

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kateřina Šestáková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko – technologická

*Clostridium botulinum*

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Šestáková**  
Osobní číslo: **C20266**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: ***Clostridium botulinum***  
Téma práce anglicky: ***Clostridium botulinum***  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracovat rešerši zaměřenou na mikroorganismy rodu *Clostridium*.
2. Zaměřit se především na charakteristiku druhu *Clostridium botulinum*.
3. Popsat onemocnění způsobená *Clostridium botulinum*.
4. Shrnout laboratorní průkaz *Clostridium botulinum*, citlivost na antibakteriální léčiva a možnosti průkazu toxinu.
5. Vyhodnotit možnosti prevence, léčby a využití toxinu v medicíně a kosmetickém průmyslu.
6. Bakalářskou práci zpracovat v souladu se směrnicí č. 7/2019 univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

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: **RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem *Clostridium botulinum* 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21.6.2023

Kateřina Šestáková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, za její vstřícnost, ochotu a kritiku při vypracování. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině a blízkým za podporu a trpělivost při psaní této práce.

## **ANOTACE**

Tato práce se věnuje charakteristice bakterie *Clostridium botulinum*. Zaměřuje se na využití botulotoxinu v medicínské oblasti i kosmetickém průmyslu. Popisuje případy pacientů s botulismem a představuje diagnostické metody detekce *Clostridium botulinum* nebo botulotoxinu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

mikroorganismy, bakterie, *Clostridium botulinum*, *C. botulinum*, botulotoxin, botulismus

## **TITLE**

*Clostridium botulinum*

## **ANNOTATION**

This work is devoted to the characteristic of the bacterium *Clostridium botulinum*. It focuses on the use of its product botulinum toxin in the medical field as well as the beauty industry. It describes cases of patients with botulism and presents diagnostic methods for detection *Clostridium botulinum* or botulinum toxin.

## **KEYWORDS**

microorganisms, bacteria, *Clostridium botulinum*, *C. botulinum*, botulinum toxin, botulism

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	11
TERMINOLOGIE .....	13
ÚVOD.....	14
1 Rod <i>Clostridium</i> .....	15
1.1 Sporulace.....	15
2 <i>Clostridium botulinum</i> .....	18
2.1 Výskyt <i>Clostridium botulinum</i> .....	19
3 Botulotoxin .....	20
3.1 Sérotypy botulotoxinu.....	20
3.2 Mechanismus účinku.....	21
3.3 Využití botulotoxinu .....	23
3.3.1 Botulotoxinové přípravky .....	23
3.3.2 Estetická medicína .....	26
3.3.3 Léčba chronických stavů .....	27
3.4 Důsledky aplikace toxinu .....	29
3.5 Biologická zbraň .....	30
4 Botulismus .....	32
4.1 Formy botulismu .....	32
4.2 Prevence botulismu .....	33
4.3 Symptomy a průběh onemocnění.....	34
4.4 Léčba botulismu .....	35
4.5 Výskyt botulismu v České republice a ve světě.....	36
4.6 Kazuistiky botulismu .....	37
4.6.1 Alimentární botulismus.....	37



4.6.2	Botulismus rány u drogově závislého muže .....	38
4.6.3	Případ kojeneckého botulismu v Koreji.....	38
4.6.4	Iatrogenní botulismus v Evropě.....	39
5	Laboratorní diagnostika .....	41
	ZÁVĚR .....	45
6	POUŽITÁ LITERATURA .....	46

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Morfologie purifikovaných spor <i>Clostridium botulinum</i> .....	17
Obrázek 2 Mechanismus účinku botulotoxinu .....	22
Tabulka 1 Rozdělení <i>Clostridium botulinum</i> do skupin.....	18
Tabulka 2 Přehled konvenčních botulotoxinových přípravků a jejich schválená indikace .....	24
Tabulka 3 Botulotoxinové přípravky a jejich imunogenicita .....	30
Tabulka 4 Laboratorní metody a jejich citlivost .....	44

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

App – Další různé fragmenty spory

BoNT – Botulotoxin

CDC – Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention)

Co – Vnější proteinové vrstvy spory

Cr – Dehydratované jádro spory

CsxA – Proteiny bohaté na cystein

Cx – Kortex spory

ECDC – Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (European Centre for Disease Prevention and Control)

ELISA – Imunoenzymatická metoda (Enzyme – linked immuno sorbent assay)

Ex – Exosporangium

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA (Food and Drug Administration)

FRET – Försterový rezonanční přenos energie

HA – Hemaglutinin 33

MPA – Biologický test na myších

MS – Hmotnostní spektrometrie

NAbs – Neutralizační protilátky

NBP – Nehemaglutininový protein,

PCR – Polymerázová řetězová reakce

SNAP 25 – Synaptosomálně asociovaný protein

SNARE proteiny – Rozpustný receptor pro připojení faktoru citlivého na N-ethylmaleimid

SUKL – Státní zdravotní ústav pro kontrolu léčiv

SÚZ – Státní zdravotní ústav

VAMP – Protein spojený s vezikulami

WBA – Western Blot Assay

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

## TERMINOLOGIE

*Grampozitivní bakterie:* má buněčnou stěnu, která se skládá ze silné vrstvy peptidoglikanů a polysacharidů přes kterou prochází řetězce kyseliny lipoteichoové. Při barvení dle Grama se barviva dostávají do buněk a alkohol je kvůli silné vrstvě peptidoglikanů nemůže vyvézt a odmýt. Proto mají tyto bakterie po obarvení v mikroskopu sytě fialovou barvu.

*Obligátně anaerobní mikroorganismus:* je schopen žít a rozmnožovat se bez přístupu kyslíku. V prostředí s kyslíkem rychle umírá.

## ÚVOD

Bakalářská práce na téma *Clostridium botulinum* se zabývá charakteristikou této bakterie. Věnuje se také terapeutickému využití botulotoxinu u různých chorobných stavů. Ukazuje kazuistiky pacientů s botulismem, jejich léčbu a laboratorní průkaz bakterie ve vzorcích odebraných od pacientů.

*Clostridium botulinum* je anaerobní bakterie, která je všudypřítomná. Může se vyskytovat například ve vodě, masu a zelenině. Pokud je voda nezávadná a maso nebo zelenina dostatečně tepelně opracované u zdravých lidí nezpůsobí žádné problémy. Pokud však není splněna tepelná úprava, a navíc v organismu vzniknou vhodné podmínky k množení této bakterie, začne růst a produkovat botulotoxin. Botulotoxin vyvolá u postiženého onemocnění známé jako botulismus.

Botulismus je dnes již velmi ojedinělé neuromuskulární onemocnění, které způsobí dočasné ochrnutí svalů. Mezi hlavní příznaky otravy botulotoxinem a rozvinutí botulismu patří poklesnutí očních víček, sucho v ústech a krku, špatné vyslovování, problémy s polykáním. U závažnějších případů hrozí riziko selhání respiračních svalů.

Botulotoxin je pozoruhodná přírodní látka. Přesto, že se jedná o velmi silný toxin ve velmi nízkých koncentracích ho lze použít k léčbě a zlepšení různých chronických chorobných stavů. Zároveň existují obavy ze zneužití botulotoxinu při bioteroristických útocích.

# 1 Rod *Clostridium*

Do rodu *Clostridium* patří grampozitivní bakterie tyčinkovitého tvaru. Bakterie tohoto rodu jsou schopny vytvářet endospory, které vznikají uvnitř vlastní buňky a pomocí kterých přežijí i za nepříznivých podmínek např. v případě nedostatku živin. Většina druhů tohoto rodu se dokáže pohybovat [1].

Fylogenetické analýzy sekvenování 16S rRNA složky řadí mezi tento rod zhruba 180 druhů bakterií. Komplexní taxonomická a evoluční analýza pomocí klasifikačního sekvenování prokázala, že rod není monofylogenetický. Podle současné klasifikace je tedy tvořen větším počtem druhů, které nemají společný základ [1].

Tento rod zahrnuje klinicky významné lidské či zvířecí patogeny, které mohou způsobit vážná až smrtelná onemocnění. Jejich nebezpečnost tkví v produkci silných exotoxinů, které dokáží poškodit hostitele a vyvolat závažná onemocnění. Díky velké metabolické různorodosti se klostridia využívají v biotechnologických programech například při výrobě biopaliv, enzymů, léčbě různých onemocnění či výzkumu léčby rakoviny [22].

*Clostridium botulinum* je jeden z významných zástupců tohoto rodu. Jedná se o grampozitivní bakterii s anaerobním metabolismem, která má pleomorfní, větvenovitý tvar tyčinek. Tato bakterie se dokáže pohybovat a za určitých specifických podmínek je schopna tvořit termorezistentní endospory [3].

## 1.1 Sporulace

Spora je klidové stádium buňky, ve kterém neprobíhá žádný metabolismus. Sporulace je ochranná reakce bakterie na stres způsobený nepříznivými podmínkami, například pokud je buňka vystavena kyslíku nebo nemá dostatek živin k dalšímu růstu a dělení [4].

Spora *Clostridium botulinum* je oválného tvaru subterminálně uložená, ležící vedle středu a je vypouklá ven z tyčinky [4].

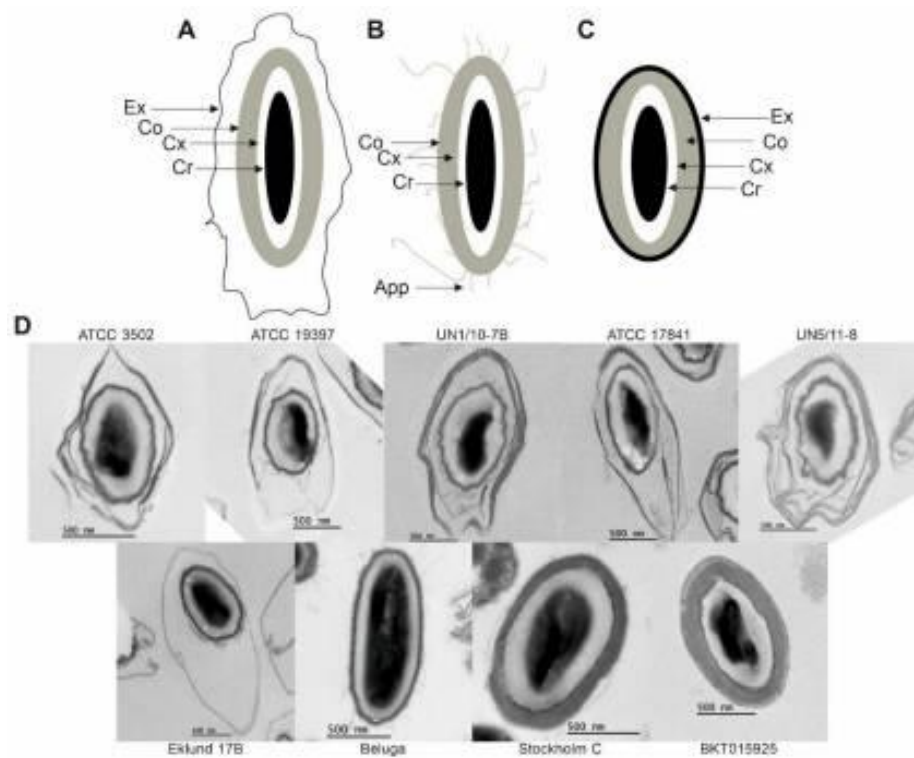
Stavba endospory je odlišná od normální buňky. Je tvořena několika vrstevnatým obalem, který obklopuje cytoplazmu s genomem a organelami tzv. dehydratované jádro (Cr). Vrstva peptidoglikanů, velké množství vápníku a kyseliny dipikolinové v kortexu (Cx) zaručují spoře odolnost vůči teplu a chemikáliím. Vnější proteinové vrstvy (Co) zvyšují odolnost k enzymatickému poškození. Na povrchu vnější vrstvy se nachází exosporium (Ex), které vytváří rozhraní mezi sporou a hostitelským prostředím [4;5].

Podle první trojrozměrné molekulární rekonstrukce povrchu spor klostridií, kde se podrobně zkoumal druh *Clostridium sporogenes*, který je velmi podobný druhu *Clostridium botulinum* skupiny I. si lze exosporium představit jako hexagonální symetrickou dvojrozměrnou mřížku s póry, která obklopuje sporu. Vnější povrch samotného exosporia připomíná srst a další různé fragmenty (App). V bazální krystalické vrstvě se nacházejí proteiny bohaté na cystein CsxA. Tento protein je zodpovědný za samosestavení této vrstvy. Předpokládá se, že proteiny bohaté na cystein zvyšují odolnost spory vůči tlaku. Obrázek 1 ukazuje morfologii spor [4;5].

Kmeny *Clostridium botulinum* skupiny I – III mají podle nových zjištění dvě odlišné strategie tvorby spor, které pravděpodobně souvisí s metabolismem. U proteolytických kmenů skupiny I dochází k tvorbě a uvolňování spor pomaleji, protože nejprve probíhá jejich akumulace a až poté uvolňování do prostředí. U neproteolytických kmenů skupiny II a III se uvolňují zralé spory už po 48 hodinách [4].

