

Botulotoxin v potravinách a v kosmetice

Svatopluk Světlík

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Svatopluk SVĚTLÍK**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Botulotoxin v potravinách a kosmetice**

Zásady pro vypracování:

- Chemická charakteristika botulotoxinu.
- Způsoby vzniku.
- Metody stanovení.
- Uplatnění botulotoxinu v kosmetice.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] DESPHANDE, SS. Handbook of food toxicology, Marcel Dekker, New York 2002.

[2] HELFERICH, W. Food toxicology, CRC Press, London 2000.

[3] BALÍKOVÁ, M. Forezní a klinická toxikologie, Galén, Praha 2004.

[4] PATOČKA, J. a kol. Vojenská toxikologie, Grada, Praha 2004.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

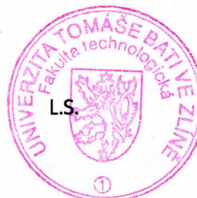
18. února 2009


Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřená na charakteristiku botulotoxinu, jeho chemické vlastnosti, biologickou aktivitu a toxicitu. V další části jsou sepsány v literatuře z posledních let popsané případy výskytu botulismu, jejich epidemiologické hledisko a pravděpodobné příčiny. Poslední část je pak zaměřena na využití botulotoxinu v kosmetice a zhodnocení jejich rizik.

Klíčová slova: *Clostridium botulinum*, kosmetika, botulismus, potraviny

ABSTRACT

This study is focused on characterisation of botulinum neurotoxins (BoTN), it's chemical properties, biological activity and toxicity. In next part are reviewed outbreaks of botulism described in recent literature, their epidemiologic aspects and possible causes. The last part is focused on application of botulinum neurotoxins in cosmetics and aesthetics and it's risks.

Keywords: botulinum neurotoxins (BoTN), cosmetics, botulism, food

Chtěl bych poděkovat především panu doc. Ing. Janišovi CSc. za jeho cenné odborné rady a mé vedení při psaní této práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
1 CHARAKTERISTIKA BOTULOTOXINU	9
1.1 PŮVODCE	9
1.2 CHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA BOTULOTOXINU	10
1.3 TOXIKOLOGIE BOTULOTOXINU	12
1.3.1 Formy intoxikace.....	13
1.3.1.1 Alimentární intoxikace	13
1.3.1.2 Otrava vycházející z infikované rány.....	14
1.3.1.3 Kojenecký botulismus.....	14
1.3.1.4 “Inadvertent botulism” (“mimovolný botulismus”).....	15
1.4 METODY DETEKCE BOTULOTOXINU	15
1.4.1 Test na myších.....	15
1.4.1.1 Princip metody	16
1.4.1.2 Výhody a nevýhody.....	16
1.4.2 ELISA.....	16
1.4.2.1 Princip metody ELISA.....	17
1.4.2.2 Typy metody ELISA	17
2 BOTULOTOXIN V POTRAVINÁCH	19
2.1 BOTULOTOXIN TYPU A	19
2.1.1 Komerční chilli omáčka	19
2.1.2 Zmražené chilli.....	19
2.1.3 Doma zavařované dětské jídlo	20
2.1.4 Doma zavařené bambusové výhonky	21
2.1.5 Konzerva ryby v tomatu	21
2.1.6 Mrkvový džus.....	22
2.1.7 Kuřecí kukuřičné chilli placky (“chicken enchiladas”).....	23
2.1.8 Fermentované tofu.....	23
2.1.9 “Pruno” (“věžeňské víno”).....	24
2.1.10 “Kondenzovaný” jogurt (“suzme jogurt”).....	25
2.2 BOTULOTOXIN TYPU B	26
2.2.1 Česnek v chilli olejové zálivce.....	26
2.2.2 Vajíčka síha	26
2.2.3 “Halal” maso	26
2.2.4 Fermentované maso - “Cinkrugan”	27
2.2.5 Doma zavařená rajčata	28
2.2.6 Konzervované zelené olivy	28
2.3 BOTULOTOXIN TYPU E.....	29
2.3.1 Uzený, vakuově balený síh.....	29
2.3.2 Doma nasolený síh	29
2.3.3 Sušená ryba.....	30
2.3.4 Mršina běluhy (<i>Delphinapterus leucas</i>)	30

2.4	BOTULOTOXIN TYPU F.....	31
2.4.1	„Korýši“	31
2.5	NEURČENÉ TYPY	31
2.5.1	“Rakfisk”	31
2.5.2	Botulismus spojený s grilováním	32
2.5.3	Botulotoxin v pečených, konzervovaných houbách.....	32
3	VYUŽITÍ BOTULOTOXINU V KOSMETICE	34
3.1	UŽÍVANÉ PREPARÁTY	34
3.2	VYUŽITÍ.....	34
3.2.1	Odstranění vrásek.....	34
3.2.2	Potlačení pocení	35
3.3	BEZPEČNOST	36
	ZÁVĚR	37
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	45
	SEZNAM OBRÁZKŮ	46
	SEZNAM TABULEK.....	47
	SEZNAM PŘÍLOH.....	48

ÚVOD

Neurotoxiny bakterií *Clostridium botulinum* jsou neúčinnější jedy známé člověku. Byly poprvé popsány Justinem Kernerem jako „klobásový jed“ a „tučný jed“ mezi léty 1817 a 1822, který také přišel s myšlenkou lékařského použití botulotoxinu, ačkoliv definovat se mu jej nepodařilo.[1]

I mezi laickou veřejností vzrůstá zájem o informace o tomto jedu, hned ze dvou důvodů, jednak kvůli rozmachu jeho používání v kosmetice k vyhlazování vrásek a jednak kvůli možnému teroristickému zneužití, ke kterému ostatně již údajně došlo hned dvakrát, ač neúspěšně, známou apokalyptickou sektou Óm Širikjó („Nejvyšší pravda“). Také Irák měl vlastnit 19 000 litrů koncentrovaného botulotoxinu.[2]

1 CHARAKTERISTIKA BOTULOTOXINU

1.1 Původce

Botulotoxin je produkován bakteriemi *Clostridium botulinum*. Tento druh zastřešuje čtyři biologicky odlišné skupiny bakterií, které mají společnou produkci tohoto neurotoxinu, navzájem stejných fyziologických vlastností, ale rozdílných antigenních typů (A-G). Název pro typ toxinu se přenesl i na klostridium, jež jej produkuje.

1. skupina obsahuje proteolytické kmeny, které tvoří botulotoxin typů A, B a F. K nim do skupiny bývá přiřazeno velmi rozšířené, netoxické *C. sporogenes*, spolehlivě odlišitelné od botulinských klostridií skupiny elektroforetickým vzorcem cytoplasmatických bílkovin a neschopností produkovat toxin.
2. skupinu představují sacharolytické kmeny, které produkují botulotoxin E, B, F.
3. skupinu tvoří kmeny produkující botulotoxin typů C a D a *C. novyi*, které však tvoří letální a nekrotizující toxin.
4. skupina obsahuje proteolytické klostridium, které produkuje botulotoxin typu G. S ním ve skupině se uvádí netoxické *C. subterminale*. [3]

Do nedávné doby byly tyto skupiny dvě, obě s vlastním názvem druhu: *C. botulinum* a *C. parobotulinum*, od čehož bylo pro značnou nesourodost i v rámci těchto druhů upuštěno a zavedena jednotná nomenklatura – *C. botulinum*. [4]

Netoxické bakterie uvedené výše ve skupinách s toxickými jsou značně podobné fenotypicky i geneticky klostridiím ze skupiny. Do *C. novyi* A byl dokonce přenesen fág kódující produkci botulotoxinu C z *C. botulinum* typu C, a tato klostridie normálně toxin neprodukující jej vytvářet začala. [3] A naopak byla “transformována” bakterie *C. botulinum* typu C a D v *C. novyi* zbavením jich fágu kódujícího toxin a jeho nahrazením fágem kódujícím toxin *C. novyi*.

