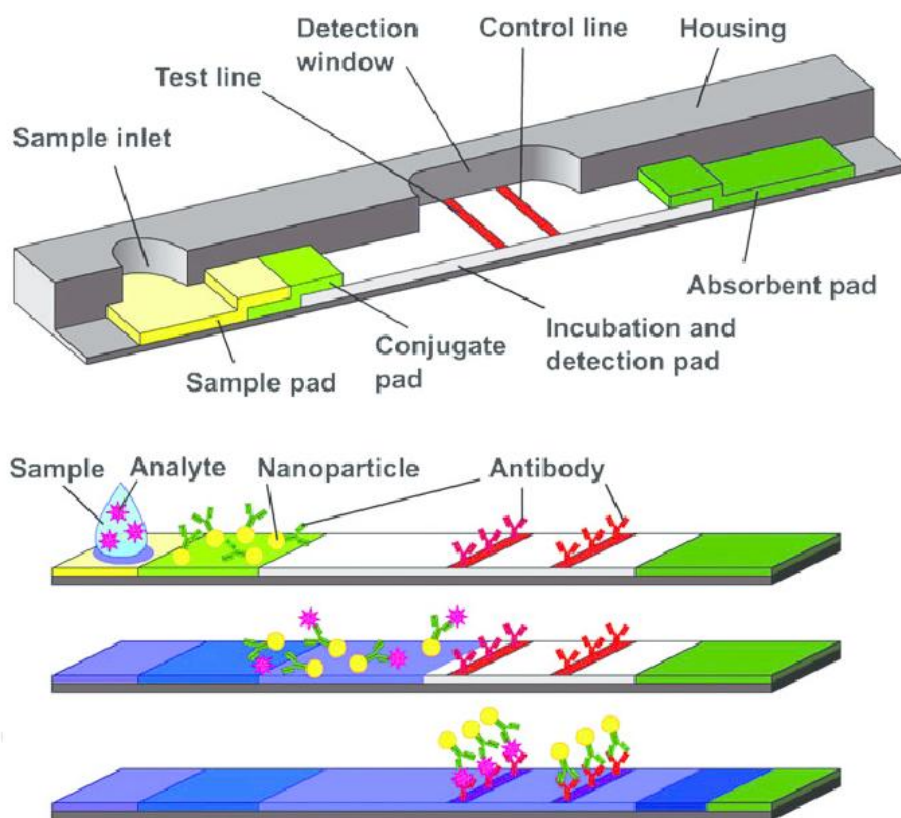
4.6 Imunochromatografické testy

4.6.1 Laterální průtokový imunochromatografický test – LFIA

Imunochromatografické testy jsou založeny na principu chromatografické separace látek probíhající na pevné fázi nasycené kapalinou. Jako pevná fáze se využívá proužek nitrocelulóзовé membrány. Proužek obsahuje anti-BoNT protilátky, které zřetelně detekují přítomnost BoNT ve vzorku. Jako kontrola testu slouží proužek značený anti-BoNT (Tripathi a kol., 2017).

Testovací proužek je obvykle složen ze čtyř zón. První zónou je startovací pole, kam je nanášen kapalný vzorek. Kapka vzorku obsahujícího toxin se nanese na reagenční podložku. V další zóně, konjugační vrstvě, dochází k hydrataci reagencií a umožnění vazby BoNT s detekční protilátkou. Tím se toxin naváže na detekční protilátku a postupným vsakováním migruje do testovací zóny, kde je imunokomplex BoNT-protilátka zachycen detekční protilátkou. Tento krok zachycení vede k zakoncentrování vázaného toxinu značeného druhou protilátkou a v důsledku toho se v testovací zóně objeví barevná čára. Detekční protilátka je obvykle značena štítky koloidního zlata nebo různě barvenými latexovými kuličkami, které jsou konjugované k detekční protilátce. Proužek vzniklý v testovací části má pak červené zabarvení (Tripathi a kol., 2017). Přebytek vzorku spolu se všemi nezachycenými částicemi putuje do čtvrté, absorpční zóny, kde je přebytek tekutiny absorbován (Liu a kol., 2014). Schéma testovacího proužku a jeho jednotlivých částí je znázorněno na Obrázku 12. Výsledek analýzy se odečítá řádově v minutách pouhým okem a udává kvalitativní informaci o přítomnosti nebo nepřítomnosti botulotoxinu ve vzorku. Pozitivní výsledek testu značí dva proužky. LFIA testy jsou validovány pro testování BoNT v široké škále potravinových matric s detekčním limitem v rozmezí 5–50 ng/ml (Singh a kol., 2012).