Tepelná rezistence spor se u jednotlivých kmenů *Clostridium botulinum* liší. Spory skupiny I mají vysokou tepelnou odolnost při 98 °C v rozmezí od 1 do 24 minut. Spory kmenu skupiny II vykazovaly střední tepelnou odolnost při 90 °C v rozmezí 11,5 – 12 minut. U kmenu skupiny III se projevila relativně nízká tepelná odolnost při 75 °C v rozmezí 6–23 minut [4].





**Obrázek 1** Morfologie purifikovaných spor *Clostridium botulinum*

Morfologie spor skupiny I a II Eklund B17 (A), skupiny II kmenu Beluga (B) a skupiny III. (C), Elektronová mikrofotografie tenkých řezů purifikovaných spor z ATCC 3502; ATCC19397; UN1/10–7 B; ATCC 17841, UN5/11–8; Eklund 17 B Beluga, Stockholm C a BKT015925 (D)

## 2 *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* je jeden z nejvýznamnějších druhů patřící do rodu *Clostridium*. Produkuje toxin tzv. botulotoxin, který způsobuje onemocnění botulismus, závažné neuroparalytické onemocnění lidí i zvířat. Je to grampozitivní tyčinka, která má obligátně anaerobní růst. Velikost této bakterie je zhruba 5 µm × 1 µm. Pro pohyb využívá *C. botulinum* bičíky, které má na celém svém povrchu [6].

Na základě fylogenetické analýzy sekvenování složky 16S RNA jsou v současnosti známy čtyři skupiny *Clostridium botulinum* značeny I - IV. Každá skupina produkuje jiný typ botulotoxinu. Převážná většina kmenů *Clostridium botulinum* produkuje jeden typ toxinu, nicméně existují kmeny, které produkují dva nebo dokonce tři typy toxinů. Dále dle toho, co klostridia při metabolismu štěpí, lze rozlišovat kmeny proteolytické, štěpící proteiny či sacharolytické, štěpící cukry [6;7;8].

**Tabulka 1** Rozdělení *Clostridium botulinum* do skupin Čerpáno z [9;10]

<i>C. botulinum</i>	Název skupiny	Metabolismus	Teplota růstu	Produkující toxin	Botulismus
Skupina I [9]	<i>Clostridium parabotulinum</i>	Proteolytický	Minimum 12 °C Optimum 35–37 °C	A, B, F	Lidský
Skupina II [69]	<i>Clostridium botulinum</i>	Sacharolytický	Minimum 3 °C Optimum 30 °C	B4, E, F	Alimentární u lidí
Skupina III [10]	<i>Clostridium noviy sensu lato</i>	Sacharolytický	Optimum 30 °C	C, D, C/D, D/C	U zvířat a ptáků
Skupina IV [10]	<i>Clostridium argentinense</i>	-	Optimum 37 °C	G	Nebyl prokázán

*Clostridium botulinum* a další klostridia produkují botulotoxin, pokud jsou v anaerobním prostředí, při pH vyšším než 4,5, při nízkém obsahu soli a cukru a při teplotě 4–45 °C [11].

Pro klostridia je typický jejich anaerobní metabolismus. Při takovém metabolismu se produkuje méně energie, pouze 2 molekuly ATP. Tento metabolismus plně využívají klostridiové bakterie v prostředí bez kyslíku s velkým množstvím organických látek. Ideálním prostředím je lidský organismus. Proces, při kterém se přemění organické sloučeniny na jiné metabolity za pomoci enzymů se nazývá fermentace. Prostřednictvím fermentace rozloží tyto mikroby cukry, alkoholy, aminokyseliny, puriny a pirimidiny [2].

## **2.1 Výskyt *Clostridium botulinum***

*Clostridium botulinum* se přirozeně vyskytuje v půdě, vzduchu, ve vodě, která neprošla úpravou čištěním a pobřežních sedimentech. Osídluje také střevní trakt zvířat. Je to takzvaný saprofyt, který využívá ke svému přežití jiný organismus nebo jeho sekret či odpadní látky, aniž by ho poškozoval [12].

Jeho spory, všudypřítomné v životním prostředí, dokáží neomezeně přežít i pro člověka tak běžnou a pro mikroorganismy většinou smrtelnou činností jakou je vaření. Lidé běžně přijímají v potravě obsažené spory, které za fyziologických podmínek v organismu neklíčí. Pokud se ale změní okolnosti a v organismu či střevě vznikne anaerobní prostředí, zvýší se pH, sníží se obsah cukru, soli a také teplota, mohou přítomné spory začít klíčit, produkovat botulotoxin a způsobit onemocnění zvané botulismus [13].

Tato bakterie a její spory se mohou dostat při zpracování zvířecího masa do výrobků jako jsou uzeniny, masové konzervy či vakuově balené a chlazené potraviny. Dále se mohou vyskytovat v medu [3;12].

### 3 Botulotoxin

Druh *Clostridium botulinum* produkuje toxin zvaný botulotoxin, který je hlavním faktorem virulence této bakterie. Botulotoxin je klasifikován jako exotoxin proteinové povahy, který se syntetizuje uvnitř mikrobiální buňky a poté je vyloučen do organismu hostitele, kde působí na nervový systém. Jedná se o tak zvaný neurotoxin, jenž se řadí mezi nejúčinnější bakteriální toxiny A–B typu. Takovéto toxiny účinkují ve tkáních vzdálených od místa invaze a růstu mikroba [8;14].

#### 3.1 Sérotypy botulotoxinu

Botulotoxiny lze rozdělit na základě serologické identifikace specifickými antiséry, na sedm sérotypů A–G [7;8].

Dále lze, prostřednictvím variací aminokyselinové sekvence klasifikovat jednotlivé typy botulotoxinů do podtypů, které jsou značeny čísly za sérotypem. V současnosti je známo osm podtypů botulotoxinu A (A1 – A8), osm podtypů botulotoxinu B (B1 – B8), Dva podtypy botulotoxinu C (C1 – C2) a botulotoxinu D (D1 – D2). Dvanáct podtypů botulotoxinu E (E1 – E12) a osm podtypů botulotoxinu F (F1 – F8). Jednotlivé variace aminokyselinové sekvence mohou mít vliv na biologickou aktivitu toxinů a dále pak i na rozpoznání monoklonálními protilátkami, které působí pouze na určité podtypy. Oproti tomu polyklonální protilátky neutralizují všechny botulotoxiny stejného sérotypu [7;8].

Byly nalezeny další nové sérotypy. První je typ H, který je identifikován jako hybrid sérotypu A a sérotypu F. Značený buď jako botulotoxin FA nebo botulotoxin HA. Je neutralizován vyššími dávkami antiséra botulotoxinu A. Druhým novým sérotypem je typ X, který má nízkou sekvenční identitu v porovnání s ostatními botulotoxiny a není neutralizován žádným antisérem používaným u botulotoxinu A–G [7;8].

Kmeny *C. botulinum* skupiny I produkují jeden nebo více typů jako sérotyp botulotoxinu A, sérotyp botulotoxinu B nebo F. Skupina II *C. botulinum* tvoří jeden sérotyp botulotoxinu buď typu B či typu E nebo F. *Clostridium botulinum* skupiny III syntetizují pouze jeden neurotoxin typu C nebo D, častěji pak hybrid v kombinaci těchto typů C/D či D/C. V neposlední řadě kmeny *C. botulinum* skupiny IV produkují botulotoxin typu G [7;8].

## 3.2 Mechanismus účinku

Klostridiové neurotoxiny jsou charakteristickými zástupci toxinů A–B typu. To znamená, že se toxin skládá ze dvou složek. Složka B slouží k navázání toxinu na receptor hostitelské buňky, nacházející se na jejím povrchu. Složka A, prostřednictvím enzymatické aktivity, poškodí buňku [8].

Na počátku celého působení je syntetizován jednořetězcový protein, jenž je neaktivní a nemá signální peptid. Tento protein je uvolněn z bakterie exfoliací buněčné stěny. Následně je aktivován proteázami na dvouřetězcovou formu proteinu, kde spojení řetězců zajišťuje disulfidická vazba. Aktivní protein se skládá ze dvou domén těžkého řetězce a jedné domény lehkého řetězce. Doména C, koncové části těžkého řetězce je zodpovědná za vazbu toxinu na receptor buňky. N koncová doména těžkého řetězce plní translokační funkci. Jediná doména lehkého řetězce je důležitá svou katalytickou aktivitou [8;15;16].

Součástí botulotoxinů jsou vedlejší proteiny vázané na toxin. Ve všech sedmi sérotypech botulotoxinu se nachází velký netoxický nehemaglutininový protein (NBP), známý jako protein vázající neurotoxin. Tyto netoxické proteiny, konkrétně proteiny hemaglutininu 33 (HA 33) a protein vázající neurotoxin se díky stabilní struktuře a vysoké rezistenci vůči proteázám ukázaly jako účinné ochranné faktory botulotoxinu před působením proteáz v gastrointestinálním traktu po jeho pozření [8].

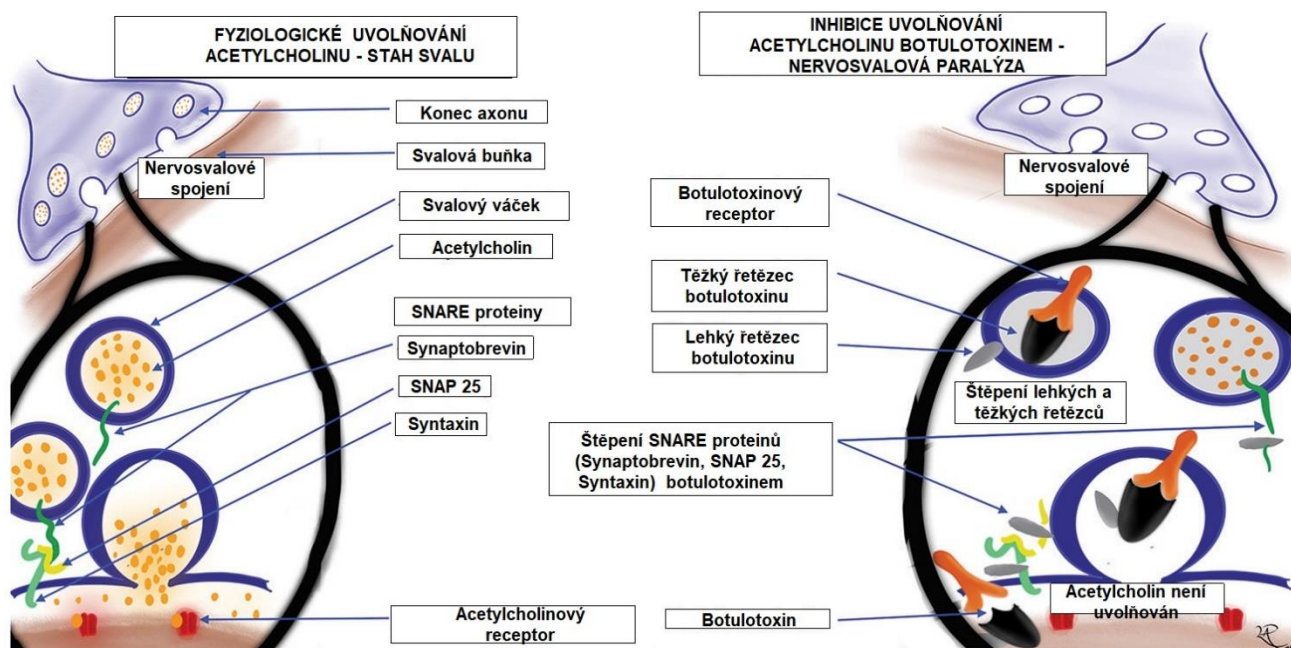
Obecně lze říct, že botulotoxin inhibuje uvolnění acetylcholinu z vezikul do synaptické štěrbin. Nedochozí k přenosu kontrakce na nervosvalovou ploténku. Následkem toho se rozvine reverzibilní neuroparalýza. Podrobně se dá mechanismus účinku popsat ve třech fázích [8;15].

V první fázi se neurotoxin naváže na nervovou buňku. Tuto vazbu zprostředkovává C koncová část těžkého řetězce, která se naváže na gangliosidy lokalizované na povrchu buňky. Tento spoj je slabý, proto se botulotoxin váže silně na proteinový receptor synaptotagmin nebo protein synaptického vezikula 2. Na proteinový receptor synaptotagmin se specificky vážou sérotypy botulotoxinu B, DC a G. Zatímco botulotoxin typu A, D, E, F, H se specificky váží na protein synaptického vezikula 2. Neurotoxiny se prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy přesouvají do synaptických vezikul [8;15].

Ve druhé fázi se vnitřek váček okyselí pomocí  $H^+$  iontů. Kyselé prostředí spustí konformační změny, které mají za následek to, že translokační doména na N části těžkého řetězce vytvoří

transmembránový kanál, kterým projde lehký řetězec botulotoxinu do nitra buňky. Lehký řetězec se musí před samotnou translokací do cytoplazmy částečně rozvinout, aby prošel kanálem [8;15;17].