Bylo také zjištěno, že některé kmeny bakterie *C. butyricum* a *baratii* vylučují botulotoxin. [5]

Všechny typy *Clostridium botulinum* jsou saprofytické, půdní bakterie. Jedná se o grampozitivní (často ale jen v mladých kulturách), sporující tyčinky. Spory jsou terminální, ve zralosti deformují buňku, a velmi termostabilní, zvláště u proteolytických typů. Jejich odolnost vůči teplu je však velmi ovlivněna i podmínkami za jakých vznikly i na prostředí, ve kterém mají vyklíčit. Sacharosa zvyšuje termoresistenci, stejně jako některé mastné kyseliny (palmitany, stearany, ...) naproti tomu např. linoleát ji snižuje, podobně jako pH menší než 7. Při neutrálním pH (pH = 7) je odolnost vůči teplu nejvyšší, i více než 6 hodin při 100°C. Neprroteolytické typy tvoří spory méně termostabilní, například spory klostridií typu E vydrží jen o něco málo déle než vegetativní buňky.[4]

1.2 Chemická charakteristika botulotoxinu

Botulotoxiny (A-G), anglicky označované jako botulinum neurotoxins (BoTN), jsou metaloproteiny (obsahují v molekule atom zinku) s proteasovou aktivitou, dříve však považovány za jednoduché proteiny (obsahující pouze aminokyselinové zbytky), navzájem podobných struktur (sdílejí z 30-60 % primární strukturu[6]) a tedy i fyziologických vlastností. Rozdíly ve struktuře jsou ale dostačující k tomu, aby navzájem působily antigenně.

Neurotoxiny jsou syntetizovány jako přibližně 150 kDa jednotné řetězce, které jsou poté rozštěpeny na dva, lehký na N-konci a těžký na C-konci, spojené disulfidickými vazbami[6]. Všechny serotypy začínají methioninem, jak lze ostatně očekávat vzhledem k translačním principům – methionin je iniciační aminokyselinou. U typů A, B, C, E a G je ale methionin odstraněn z řetězce posttranslačními úpravami.[7]-[9]

Molekula BoTN se skládá ze tří domén: katalytické (nacházející se na lehkém řetězci[6]), translokační a vazné (lokalizované na řetězci těžkém [6]). Toxicita je způsobena katalytickou aktivitou lehkého řetězce – Zn(II) endopeptidasy. Katalytické doména je kompaktní globule sestávající ze směsi α -helixů, β -listů a vláken s hrdlu podobným aktivním místem metaloproteasy.[10]

Struktura lehkého řetězce bez zinku je obdobná jako u holoproteinu (kromě toho, že tedy neobsahuje Zn^{2+} iont), což poukazuje na to, že atom zinku má funkci katalytickou, nikoliv strukturní.[6]

Botulotoxiny jsou ničeny světlem, teplem, zářením a vysoce alkalickým prostředím. Nicméně přesto, že jsou polypeptidy, je jejich rezistence k rtg záření i teple poměrně vysoká. Např. je ničí až 10 minutový var.[3]

Botulotoxin A je protein o 1296 aminokyselinových (AK) residuech s disulfidickou vazbou pojící jednotlivé řetězce mezi 430-tým a 454-tým aminokyselinovým zbytkem. V molekule se nachází ještě jedna disulfidická vazba, konkrétně v těžkém řetězci (HC), mezi zbytky v pozici 1235 a 1280. Sekvence 2 – 448 (1. AK je methionin, jak už bylo zmíněno) AK představuje lehký řetězec (LC), 449 – 1296 AK pak těžký.[6]

Botulotoxin B je tvořen 1291 AK, s disulfidickou vazbou mezi zbytky 437 a 446. LC tvoří sekvence 2 – 441, HC pak 442 – 1291 AK.[8]

Botulotoxin C je stejně dlouhý jako typ B, tedy 1291 AK, ale liší se v délce lehkého a samozřejmě i těžkého řetězce: 2 – 449 AK u lehkého a 450 – 1291 AK u těžkého. V pozici disulfidické vazby na LC se neliší, ale na HC vychází příčný můstek z pozice 453 AK. Tento typ je rozdělován dále na C1 a C2 (popř. C α a C β [4]). Antitoxin proti C1 neutralizuje C1 i C2, ale antitoxin proti C2 neneutralizuje C1. Mimo to jsou již známy kmeny tvořící toxin C $\alpha\beta$. [4]

Typ D obsahuje 1276 aminokyselinových residuech, z čehož prvních 442 AK připadá na lehký řetězec a 443 – 1276 na těžký. Disulfidický můstek je mezi AK v pozici 437 a 450.[6]

Typ E je sekvencí 1251 AK, 2 – 422 je lehký řetězec, 423 – 1251 těžký. Disulfidická vazba překlenuje zbytky 412, 426.[9]

Botulotoxin F je tvořen 1274 aminokyselinovými zbytky, z toho 1 – 436 tvoří lehký řetězec, 437 – 1274 pak těžký. Disulfidická vazba je vytvořena mezi 429-tým a 445-tým AK zbytkem.[6]

Poslední typ G, je vzácný[5] a také nedávno objevený, tedy i málo prozkoumaný. Z celkového počtu 1297 AK připadá sekvence 2 – 442 AK na lehký řetězec, 443 – 1297 na těžký, jsou spojeny disulfidickou vazbou mezi 436 a 450 AK.[6]

1.3 Toxikologie botulotoxinu

Botulotoxin, konkrétně typ A, je často považován za nejtoxičtější látku na světě, v některých materiálech lze nalézt údaj, podle něhož je tento neurotoxin “až” druhý – po tetanotoxinu (tetanospasminu) a občas jsou tyto toxiny považovány za ekvivalentně biologicky aktivní. Tyto rozpory, nejlépe znatelné na minimální letální dávce usmrcující 50 % intoxikovaných (LD_{50}), variující od 1 ng/kg živé váhy po 1000 ng (v materiálu [11] bylo dokonce uvedeno $LD_{50} = 0,001$ g/kg živé váhy laboratorní myši, což lze však považovat spíše za tiskovou chybu, protože v této tabulce bylo také napsáno, že sarin má LD_{50} 100 g/kg, hodnoty byly pravděpodobně myšleny v mikrogramech), jsou způsobeny hlavně tím, že tato hodnota nebyla přesně zjištěna a bývá jen odvozována extrapolací z toxicity vůči primátům. Ve starší literatuře se tak můžeme také dočíst, že typ D je až 20000krát toxičtější než typ A[4], s odvoláním na test na myších. Tento omyl byl pravděpodobně způsoben neznalostí druhové specifity - typ D je účinnější na myš než A, naproti tomu člověk je citlivější vůči typu A.

Mechanismus toxického účinku je relativně jednoduchý. V první řadě musí dojít k hydrolyse sulfidické vazby mezi HC (těžkým řetězcem) a LC (lehkým řetězcem), což se u proteolytických kmenů děje již v bakteriální buňce, u neproteolytických kmenů k tomu dochází účinkem trypsinu v tenkém střevě, což vysvětluje zvýšenou toxicitu sérotypů neproteolytických kmenů při perorálním vniku do organismu než intravenosní/intramuskulární cestou[4], což naopak například u typu A je mnohem závažnější brána vstupu, část vniklého množství je totiž destruováno v trávicím traktu.

Lehký řetězec – proteáza má substrátovou specifitu vůči jednomu ze tří SNARE (Soluble NSF attachment protein receptors[12]) bílkovin (ke kterému konkrétně se liší v rámci jednotlivých typů – typ A např. SNAP 25), které jsou důležité pro uvolnění vezikul obsahujících neurotransmiter acetylcholin. Při hydrolyse těchto proteinů nemůže dojít k uvolnění vezikul do plazmatické membrány periferních nervů, není tak umožněn přenos nervových impulsů na svalové vlákno, čímž dojde k jeho ochrnutí.