Imunochromatografické testy slouží jako screeningové a vyznačují se svým snadným provedením a nízkou cenou. Další výhodou imunochromatografického testu je jeho využití v terénu, jelikož poskytuje výsledek do několika minut (Grenda a kol., 2014). Mezi hlavní nevýhody patří jejich nízká citlivost a neschopnost rozlišovat jednotlivé sérotypy BoNT mezi sebou (Scarlatos a kol., 2005).



Obrázek 12: Schéma imunochromatografického testu (Mark a kol., 2010)

Využití imunochromatografického testu v praxi

Imunochromatografické testy mají větší využití v praxi a to z důvodu jejich rychlé analýzy. S těmito testy se lze setkat především v mikrobiologických laboratořích, kde se provádějí testy na přítomnost bakterie *Clostridium difficile* ve stolici kojenců. Stejným způsobem lze zjistit přítomnost *C. botulinum* ve stolici dospělého člověka nebo kojence, ale s tím rozdílem že jsou v testovacích proužcích obsaženy jiné protilátky než v testovacím proužku na průkaz *C. difficile*. Imunochromatografické testy jsou především nejvíce využívány při analýze potravin ve Spojených státech amerických, kde je častější výskyt intoxikace potravin botulotoxinem než v České republice. Po zhotovení extraktů z potravin, které jsou podezřelé na kontaminaci bakterií *C. botulinum*, je proveden tento test vypovídající o kontaminované či nekontaminované potravine. V případě pozitivního výsledku jsou dále provedeny testy určující specifitější výsledky o bakterii a jejím toxinu (Sharma a kol., 2005).

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo popsat metody detekce toxinu produkovaných bakterií *Clostridium botulinum*. Toxin produkovaný touto bakterií se nazývá botulotoxin a svým toxickým účinkem působí na nervosvalový přenos. Botulotoxin svým působením blokuje malé synaptické vezikuly, které jsou zodpovědné za uvolňování acetylcholinu potřebného při nervosvalovém přenosu. Botulotoxin se vyskytuje ve více sérotypech, které se od sebe liší svým neurotoxickým účinkem na SNARE proteiny. Pro člověka nejzávažnějším sérotypem jsou sérotypy A, B a E. Pro zvířata jsou pak toxické zejména sérotypy C a D. V důsledku tohoto neurotoxického působení způsobuje botulotoxin paralytické onemocnění zvané botulismus.

Detekce toxinů bakterie *Clostridium botulinum* spočívá jak v kvantitativní, tak v kvalitativní analýze. Jako zlatý standard pro detekci botulotoxinu je používán biologický test prováděný na myších. Tento test přímo poukazuje na biologickou aktivitu toxinu, přičemž lze sledovat jeho toxické působení. Jedinou nevýhodou tohoto testu je jeho časová náročnost. Další metodou detekce botulotoxinu, která je v klinické praxi velmi rozšířená, je ELISA test. ELISA test spadá do skupiny imunologických metod využívajících pro detekci specifické protilátky namířené proti botulotoxinu. Tento test má dva typy uspořádání, kdy se častěji používá uspořádání sendvičové. Při sendvičovém uspořádání je toxin uchycen mezi dvě protilátky a jeho koncentrace je měřena na spektrofotometru. Podobnou metodou je elektrochemiluminiscence. Tento imunotest využívá k reakci anti-sérotypové protilátky značené elektrochemiluminiscenční značkou. Vzniklá elektrochemiluminiscence se měří po vložení napětí na platinovou elektrodu. Celkové množství toxinu obsaženého ve vzorku je pak stanoveno pomocí analyzátoru. Největší předností tohoto testu je jeho krátká doba analýzy. Další metodou detekce botulotoxinu je qPCR. Jedná se o metodu spadající mezi molekulárně biologické metody. Kvantitativní PCR je založena na detekci genu charakteristického pro botulotoxin. Proces PCR využívá amplifikovaný úsek DNA botulotoxinu, jenž je přidán do reakční směsi, která obsahuje fluorescenční substrát. Tento fluorescenční substrát interaguje s dsDNA a intenzita fluorescenčního záření je měřena detektorem. Další a velmi specifickou metodou detekce botulotoxinu ve vzorku je Endopep-MS test. Tento test patří mezi instrumentální metody, ale je vyvinut přímo pro diferenciaci aktivních sérotypů botulotoxinu způsobujících alimentární botulismus. Princip tohoto testu spočívá v endopeptidázové aktivitě samotného toxinu a ve štěpení specifických SNARE proteinů. K detekci nastříhaných peptidů