Třetí fáze je zahájena aktivací lehkého řetězce. Působením štěpících enzymů, to jest protein tepelného šoku a thioredoxin – reduktáza – thioredoxin systému, se lehký řetězec uvolní od zbytku botulotoxinu a tím se aktivuje. Takto aktivovaný řetězec prostřednictvím své enzymatické aktivity štěpí proteiny komplexu rozpustný receptor pro připojení faktoru citlivého na N-ethylmaleimid (SNARE proteiny), těmi jsou membránový protein spojený s vezikulami (VAMP), synaptosomálně asociovaný protein (SNAP 25), synaptobrevin a syntaxin. Tyto proteiny jsou důležité pro fúzi váčku z presynaptické membrány do synaptické štěrbiny a uvolnění acetylcholinu. Každý sérotyp botulotoxinu specificky štěpí jiný z těchto proteinů. Botulotoxin typu A, E štěpí synaptosomálně asociovaný protein. Sérotypy B, D, F, H, specificky štěpí membránový protein spojený s vezikulami. Botulotoxin typu C štěpí synaptosomálně asociovaný protein i syntaxin. Rozštěpení těchto proteinů zabrání uvolňování acetylcholinu a tím i dočasné ochrnutí svalů, zapříčiněného zablokováním nervového vzruchu na nervosvalové ploténce. Obrázek 2 znázorňuje mechanismus účinku botulotoxinu [8;15;16].



Obrázek 2 Mechanismus účinku botulotoxinu

Upraveno z [18]

Doba trvání paralýzy se u jednotlivých sérotypů liší. Paralýza botulotoxinem A, C u lidí trvá 3–6 měsíců. V případě botulotoxinu B, D a F je to 12–16 týdnů. Botulotoxin E má nejkratší dobu trvání a to 2–7 týdnů [8].

### **3.3 Využití botulotoxinu**

Ač je botulotoxin považován za jeden z neúčinnějších jedů, v průběhu let se pohled na tuto látku změnil a začalo se na něj pohlížet i jako na lék. V současnosti je využíván k terapii v různých oblastech medicíny. Především pak v estetické medicíně a k léčbě široké škály chronických stavů, například spasticity a dalších [19;20].

#### **3.3.1 Botulotoxinové přípravky**

První zmínky pocházejí z roku 1817, kdy německý lékař Justinus Kerner detailně popsal klobásový jed, neizoloval ho, ale popsal, jak působí. Už tehdy předpokládal, že by se jed mohl použít k léčbě chorob s nadměrnou aktivitou svalů. První terapeutické využití proběhlo v roce 1980, kdy oftalmolog Allan Scott aplikoval čistý botulotoxin do očních svalů člověka k léčbě strabismu [21;22].

První botulotoxinový přípravek pro léčbu blefarospazmu u člověka, byl licencován v roce 1989 Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv, USA (FDA). V současné době existuje šest tradičních přípravků botulotoxinu, které lze využít pro terapeutické účely. Čtyři z nich jsou schváleny americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Přípravek Prosigne a Meditoxin jsou používány pouze v Číně a Jižní Koreji. Přehled konvenčních přípravků a jejich schválené indikace viz Tabulka 2 [15;21].

Z těchto čtyřech schválených přípravků obsahují tři produkty botulotoxin A jsou jimi Onabotulinumtoxin A, Incobotulinumtoxin A a Abobotulinumtoxin A. Všechny tyto produkty jsou dodávány ve formě prášku, ze kterého smícháním s fyziologickým roztokem vznikne injekční roztok připravený k aplikaci. Rimabotulinumtoxin B jako jediný obsahuje botulotoxin sérotypu B a oproti ostatním je dodáván v tekuté formě [23].

V České republice je Státním zdravotním ústavem pro kontrolu léčiv (SUKL) registrováno několik botulotoxinových přípravků. Hrazené pojišťovnou jsou v ČR přípravky Botox 100 SU, Xeomin 100SU, Dysport 300 SU a Dysport o síle 500 SU. Dále se na českém trhu vyskytují přípravky Alluzience, Botouture, Vistabel [24].



**Tabulka 2 Přehled konvenčních botulotoxinových přípravků a jejich schválená indikace** Převzato z [15]

<b>Jméno výrobku</b>	<b>Vlastnický název</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Schváleno US FDA</b>	<b>Indikace schválená americkým FDA</b>	<b>Rok schválení</b>
Botox	Onabotulinumtoxin A	Společnost Allergan Inc.	Ano	Blefarospasmus	1989
				Hemifaciální spasmus	1989
				Strabismus	1989
				Cervikální dystonie	2000
				Migréna	2010
				Spasticita horní končetiny	2010
				Spasticita dolních končetin (dospělí)	2014
				močový měchýř (NDO)	2011
				Hyperaktivní močový měchýř (OB)	2013
Xeomin	IncobotulinumtoxinA	Merz Pharmaceuticals	Ano	Vrásky na čele	2018
				Cervikální dystonie	2010
				Blefarospasmus	2010
				Zamračené linie	2011
				Spasticita horní končetiny	2015
Dysport	AbobotulinumtoxinA	Ipsen Pharmaceuticals	Ano	Sialorrhoea u dospělých	2018
				Cervikální dystonie	2009
				Zamračené linky a vrásky	2009
				Spasticita horních končetin (dospělí)	2015
				Spasticita dolních končetin (děti)	2016
Myoblok/Neurobloc	Rimabotulinumtoxin B	USA – WorldMed – Slunovrat	Ano	Spasticita dolních končetin (dospělí)	2017
				Cervikální dystonie	2009
Proscine/Prosigne	Typ A	Lanzhou Institute, Čína	Ne		
Meditoxin/notox	Typ A	Meditox, Jižní Korea	Ne		



Botulotoxinové léky jsou směsí sloučenin, které se skládají z botulinumneurotoxinu, komplexotvorných proteinů a pomocných látek. Botulinumneurotoxin je aktivní složka botulotoxinových preparátů. Jako aktivní složka v přípravku se používá buď sérotyp A nebo B. Ostatní typy E, C, D, F byly použity pouze experimentálně. Různé typy a podtypy botulotoxinu vykazují jiné vlastnosti. Komplexotvorné proteiny vznikají přirozeně jako zbytky při tvorbě botulotoxinového preparátu. Obecně nemají vliv na působení botulotoxinu, ale předpokládá se, že může zvyšovat antigenicitu. Proto jsou raději tyto proteiny z přípravků odstraňovány, aniž by se změnil jeho terapeutické nebo nevznikaly nové nežádoucí účinky. Pomocné látky slouží ke stabilizaci botulotoxinových léků. Obvykle se pro tuto funkci používá lidský sérový albumin. Stabilizovat je může i želatina, polysorbát nebo cukry. U kapalných forem přípravků se ke stabilizaci využívají pufrů snižujících pH roztoku [25].

Daxibotulinumtoxin A je nový produkt společnosti Revance, která v roce 2020 podala americkému Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv žádost o udělení licence pro terapeutickou indikaci pro léčbu glabérálních vrásek. Jedná se o produkt botulotoxinu A, který prošel procesem fermentace a několika purifikačními a chromatografickými kroky, které minimalizují přítomnost bakteriálních či genetických zbytků. Aktivní složkou je purifikovaný jádrový neurotoxin zvaný daxibotulinumtoxin A. Ke stabilizaci je v přípravku použit peptid RTP004 s polysorbátem 20. Kladný náboj peptidu RTP004 zprostředkovává elektrostatickou vazbu k negativně nabitým povrchům neuronů. Peptid zvyšuje afinitu daxibotulinumtoxinu A k záporně nabitým presynaptickým nervovým zakončením. Tato silná vazba pravděpodobně zvýší možnost daxibotulinumtoxinu A se navázat na správný proteinový receptor, usnadní lokaci a zvýší počet internalizovaných molekul neurotoxinu v místě vpichu a tím prodlouží účinek léku [15;26;27].

Parabotulinumtoxin A obchodním názvem Neurox je novým botulotoxinovým preparátem schváleným v roce 2019 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pouze pro kosmetickou léčbu středních až těžkých glabérálních linií. Je to produkt botulotoxinu sérotypu A s viditelnými výsledky do druhého dne po jeho aplikaci, na rozdíl od přípravku Botox, který působí až po 24–72 hodinách. Neurox je bezpečný, účinný s rychlým nástupem účinku a doplňuje tak již dostupné botulotoxinové léky [28].

Botulotoxin typu E je v současnosti zkoumán v laboratorních studiích. Má prokazatelně rychlý nástup účinku, ale krátkou dobu působení, zhruba 2–4 týdny v porovnání s ostatními botulotoxinovými léky. Tohoto poznatku by bylo možné využít k léčbě akutních stavů,

u kterých není potřeba dlouhé působení botulotoxinu. Tato vlastnost je dána odlišnou strukturou sérotypu a jeho schopností se vázat na neurony. Všechny tři domény botulotoxin E jsou organizovány na společném rozhraní. Trojrozměrný tvar proteázové části zřejmě přispívá k rychlejšímu přechodu od vazby přes internalizaci až k translokaci. Proteáza botulotoxinu E je z nervových buněk rychle odstraněna [29].

Letibotulinumtoxin A, obchodním názvem Botulax vyráběný v Jižní Koreji, je nový neurotoxin z kmene *Clostridium botulinum* CBFC26. Jedná se o botulotoxin sérotypu A. Botulax je analogem Botoxu. Účinnost a bezpečnost nebyla horší než u onabotulotoxinu A [30].

Dávky jednotlivých přípravků nejsou totožné nebo ekvivalentní. Každá formulace je dostupná v jiných jednotkách U na lahvičku a obsahuje odlišnou gramáž neurotoxického proteinu v ng na lahvičku. Z tohoto důvodu je důležité, aby se lékař vždy řídil pokyny od výrobce [15;25].

Velké farmaceutické společnosti vyvíjejí nové botulotoxinové přípravky s cílem rozšířit jejich indikační spektrum. Vznikají analogy tradičního Botoxu či jiných přípravků. Jejichž cenová dostupnost je podstatně nižší než Botox. Společnosti se snaží prodloužit účinek působení botulotoxinů. Budoucí vývojové tendence jsou snížit počet pomocných látek v tomto léku, aby se snížilo riziko přenosu HIV. Dále je vyvinuto úsilí převést stávající botulotoxinové léky do tekuté podoby. Další směr vývoje botulotoxinových léků je jejich transdermální aplikace. Tato aplikace je velmi atraktivní pro estetickou medicínu [25].

### **3.3.2 Estetická medicína**

První kosmetické účinky botulotoxinu byly pozorovány jako vedlejší účinek při léčbě blefarospasmu v roce 1987, kdy se pacientům při této léčbě navíc jako vedlejší účinek, vyhladila glabelární linie. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA schválil jeho kosmetické a nekosmetické využití botulotoxinových přípravků 15.2.2002 [31].

Rytidy neboli vrásky vznikají hyperaktivitou svalů obličeje a stárnutím. Pro jejich redukci a léčbu se používají botulotoxinové injekce. Nejčastějšími ošetřovanými oblastmi obličeje jsou rytidy čela, zamračené linie glabely, podočnicové a nosní vrásky, periorální linky v oblasti rtů. Dále lze ošetřit gingivální úsměv, pomerančovou bradu nebo pomocí botulotoxinu zeštíhlit čelist. Léčba hlubokých vrásek má pozitivní vliv na psychiku pacienta. Pro úspěšnou léčbu vrásek je důležité znát podrobně anatomii ošetřovaných oblastí a vymezení správných bezpečnostních zón tak, aby nevznikly po aplikaci komplikace, jako je například pokles horního víčka a obočí, neúplné uzavření víčka nebo asymetrický úsměv [31;32;33].

Dalším kosmetickým využitím botulotoxinu je léčba mastné pleti. Kožní maz působí jako kožní bariéra organismu před vnějšími faktory. Při nadměrné tvorbě může kožní maz blokovat póry a způsobit zánět kůže. Aplikací botulotoxinu na čele u lidí s mastnou pleť bylo prokázáno snížení produkce kožního mazu po dobu 16 týdnů [31].

Několik studií potvrdilo, že aplikace botulotoxinu zmírňuje projevy zarudnutí obličeje u zánětlivé dermatózy zvané růžovka a snižuje počet návalů horka při menopauze. Botulotoxin je také účinný v prevenci jizev, kdy snižuje napětí působící na okraji rány, které při hojení určuje konečný vzhled jizvy [31].

Existují kontraindikace, kdy botulotoxinové injekce nelze použít, a to v případě neuromuskulárních poruch, roztroušené sklerózy, těhotenství, kojení, při alergii na albumin, onemocnění krve, plic, srdce, jater, ledvin. Použití není vhodné u hubených a podvyživených lidí, svaly jsou v takovýchto případech tenké a účinné látky by se mohly dostat do okolních tkání a způsobit nepříznivý efekt [32;34].

### **3.3.3 Léčba chronických stavů**

Botulotoxinové injekce se využívají pro svůj mechanismus účinku v mnoha oborech lékařské medicíny k léčbě chronických stavů. Nejvíce se botulotoxin využívá v neurologii při léčbě spasticity a chronické bolesti. Dále se uplatňuje pro léčbu patologických stavů v oftalmologii, urologii, gynekologii či dermatologii a dalších. Existují studie, které prokázaly příznivý vliv botulotoxinu na léčbu deprese. Tabulka 2 uvádí některé indikace při kterých se botulotoxin používá [15;35].