Těžký řetězec slouží k penetraci buňky, vazná doména se dle sérotypu naváže na povrch buňky a v následné endocytose zprostředkované receptory translokační doména asistuje LC v prostupu membránou.[6]

Tímto způsobem dojde k pro botulotoxin typické sestupné paralýze, často končící smrtí v následku bulbární paralýzy - poruchami dýchání a zástavou srdce.[3]

Člověk je nejvíce citlivý vůči typům A, B, E a F, zvířata pak vůči C a D. Typ G je vzácný, jen s několika zaznamenanými intoxikacemi u člověka.[5]

1.3.1 Formy intoxikace

K intoxikaci botulotoxinem může docházet pěti způsoby: otravou v jídle vyprodukovaným botulotoxinem, botulismus z infekce rány, kojenecký botulismus, skrytý botulismus a botulismus "mimovolný" přičemž jen v prvním a posledním případě se jedná o čistou intoxikaci. Ve třech zbývajících jde o toxiinfekce.

1.3.1.1 Alimentární intoxikace

V potravině kontaminované bakteriemi *Clostridium botulinum* začnou tyto produkovat za příhodných podmínek botulotoxin. A to dokonce i za chladničkových teplot, tedy okolo 4 °C, naproti tomu při pH nižším než 5,5 se produkce zastavuje.

[3] Další z nebezpečných vlastností této kontaminace je absence alterace chuti při přítomnosti botulotoxinu v konzervě, netvoří se ani "bombáže".[13]

Z potravy, nejčastěji domácích konzerv (jak masových, tak zeleninových) a komerčně prodáváných polokonzerv, včetně různých omáček, je v zažívacím traktu toxin vstřebáván do krve, putuje do centrálního nervového systému k zakončení motorických nervů. Jen malá část pozřitého toxinu je vstřebána, toto množství je však často ještě dostačující k projevu příznaků.

Inkubační doba se pohybuje ve velkém rozpětí, od několika hodin až po deset dnů, nejčastěji však v rámci 18-36 hodin.

K prvním symptomům, v důsledku chabých obrn svalů inervovaných mozkovými nervy, patří dvojité vidění, pokles víček, potíže s polykáním, u jedné třetiny pacientů intoxikovaných typem A nebo B se vyskytnou gastrointestinální potíže, u typu E téměř vždy. Paralýza postupuje směrem dolů a dochází k obrnám kosterních svalů, v konečném důsledku, jak už bylo zmíněno výše, k poruše dýchání a zástavě srdce.

K léčbě se používají nitrosvalově vysoké dávky (50 000j.) trivalentního (proti typům A, B a E) koňského IgG 2-3x denně do vymizení příznaků, po zjištění sérotypu

BoTN je výhodné přejít na monovalentní protilátky.[3] Jednoznačně však byla prokázána efektivnost antitoxinové terapie pouze u typu E.[5] Navíc je nutno podat tyto protilátky nebo krátce (a nejlépe dokonce před) po expozici, aby byly účinné, což mnohdy není možné. Navíc v široké veřejnosti existují obavy o bezpečnosti užívání antitoxinů. Proto probíhají výzkumy hledající nízkomolekulární inhibitory lehkého řetězce BoTN – proteasy.[12]

Antibiotika se administrují výjimečně, a to těmi, kteří považují za možné, že se *C. botulinum* dokáže rozmnožovat i ve zdravém střevě dospělých.

Při plně rozvinuté otravě je nutno léčbu zaměřit hlavně symptomaticky – na podporu dýchání atp. Díky rozvoji podpůrné péče došlo k snížení mortality z 60 %[4] na 10 %[5]

1.3.1.2 Otrava vycházející z infikované rány

Velmi vzácně se lze setkat s případem, kdy se člověku v ráně (otevřená zlomenina, střelné poranění[4], byly hlášeny také případy u narkomanů s intravenosním podáváním drogy[5]) pomnoží bakterie *C. botulinum*. Klostridia nepronikají hlouběji, jsou vázány na nekrotickou tkáň (kvůli nízkému redox potenciálu), kde produkují toxin, který je poté vstřebáván do krevního oběhu.

Inkubační doba opět je velmi rozdílná, od několika dnů až po dva týdny. Delší inkubační doba je způsobena prvotním vyklíčením spor, pomnožením a uvolňováním toxinu při rozpadu buněk. Kromě toho rozdílu vůči alimentární intoxikaci lze nalézt již jen jeden: absenci gastrointestinálních potíží, popř. zanícení rány a horečku, která se běžně u alimentární intoxikace nevyskytuje, jelikož nejde o infekci, naopak je teplota často snížena.

Léčba je také obdobná jako u alimentární intoxikace, navíc se podávají antibiotika k potlačení růstu bakterií v ráně.[5]

1.3.1.3 Kojenecký botulismus

Vzhledem k nedovyvinuté mikroflóře ve střevě kojenců, nejčastěji ve věku 2 až 4 měsíců (po devátém měsíci se takřka nevyskytuje), bakterie *C. botulinum* jsou schopny střevo osídlit a produkovat v něm toxin.

První příznak, zácpa, je často přehlížena. Následuje letargie, dítě spí více než normálně. Oslabuje dáivý a sací reflex, potíže s polykáním se často projeví jako slintání, v těžkých případech se může objevit zástava dýchání.

Kojenecký botulismus může být letální, někdy dokonce dochází i k náhlé smrti – ve 4 – 15 % je SIDS (syndromu náhlého úmrtí kojenců) způsoben právě tímto onemocněním.[5]

Jako zdroj toxoinfekce se často uvádí med, až každý desátý vzorek medu obsahuje spory *C. botulinum*. [3]

U lidí s kompromitovanou flórou zažívacího ústrojí, ať už z dlouhodobého používání antibiotik nebo achlorhydrií, se občas také vyskytnou případy kolonizace střev touto bakterií, tento typ botulismu dostal vlastní název skrytý botulismus.

Nejdůležitějším aspektem léčby je nepřetržitá podpurná péče, antibiotika nejsou doporučována vzhledem k dalšímu potlačení přirozené mikroflóry a možné superinfekci *C. botulinum*. Mortalita je kupodivu nižší než 5 %.[5] Otázkou zůstává, kolik úmrtí na kojenecký botulismus bylo diagnostikováno pouze jako SIDS.

1.3.1.4 “Inadvertent botulism” (“mimovolný botulismus”)

Jedná se o nejnovější formu botulismu (ještě nemá pravděpodobně ani český název), související s používáním, intramuskulárním podáváním, botulotoxinu k lékařským (různé pohybové poruchy, křeče apod.) a kosmetickým účelům (vyhlazování vrásek, ...).

Bylo zaznamenáno zatím jen několik případů. Dva pacienti po aplikaci dávky botulotoxinu menší, než je doporučená, začaly projevovat slabost a elektrofysiologické abnormality. U dalších čtyř pacientů došlo k ovlivnění autonomního nervového systému po aplikaci toxinu, ale bez slabosti. Došlo k zvýšené blokaci ve svalech vzdálených od místa podání, biopsie navíc odhalily v těchto svalech morfologické abnormality.[14]

1.4 Metody detekce botulotoxinu

1.4.1 Test na myších

Jedná se o nejstarší metodu, která je zatím stále standartem pro průkaz botulotoxinu v potravině.[15]

1.4.1.1 Princip metody

Eluát z potravin se podává skupinám myší, z nichž každá dostane také monovalentní antitoxin. Při kontaminaci této potravin botulotoxinem zajdou myši za příznaků botulismu (naježená srst, obtížné dýchání, slabost údů, celková paralýza[16]), kromě jedné skupiny – chráněné antitoxinem “správného” typu – tak se tedy určí i typ botulotoxinu v potravě.