slouží hmotnostní spektrometr s laserovou desorpční ionizací. Po získání hmotnostního spektra je spektrum porovnáno s databází spekter a je vyhodnoceno o jaký sérotyp botulotoxinu se jedná. Posledním testem využívaným k detekci botulotoxinu je imunochromatografický test. Imunochromatografický test slouží jako screeningový a udává nám pouze kvalitativní údaj o výskytu toxinu ve vzorku. Celý tento test funguje na principu chromatografické separace, kdy je unášen vzniklý imunokomplex testovacím proužkem, a při pozitivním nálezu vznikají dvě barevné linky v testovací části proužku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ADAMS M. R., MOOS M. O., MCCLURE P. J. [2016]. Food Microbiology (4th Edition). Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, ISBN 978-1-84973-960-3, s: 227-237.
- [2] AMBROŽOVÁ H. [2019]. Botulismus – vzácné, ale stále se vyskytující život ohrožující onemocnění. Klinika infekčních nemocí 2. LF UK a Nemocnice Na Bulovce, Praha. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, **68** (1), s: 33-38.
- [3] AOKI K. R. [2001]. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B and F in mice. *Toxicon*, **39** (12), s: 1815-1820.
- [4] ARNON S.S., SCHECHTER R., INGLESBY T. V. a kol. [2001]. Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management, *JAMA*, **285** (8), s: 1059-1068.
- [5] BARASH J. R., ARNON S. S. [2014]. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins, *Journal of Infectious Diseases*, **209** (2), s: 183-191.
- [6] BARR J. R., MOURA H., BOYER A. E, WOOLFITT A. R., KALB S. R., PAVLOPOULOS A., MCWILLIAMS L. G., SCHMIDT J. G., MARTINEZ R. A., ASHLEY D. L. [2005]. Botulinum Neurotoxin Detection and Differentiation by Mass Spectrometry. *Emerging Infectious Diseases*, **11** (10), s: 1578-1583.
- [7] BJÖRNSTAD K., TEVELL ÅBERG A., KALB S. R., WANG D., BARR J. R., BONDESSON U., HEDELAND M. [2014]. Validation of the Endopep-MS method for qualitative detection of active botulinum neurotoxins in human and chicken serum. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **406** (28), s: 7149-7161.
- [8] BRUL S., FRATAMICO P. M., MCMEEKIN T. A. [2011]. Tracing Pathogens in the Food Chain. Philadelphia: Woodhead Publishing, ISBN 978-1-84569-496-8, s: 439-441.
- [9] BURSOVÁ Š., DUŠKOVÁ M., NECIDOVÁ L., KARPÍŠKOVÁ R., MYŠKOVÁ P. [2014]. Mikrobiologické laboratorní metody, Brno, **84**, ISBN 978-80-7305-676-6.
- [10] CARTER A. T, PECK M. W. [2015]. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. *Research in Microbiology*, **166** (4), s: 303-317.

- [11] CAULFIELD A., WENGENACK N. [2016]. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, **4**.
- [12] CENCIARELLI O., RILEY P. W., BAKA A. [2019]. Biosecurity Threat Posed by Botulinum Toxin. *Toxins*, **11** (12).
- [13] DEMBEK Z. F., SMITH L. A., RUSNAK J. M. [2007]. Botulism: Cause, Effects, Diagnosis, Clinical and Laboratory Identification and Treatment Modalities. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, **1** (2), s: 122-134.
- [14] DIKEMAN M., DEVINE C. [2014]. Encyclopedia of Meat Sciences (2nd Edition) – Botulism. Elsevier, ISBN 978-0-12384-731-7, s: 330-334.
- [15] DUARTE-DAVIDSON R., GAULTON T., WYKE S., COLLINS S. [2019]. Chemical Health Threats: Assessing and Alerting. The Royal Society of Chemistry, ISBN 978-1-78262-368-7, s: 43- 45.
- [16] EHLER E. [2013]. Použití botulotoxinu v neurologii. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, **76** (1), s: 7-21.
- [17] ESPELUND M., KLAVENESS D. [2014]. Botulism outbreaks in natural Environments. *Frontiers in Microbiology*, **5** (287).
- [18] ERBGUTH F. J. [2004]. Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Movement Disorders*, **19**, s: 2-6.
- [19] FANG P. K., RAPHAEL B. H., MASLANKA S. E, CAI S., SINGH B. R. [2010]. Analysis of genomic differences among *Clostridium botulinum* type A1 strains, *BMC Genomics*, **11** (1), s: 725.
- [20] GOERING R. V., DOCKRELL H. M., ZUCKERMAN M. A., CHIODINI P. L., JULÁK J. [2016]. Mimosva lékařská mikrobiologie. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, **5**, ISBN 978-80-7387-928-0., s: 294.
- [21] GRATE J. W., OZANICH R. M., WARNER M. G., MARKS J. D., BRUCKNER-LEA C. J. [2010]. Advances in assay and analytical approaches for botulinum-toxin detection. *Trends in Analytical Chemistry*, **29** (10), s: 1137-1156.
- [22] GREINDA T., KUKIER E., KWIATEK K. [2014]. Methods and difficulties in detection of *Clostridium botulinum* and its toxins. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **17** (1), s: 195-205.
- [23] GUGLIELMO-VIRET V., ATTRÉE O., BLANCO-GROS V., THULLIER P. [2005]. Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of