Dětská mozková obrna je motorické postižení, kdy je poškozena část mozku zodpovědná za koordinaci těla, to má za následek špatné fungování pohybového aparátu. Spasticita, tedy zvýšené svalové napětí kosterních svalů, jejich ztuhnutí a zhoršená pohyblivost svalů je typickým příznakem této nemoci. Pro uvolnění napětí svalů se využívá lokální injekce botulotoxinu A. Je velmi důležité zvážit kdy je vhodné použít botulotoxin tak, aby se eliminoval výskyt nežádoucích účinků, které mohou spasticitu více prohloubit. Patří mezi ně zvýšení svalové slabosti, svalová atrofie, zvýšení svalové fibrózy. U správně zvolených případů se po aplikaci zlepší aktivní kloubní rozsah, sníží se tuhost svalů, zlepší se chůze. U malých dětí oddálí nutné ortopedické operace. Optimální je aplikovat léčbu mezi 2–5 rokem života dítěte. Klinické účinky trvají zpravidla 3–6 měsíců, ale některé účinky mohou přetrvávat až 12 měsíců.

Prodloužení a zvýšení účinnosti botulotoxinu prokazatelně podporuje fyzioterapeutické cvičení a posilování léčených svalů [16;35;36].

Deprese patří k nejčastějším duševním onemocněním po celém světě. Několik studií prokázalo, že botulotoxin A, injektovaný do glabelární oblasti má antidepresivní účinky a snižuje symptomy mírné až středně těžké deprese. Účinnost botulotoxinu je dle studií srovnatelná se zavedenými antidepresivy. Ukázalo se, že botulotoxin má kratší dobu nástupu účinku a menší počet vedlejších účinků než dosud používaná antidepresiva. Bohužel v současnosti není schválen žádný botulotoxinový přípravek pro léčbu deprese, avšak probíhají 3. fáze studií, které mají přispět ke schválení botulotoxinového léčiva pro tuto indikaci. Pacienti, u kterých nezabírají antidepresiva, jsou léčeni aplikací botulotoxinu do glabelární oblasti z estetického hlediska pro odstranění negativních emocí z obličeje. Příznaky deprese se u nich tedy snižují pouze jako vedlejší účinek. Pozitivní účinek má botulotoxin na léčbu chronické migrény, která může úzce souviset s depresí [37;38;39].

Syndrom hyperaktivního močového měchýře (OAB) je charakterizovaný jako patologické nutkání močit s velmi častou frekvencí, v krátké době doprovázené nykturií a urgentní inkontinencí, která se může, nemusí projevit. Léčba tohoto onemocnění zahrnuje správné dávkování tekutin, úpravu návyků, farmakologickou terapii a v naléhavých případech i chirurgický zákrok. Jednou z možností léčby a zmírnění příznaků je aplikace injekce Onabotulinumtoxin A v doporučené dávce 100 U jednotek. Tato dávka je pacienty dobře snášena, účinná a bylo zaznamenáno méně nežádoucích účinků. Botulotoxin zvyšuje kapacitu močového měchýře, výrazně snižuje denní frekvenci močení, urgenci a močovou inkontinenci. Bohužel existují po injekčním vpravení botulotoxinu rizika a nežádoucí účinky. Konkrétně se zvyšuje postmikční reziduální objem, tj. množství zadržené moči v močovém měchýři po vymočení. Po aplikaci se objevují časté záněty močového měchýře a v některých případech, zejména u starších lidí, je nutná katetrizace. Hlavní nevýhodou botulotoxinu je krátkodobý účinek. Doporučený interval pro přeléčení je 6–9 měsíců. Je proto důležité seznámit pacienty se všemi nežádoucími účinky a odborník by měl rozhodnout, zda je vhodné tento typ léčby pacientovi doporučit [40;41].

Účinnost onkologické léčby se s rozvojem molekulární biologie v posledních letech velmi zvýšila. Studie prokázaly, že botulotoxin výrazně snižuje bolest u onkologických pacientů po proběhlé radiační terapii, chemoterapii a chirurgických zákrocích. Množství aplikovaného botulotoxinu závisí na individuální reakci na léčbu, typu přípravku a na síle projevů příznaků

onemocnění. Další výzkum ukázal, že botulotoxin redukuje a zmenšuje objem nádoru. Navíc se zjistilo, že botulotoxin podporuje a napomáhá spouštět apoptózu nádorových buněk. Využití botulotoxinu pro tyto účely jsou spojena s riziky nežádoucích účinků. Jejich výskyt byl však ve všech studiích velmi nízký. Patří mezi ně malé parézy v oblasti vpichu, sucho v ústech či omezený hematom. Existují obavy, že by taková injekce u onkologických pacientů mohla způsobit ovlivnění funkcí kardiovaskulárního systému a rozvoj imunorezistence vůči botulotoxinu. Je důležité zvážit výběr vhodných pacientů. Mezi hlavní kontraindikace pro tuto terapii patří těhotenství, kojení, Lambert – Eatonův syndrom, pacienti, kteří jsou současně léčeni antibiotiky jako je gentamicin či streptomycin, mohou interferovat s botulotoxinem a prodloužit tak neurotoxický účinek. Pro ještě větší eliminaci zmíněných rizik se zvažuje použití netoxických rekombinantů botulotoxinu. To vše je předmětem dalších studií [42;43].

### **3.4 Důsledky aplikace toxinu**

Imunogenicitu je definována jako schopnost molekuly, cizorodé částice, proteinu či složky vyvolat imunitní odpověď hostitelského organismu. Existují případy, kdy injekce botulotoxinu nepůsobila tak, jak by měla v důsledku vzniku a rozvoje blokujících nebo neutralizačních protilátek (NAbs). Protilátky proti botulotoxinu lze rozdělit na neutralizační a neneutralizační. Neutralizační protilátky jsou zacílené na jádro neurotoxinu, hlavně tedy na vazebné místo těžkého řetězce a tím ovlivnění účinnosti toxinu. Neneutralizační protilátky vůči botulotoxinu jsou zaměřené na doplňkové proteiny či ireverzibilní vazebná místa na jádrovém neurotoxinu, neovlivňují účinnost toxinu [44;45].

Příčiny vzniku rezistence nebyly nikdy přesně zjištěny, nicméně jsou připisovány nízké dávce, nesprávné injekci do svalů, přítomnost kontraktur nebo protilátek po předchozí vakcinaci proti botulotoxinu, krátkým intervalem mezi jednotlivými dávkami botulotoxinu či příliš vysokými dávkami, které způsobí vznik protilátek [45].

Primární rezistence je stav, kdy už první injekce botulotoxinu nezlepší symptomy a další léčebný postup je také bez odezvy. Výskyt této rezistence je velmi ojedinělý. Je důležité nezaměnit hůře diagnostikovaný stav, který na botulotoxin obecně vůbec nereaguje za imunitní necitlivost vůči botulotoxinu způsobenou protilátkami [45].

Sekundární rezistence je charakterizovaná prvotním účinkem botulotoxinu, který potlačí symptomy a zlepší projevy onemocnění. Následnou a opakovanou léčbou a aplikací botulotoxinu se jeho účinnost ztrácí [45].

Každá ze známých forem a přípravků botulotoxinu A či B má odlišnou sílu být imunogenní. Zjistilo se, že pomocné proteiny v botulotoxinových přípravcích mohou relativně určovat imunogenicitu jednotlivých botulotoxinů. První generace onabotulinumtoxinu A měla míru rezistence 5 % - 17 %, proto onabotulinumtoxin A druhé generace obsahuje nižší množství pomocných proteinů. Incobotulinumtoxin A jako jediný neobsahuje NAP proteiny, což může vysvětlit jeho velmi nízký výskyt protilátek proti botulotoxinu. V Tabulka 3 je znázorněn přehled míry rezistence všech používaných přípravků botulotoxinu[44;45].

**Tabulka 3** Botulotoxinové přípravky a jejich imunogenicita Upraveno z [45]

<b>Botulotoxinové přípravky</b>	<b>Rozsah inumogenicity</b>	<b>Poznámky</b>
<b>Onabotulinumtoxin A (první generace)</b>	5–17 %	Nepoužívá se
<b>Onabotulinumtoxin A (nová)</b>	0,2 – 3,6 %	Snížené množství neaktivního proteinu ve srovnání se starší formulací
<b>Abobotulinumtoxin A</b>	0,9 – 3,6 %	Obsahuje flagelin s potenciálními pomocnými vlastnostmi a komplexotvorné proteiny
<b>Incobotulinumtoxin A</b>	0 – 0,5 %	NAP odstraněny
<b>Rimabotulinumtoxin B</b>	18 – 42,4 %	B sérotyp, silnější autonomní účinky

Testy k detekci protilátek vůči botulotoxinu lze rozdělit na biologické a strukturní. Biologické testy využívají k určení protilátek zvířata, konkrétně myši. Mezi takové testy patří test ochrany myši (MPA). Mezi strukturní testy patří ELISA a Western Blot Assay (WBA). Je snaha odstupovat od usmrcování zvířat a využívat vysoce citlivé a specifické strukturní metody, které jsou levné, rychlé, humánní a snadno dostupné [45].

### **3.5 Biologická zbraň**

Botulotoxin produkovaný bakterií *Clostridium botulinum* je jednou z nejtoxičtějších přirozeně se vyskytujících biologických látek na světě. Kvůli vysoké toxicitě byl Úřadem pro kontrolu

a prevenci nemocí, USA zařazen do kategorie A. Tedy do kategorie pro látky s velmi vysokou patogenitou a smrtností, které se snadno šíří do okolí [46;47].

Kvůli hrozbě možného zneužití státem či organizací ve válce a ohrožení veřejného zdraví obyvatelstva byly podepsány mezinárodní úmluvy pro regulaci zneužití. V roce 1925 byl podepsán Ženevský protokol, tedy mezinárodní úmluva o zákazu použití jedovatých plynů a bakteriologických metod ve válce. Následně byla v roce 1972 podepsána Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění biologických a toxinových zbraní a jejich zničení. V roce 1997 vstoupila v platnost Úmluva o zákazu vývoje, výroby, hromadění a použití chemických zbraní a jejich zničení zkráceně Úmluva o chemických zbraních. Úmluvy z roku 1972 a 1997 upravují původní Ženevský protokol [48].

Letální potenciál  $LD_{50}$  botulotoxinu, tj. množství, které je potřeba pro usmrcení 50 % skupiny zvířat je 1 ng/kg. Pokud má látka  $LD_{50} < 25$  mg/kg jedná se o velmi toxickou látku. Z tohoto je jasné patrné, že je botulotoxin velmi nebezpečný a toxický. Uvádí se, že smrtelná dávka pro člověka, který váží 70 kilogramů je při pozření zhruba 70  $\mu$ g botulotoxinu, při vdechnutí 0,7 – 0,9  $\mu$ g. Při bioteroristickém útoku by byl botulotoxin rozšířen mezi lidi kontaminovanou vodou, jídlem nebo vzduchem ve formě aerosolu. Proto je důležité sledovat počty případů onemocnění botulismu. Zvýšený počet případů onemocnění může poukazovat na teroristické zneužití biologické látky Pro průkaz přítomnosti toxinu ze vzorků odebraných a analyzovaných přímo v terénu mimo laboratoř existují přístroje zvané biosenzory, které fungují na principu imunologických metod [46;48].



## 4 Botulismus

Botulismus je vzácné neuroparalytické onemocnění lidí a zvířat, které způsobuje botulotoxin produkovaný bakterií *Clostridium botulinum*, charakteristicky doprovázené inhibicí slinných žláz což má za následek sucho v ústech a krku. Dalšími typickými příznaky jsou například porucha vyslovování, paralýza očních víček. Symptomy onemocnění se objevují náhle během několika hodin až dnů. U závažnějších otav může dojít k paralýze respiračních svalů, a připojení pacienta na umělou plicní ventilaci [11].

### 4.1 Formy botulismu

Botulismus se u lidí může vyskytovat v různých formách. Nejčastěji se objevuje alimentární botulismus, který je způsobený požitím kontaminované potravy, kdy je v takovémto jídle přítomen botulotoxin produkovaný bakterií *Clostridium botulinum*. Tato bakterie ve formě spor přežije tepelnou úpravu potravin, poté se bakterie rozmnoží a začne produkovat botulotoxin, který způsobí botulismus. Botulotoxin se může v potravine objevit náhodou, kdy při vhodných podmínkách vyklíčí přítomné spory nebo je do potravin úmyslně přidán. Alimentární botulismus, způsobený nejčastěji sérotypy A, B, E, F, je nejčastěji se vyskytující formou v Evropě. Má epidemiologický potenciál a jeho výskyt může být považován za nouzovou situaci v oblasti veřejného zdraví obyvatel [11;13].

Raný botulismus vzniká v případě, že spory *Clostridium botulinum* kontaminují otevřenou ránu. Anaerobní prostředí rány přispívá k růstu a množení bakterie, která produkuje botulotoxin. Botulotoxin poté způsobí sestupnou svalovou paralýzu. Dříve se tato forma onemocnění objevovala u válečných zranění, která byla infikována spory bakterie. V posledních letech se raný botulismus typicky vyskytuje u lidí, kteří si injekčně subkutánně či subdermálně aplikují drogy, protože jehly a stříkačky určené k aplikaci jsou kontaminovány spory. Tento typ botulismu nemá epidemiologický potenciál [13;49;50].