Tato metoda se používá i k diagnóze botulismu u lidí, toxin se přitom hledá v séru či v plasmě, výplachu střev a zvracích, u zemřelého také v játrech. Oproti potravinám, kde bývá až několik tisíc smrtelných dávek pro myš, je v těchto materiálech toxinu málo, jen několik smrtelných dávek.[3][4][17]

1.4.1.2 Výhody a nevýhody

Detekční limit této metody je pouhých 0,02 ng toxinu. Kromě výhody v této tak vysoké sensitivitě je další také v koncepční jednoduchosti, naproti tomu neselektivnost, kdy je zapotřebí dalšího neutralizačního testu k určení sérotypu patří k limitům této metody. K dalším se pak řadí časová náročnost, až 4 dny mohou být nutné k získání výsledků, finanční náročnost, potřeba specializovaného personálu a také velkého množství myší při větším počtu vzorků.[16] Toto také vyvolává etické a politické otázky a odpor veřejnosti. V některých zemích Evropy není možné tento test provádět.[18]

1.4.2 ELISA

Pro výše uvedené nedostatky testu na myších, zvláště pak časovou náročnost, která v hrozbě možného zneužití botulotoxinu teroristy je metodou zcela nevyhovující, se vyvíjí nové metody, popř. se adaptují již používané. Takovou metodou je i ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), patřící do “rodiny” imunologických technik, vyvinutá nezávisle na sobě dvěma výzkumnými skupinami, Peterem Pearlmannem a Evou Engvall na Stockholmské univerzitě ve Švédsku a Antonem Schuursem a Bauke van Weemenem v Nizozemsku.[19]

1.4.2.1 *Princip metody ELISA*

Protilátky

Jako ostatně všechny imunologické techniky využívá ELISA vysoce specifické vazby mezi protilátkou a antigenem. Protilátky jsou proteiny produkované bílými krvinkami jako odpověď na cizorodou látku vniklou do organismu. Specificky se vážou na místo na této látce označované jako antigen a právě této vazby využívají imunologické techniky k detekci mikroorganismů, proteinů a toxinů. Pokud je cizorodá látka velká molekula, může mít více antigenních míst a v odpověď bílé krvinky produkují polyklonální protilátky, monoklonální pak jsou takové protilátky, které produkuje jedna bílá krvinka v odpověď na jedno antigenní místo.

Značkování

Aby bylo možné určit, zda došlo k vytvoření vazby mezi antigenem a protilátkou, je zapotřebí systém k vizualizaci či měření jejich interakce. Kvůli tomu se na protilátku umístí “značka”, např. fluorescenční či chemiluminescentní látka, radioisotop nebo enzym. “Enzym-linked” napovídá, že v případě ELISA to bude právě enzym, který zprostředkuje ono značkování. Ve většině systémů enzym katalysuje přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt. Často jsou používány komplexy enzym-substrát alkalické fosfatasy (enzym) a p-nitrofenol fosfátu (substrát) a peroxidasu z křenu (enzym) a tetramethylbenzidin (substrát). U obojího vzniká žlutý produkt.

Pevný nosič

“Imunosorbent” vyjadřuje, že protilátky jsou adsorbovány na pevný podklad, který je nutný pro reakci probíhající během ELISA. Nejpoužívanější jsou mikrotitrační destičky pro jejich levnost, snadnost používání a také proto, že je možné více analýz najednou, vzhledem k 96 buňkám, jež destičky mívají.

1.4.2.2 *Typy metody ELISA*

“Sandwich” ELISA

Jedná se o nejjednodušší a v komerčně prodávaných sestavách nejčastěji používaný typ. “Sandwich” naznačuje, že antigen je chycen mezi dvě protilátky, vytvářejíce tak jakýsi “sandwich”. Antigen ze vzorku je první zachycen na protilátky adsorbované na podklad,

zbytky jsou vymyty a poté je přidána značená protilátka enzymem. Následuje další promývání a přidání bezbarvého substrátu, který navázaný enzym změní v barevný produkt. Nakonec se pro zabránění dalších reakcí enzymu přidá *stop solution* (kyselina sírová) a měří se změna barvy. Pro kvantitativní stanovení se kalibruje koncentrace antigenu proti intenzitě barvy.

Kompetitivní ELISA

U tohoto typu je na pevný podklad navázán antigen, nikoliv protilátka. Vzorek a enzymem značená protilátka jsou přidány zároveň. Pokud není ve vzorku antigen obsažen, naváží se značené protilátky na antigen adsorbovaný na podkladu. Po promytí a přidání substrátu, enzym navázaný na protilátkách jej změní v barevný produkt. Naopak, pokud ve vzorku je antigen obsažen, značené protilátky se na něj naváží a při promývání se vymyjí, poté přidání substrátu není změněn v barevný produkt, jelikož enzym katalysující tuto přeměnu není přítomen. Kompetitivní ELISA dává tedy opačné výsledky než "Sandwich" ELISA: zabarvený produkt zde znamená negativní výsledek, bezbarvý (málo zabarvený) pak výsledek pozitivní. Podobně však jako Sandwich ELISA může být pro kvantitativní stanovení provedena kalibrace koncentrace antigenu proti intenzitě zabarvení.

Tento typ se využívá pro detekci menších molekul, které lze těžko detekovat pomocí Sandwich ELISA, která potřebuje dvě vazná místa pro protilátky.[20]

2 BOTULOTOXIN V POTRAVINÁCH

2.1 Botulotoxin typu A

2.1.1 Komerční chilli omáčka

V létě 2007 se vyskytlo ve třech státech, Texasu, Indianě a Kalifornii pět případů botulismu způsobeného, minimálně ve třech případech (ve dvou, z Texasu, byly vzorky séra odebrány až 9 dní po projevení příznaků a požitou potravinu nebylo možno zkontrolovat), botulotoxinem typu A. Ve všech případech byla nemocnými požita ve dnech před manifestací příznaků „Hot Dog Chilli Sauce“ vyráběná společností Castleberry s datem produkce osmého května 2007. Jen v jednom případě však byla potvrzena přítomnost toxinu v zbytku chilli omáčky, tato navíc nebyla označena.

Ani v jednom případě nedošlo k úmrtí.

FDA otestovala pomocí metody ELISA sedmnáct konzerv vyprodukovaných ve stejný den jako ty, které pravděpodobně způsobily otravu, ze stejné šarže. Šestnáct z nich bylo pozitivních na přítomnost botulotoxinu typu A. Tato zjištění byla potvrzena také testem na myších.

Vyšetřování FDA a FSIS zjistilo nedostatky ve výrobním procesu. Spory *C. botulinum* jsou přítomny běžně v prostředí a mohou přežít konzervační proces, pokud potravina není podrobena dostatečně vysoké teplotě a tlaku. Anaerobní podmínky, nízká kyselost ($\text{pH} > 4,6$), nízká koncentrace cukru a soli a teploty vyšší než $3,9^\circ\text{C}$ umožňují růst botulinických klostridií a následnou produkci botulotoxinu.[21]

2.1.2 Zmražené chilli

V roce 2001, 29. dubna byli do nemocnice v Texasu přijati čtyři muži s progresivní slabostí periferních svalů. Tři z nich se zúčastnili večeře v kostele, třetí jedl zbylé jídlo od této večeře. Při dalším šetření bylo zjištěno, že celkem 15 lidí z dvaceti čtyř lidí, kteří se zmíněné večeře zúčastnili a jedli chilli, bylo intoxikováno botulotoxinem typu A, z čehož však jeden neměl žádné potíže a dalších pět měli potíže mírné a nebyli tedy hospitalizováni. Další případ se vyskytl u člověka, který se večeře nezúčastnil, ale jedl komerčně prodávaný chilli produkt s prokázaným obsahem BoTN A. U čtyř z šestnácti lidí

se vyskytovaly pouze gastrointestinální příznaky, u 8 i potíže spojené s postihnutím nervové soustavy (rozmazané vidění, těžkost při polykání apod.), u 3 pak byla postihnuta jen nervová soustava. U devíti byl BoTN A stanoven ve stolici, ostatní byly diagnostikovány dle symptomů a epidemiologického spojení. Ani jedna intoxikace nebyla smrtelná, šest postižených však muselo být intubováno.