- Clostridium botulinum* type B neurotoxin. *Journal of Immunological Methods*, **301** (1-2), s: 164 -172.
- [24] GUPTA R. C. [2015]. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (2nd Edition). Elsevier, ISBN 978-0-12-800159-2, s: 361-385.
- [25] HALPIN J. L., DYKES J. K., KATZ L., CENTURIONI D. A., PERRY M. J., EGAN CH. T., LÚQUEZ C. [2019]. Molecular Characterization of *Clostridium Botulinum* Harboring the bont/B7 Gene. *Foodborne Pathogens and Disease*, **16** (6), s: 428-433.
- [26] HATHEWAY C. L., BALOWS A., HAUSLER W. J., OHASHI M., TURANO A., LENNETE E. H. [1988]. Botulism. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. New York, NY: Springer New York, ISBN 978-1-4612-8393-5, s: 111-133.
- [27] HILL B. J., SKERRY J. C., SMITH T. J., ARNON S. S., DOUEK D. C. [2010]. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiology*, **10** (1), s: 267.
- [28] HILL K. K., SMITH T. J. [2013]. Genetic Diversity Within *Clostridium botulinum* Serotypes, Botulinum Neurotoxin Gene Clusters and Toxin Subtypes. Current Topics in Microbiology and Immunology, ISBN 978-3-642-33569-3, s: 1-20.
- [29] CHENG L. W., STANKER L. H. [2013]. Detection of botulinum neurotoxin serotypes A and B using a chemiluminescent versus electrochemiluminescent immunoassay in food and serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61** (3), s: 755-760.
- [30] JOHNSON A. L., MCADAMS-GALLLAGHER S. C., ACETO H. [2016]. Accuracy of a Mouse Bioassay for the Diagnosis of Botulism in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **30** (4), s: 1293-1299.
- [31] JOHNSON E. A. [2019]. *Clostridium botulinum*. Food Microbiology, Washington DC, USA: ASM Press, ISBN 978-1-68367-047-6 s: 487-512.
- [32] JU H., LAI G., YAN F. [2017]. Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers – Electrochemiluminescent immunosensing. Elsevier, ISBN 978-0-08101-999-3, s: 171-206.
- [33] KALB S. Z., KRILICH J. C., DYKES J. K., LÚQUEZ C., MASLANKA S. E., BARR J. R. [2015]. Detection of Botulinum Toxins A, B, E and F in Foods by Endopep-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63** (4), s: 1133-1141.
- [34] KAŇOVSKÝ P. [2001]. Botulotoxin a jeho role v léčbě neurologických onemocnění, Centrum pro abnormální pohyby a parkinsonismus, I. neurologická klinika LF MU, Brno, s: 42-46.