Kojenecký botulismus je vzácné paralytické onemocnění kojenců nejčastěji ve věku 2–8 měsíců. Do organismu kojence se spory bakterií dostanou pravděpodobně požitím medu nebo vdechnutím prachových částic, které spory obsahují. Přesný zdroj spor je nejasný. Jedná se o střevní toxémii, kdy spory klíčí ve střevním traktu dítěte a uvolňují botulotoxin, který je transportován krví a ovlivňuje přenos nervového vzruchu na nervosvalovou ploténku, což má za následek paralýzu svalů [51;52].



Botulismus intersticiální toxémie u dospělých je další forma botulismu. Může postihovat dospělé a děti starší 1 roku. Stejně jako u kojeneckého botulismu se i v tomto případě jedná o střevní toxémii, kdy zdroj spor není zcela jasný. Zdrojem může být kontaminovaná potravina či inhalace spor z ovzduší. Bohužel tato forma není mezi lidmi natolik známá jako kojenecký botulismus, proto je hlášených případů intersticiální toxémie dospělých málo, ale ve skutečnosti jich může být více. Pacienti s předchozími operacemi střev, Crohnovou chorobou, s abnormalitami střeva a antimikrobiální terapií jsou citliví ke klíčení spor v lumenu střeva následnému rozvinutí sestupné paralýzy svalů. Pro diagnostiku tohoto typu botulismu je detekce přítomnosti *Clostridium botulinum* ve stolici [53].

Je prokázán případ iatrogenního botulismu, tj. botulismus způsobený chybnou terapeutickou nebo kosmetologickou aplikací botulotoxinu do svalů. Dochází k systémovému rozšíření botulotoxinu do vzdálených tkání. Tento stav je doprovázen klinickými následky a to dysfagie, systémová slabost a respirační selhání. Je to závažný a velmi vzácný stav, který může být způsoben použitím necertifikovaných přípravků botulotoxinu nebo vysokou koncentrací botulotoxinu [11;54].

Byl zaznamenán také jeden případ inhalačního botulismu u výzkumného pracovníka, který vdechl botulotoxin ve formě aerosolu. V tomto případě se jednalo o náhodnou intoxikaci ve výzkumné laboratoři. Přirozeně se tato forma botulismu nevyskytuje. Pokud by se v dané oblasti objevil vysoký počet případů onemocnění botulismem, mohlo by se jednat o bioteroristický útok, kdy byl použit čistý botulotoxin ve formě aerosolu. Proto je důležité počty kontrolovat a zjistit zdroj nákazy. Studie prováděné na morčatech zjistily, že kombinace monoklonálních protilátek může zabránit rozšíření botulismu sérotypu A i sérotypu B po expozici morčat aerosolem. Předpokládá se, že by tato kombinace protilátek s ohledem na jejich účinnost a poločas rozpadu měla být efektivní s dlouhotrvajícím účinkem i u lidí [13].

## 4.2 Prevence botulismu

Pro prevenci a zabránění přenosu alimentárního botulismu je důležité dodržet správnou a dostatečně dlouhou tepelnou úpravu masa (i vakuově baleného), uzenin a podomácku konzervovaných masových výrobků a zeleniny [3].

Spory *C. botulinum* skupiny I přežijí i vysoké teploty relativně dlouhou dobu. Spory *C. botulinum* jsou středně odolné k teplu, ale velmi dobře klíčí při teplotách 3–8 °C. Proto je při skladování vakuově balených a chlazených masových výrobků důležité udržovat teplotu pod

2,5°C. Dále se u těchto výrobků doporučuje, pokud mají trvanlivost nad 10 dnů, provést 6D tepelné ošetření, které kombinuje teplotu a čas při 90 °C 10 minut a zajistí snížení počtu buněk *C. botulinum* skupiny II nebo spor ve vakuově balených potravinách. Metoda 6D zabíjení je účinnější než pasterizace[3].

Komerční tepelné ošetření pasterizací nemusí být vždy účinné. Proto jsou k ochraně a nezávadnosti potravin využívány dusitany a soli organických kyselin, které mají inhibovat růst bakterií a tvorbu toxinů. Dusitany jsou vhodným antibotulinovým prostředkem k ošetření masa. U bezmasých výrobků je jeho použití omezeno. Sorban sodný a octan sodný jsou soli schopné inhibovat růst, kyselina sorbová pak udržuje kyselé prostředí, které není vhodné pro množení bakterie [3;55].

Obecně je pro nezávadnost potravin důležité dodržet několik zásad. Udržovat potraviny v čistotě, odděleně připravovat syrové a vařené maso, dostatečně dlouhou dobu ho vařit, skladovat potraviny při správné doporučené teplotě a používat při přípravě a vaření zdravotně nezávadnou vodu a kvalitní suroviny [55].

### **4.3 Symptomy a průběh onemocnění**

Poté co se v organismu nahromadí botulotoxiny a začnou ovlivňovat nervosvalové spojení, tedy inhibovat uvolňování acetylcholinu, objevují se první příznaky. Inkubační doba se liší v závislosti na fyzickém stavu pacienta, sérotypu, množství botulotoxinu a formy botulismu. Symptomy se mohou objevit zpravidla během několika hodin výjimečně až dnů od kontaminace neurotoxinem. U alimentárního botulismu se můžou objevit křeče v břiše, nevolnost, zvracení, průjem, později zácpa [11;56].

Následuje manifestace prvních autoimunitních neurologických příznaků jako je rozmazané či dvojité vidění (diplopie), rozšířené fixované zorničky, sucho v ústech (xerostomie), bolest v krku, orhostatická hypotenze a fotofobie. Vlivem bulbární paralýzy hlavových nervů IX, X, XI a XII se u pacientů s botulismem objevuje pokles očních víček takzvaná ptóza a paralýza očních svalů. Dále pak problémy s artikulací (dysartrie). Také poruchy hlasu, jako například chrapot nebo přeskokování hlasu při mluvení (dysfonie), způsobené ochrnutím hlasivek. Paralýza hlavových nervů může mít za následek potíže s polykáním (dysfagie) a dušnost (dypnoe). V některých případech se objevuje i střevní ileus a retence moči [11;13;56].

Postupem času se začne projevovat různý stupeň oboustranné sestupné symetrické paralýzy, která začíná ochrnutím šíjového svalstva. Dále paralýza postihuje proximální před distální kosterní svalstvo končetin a postupuje až do respiračních svalů a svaly bránice [56].

Pokud se botulismus neléčí nastává smrt v důsledku obstrukce dýchacích cest, která je způsobena paralýzou svalů, následně dojde k selhání funkce respiračních svalů a zástavě dýchání. Pacienti jsou po celou dobu bdělí a orientovaní [13;56].

#### **4.4 Léčba botulismu**

Dříve byla úmrtnost na botulismus okolo 60 % v současnosti s rozvojem moderních technologií a kvalitnější zdravotní péčí se mortalita pohybuje pod 7 %. Samotná léčba botulismu a kompletní zotavení pacienta může trvat i několik měsíců. Terapie botulismu se skládá hlavně z podání antitoxinu a podpůrné lékařské péče. U alimentárního botulismu způsobeného požitím intoxikované potraviny se navíc doporučuje gastrointestinální dekontaminace. Horní i dolní dekontaminace se provádí pomocí sondy, nebo výplachem žaludku či střev. Zácpa by totiž mohla způsobit setrvání kontaminované potravy v trávicím traktu [11;56].

Pacientům, kteří mají klinické podezření na intoxikaci botulotoxinem by se měl nejpозději do 48 hodin optimálně však do 24 hodin od prvních neurologických příznaků, podat antitoxin. Několik studií potvrdilo, že pokud se antidotum podá v tomto časovém rozmezí, zastaví se progresi paralýzy nebo se dokonce v některých případech zabrání respiračnímu selhání a výrazně se zkrátí léčba umělou plicní ventilací a pobyt na lůžku jednotky intenzivní péče. Antitoxinem jsou protilátky získané z koní, které se váží na volně cirkulující botulotoxiny v krevním řečišti. Neutralizují a blokují vazbu botulotoxinu na synaptické receptory. Vzniklý komplex antidotum – botulotoxin je z krve odstraněn. Existují trivalentní koňské antitoxiny A, B, E, které jsou specifické proti nejčastěji se vyskytujícím sérotypům botulotoxinu. Z důvodů vyšších rizik anafylaxe se tento antitoxin nepoužívá k léčbě dětí. V Evropě a Spojených státech amerických se tyto trojmocné přípravky liší celkovým množstvím antitoxinu v jedné dávce, proto je důležité řídit se pokyny výrobce. V posledních letech se od výše zmíněných přípravků ustupuje a jsou nahrazeny heptavalentním antitoxinem (HBAT, BAT) působícím proti sedmi známým sérotypům botulotoxinu A, B, C, D, E, F, G. Tento přípravek se používá jak v Evropě, tak ve Spojených státech amerických k terapii dospělého i dětského botulismu. Předpokládá se, že antitoxin nemá nežádoucí účinky na plod v případě, že je aplikován těhotné pacientce. Molekula antitoxinu je natolik velká, že nemůže projít placentou. Na potvrzení tohoto předpokladu je potřeba více studií [11;13;56;57;58].

Kvůli zvýšenému riziku respiračního selhání je velmi důležité sledovat dýchání. V případě potřeby je pacient intubován a připojen na umělou plicní ventilaci. Čas strávený na ventilaci se liší v závislosti na sérotypu a množství botulotoxinu, může to být 2–6 týdnů i déle [11;13].

Antibiotické látky nemají vliv na mechanismus botulotoxinu. U raného botulismu je jejich použití důležité k zabránění sekundární infekce. Nicméně aminoglykosidiová antibiotika společně s klindamycinem jsou neuromuskulární blokátory, které brání uvolňování acetylcholinu a mohou stav pacienta zhoršit. *Clostridium botulinum* je citlivý na antibiotikum trimethoprim – sulfamethoxazol a penicilin [11;59].

Výzkum a probíhající studie ukazují potenciál v terapii botulismu pomocí specifických inhibitorů botulotoxinu. Další variantou by mohlo být podání 3,4 – diaminopyridinu a guanidinu, kteří zvyšují uvolňování acetylcholinu. Přínos těchto látek je nejasný, stejně jako terapie plazmaferézou [11;13].

#### **4.5 Výskyt botulismu v České republice a ve světě**

Ze statistik Státního zdravotního ústavu (SZÚ) České republiky vyplívá, že je botulismus na tomto území velmi vzácným onemocněním. Od roku 2008 do roku 2022 bylo zaznamenáno 11 případů botulismu. Dva z nich byly hlášeny v roce 2022, kdy pravděpodobným zdrojem nákazy byla kontaminovaná paštika [60].

Starší data z let 1998 až 2016 zaznamenala 35 případů ve věku od 7 let do 78 let. V roce 2013 byly hlášeny 4 případy a v roce 2014 jeden případ. U všech evidovaných případů se jednalo o alimentární přenos kontaminovanou potravou. Kojenecký botulismus se v České republice nevyskytl. [61;62].

Podle statistik Evropského centra pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) v roce 2020 evidovalo 29 zemí Evropské unie a Evropského hospodářského prostoru 82 laboratorně potvrzených případů botulismu. Nejvyšší počet nákazy v tomto roce zaznamenala Itálie se 46 případy. Francie oznámila druhý nejvyšší počet a to 11 případů. Polsko a Rumunsko hlásilo shodně 6 případů, dále pak Německo a Španělsko 3 případy. Rakousko, Belgie, Chorvatsko, Island, Litva, Norsko a Portugalsko evidovalo 1 případ v tomto roce. Šestnáct zemí, mezi kterými byla i Česká republika hlásilo nula případů [63].

Ve Spojených státech amerických Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) evidovalo v roce 2020 celkem 189 případů. Z toho se v osmi případech jednalo o alimentární přenos.

Kojenecký botulismus byl potvrzen u 146 pacientů. 35 případů bylo zaevidováno jako raný nebo nespecifikovaný přenos [64].

## 4.6 Kazuistiky botulismu

Následující kapitola bude věnována kazuistikám konkrétních případů alimentárního, raného, kojeneckého a iatrogenního botulismu v praxi.

### 4.6.1 Alimentární botulismus

Do nemocnice v italském městě Pavia přišel 24letý muž, který čtyři dny trpěl přetrvávajícími bolestmi břicha, horečkou a občasnými epizodami dvojitého vidění. Muž zdravotnímu personálu dále sdělil, že neměl nevolnosti, nezvracel a pravidelně se vyprazdňoval [65].

Na počátku vyšetření měl pacient horečku 38 °C, byl mírně spavý, ale nejevil známky neurologického postižení. Fyzikálním vyšetřením břicha bylo zjištěno mírné roztažení střev s citlivostí v pravé jámě kyčelní. Krevní testy byly negativní až na C – reaktivní protein, který se v krvi vyskytoval ve vysokých koncentracích a to 86,3 mg/l. Pacient měl negativní test na SARS – CoV – 2 [65].

Rentgen a následně i počítačová tomografie potvrdily roztažení střev vlivem nahromadění vzduchu a tekutin. Tímto nálezem byla vyřazena obstrukce tenkého střeva jako možná příčina potíží. Pacientovi byla zavedena nazogastrická sonda s výživou, během 24 hodin se bolesti a obtíže břicha zlepšily, nicméně se u něho začaly projevovat neurologické příznaky jako sucho v ústech, dvojité vidění, ptóza očních víček a rozšířené zorničky [65].