Proč devět lidí, kteří jedli kontaminovaný pokrm, nebylo intoxikováno, lze vysvětlit nerovnoměrným rozdělením toxinu v potravíně, popř. imunitou kvůli nerozpoznání hostitelský faktorů.

Botulotoxin typu A byl detekován ve zbytcích chilli z večere a také provedena detekce botulotoxinu v neotevřeném balení chilli, získaném od kostelního kuchaře, zakoupené v “salvage store” společně s tou, jež byla použita k přípravě večere, koncentrace toxinu byla 10 000 smrtelných dávek pro myš/g a 160 ng BoTN A/g chilli.[19]

Při vyšetřování byla zjištěna zásadní pochybení v “salvage store” (tyto obchody prodávají potraviny, které byly často odmítnuty obchody běžnými, potraviny s prošlou minimální trvanlivostí apod.), z hlediska nakládání s potravinami, potraviny určené ke skladování v chladu, či dokonce zmražené, byly vystavovány a ponechány při pokojové teplotě, přebalované potraviny byly špatně označovány apod.

Jelikož v inkriminovaném chilli byla jedinou mikrobiologickou bariérou mrazničková teplota (pH bylo naměřeno 5,47) a neprošlo úpravami určenými k ničení spor, není kontaminace BoTN A překvapivá vzhledem k zmíněným pochybením ze strany zaměstnanců obchodu.[22]

2.1.3 Doma zavařované dětské jídlo

Šestiměsíční chlapec byl přivezen do nemocnice se slabým sacím reflexem na lahvi s pitím, slabým pláčem, povadlými víčky a méně aktivní než obvykle, až letargický. Navíc nemohl udržet hlavu ve vzpřímeném stavu. V té době mu matka začala podávat pevnou stravu.

Ve zbytcích jídla, doma zavařeném hrášku a hovězím, byl prostřednictvím přímé extrakce stanoven botulotoxin A. Ve stolici ani v kapalině použité k výplachu střev toxin nebyl detekován.

Tento případ je zajímavý, jelikož v USA nebyl ještě zaznamenán případ takto mladého člověka postihnutého alimentárním botulismem, v tomto věku se většinou vyskytuje dětský botulismus. Navíc byla nemoc náhlá, s počátkem méně než 24 hodin po expozici, rychle následovaná dýchací poruchou a nutností mechanické ventilace. Přesto po přibližně měsíci a půl bylo dítě úspěšně extubováno a posláno k rehabilitaci.[23]

2.1.4 Doma zavařené bambusové výhonky

V roce 2006, 15. března navštívilo mnoho lidí pohotovost v Thajsku s příznaky nevolnosti, zvracením a bolestí v oblasti břichní, jeden muž musel být intubován. V následujících dnech bylo zjištěno, že celkem 163 lidí bylo postiženo botulismem z doma zavařených bambusových výhonků, podávaných na náboženském obřadu.

Vzorky ze zbytků jídla byly kultivovány, s nárůstem *C. botulinum*. Pomocí multiplexní PCR byl identifikován botulotoxin A.[24]

V roce 1998 ve stejné oblasti došlo také k výskytu alimentárního botulismu asociovaného s doma zavařenými bambusovými výhonky, s kontaminací botulotoxinem typu A, celkem u šesti lidí, z čehož dva lidé zemřeli.[25]

U 43 došlo k selhání dýchání, hlavní příčiny smrti u botulismu, nikdo však v tomto případě nezemřel.[26]

2.1.5 Konzerva ryby v tomatu

Poblíž Johannesburgu v Jižní Africe onemocněli dva sourozenci asi 12 hodin po pozření ryby konzervované v tomatu. Oba zprvu trpěli křečemi v žaludku a zvracením, slabostí ve svalech na končetinách a v obličeji, toto rychle přešlo v paralysu dýchacích svalů a srdeční zástavě. Dvanáctiletá dívka zemřela na cestě do nemocnice, osmiletý chlapec byl tady resuscitován a převezen do nemocnice v Johannesburgu, kde byl přijat na jednotku intenzivní péče. Antitoxin nebyl k dispozici. Došlo ke generalizované sestupné paralýze, pacient byl deset dní na podpoře dýchání, poté byl odpojen, když byla potvrzena mozková smrt pomocí EEG.

Implikovaná konzerva byla velmi poškozená, dokonce s perforovací stěny. Bylo zjištěno, že byla původně vyhozena “prodejcem pro sociálně slabé rodiny”, ale z kontejneru poté vyzvednuta a darována rodině zesnulých sourozenců.

Po injekci séra obou zesnulých, obsahu žaludku chlapce i extraktu z konzervy uhynuly všechny myši, včetně těch, jimž byl podán monovalentní antitoxin (A, B, E). Proto byly vzorky naředěny a test zopakován, po naředění 1:10 přežila pouze myš chráněná typem antitoxinu A. Po naředění 1:40 také, 1:80 a i 1:100 už přežily všechny myši, stejně jako po zahřátí vzorků na 80°C po dobu dvaceti minut a jejich injekci.

Kultivací vzorku jídla byl zjištěn výskyt grampozitivní bakterie, ve stolici se nevyskytoval.

Výrobce konzerv dobrovolně stáhl danou šarži, vrátilo se mu však pouze 6 708 konzerv z 38 448 vyrobených v této šarži. Několik konzerv z navrácených bylo podrobena testu na myších, botulotoxin nebyl prokázán v žádné z nich. Toto, stejně jako typ toxinu (v produktech z vodních živočichů se většinou jedná o kontaminaci BoTN E) poukazuje spíše na kontaminaci skrze poškození konzervy.[27]

2.1.6 Mrkvový džus

V Georgii se osmého září přihlásily do nemocnice tři muži s ochromením kraniálních nervů a s progresivní sestupnou paralysou. Po administraci antitoxinu se progresse zastavila, přesto muži zůstali v nemocnici na ventilátorech.

Pacienti spolu jedli den předtím, sdíleli několik jídel, mezi nimi i džus společnosti Bolthouse Farms. V tomto, stejně jako v séru a stolici pacientů, byl identifikován botulotoxin typu A. V dalších lahvích včetně lahví z jiných šarží nebyl botulotoxin nalezen. Z tohoto důvodu bylo předpokládáno, že došlo k špatnému teplotnímu skladování džusu, toto však podle informací poskytnutých pacienty nebylo potvrzeno.

Navíc se šestnáctého září objevil další pacient v Tampě se sestupnou paralysou a selháním dýchací soustavy, u něhož v séru byl prokázán také BoTN A. V mrkvovém džusu (z jiné šarže, než láhev z osmého září), který požil, byl rovněž detekován botulotoxin A. Z šarže jako u tohoto džusu byly CDC poskytnuty další lahve k otestování, toxin v nich nebyl prokázán.[28]

Podobně jako u případu botulismu asociovaného se zmraženým chilli, i zde platí poznámka o sporách, džus měl pH ~ 6 a také nebyl vystaven ani dostatečné teplotě či tlaku ke zničení spor.

2.1.7 Kuřecí kukuřičné chilli placky (“chicken enchiladas”)

Devátého srpna byly přijaty do nemocnice ve Francii dvě ženy s gastrointestinálními příznaky spojené s dysfagií, rozmazaným viděním a paralyzou mimických svalů, s rapidní progresí směrem k celkové a generalizované paralyse. Bylo nutné obě ženy intubovat a připojit na podporu dýchání. Třináctého srpna jim byl podán trivalentní antitoxin (proti typu A, B a E), třetího září se objevili první známky zlepšování stavu.

Byla potvrzena diagnosa botulismu nalezením botulotoxinu typu A v séru pacientek.