- [35] KAPPEL A., EHM M. [2017]. Immunoassays for diagnosis of coagulation disorders. *Hämostaseologie*, **30** (4), s: 194-201.
- [36] KIESSLING V., KREUTZBERGER A. J. B., LIANG B., NYENHUIS S. B., SEELHEIM P., CASTLE D. J., CAFISO D. S., TAMM L., K. [2018]. A molecular mechanism for calcium – mediated synaptotagmin – triggered exocytosis. *Nature Structural and Molecular Biology*, **25** (10), s: 911-917.
- [37] KRHUT J. [2006]. Botulotoxin – struktura, mechanismus účinku a klinické použití, Urologie pro praxi, FNŠP Ostrava – Poruba, **5**, s: 278-282.
- [38] LAWLEY R., CURTIS L., DAVIS J. [2012]. The Food Safety Hazard Guidebook (2nd Edition). Cambridge: Royal Society of Chemistry, ISBN 978-1-84973-381-6, s: 27-33.
- [39] LEQUIN R. M. [2005]. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, **51** (12), s: 2415-2418.
- [40] LINDSTRÖM M., KETO R., MARKKULA A., NEVAS M., HIELM S., KORKEALA H. [2001]. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E and F in Food and Fecal Material. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (12), s: 5694-5699.
- [41] LIU B., DU D., HUA X., YU X. Y., LIN Y. [2014]. Paper-Based Electrochemical Biosensors: From Test Strips to Paper-Based Microfluidics. *Electroanalysis*, **26** (6), s: 1214-1223.
- [42] MARK D., HAEBERLE S., ROTH G., STETTEN VON F., ZENGERLE R. [2010]. Microfluidic Lab-on-a-Chip Platforms: Requirements, Characteristics and Applications. *Chemical Society Reviews*, **39**, s: 1153-1182.
- [43] MATTHEWS K. R., KNIEL K. E., MONTVILLE T. J. [2017]. Food Microbiology – An Introduction (4th Edition). American Society for Microbiology, ISBN 978- 1-555-81938-5, s: 167-187.
- [44] MATTHEWS K. R., KNIEL K. E., MONTVILLE T. J. [2008]. Food Microbiology – An Introduction (2nd Edition). American Society for Microbiology, ISBN 978-1-55581-396-3.
- [45] MCCARTHY J. [2003]. Immunological technique: ELISA. *Detecting Pathogens in Food*, s: 241-258.
- [46] MOTARJEMI, MOY Y., TODD G., EWEN. [2014]. Encyclopedia of Food Safety. Elsevier, ISBN 978-0-12-378613-5, s: 223-224.

- [47] NIGAM P. K., NIGAM A. [2010]. Botulinum toxin. *Indian Journal of Dermatology*, **55**, s: 8-14.
- [48] PATOČKA J, ŠPLIŇO M, MĚRKA V. [2005]. Botulism and Bioterrorism: How Serious is This Problem? *Acta Medica (Hradec Králové, Czech Republic)*, **48** (1), s: 23-28.
- [49] PELLETT S., TEPP W. H., JOHNSON E. A. [2019]. Critical Analysis of Neuronal Cell and the Mouse Bioassay for Detection of Botulinum Neurotoxins. *Toxins*, **11** (12), s: 2-15.
- [50] PEUTHERER F. J., SLACK R. C. B., GREENWOOD D. [1999]. Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Praha: Grada, ISBN 80-7169-365-0, 1, s: 245 – 253.
- [51] PRAKASH N., SHARADA P., PRADEEP G. [2010]. Bioterrorism: Challenges and considerations. *Journal of Forensic Dental Sciences*, **2** (2), s: 59-62.
- [52] REYNOSO E., TORRES E., BETTAZZI F., PALCHETTI I. [2019]. Trends and Perspectives in Immunosensors for Determination of Currently-Used Pesticide: The Case of Glyphosate, Organophosphates, and Neonicotinoids. *Biosensors*, **9** (20), s: 2-12.
- [53] RICH M. M. [2006]. The control neuromuscular Transmission in health and disease. *The Neuroscientist*, **12** (2), s: 134-142.
- [54] RIVERA V., GAMEZ F. J., KEENER W. K., WHITE J. A., POLI M. [2006]. Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxins A, B, E and F in clinical samples, selected food matrices and buffer using paramagnetic bead-based electrochemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*, **353** (2), s: 248-256.
- [55] ROBINSON R. [1999]. Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier, ISBN 978-0-08052-259-0, s: 463-465.
- [56] ROSEN O., FELDBERG L., YAMIN T. S., DOR E., BARNEA A., WEISSBERG A., ZICHEL R. [2017]. Development of a multiplex Endopep-MS assay for simultaneous detection of botulinum toxins A, B and E. *Scientific Reports*, **7** (1).
- [57] ROSSETTO O., PIRAZZINI M., FABRIS F., MONTECUCCO C. [2020]. Botulinum Neurotoxins: Mechanism of Action. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, *Handbook of Experimental Pharmacology*, **1**, s: 1-13
- [58] ROY J., JAIN N., SINGH G., DAS B., MALLICK B. [2019]. Small RNA proteome as disease biomarker: An inkognito treasure of clinical utility. Elsevier, ISBN 978-0-12815-669-8 s: 101-136.