Lékaři uvažovali, že se může jednat o otravu těžkými kovy. Při dotazování pacient uvedl, že stejnými, ale mírnějšími příznaky jako nevolnost, bolest břicha, sucho ústech, trpěli i jeho rodiče. Dále uvedl, že před zhruba šesti dny jedl domácí zavařeninu. Po zjištění těchto informací měli lékaři podezření na alimentární botulismus [65].

Byly proto odebrány vzorky krve a stolice a odeslány do referenční laboratoře, kde se polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase potvrdila přítomnost *Clostridium botulinum* sérotypu B v pěti vzorkách stolice za sebou [65].

Na základě určené diagnózy byla zahájena léčba heptavalentním antitoxinem. Pacientův stav se následně významně zlepšil a během 24 hodin došlo k vymizení většiny příznaků [65].

Vzorky krve a stolice pacientových rodičů se také prokázaly jako pozitivní. Zahájila patřičná léčba, kterou následovalo úspěšné uzdravení [65].

#### 4.6.2 Botulismus rány u drogově závislého muže

Na pohotovost v jedné z londýnských nemocnici přišel 44letý muž s dvoudenními obtížemi s polykáním, bolestí v krku a sníženou schopností příjmu potravy. Muž injekčně užíval heroin, kokain a benzodiazepin. Poslední dávku heroinu si podal do levého třísla 4 dny před přijetím na pohotovosti [66].

Při vyšetření neměl horečku a nejevil známky zánětlivé reakce nebo sepse. Na levém třísle byl objeven vlhký, klidný injekční vpich. Byl prokázán otok čípku dutiny ústní a erytematozní hltan, proto byl pacient odeslán na ORL. Zde ho léčili nitrožilními antibiotiky na podezření z uvulitidy, tedy zánětlivého onemocnění čípku v dutině ústní [66].

Během 12 hodin od přijetí se začala u pacienta projevovat bulbární slabost, dyspnoe, ptóza, rozmazané vidění, dysfagie a dysartrie a také symetrická slabost horních končetin [66].

Následně byl pacient převezen s respiračními obtížemi, sníženou saturací kyslíku a minimální pohyblivostí v obličeji na jednotku intenzivní péče a byl intubován. Zahájila se léčba antibiotiky a podán heptavalentní botulotoxinový antitoxin. Na levém třísle v místě nalezeného vpichu se prokázala, pomocí CT, přítomnost opouzdřeného pseudoaneuryzmatu a malého abscesu. Proto byla rána chirurgicky ošetřena. Dále byl muž vyšetřen neurology, aby se vyloučily ostatní neurologické choroby. Nejpravděpodobnější diagnóza byla raný botulismus [66].

Později byl ve vzorku odebraného stěru z rány a hnisu, pomocí PCR metody prokázán gen *C. botulinum*, botulotoxin sérotypu B [66].

Pacient byl na jednotce intenzivní péče připojen k umělé plicní ventilaci po dobu 8 dnů. Dále mu po dobu 10 dnů byly podávány antibiotika a dihydrokodein jako substituce opiátové závislosti. Jeho stav se zlepšoval, rána se dobře hojila, byl schopný samostatně jíst a pít. Nicméně 3 dny po extubaci a 4 hodiny po poslední kontrole byl nalezen bez pulzu a asystolický. Kardiopulmonální resuscitace byla neúspěšná. Následná pitva prokázala předávkování opiáty. Na bérce se našel nový vpich. V krvi a moči byla zjištěna vysoká koncentrace morfinu. V jeho oděvu byl nalezen heroin [66].

#### 4.6.3 Případ kojeneckého botulismu v Koreji

Dne 7. června 2019 byla v nemocnici hospitalizovaná čtyřměsíční holčička s podezřením na gastrointestinální sepsi. Letargie, snížený příjem potravy a slabý pláč u pacientky přetrvávaly

sedm dní. Provedené laboratorní vyšetření rozboru krevních plynů, sérových elektrolytů, sedimentace erytrocytů, hladiny C – reaktivního proteinu a renálních funkcí byla všechna ve fyziologickém rozmezí. Materiály jako krev, moč, likvor, stolice byly na kultivaci negativní. Sono břicha ani ortofaryngoskopie nic neodhalily [67].

Třetí den neurologické vyšetření ukázalo snížený celkový svalový tonus (hypotonii), ztrátu kontroly nad hlavou a minimální odezvu na bolest. Dále nebyly u pacientky přítomny spontánní pohyby očí a objevila se ptóza a slabý dávivý reflex. Proto byly realizovány testy na vyloučení onemocnění jako encefalitida, Guillain Barre syndrom, myastheria gravis, spinální svalová atrofie a neurometabolické onemocnění. Všechny testy byly negativní. Taktéž magnetická rezonance mozku a páteře byla negativní [67].

Až videofluoroskopické vyšetření polykání ukázalo průnik do trachey i aspiraci bez toho, aniž by se pacientka snažila sousto vykašlat. Opakované dráždění motorického nervu poukázalo na nízkou amplitudu akčního svalového potenciálu. Oba tyto zjištěné poznatky vedly lékaře k domněnkám, že by se mohlo jednat o presynaptickou poruchu nervosvalového spojení například botulismus [67].

10. den po přijetí byly odebrány biologické vzorky séra a stolice do Korejského centra pro kontrolu a prevenci nemocí. Zde se pomocí biologického testu na myších prokázala ve stolici přítomnost botulotoxinu A i B. Zdroj nákazy se nepodařilo z odebraných vzorků mléka a vody zjistit [67].

Po potvrzení diagnózy byl pacientce podán heptavalentní botulotoxinový antitoxin. Tři týdny po aplikaci antidota a rehabilitacích se zlepšil příjem potravy a zvýšil se svalový tonus. Po měsíci pacientka opět podstoupila vyšetření polykání a tentokrát již nedošlo k průniku tracheou ani k aspiraci [67].

Hospitalizace trvala 40 dní, přičemž výživa byla podávána sondou po dobu 34 dní. Úplné vymizení symptomů botulismu nastalo po třech měsících, kdy u pacientky probíhal normální fyziologický vývoj [67].

#### **4.6.4 Iatrogenní botulismus v Evropě**

Od 28. února 2023 do 30. března 2023 bylo v Evropě evidováno 87 případů iatrogenního botulismu, který se rozvinul po aplikaci intragastrické botulotoxinové injekce pro terapii obezity. Příznaky pacientů se začaly objevovat týden po podání injekce. Obecně mezi hlavní



příznaky patřila únava, potíže s polykáním, dvojité a rozmazané vidění, potíže s dýcháním a slabost [68].

Během epidemiologického šetření tureckými zdravotnickými a kontrolními orgány se zjistilo, že intragastrická aplikace botulotoxinové injekce byla indikována v soukromých nemocnicích v Istanbulu a v Izmiru. Obě oddělení byla uzavřena a botulotoxinové přípravky byly odebrány a testovány. Zjistilo se, že se jedná o licencované botulotoxinové přípravky, které však nebyly schváleny pro tuto žaludeční terapii a byly tedy použity nepovoleně tak zvaně off – label. Na základě těchto zjištění Evropská léková agentura vydala prohlášení a sdělila, že žádný z licencovaných botulotoxinových preparátů není schválen pro terapii obezity intragastrickou aplikací injekce [68].

V Turecku bylo od 28.2. do 8.3 2023 hlášeno 53 případů a to konkrétně 50 případů v nemocnici v Istanbulu a 3 případy v nemocnici v Izmiru. 31 pacientů bylo hospitalizováno v nemocnici. Stav tří pacientů vyžadoval pobyt a léčbu na jednotce intenzivní péče. Celkově bylo sedmnáct nemocných léčeno heptavalentním antitoxinem [68].

Německo zaznamenalo 30 případů klinického botulismu pravděpodobného iatrogenního přenosu po aplikaci intragastrické injekce. Pacienti byli středního věku a prokazatelně podstoupili terapii hubnutí od 3.2 do 25.3.2023. Většina postižených byla ošetřena mezi 22. až 25. únorem. Klinický projev případů se pohyboval od mírných průběhů po závažné. Několik nemocných bylo přijato s obtížným dýcháním na jednotku intenzivní péče [68].

Rakousko oznámilo jeden případ botulismu patrně iatrogenního původu. Jednalo se o 22–44letou ženu, která podstoupila 22. února 2023 v turecké nemocnici zákrok intragastrickou botulotoxinovou injekcí pro léčbu hubnutí. Pacientka byla s ptózou, dysfagií, dyspnoí, šíjovou slabostí a celkovou svalovou slabostí hospitalizována v nemocnici [68].

Francie oznámila jeden případ ženy, která byla hospitalizovaná a sledována na jednotce intenzivní péče, protože prokazatelně podstoupila dne 22. února 2023 na klinice v Istanbulu léčbu botulotoxinovou injekcí [68].

Taktéž Švýcarsko ohlásilo dva případy nejspíše iatrogenního botulismu. Oba pacienti si nechali aplikovat intragastrickou injekci ve dnech 22. února a 25. února 2023. Dotyční byli hospitalizováni, léčeni a sledováni v nemocnici [68].



## 5 Laboratorní diagnostika

Diagnostika botulismu je obecně v případech jednotlivců velmi obtížná a někdy i chybně stanovená. Jedním z důvodů je pravděpodobně také to, že jsou příznaky v počáteční fázi onemocnění nespecifické a lze je zaměnit s běžnějšími chorobami jako například s mrtvicí, myasthenia gravis, Guillain – Barré syndromem, Eaton – Lambertův syndromem či paralýzou způsobenou klíšťaty. Případy botulismu se vyskytují ojediněle, a tak některé případy nemusí být vůbec rozpoznány a nebo jsou diagnostikovány až po smrti pacienta. Protože jsou pacienti odesíláni nejprve ke specialistům jako oftalmolog, otolaryngolog, neurolog. Po sérii vyšetření jsou se zhoršujícím stavem hospitalizováni v nemocnici [11].

Laboratorní diagnostika tohoto onemocnění trvá několik dní. Proto se léčba zahajuje již při podezření, které je podloženo klinickými příznaky u pacienta. Laboratorní testy jsou klíčové pro potvrzení klinické diagnózy v souvislosti s regulačními orány, identifikací sérotypů botulotoxinů a určení zdroje intoxikace. Botulismus je potvrzen za prvé na základě pozitivní detekce botulotoxinu v séru, ve stolici či žaludeční šťávě. Za druhé v případě přítomnosti druhu rodu *Clostridium*, který produkuje neurotoxin tj. *C. botulinum*, *C. butyricum* a dalších ve vzorku stolice či kultuře rány. A za třetí, pokud je v potravě, kterou pacient jedl nebo ve vzorku vody, prokázán botulotoxin [13].

Biologický test na myších (MPA) je považován za zlatý standard pro diagnostiku neurotoxinu, který se provádí pouze ve specializovaných referenčních laboratořích. Vzorky pacientů se aplikují myším intraperitoneálně tj. do dutiny břišní, kdy jedna skupina myší má antitoxin a druhá antitoxin nemá. Myši jsou po dobu 96 hodin pozorovány pracovníky, kteří sledují, zda se u nich projeví symptomy botulismu. Výsledky tohoto testu mohou být známy do 24 hodin. Tato metoda je schválena pro laboratorní diagnostiku. V současnosti je snaha od této metody ustoupit a nahradit ji jinými metodami, které zdokonalí detekci, omezí usmrcování zvířat a jejich citlivost bude srovnatelná s tímto biologickým testem, nebo dokonce ještě vyšší [13;69].

Imunologické ELISA metody jsou momentálně považovány za nejrychlejší, nejcitlivější a dobře reprodukovatelný prostředek k průkazu a kvantifikaci botulotoxinů ve vzorku. Nevýhoda metod spočívá v tom, že bez rozdílu detekuje jak neaktivní, tak i aktivní formy neurotoxinu. Některé verze imunologických ELISA metod prokázaly vyšší citlivost než výše zmíněný biologický test na myších. Tyto stanovené metody se ukázaly jako vhodné pro detekci toxinu ve vzorku potravin [69].

Pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), metody, která je založená na principu ionizace částic ve vzorku, tvorbě nabitých částic a proměření jejich poměru hmotnosti k náboje, lze určit sérotyp i podtyp botulotoxinu během 24 hodin. Citlivost této techniky je v porovnání s ostatními metodami nižší. Pro zvýšení citlivosti je možné kombinovat tuto metodu s dalšími měřícími postupy [69].

Pro rozlišení sérotypu A i sérotypu B se dnes využívá metoda na principu MALDI – TOF, kdy se čista kolonie rozpustí a ve vzniklém roztoku se spektrofotometricky proměří složení bakterií, které se porovnává s databází patogenů [69].

Další možností, kterou lze využít k průkazu a identifikaci sérotypu botulotoxinu ve vzorku je endopeptidázový test, založený na principu měření biochemické aktivity lehké domény neurotoxinu. Endopeptidázový test se využívá v kombinaci s hmotnostní spektrometrií k detekci štěpných produktů toxinu, protože sekvence substrátu a místa štěpení jsou pro každý sérotyp botulotoxinu jedinečná [69].