Obě pacientky vypověděly, že pozřely den před onemocněním průmyslově vyráběné, předvařené jídlo mexického typu “Tex-Mex”, kuřecí kukuřičné placky, jedná se o jídlo prodávané jako soubor potravin, složený ze sýrové, čedarové omáčky, předvařeného kuřete, směsi zeleniny a dvou pšeničných tortill. Konzumuje se po ohřátí v mikrovlnné troubě.

Zbytek kuřete a zeleninové směsi odhalil kontaminaci bakterií *C.botulinum*, a vysokou koncentraci botulotoxinu A (280 000 smrtelných dávek pro myš/g), sýrová omáčka byla negativní na obsah toxinu.

Epidemiologické šetření zjistilo, že šlo pravděpodobně o chybné skladování v domově pacientek, kde byly uloženy při pokojové teplotě oproti doporučení výrobce a byly spotřebovány den po datu “Spotřebujte do”. Inspekce ve výrobě nenašla žádná pochybení, produkt se pasterizoval dvě hodiny při teplotě osmdesátí pěti stupňů.

Jedná se o nejtěžší případ botulismu ve Francii z posledních několik let.[29]

2.1.8 Fermentované tofu

Dvacátého osmého listopadu se dostavila starší žena asijského původu k očnímu lékaři kvůli dvojitému vidění a pokleslým víčkům, což lékař určil jako dlouhodobý diabetes mellitus. Čtvrtého prosince pak žena navštívila svého praktického lékaře s předcházejícími příznaky, nyní však byla postižena též zmateností, potížemi s polykáním, slintáním a slabostí v pravé ruce. Její manžel si stěžoval na zhoršující se podobné příznaky.

Po přijetí na jednotku intenzivní péče jim byl podán antitoxin a už nedošlo k zhoršení symptomů.

Botulotoxin nebyl zjištěn v séru ani stolici, ale *C.botulinum* bylo kultivací zjištěno v obohacených vzorcích ze stolice. Toxin byl zjištěn ve fermentovaném tofu, které postižení jedli před projevením příznaků. Tofu bylo nakoupeno v maloobchodě. Bylo povařeno, osušeno utěrkou a nařezáno na kostky, které se daly do mísy přikryté plastovým víkem a uchováno 10-15 dní při pokojové teplotě. Poté se ve skleněných nádobách smíchalo s chilli kořením, solí, bílým vínem na vaření, rostlinným olejem a kuřecím bujónem a nechalo naložené po další 2-3 dny při pokojové teplotě, načež se fermentované tofu uskladnilo a snědlo při pokojové teplotě.

Pacientka vypověděla, že takto připravila tofu mnohokrát, není tedy jasné, proč tentokrát došlo ke kontaminaci.[30]

2.1.9 “Pruno” (“vězeňské víno”)

Čtyři vězni v Kalifornii byli hospitalizováni prvního července 2004 kvůli dysfagii, rozmazanému vidění, dechové nedostatečnosti a generalizované svalové slabosti. Všichni čtyři uvedli, že pili stejnou várku “pruno” (víno vyráběné vězni z dostupných surovin, v tomto případě z neoloupané brambory, jablk, “staré broskve”, kečupu a pudinku), vyrobeného jedním z vězňů.

Byly odebrány vzorky stolice, obsahu žaludku a séra od vězňů. Pruno samotné k dispozici nebylo, ale v cele jednoho z vězňů byl nalezen hrnek se stopami po něm. Tyto vzorky byly testovány pomocí testu na myších na důkaz toxinu a kultivačně ve stolici a obsahu žaludku byly prokazovány bakterie *C.botulinum*.

Toxin byl detekován u tří vězňů v séru, u jednoho přímo ve stolici, u tří v kultuře ze stolice. Jako typ byl určen botulotoxin typu A. Botulinická klostridia byla detekována u jednoho pacienta ve stolici. Ve vzorku pruno z hrnku vězně toxin nebyl detekován, byly zde však nalezeny klostridia tvořící botulotoxin typu A.

Dva muži vyžadovali mechanickou ventilaci, ale nakonec se všichni čtyři zotavili.

O rok později, v květnu, se v jiné věznici vyskytl další případ botulismu A po ingesci pruno, vyrobeného z brambor. Vězeň musel být delší dobu na ventilátoru, ale nakonec se také uzdravil.[31]

2.1.10 “Kondenzovaný” jogurt (“suzme jogurt”)

V září 2005 byl u deseti lidí (rodinně spjatých) diagnostikován botulismus po požití suzme jogurtu, který byl předtím zakopán pod zemí několik měsíců.

Devatenáctiletý muž byl přijat do nemocnice s rozmazaným viděním, nechutenstvím, bolestí hlavy a krku, kde u něj došlo k srdeční zástavě, byl resuscitován a hospitalizován na jednotce intenzivní péče a připojen na mechanickou ventilaci. Antitoxin byl administrován a přestože u něj došlo k ustálení hemodynamických hodnot, nemohl být odpojen od ventilace. Po 10 dnech došlo k další srdeční zástavě a pacient nereagoval na resuscitaci a zemřel.

Jeho matka, padesáti šestiletá žena, byla stejný den hospitalizována s bolestí krku, kašlem, ztíženým polykáním, načež se u ní vyskytly příznaky jako u jejího syna. Další den byl podán antitoxin. Třicátý den hospitalizace došlo k srdeční zástavě a resuscitace neúčinkovala.

Bylo hospitalizováno dalších 7 pacientů s mírnějšími příznaky, typově však podobnými s matkou a jejím synem. Jeden muž byl navíc léčen ambulantně. Všichni jedli zmíněnou potravinu, uvedli, že po při vyzvednutí ze země zjistili, že víčko bylo deformováno a jogurt se dostal do kontaktu s půdou, při jeho konzumaci zjistili odklon od standardní chuti.

Byl otestován vzorek potraviny testem na myších, stejně jako sérum hospitalizovaných pacientů. V jogurtu byl identifikován botulotoxin typu A. Myši, jímž byla dána injekce vzorku sér zemřelých pacientů, zemřeli za příznaků botulismu během 24 hodin, u mírnějších případů musela být použita dvojitá dávka, aby byly vyvolány příznaky botulismu. Myši injektované sérem z pacientů odebraných po podání trivalentního antitoxinu nevykazovaly žádné změny ve zdravotním stavu.[32]

2.2 Botulotoxin typu B

2.2.1 Česnek v chilli olejové zálivce

Zdravý, třiceti-osmiletý muž onemocněl botulismem po pozření přibližně 4 stroužků česneku z produktu Česnek v chilli olejové zálivce, určeného k přímé spotřebě. Produkt byl prodáván při pokojové teplotě.

Mikroskopické vyšetření neodhalilo žádná typická klostridia v otevřeném produktu, naměřeno v něm bylo $\text{pH} = 4,7$. Test na myších však prokázal přítomnost botulotoxinu, neutralizační test pak určil typ, BoTN B. Kultivačně v produktu byly také prokázány bakterie *C. botulinum*.

V jedné neotevřené nádobě z inkriminované šarže a ve dvou nádobách z jiných šarží byl také stanovován botulotoxin, avšak s negativním výsledkem.

Později se ovšem ukázalo, že 134 nádob s tímto produktem ze stejné šarže jako ta, jež způsobila u muže intoxikaci, bylo odmítnuty k odkoupení kvůli vypouklinám ve víčku, ale výrobce neprovedl žádná šetření pro determinaci, čím tento stav byl způsoben. Podle výrobce byla šarže podrobena teplotnímu záhřevu $83\text{--}85^\circ\text{C}$ po neurčité době.[33]

2.2.2 Vajíčka síha

Ve Finsku v roce 2004 se u čtyřiapadesátileté ženy vyvinul botulismus po pozření vajíček síha. V těchto byl stanoven botulotoxin typu E pulsní gelovou elektroforesou, toxin i botulinická klostridia typu E byly také stanoveny ve vzorcích ze stolice a žaludku.