- [59] RYAZANTSEV D. Y., VORONINA D. V., ZAVRIEV S. K. [2016]. Immuno – PCR: achievements and perspectives. *Biochemistry*, **81** (13), s: 1754-1770.
- [60] SALAZAR A., VELÁZQUEZ-SOTO H., MARTÍNEZ-JIMÉNEZ M. C., BALBOA-AYALA J. [2017]. Allergen-Based Diagnostic: Novel and Old Methodologies with New Approaches, ISBN 978-953-51-3567-8.
- [61] SCARLATOS A., WELT B. A., COOPER B. Y., ARCHER D., DEMARSE T., CHAU K. V. [2005]. Methods for Detecting Botulinum Toxin with Applicability to Screening Foods Against Biological Terrorist Attacks. *Journal of Food Science*, **70** (8), s: 121-130.
- [62] SCHANTZ E. J., KAUTTER D. A. [1978]. Standardized Assay for *Clostridium botulinum* Toxins. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, **61** (1), s: 96-99.
- [63] SEBAIHIA M. a kol. [2007]. Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Research*, **17** (7), s: 1082-1092.
- [64] SHARMA S. K., EBLEN B. S., BULL R. L., BURR D. H., WHITING R. C. [2005]. Evaluation of Lateral-Flow *Clostridium botulinum* Neurotoxin Detection Kits for Food Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (7), s: 3935-3941.
- [65] SHARMA S. K., FERREIRA J. L., EBLEN B. S., WHITING R. C. [2006]. Detection of type A, B, E and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with Digoxigenin-labeled antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (2), s: 1231-1238.
- [66] SHARMA S. K., WHITING R. C. [2005]. Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods, **68**, s: 1256-1263.
- [67] SINGH A. K., STANKER L. H., SHARMA S. K. [2012]. Botulinum neurotoxin: Where are we with detection technologies?. *Critical Reviews in Microbiology*, **39** (1), s: 43-56.
- [68] TAO J., LIU W., DING W., HAN R., SHEN Q., XIA Y., ZHANG Y., SUN W. [2020]. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, **85** (3), s: 744-754.
- [69] TIWARI A., NAGALLI S. [2019]. *Clostridium botulinum*. StatPearls Publishing
- [70] TRIPATHI P., UPADHYAY N., NARA S. [2017]. Recent advancement in lateral flow immunoassays: A journey for toxin detection in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **58** (10), s: 1715-1734.

- [71] UNGAR D., HUGHSON F. M. [2003]. SNARE protein structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **19** (1), s: 493-517.
- [72] WANG D., BAUDYŠ J., HOYT K. M., BARR J. R., KALB S. R.. [2017]. Further optimization of peptide substrate enhanced assay performance for BoNT/A detection by MALDI – TOF mass spektrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409** (20), s: 4779-4786.
- [73] WANG D., BAUDYŠ J., HOYT K., BARR J. R., KALB S. R. [2019]. Sensitive detection of type G botulinum neurotoxin through Endopep – MS peptide substrate optimization. *Springer link*, **411** (21), s: 5489-5497.
- [74] WANG T., LI L., HONG W. [2017]. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic*, **18** (12), s: 767-775.
- [75] WAREING P., STUART F., FERNANDES R. [2010]. Micro – Facts – The Working Companion for Food Microbiologists (7th Edition). Cambridge:Royal Society of Chemistry, ISBN 978-1-905224-84-5, s: 52-63.
- [76] WILDER-KOFIE T. D., LÚQUEZ C., ALDER M., DYKES J. K., COLEMAN J. D., MASLANKA S. E. [2011]. An alternative in vivo method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection. *Comparative medicine*, **61** (3), s: 235-242.
- [77] YOON S. Y., CHUNG G. T. KANG D. H., RYU CH., YOO C. K., SEONG W. K. [2005]. Application of Real-Time PCR Quantitative Detection of *Clostridium botulinum* Type A Toxin Gene in Food. *Microbiology and Immunology*, **49** (6), s: 505-511.
- [78] www.microbe-canvas.com
Microbe Canvas | Medische Microbiologie ErasmusMC | [online]. Copyright ©
[cit. 27. 6. 2020]
Dostupné z: <http://microbe-canvas.com/diseases.php?p=2332>