Enzymatickou aktivitu botulotoxinu lze měřit pomocí imunologického testu, který se nazývá Endopep – ELISA. Principem testu je specifické zacílení monoklonálních protilátek na tak zvané neoepitopy, které vznikají během štěpení cílených substrátů. Existují diagnostické panely s navázanými protilátkami, kde se po aplikaci vzorku odečítají přítomné štěpné produkty. Tato metoda má potenciál díky vysoké citlivosti v budoucnu nahradit biologický test na myších [69]

Studie ukázaly, že endopeptidázový test lze využít ve spojení s Försterovým rezonančním přenosem energie (FRET), kdy dochází k přenosu energie mezi molekulami, které jsou fluorescenčně značeny. Jedna molekula je dárce a druhá příjemcem. Po přijetí energie se měří vyzařované záření akceptorem. Výhody této techniky spočívají v rychlosti stanovení, vysoké citlivosti, ale hlavně ve schopnosti identifikovat aktivní formy botulotoxinu ve vzorku pacienta [69].

Další alternativou biologického testu mohou být buněčné testy, nicméně jejich zavedení do praxe je velice problematické, protože se musí udržovat diferencované myší či lidské neuronové buňky v dobrém stavu. Nicméně studie a výzkum prokázaly stejnou citlivost jakou má biologický test. V Tabulka 4 jsou všechny výše uvedené metody shrnuty [69].

Kvantitativní polymerázová reakce PCR je metoda, která se kvůli vysoké citlivosti běžně využívá k detekci genů *C. botulinum* v klinickém vzorku jejich kvantifikaci a stanovení sérotypu botulotoxinu. Využívá se q – PCR metody v reálném čase, kdy se v reálném čase

sleduje amplifikace, tedy rychlé zmnožení v reálném čase, za pomoci fluorescence. I přesto, že patří mezi nejcitlivější techniky, může vydávat falešně negativní výsledky, pokud je ve vzorku velmi malé množství DNA [70].

Digitální PCR s mikrokapkami se liší kvantifikací počtu DNA molekul od PCR v reálném čase. V této PCR je reakce rozdělena do milionu oddílů, kdy každý oddíl obsahuje cílovou molekulu nebo neobsahuje žádnou. Absolutní koncentrace genových kopií ve vzorku je dána součtem pozitivních a negativních oddílů. Navíc je tato metoda méně ovlivněna inhibitory vzorků, lépe detekuje malý počet kopií a má vyšší přesnost [70].

Tabulka 4 Laboratorní metody a jejich citlivost Upraveno z [69]

Princip metody	Doba analýzy	Sérotyp botulotoxinu	Citlivost	Výhody/omezení
Biologický test na myších	4 dny	A–F	1–10 pg/ml	Citlivá metoda detekuje funkční toxin Etický problém, časová náročnost
Imunologické metody Sendvičová ELISA	6–7 hod	A–F	2–179 pg/ml	Rychlá detekce Detekce aktivních i neaktivních forem toxinů
Hmotnostní spektrometrie	5–8 hod	A–F	0,1 – 1 pg/ml	Rychlá detekce Detekce aktivních i neaktivních forem toxinů
Endopeptidázový test s ELISA nebo hmotnostní spektrometrií	7–8 hod	A–G	0,1 – 1000 pg/ml	Rychlá detekce Detekce štěpení
Testy s FRET	2–5 hod	A	0,1 - 20 pg/ml	Rychlá detekce aktivních forem toxinu
Buněčné testy lidských neuronů z indukovaných pluripotentních buněk	3–5 dní	A–E	0,55 – 1500 pg/ml	Citlivá metoda detekuje funkční toxin Technicky náročná

## ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo charakterizovat bakterii *Clostridium botulinum*. Uvést využití botulotoxinu v praxi. Na kazuistikách pacientů s botulismem ukázat, jak obtížné je stanovit diagnózu a laboratorně ji potvrdit.

Původcem botulismu je bakterie *Clostridium botulinum*, která produkuje botulotoxin. Botulotoxin brání uvolnění acetylcholinu na nervosvalovou ploténku tím zamezí přenosu vzruchu do svalů a způsobí dočasnou paralýzu svalů. V současnosti se jedná o ojedinělé onemocnění. Mezi hlavní rizikové faktory patří špatná tepelná úprava masných a zeleninových výrobků, konzumace podomácku vyrobených zavařenin, injekční aplikace drog.

Stanovit diagnózu botulismu je v praxi obtížné a může být zaměněn za neurologické onemocnění. Je důležité zahájit léčbu při pouhém podezření na otravu botulotoxinem. Studie prokázaly, že pokud se u pacienta zahájí léčba trivalentním nebo heptavalentním antitoxinem včas, výrazně se zkrátí doba strávená na umělé plicní ventilaci na jednotce intenzivní péče a urychlí se tak proces rekonvalescence. Laboratorní průkaz *Clostridium botulinum* z odebraných vzorků je nezbytný k potvrzení diagnózy. Úskalí laboratorní diagnostiky tkví v časové náročnosti některých dosud používaných metod jako například biologického testu na myších, kdy je výsledek znám po několika dnech.

Botulotoxin se v současnosti kvůli svému mechanismu účinku hojně využívá ve velmi nízkých koncentracích v estetické medicíně a kosmetologii pro vyhlazení vrásek a zlepšení pleti a pokožky. Využívá se napříč dalšími medicínskými obory pro zlepšení chronických stavů například pro uvolnění spasticity či zmírnění bolesti. Ač je účinek botulotoxinu dočasný je důležité dodržovat pokyny od výrobce, aby nevznikaly nežádoucí účinky.

Výzkum a vývoj nových botulotoxinových přípravků je důležitý pro léčbu dalších onemocnění. Také je důležité nalézt nové metody, které zefektivní laboratorní diagnostiku *Clostridium botulinum*. Měly by být dostupné, levné, rychlé a vysoce citlivé.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CRUZ-MORALES, Pablo, Camila A ORELLANA, George MOUTAFIS, Glenn MOONEN, Gonzalo RINCON, Lars K NIELSEN, Esteban MARCELLIN a Eric BAPTESTE. Revisiting the Evolution and Taxonomy of Clostridia, a Phylogenomic Update. *Genome Biology and Evolution* [online]. 2019, **11**(7), 2035-2044 [cit. 2023-02-15]. ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evz096[
- [2] DÜRRE, Peter, Patrick EICHENBERGER a Adam DRIKS. Physiology and Sporulation in Clostridium. *Microbiology Spectrum* [online]. 2014, **2**(4) [cit. 2023-02-15]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012
- [3] PERNU, Noora, Riikka KETO-TIMONEN, Miia LINDSTRÖM a Hannu KORKEALA. High prevalence of Clostridium botulinum in vegetarian sausages. *Food Microbiology* [online]. 2020, **91** [cit. 2023-04-06]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2020.103512
- [4] PORTINHA, Inês M., François P. DOUILLARD, Hannu KORKEALA a Miia LINDSTRÖM. Sporulation Strategies and Potential Role of the Exosporium in Survival and Persistence of Clostridium botulinum. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(2) [cit. 2023-02-19]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23020754
- [5] JANGANAN, Tamarai K., Nic MULLIN, Ainhua DAFIS-SAGARMENDI, et al. Architecture and Self-Assembly of Clostridium sporogenes and Clostridium botulinum Spore Surfaces Illustrate a General Protective Strategy across Spore Formers. *MSphere* [online]. 2020, **5**(4), e00424-20 [cit. 2023-02-19]. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.00424-20
- [6] KHAVI L, Abdolmohammadi a Zahmatkesh AZADEH. Major pathogenic Clostridia in human and progress toward the clostridial vaccines. *Iran J Basic Med Sci.* [online]. 2022, September 2022, **2022**(25(9)), 1059-1068 [cit. 2023-02-19]. Dostupné z: doi:10.22038/IJBMS.2022.65518.14417
- [7] RASETTI-ESCARGUEIL, Christine, Emmanuel LEMICHEZ a Michel R. POPOFF. Public Health Risk Associated with Botulism as Foodborne Zoonoses. *Toxins* [online]. 2020, **12**(1) [cit. 2023-02-28]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12010017
- [8] CAI, Shuwei, Raj KUMAR a Bal Ram SINGH. Clostridial Neurotoxins: Structure, Function and Implications to Other Bacterial Toxins. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(11) [cit. 2023-03-18]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9112206
- [9] BOWE, Brooke Kathryn, Travis Gwynn WENTZ, Briana Marie GREGG, William Howard TEPP, Kristin Marie SCHILL, Shashi SHARMA a Sabine PELLETT. Genomic Diversity, Competition, and Toxin Production by Group I and II Clostridium botulinum Strains Used in Food Challenge Studies. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(10) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10101895
- [10] FILLO, Silvia, Francesco GIORDANI, Elena TONON, Ilenia DRIGO, Anna ANSELMO, Antonella FORTUNATO, Florigio LISTA a Luca BANO. Extensive Genome Exploration of Clostridium botulinum Group III Field Strains. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(11) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9112347
- [11] LONATI, Davide, Azzurra SCHICCHI, Marta CREVANI, et al. Foodborne Botulism: Clinical Diagnosis and Medical Treatment. *Toxins* [online]. 2020, **12**(8) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12080509

- [12] GREENDA, Tomasz, Magdalena GRABCZAK, Zbigniew SIERADZKI, Krzysztof KWIATEK, Krystyna POHORECKA, Marta SKUBIDA a Andrzej BOBER. Clostridium botulinum spores in Polish honey samples. *Journal of Veterinary Science* [online]. 2018, **19**(5) [cit. 2023-04-11]. ISSN 1229845X. Dostupné z: doi:10.4142/jvs.2018.19.5.635
- [13] RAO, Agam K., Jeremy SOBEL, Kevin CHATHAM-STEPHENS a Carolina LUQUEZ. Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism, 2021. *MMWR. Recommendations and Reports* [online]. 2021, **70**(2), 1-30 [cit. 2023-05-25]. ISSN 1057-5987. Dostupné z: doi:10.15585/mmwr.rr7002a1
- [14] DONG, Min, Geoffrey MASUYER a Pål STENMARK. Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2019, **88**(1), 811-837 [cit. 2023-02-28]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111654
- [15] CHOUDHURY, Supriyo, Mark R. BAKER, Suparna CHATTERJEE a Hrishikesh KUMAR. Botulinum Toxin: An Update on Pharmacology and Newer Products in Development. *Toxins* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2023-04-02]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins13010058
- [16] MULTANI, Iqbal, Jamil MANJI, Tandy HASTINGS-ISON, Abhay KHOT a Kerr GRAHAM. Botulinum Toxin in the Management of Children with Cerebral Palsy. *Pediatric Drugs* [online]. 2019, **21**(4), 261-281 [cit. 2023-04-02]. ISSN 1174-5878. Dostupné z: doi:10.1007/s40272-019-00344-8
- [17] LEKA, Oneda, Yufan WU, Xiaodan LI a Richard A. KAMMERER. Crystal structure of the catalytic domain of botulinum neurotoxin subtype A3. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2021, **296** [cit. 2023-04-02]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbc.2021.100684
- [18] ARORA, Gulhima. Botulinum toxin – Know the product before injecting. *Cosmoderma* [online]. 2021, **1** [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:10.25259/CSDM\_57\_2021
- [19] DRESSLER, Dirk a Eric A. JOHNSON. Botulinum toxin therapy: past, present and future developments. *Journal of Neural Transmission* [online]. 2022, **129**(5-6), 829-833 [cit. 2023-04-06]. ISSN 0300-9564. Dostupné z: doi:10.1007/s00702-022-02494-5
- [20] PALAZÓN-GARCÍA, Ramiro a Ana María BENAVENTE-VALDEPEÑAS. Botulinum Toxin: From Poison to Possible Treatment for Spasticity in Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(9) [cit. 2023-04-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22094886
- [21] RASETTI-ESCARGUEIL, Christine a Michel R. POPOFF. Engineering Botulinum Neurotoxins for Enhanced Therapeutic Applications and Vaccine Development. *Toxins* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins13010001
- [22] ANANDAN, Charenya a Joseph JANKOVIC. Botulinum Toxin in Movement Disorders: An Update. *Toxins* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins13010042
- [23] CARR, Warner W., Neal JAIN a J. Wesley SUBLETT. Immunogenicity of Botulinum Toxin Formulations: Potential Therapeutic Implications. *Advances in Therapy* [online]. 2021, **38**(10), 5046-5064 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0741-238X. Dostupné z: doi:10.1007/s12325-021-01882-9