Kromě toho byl v žaludečních vzorcích stanovena také bakterie *C. botulinum* typu B, toto však bylo považováno za bezpředmětné s ohledem na průběh choroby, její výskyt v zažívacím traktu je běžný, vzhledem k jejich vysoké prevalenci v prostředí, aniž by měli nějaký dopad na zdraví člověka.

Byl to první případ alimentárního, čistě domácího (jak pacient, tak potravina byla Finského původu) botulismu ve Finsku.[34]

2.2.3 “Halal” maso

Ve Francii se v srpnu 2003 vyskytly čtyři případy, z nichž tři se vyskytly v jedné rodině, botulismu spojeného s konzumací kontaminovaného “halal” (maso halal je maso

získané ze zvířete zabitého dle muslimského práva) párku. Ve všech čtyřech případech šlo o relativně mírné intoxikace se symptomy jako rozmazané a zdvojené vidění, potíže s polykáním. Všichni postižení se zotavili.

Potravina ve všech případech pocházela od stejného výrobce, jehož všechny masové výrobky s datem “Spotřebujte do” dvanáctého března 2004 nebo dřívějším byly staženy z prodeje.

V séru pacientů a v jednom případě i v potravině byl detekován botulotoxin typu B.[35]

2.2.4 Fermentované maso - “Cinkrugan”

Dvacátého devátého května byl na pohotovost v Thajsku převezen muž z místní nemocnice se symptomy typu rozmazané vidění, dysfagie, pokleslá víčka, rozšířené zornice a zácpa trvající již tři dny.

Během následujících 18 hodin byla paralýza kraniálních nervů téměř kompletní, objevila se sestupná paralýza nakonec vedoucí k selhání dýchání, muž byl tedy intubován a připojen k mechanické ventilaci a byla učiněna předběžná diagnosa botulismu.

Antitoxin proti botulismu nebyl podán, kvůli již značnému propuknutí nemoci, muži byly podány laxativa (první stimulační, které však neměly žádný efekt, byla tedy zvolena hyperosmotická). Po třech dnech jejich podávání se stav pacienta začal zlepšovat a 41. den hospitalizace byl propuštěn k rehabilitaci.

Vzorky krve, stolice a potravin – Cingruganu byly podrobeny testům na přítomnost bakterie *C. botulinum* a jejich toxinu. V potravině byl zjištěn botulotoxin typu B.

Cingrugan je tradiční pokrm, připravený ze syrového masa (v tomto případě pacient chytil a usmrtil divokou kozu) a vařené rýže, tato směs se nechá v džbánu fermentovat jeden týden. Normálně má maso bělavou barvu, v tomto případě však mělo údajně barvu tmavě zelenou.

Celkem pět lidí jedlo tento pokrm, u všech se vyvinuly příznaky konzistentní s botulismem – suchost v ústech, rozmazané vidění, pacient, který snědl největší porci, zažil nejtěžší příznaky.[36]

2.2.5 Doma zavařená rajčata

V lednu 1999 onemocněli tři lidé, rodinně spjati (muž s manželkou a jejich zeť), botulismem pravděpodobně (jídlo nebylo k dispozici k otestování) po konzumaci omáčky z rajčat zakoupených na farmě, doma zavařených bez přídavku soli a okyselení, skladované při teplotě vyšší než šest stupňů Celsia, na večeři, jíž se zúčastnilo celkem 8 lidí.

Byly odebrány vzorky stolice od manželky a zete a dalších čtyř asymptomatických lidí účastnících se večeře, a sérum od tří postižených lidí, projevujících příznaky botulismu, rozmazané vidění, slabost, suchost v ústech, dysfagie apod.

Manžel prodělal nejtěžší příznaky, několik týdnů byl hospitalizován, ostatní dva projevující příznaky byli léčeni pouze ambulantně.

Botulotoxin typu B byl stanoven pouze ve vzorku stolice dcery (manželky zete), séra byla negativní u všech testovaných osob.[37]

2.2.6 Konzervované zelené olivy

V březnu 2004 byly Italskému národnímu institutu zdraví nahlášeno 16 možných případů botulismu. Vyšetřování ukázalo, že všichni jedli 22. nebo 24. března v restauraci v Molise (23. zde bylo zavřeno). Podařilo se zkontaktovat 66 návštěvníku restaurace z uvedených dní a pokud u sebe zaznamenali rozmazané nebo dvojité vidění a alespoň jeden z následujících příznaků: suchost v ústech, ztíženou artikulaci, slabost v horních nebo dolních končetinách, potíže s dýcháním a těžkou zácpu, byli pozváni do nemocnice k potvrzení botulismu a byly označeni jako "možné případy", pokud u nich byl laboratorně botulismus potvrzen, byli považováni za potvrzené případy. Dvacet osm lidí zažilo alespoň dva příznaky (42 % míra napadení), 25 bylo považováno za možné případy (89 %) a 3 (11 %) jako případy definitivní.

Vzorky stolice od 24 pacientů a séra od 5 pacientů byly otestovány testem na myších a kultivačně. Ve třech vzorcích stolice byly kultivačně potvrzeny bakterie *C. botulinum* typu B, ostatní, stejně jako séra byly negativní.

Žádné z jídel servírovaných v uvedené dny nebyly k dispozici a žádný ze vzorků jídel v restauraci odebraných nebyl pozitivní na přítomnost toxinu nebo klostridií.

Na základě epidemiologického šetření a výpovědi zaměstnanců z restaurace však byly jako pravděpodobná kontaminovaná potravina určeny zelené olivy. Tyto byly připraveny na podzim roku 2003 z místních oliv, byly naloženy do slaného nálevu na 35 dní, poté dekantovány a solanka byla nahrazena čerstvou vodou. U oliv připravených společně s těmi, které byly podávány v uvedené dny bylo naměřeno pH = 6,2. Během přípravy ani pH, ani koncentrace soli nebyla standardizována.

Celkově bylo 20 (71 %) lidí vyšetřeno na pohotovosti, 15 (53 %) přijato do nemocnice a 18 % bylo umístěno na jednotku intenzivní péče. Nikdo nepotřeboval podporu dýchání a nikdo nezemřel.[38]

2.3 Botulotoxin typu E

2.3.1 Uzený, vakuově balený síh

V jižním Finsku 29. června 2006 došlo k alimentárnímu botulismu u ženy s příznaky zvracení a průjmu, další den došlo také ke svalové slabosti horních i dolních končetin. Po přijetí do nemocnice bylo nutno zavést mechanickou ventilaci. U jejího manžela došlo k průjmu a problémům s polykáním, ale neměl jiné obtíže, přesto byl kvůli průjmu také přijat do nemocnice.

Neutralizačním testem na myších byl určen botulotoxin typu E v pacientčině séru.

Manžel vypověděl, že 28. června pozřeli s manželkou uzeného síha. Nezůstaly zbytky toho jídla, ve výplachu z obalu potraviny nebylo pomocí PCR ani kultivačně nalezeno *C. botulinum*. Se stejným výsledkem bylo testováno 10 balení ryb ze stejné šarže, stejně jako z šarží předchozích a následujících.

Při inspekci výroby, kde byla potravina produkována nebyla zjištěna žádná pochybení, je tedy pravděpodobné, že došlo k pochybení v teplotním skladování v prodejně nebo doma u pacientů.[39]

2.3.2 Doma nasolený síh

V New Jersey byl zaznamenán případ botulismu u muže, který nasolil síha a nechal jej nevykuchaného asi měsíc na kuchyňské lince. 3. července ji ochutnal, načež se u něj vyvinuly gastrointestinální a neurologické potíže, kvůli nimž se dostavil na pohotovost.

Den nato byla tato ryba podávána na oslavě. U 3 lidí z této oslavy se postupně (od 4 po necelých 24 hodin) objevily převládající gastrointestinální potíže a u jedné ženy neurologické potíže – rozostřený zrak, sucho v ústech, později se také objevila dechová nedostatečnost.