- [24] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. Seznam léčivých botulotoxinových přípravků dle registračního čísla. In: *Státní zdravotní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, 2023 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>
- [25] DRESSLER, Dirk. Therapeutically relevant features of botulinum toxin drugs. *Toxicon* [online]. 2020, **175**, 64-68 [cit. 2023-04-09]. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2019.12.005
- [26] SOLISH, Nowell, Jean CARRUTHERS, Joely KAUFMAN, Roman G. RUBIO, Todd M. GROSS a Conor J. GALLAGHER. Overview of DaxibotulinumtoxinA for Injection: A Novel Formulation of Botulinum Toxin Type A. *Drugs* [online]. 2021, **81**(18), 2091-2101 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-021-01631-w
- [27] GALLAGHER, Conor J., Ronald R. BOWSHER, Amanda CLANCY, Jeffrey S. DOVER, Shannon HUMPHREY, Yan LIU a Gregg PRAWDZIK. Clinical Immunogenicity of DaxibotulinumtoxinA for Injection in Glabellar Lines: Pooled Data from the SAKURA Phase 3 Trials. *Toxins* [online]. 2023, **15**(1) [cit. 2023-04-09]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins15010060
- [28] SONG, Sinyoung, Yeon Hoon LEE, Joon Pio HONG a Tae Suk OH. Safety, efficacy, and onset of a novel botulinum toxin type A (Nabota) for the treatment of glabellar frown lines: a single-arm, prospective, phase 4 clinical study. *Archives of Craniofacial Surgery* [online]. 2018, **19**(3), 168-174 [cit. 2023-04-09]. ISSN 2287-1152. Dostupné z: doi:10.7181/acfs.2018.01886
- [29] PONS, Laurent, Claire VILAIN, Magali VOLTEAU a Philippe PICAUT. Safety and pharmacodynamics of a novel recombinant botulinum toxin E (rBoNT-E): Results of a phase 1 study in healthy male subjects compared with abobotulinumtoxinA (Dysport®). *Journal of the Neurological Sciences* [online]. 2019, **407** [cit. 2023-04-09]. ISSN 0022510X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jns.2019.116516
- [30] CHANG, Hyun, Bo HONG, Sang-Jee LEE, Soyoun LEE, Joo PARK a Jeong-Yi KWON. Efficacy and Safety of Letibotulinum Toxin A for the Treatment of Dynamic Equinus Foot Deformity in Children with Cerebral Palsy: A Randomized Controlled Trial. *Toxins* [online]. 2017, **9**(8) [cit. 2023-04-10]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins9080252
- [31] NAIK, Piyu Parth. Utilities of Botulinum Toxins in Dermatology and Cosmetology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2021, **14**, 1319-1330 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1178-7015. Dostupné z: doi:10.2147/CCID.S332247
- [32] LI, Kelun, Fanyu MENG, Yu Ru LI, et al. Application of Nonsurgical Modalities in Improving Facial Aging. *International Journal of Dentistry* [online]. 2022, **2022**, 1-18 [cit. 2023-05-03]. ISSN 1687-8736. Dostupné z: doi:10.1155/2022/8332631
- [33] HONG, Sung Ok. Cosmetic Treatment Using Botulinum Toxin in the Oral and Maxillofacial Area: A Narrative Review of Esthetic Techniques. *Toxins* [online]. 2023, **15**(2) [cit. 2023-05-03]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins15020082
- [34] BORBA, André, Suzana MATAYOSHI a Matheus RODRIGUES. Avoiding Complications on the Upper Face Treatment With Botulinum Toxin: A Practical Guide. *Aesthetic Plastic Surgery* [online]. 2022, **46**(1), 385-394 [cit. 2023-05-03]. ISSN 0364-216X. Dostupné z: doi:10.1007/s00266-021-02483-1



- [35] KAYA KELES, Cemre Su a Filiz ATES. Botulinum Toxin Intervention in Cerebral Palsy-Induced Spasticity Management: Projected and Contradictory Effects on Skeletal Muscles. *Toxins* [online]. 2022, **14**(11) [cit. 2023-05-06]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins14110772
- [36] SÄTILÄ, Heli. Over 25 Years of Pediatric Botulinum Toxin Treatments: What Have We Learned from Injection Techniques, Doses, Dilutions, and Recovery of Repeated Injections?. *Toxins* [online]. 2020, **12**(7) [cit. 2023-05-06]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12070440
- [37] WOLLMER, Marc Axel, Michelle MAGID, Tillmann H. C. KRUGER a Eric FINZI. Treatment of Depression with Botulinum Toxin. *Toxins* [online]. 2022, **14**(6) [cit. 2023-05-06]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins14060383
- [38] ZHANG, Qilin, Wenqi WU, Yuxin FAN, et al. The safety and efficacy of botulinum toxin A on the treatment of depression. *Brain and Behavior* [online]. 2021, **11**(9) [cit. 2023-05-06]. ISSN 2162-3279. Dostupné z: doi:10.1002/brb3.2333
- [39] HERD, Clare P, Claire L TOMLINSON, Caroline RICK, William J SCOTTON, Julie EDWARDS, Natalie J IVES, Carl E CLARKE a AJ SINCLAIR. Cochrane systematic review and meta-analysis of botulinum toxin for the prevention of migraine. *BMJ Open* [online]. 2019, **9**(7) [cit. 2023-05-06]. ISSN 2044-6055. Dostupné z: doi:10.1136/bmjopen-2018-027953
- [40] CHEN, Jing-Liang a Hann-Chorng KUO. Clinical application of intravesical botulinum toxin type A for overactive bladder and interstitial cystitis. *Investigative and Clinical Urology* [online]. 2020, **61**(Suppl 1) [cit. 2023-05-07]. ISSN 2466-0493. Dostupné z: doi:10.4111/icu.2020.61.S1.S33
- [41] ARAKLITIS, George, Georgina BAINES, Ana Sofia DA SILVA, Dudley ROBINSON a Linda CARDOZO. Recent advances in managing overactive bladder. *F1000Research* [online]. 2020, **9** [cit. 2023-05-07]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.26607.1
- [42] GREENDA, Tomasz, Anna GREENDA, Paweł KRAWCZYK a Krzysztof KWIATEK. Botulinum toxin in cancer therapy—current perspectives and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2022, **106**(2), 485-495 [cit. 2023-05-08]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-021-11741-w
- [43] PROIETTI, Ilaria, Nevena SKROZA, Alessandra MAMBRIN, et al. Aesthetic Treatments in Cancer Patients. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2021, **14**, 1831-1837 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1178-7015. Dostupné z: doi:10.2147/CCID.S342734
- [44] CARR, Warner W., Neal JAIN a J. Wesley SUBLETT. Immunogenicity of Botulinum Toxin Formulations: Potential Therapeutic Implications. *Advances in Therapy* [online]. 2021, **38**(10), 5046-5064 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0741-238X. Dostupné z: doi:10.1007/s12325-021-01882-9
- [45] BELLOWS, Steven a Joseph JANKOVIC. Immunogenicity Associated with Botulinum Toxin Treatment. *Toxins* [online]. 2019, **11**(9) [cit. 2023-05-09]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins11090491
- [46] JANIK, Edyta, Michal CEREMUGA, Joanna SALUK-BIJAK a Michal BIJAK. Biological Toxins as the Potential Tools for Bioterrorism. *International Journal of Molecular*

*Sciences* [online]. 2019, **20**(5) [cit. 2023-05-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20051181

[47] KIM, Na Young, Won Rak SON, Min Hoon LEE, et al. A multipathogen DNA vaccine elicits protective immune responses against two class A bioterrorism agents, anthrax and botulism. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2022, **106**(4), 1531-1542 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-022-11812-6

[48] POHANKA, Miroslav. Immunosensors for Assay of Toxic Biological Warfare Agents. *Biosensors* [online]. 2023, **13**(3) [cit. 2023-05-09]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios13030402

[49] LI, Lucy Qian, Andrew CADAMY a Andrew SEATON. Wound botulism presenting as dysphagia to an ENT ward. *BMJ Case Reports* [online]. 2020, **13**(2) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1757790X. Dostupné z: doi:10.1136/bcr-2019-232367

[50] GHANTARCHYAN, Henrik, Alexander T PHAN, Janie HU, Kunal THAKER, Inessa DOMBROVSKY, Kristina ROLOFF a Sarkis ARABIAN. Wound Botulism in the Setting of Pregnancy: A Literature Review and Case Report. *Cureus* [online]. [cit. 2023-05-15]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.29273

[51] GOLDBERG, Bar, Dana DANINO, Yoel LEVINSKY, et al. Infant Botulism, Israel, 2007–2021. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2023, **29**(2), 235-241 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2902.220991

[52] CHARAN, N, JMJ WONG, WSD CHAN, et al. Infant botulism in Singapore. *Singapore Medical Journal* [online]. 2020, **61**(3), 165-166 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00375675. Dostupné z: doi:10.11622/smedj.2020017

[53] HARRIS, Richard A., Fabrizio ANNIBALLI a John W. AUSTIN. Adult Intestinal Toxemia Botulism. *Toxins* [online]. 2020, **12**(2) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12020081

[54] TIMMERMANS, Grégory, Frédérique DEPIERREUX, François WANG, Isabelle HANSEN a Pierre MAQUET. Cosmetic Injection of Botulinum Toxin Unmasking Subclinical Myasthenia Gravis: A Case Report and Literature Review. *Case Reports in Neurology* [online]. 2019, **11**(2), 244-251 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1662-680X. Dostupné z: doi:10.1159/000502350

[55] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Botulism. In: *World Health Organization* [online]. 2018, 10.1.2018 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>

[56] CHALK, Colin H, Tim J BENSTEAD, Joshua D POUND a Mark R KEEZER. Medical treatment for botulism. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. [cit. 2023-05-30]. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD008123.pub4

[57] BELIVEAU, Martin, Deborah ANDERSON, Doug BARKER, Shantha KODIHALLI, Emilie SIMARD, Christine HALL a Jason S. RICHARDSON. Exposure-Response Modeling and Simulation to Support Human Dosing of Botulism Antitoxin Heptavalent Product. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2022, **112**(1), 171-180 [cit. 2023-05-30]. ISSN 0009-9236. Dostupné z: doi:10.1002/cpt.2620

[58] GHANTARCHYAN, Henrik, Alexander T PHAN, Janie HU, Kunal THAKER, Inessa DOMBROVSKY, Kristina ROLOFF a Sarkis ARABIAN. Wound Botulism in the Setting of Pregnancy: A Literature Review and Case Report. *Cureus* [online]. [cit. 2023-06-06]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.29273

- [59] BARASH, Jason R., Joe B. CASTLES a Stephen S. ARNON. Antimicrobial Susceptibility of 260 Clostridium botulinum Type A, B, Ba, and Bf Strains and a Neurotoxicogenic Clostridium baratii Type F Strain Isolated from California Infant Botulism Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2018, **62**(12), e01594-18 [cit. 2023-06-24]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01594-18
- [60] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV. Případy botulismu v Evropě po lékařských zákrocích botulotoxinem, ECDC, 14. 3. 2023. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha 10, 2023 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://szu.cz/tema/a-z-infekce/b/botulismus/pripady-botulismu-v-evrope-po-lekarskych-zakrocich-botulotoxinem-ecdc-14-3-2023/>
- [61] MUDR. ŠPAČKOVÁ, Michaela. Výskyt botulismu po konzumaci ryb. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha 10, 2017 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://szu.cz/tema/a-z-infekce/b/botulismus/vyskyt-botulismu-po-konzumaci-ryb/>
- [62] MUDR. PŘÍKAZSKÁ, Marta a MUDr. Zdenka MANDÁKOVÁ. Botulismus u narkomanů v Glasgowě ve Skotsku. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha 10, 2015 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://szu.cz/tema/a-z-infekce/b/botulismus/botulismus-u-narkomanu/>
- [63] EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Botulism Annual Epidemiological Report for 2020. In: *European Centre for Disease Prevention and Control* [online]. Stockholm, Sweden, 2023 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/botulism-annual-epidemiological-report-2020.pdf>
- [64] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Notifiable Diseases Surveillance System, 2020 Annual Tables of Infectious Disease Data. Atlanta, GA. CDC Division of Health Informatics and Surveillance, 2023. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/nndss/data-statistics/infectious-tables/index.html>.
- [65] FRIZIERO, Alberto, Cosimo SPERTI, Gianfranco DA DALI, et al. Foodborne botulism presenting as small bowel obstruction: a case report. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2021, **21**(1) [cit. 2023-06-01]. ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/s12879-020-05759-0
- [66] LI, Lucy Qian, Andrew CADAMY a Andrew SEATON. Wound botulism presenting as dysphagia to an ENT ward. *BMJ Case Reports* [online]. 2020, **13**(2) [cit. 2023-06-01]. ISSN 1757-790X. Dostupné z: doi:10.1136/bcr-2019-232367
- [67] JANG, Hyeon Gu, Jooyoung JANG, Hyun, Joo JUNG a Da Eun JUNG. The First Reported Case of Infant Botulism in Korea: Treatable Infantile Neuromuscular Disease. *Journal of Korean Medical Science* [online]. 2020, **35**(14) [cit. 2023-06-01]. ISSN 1011-8934. Dostupné z: doi:10.3346/jkms.2020.35.e93
- [68] EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Communicable Disease Threats Report Week 13, 26 March–1 April 2023. *WEEKLY BULLETIN* [online]. Solna, Sweden, 2023, **2023**(13), 3-5 [cit. 2023-06-23]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/communicable-disease-threats-report-week-13-2023.pdf>
- [69] RASETTI-ESCARGUEIL, Christine a Michel R. POPOFF. Recent Developments in Botulinum Neurotoxins Detection. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(5) [cit. 2023-05-26]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10051001

[70] GAO, Pengya, Changde WU, Jin ZHANG, et al. Evaluation and Optimization of Microdrop Digital PCR for Detection of Serotype A and B Clostridium botulinum. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2022, **13** [cit. 2023-06-01]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.860992