U všech pěti postižených pacientů test séra neprokázal přítomnost botulotoxinu, což mohlo být způsobeno malou dávkou a jejím rychlém vyčištění z krve nebo jejich potíže nebyly způsobeny botulotoxinem. Neurologické potíže u dvou pacientů však nemohou být vysvětleny jinak než ingescí botulotoxinu. Ve zbytcích ryby byl testem na myších určen BoTN E.[40]

2.3.3 Sušená ryba

V čtyřicátém pátém týdnu roku 2003 byly nahlášeny lokálním autoritám v severním Německu tři možné případy botulismu. Tři lidé, rodiče se synem, začali pociťovat nevolnost desátého října, další den se u syna objevily typické příznaky botulismu. Po převezení do nemocnice musel být připojen na podporu dýchání.

Kontaminovanou potravinou byla mořská ryba chycená na řece Labe. Byla vykuchána, naložena do solného nálevu, vytažena a sušena několik dní na volně vzduchu a poté konzumována bez další úpravy.

Testem na myších byl prokázán botulotoxin typu E v chlapcově séru, vzorek z ryby byl také pozitivní na obsah toxinu.[41]

2.3.4 Mršina běluhy (*Delphinapterus leucas*)

Dvanáctého července 2002 našli dva obyvatelé vesnice Yup'ik na Aljašce mrtvou běluhu, u níž odhadli, že zemřela někdy toho jara. Její ocas rozřezaly na kousky a tyto v uzavřitelných baleních uložili do lednice. Několik dní na to se o něj podělili s přátely, celkem 14 lidí jedlo syrový muktuk (kůže a tenká vrstva narůžovělého tuku ležící hned pod kůží). U osmi z nich se objevily příznaky konzistentní s botulismem během dvanácti až sedmdesáti dvou hodin, tj. slabost, nevolnost, rozmazené vidění, dysfagie a další. Byli hospitalizováni a během dvacetičtyř až šedesáti hodin od manifestace příznaků jim byl podán trivalentní antitoxin (A, B, E). Všichni pacienti se zotavili.[42]

Byly sesbírány tři vzorky stolice, tři vzorky žaludeční šťávy, sedm vzorků sér a osm vzorků muktuku. Jen jeden vzorek stolice byl pozitivní na obsah botulotoxinu typu E pomocí standardního testu na myších, ostatní klinické vzorky byly negativní. Naproti tomu všechny vzorky muktuku byly pozitivní na obsah botulotoxinu typu E.

Aljaška patří k zemím s nejvyšší incidencí botulismu ve světě a všechny případy byly spojeny s typickými aljašskými pokrmy, zahrnující “fermentované” pokrmy, sušené jídlo, olej z lachtanů a právě muktuk z mořských savců.[43]

2.4 Botulotoxin typu F

2.4.1 „Korýši“

Čtyřicetiletá žena se dostavila na pohotovost se stížnostmi na rozmazané vidění, potíže s polykáním, suchost v ústech a se zhoršováním tohoto stavu během uplynulých šesti hodin. V nemocnici se vyvinulo těžké krátké dýchání, kvůli čemuž byla převezena na jednotku intenzivní péče. Tam došlo ke kompletní paralýze, přes podání bivalentního (A a B) antitoxinu. Po určení botulotoxinu typu F ze stolice pacientky, byl podán experimentální heptavalentní antitoxin. V následujících dnech se pacientčin stav začal zlepšovat, po dvaceti dvou dnech hospitalizace byla propuštěna do rehabilitačního centra.

Uvedla, že pozřela “korýše”, zmražené garnáty a konzervu tuňáka.[44]

2.5 Neurčené typy

2.5.1 “Rakfisk”

Do nemocnice byla přijata žena ke konci roku 2003 poté, co nemohla vstát z postele. Nemohla polykat, její zorničky byly rozšířené a nereaktivní. Bylo zjištěno, že její manžel, syn s přítelem byli také nemocní. Tato nemoc se vyvinula poté, co všichni spolu jedli rakfisk (“rakfisk” je polofermentovaná ryba připravovaná často v Norsku na Vánoce, ryba se nasolí a ocukruje, dá se do přetlakové nádoby a ponechá několik týdnů při teplotě 5-8°C, načež se jí bez další úpravy), den po konzumaci všichni zvraceli a bolelo je břicho, rozvíjela se u nich suchost v ústech, celková únava a problémy s polykáním. Dva lidé, kteří také jedli toto jídlo, neonemocněli.

Botulismus byl diagnostikován pouze klinicky.[41]

2.5.2 Botulismus spojený s grilováním

V Rakousku bylo přijato pět pacientů během prvního a druhého července 2006, s klinickými příznaky suchosti v ústech, rozmazaného vidění a obtížemi s polykáním. Dva si stěžovali také na zácpu a snížené pocení.

Dvacátého pátého června se všichni zúčastnili grilování, kde se podávalo několik různých jídel, vepřové a bůček z domácí zabijačky (i zvířata byla domácí) a domácí studený dezert (cukroví s krémem zvané "Schaumrolle") a několik salátů z nakoupené zavařené vlašské fazole, vařených brambor, okurek, rajčat, cibule v zálivce z oleje, octa a kyselé smetany. Další z nakoupených potravin byla klobása, kečup, dvě různé dochucovací omáčky, chleba a různé studené salámy. Čerstvé jahody přes noc naložené v bílém víně zde byly také podávány jako další dezert.

Všech pět pacientů jedlo vepřové maso. To pocházelo z vepře poraženého čtyři týdny před podáváním. Před bouráním se tělo ponechalo přibližně 24 hodin při okolní teplotě, poté bylo vloženo maso až po pěti kusech do mrazících, vzduchotěsných vaků a zmrazeno. Před grilováním bylo ponecháno přes noc k rozmrznutí při pokojové teplotě.

Ani jeden pacient nejedl uzeniny.

Myším byla podána směs ze séra pacientů a solného roztoku (testovací skupina), resp. ze séra pacientů a trivalentního antitoxinu (kontrolní skupina). Kontrolní skupina přežila, myši z testované skupiny byly postiženy typickou paralysou a zašly na zástavu dýchání.

Ve vzorcích zmrazeného vepřového nebyl botulotoxin detekován, přesto byla vytvořena hypotéza, že jeden vak s pěti kusy masa (jelikož bylo pět případů) byl kontaminován a přes zahřev při grilování zbylo dost toxinu pro vznik otravy. Je to ale jen hypotéza, potravinový zdroj nebyl potvrzen.[45]

2.5.3 Botulotoxin v pečených, konzervovaných houbách

Pět žen ve věku 20 až 49 let společně pracujících v zahradě v Turecku se otrávil botulotoxinem pravděpodobně po požití pečených, konzervovaných hub (nebyl k dispozici test na průkaz toxinu nebo bakterie, ale bylo to jediné jídlo, ze kterého se mohly všechny

pacientky otrávit). Botulismus měl u žen různou míru závažnosti, jedna pacientka (těhotná, dvacetiletá žena) nemusela být hospitalizována, pravděpodobně proto, že údajně požila jen malou porci hub, jedna pacientka byla nalezena ráno po pravděpodobné ingesci toxinu se stížným dýcháním, po přivezení na pohotovost u ní byl diagnostikována zástava srdce a resuscitace se nezdařila. Ostatní tři ženy byly hospitalizovány s příznaky botulismu po 22 až 32 dní, poté byly propuštěny. [46]

3 VYUŽITÍ BOTULOTOXINU V KOSMETICE

3.1 Užívané preparáty

Pro kosmetické užití se nejčastěji používají dva produkty, “evropský” Dystort® a “americký” Botox®, v Německu je pak vyráběn ještě Xeomin®. Na trhu se objevují v poslední době další produkty. Všechny mají jedno společné, obsahují botulotoxin typu A.

Botulotoxin typu B se pak prodává pod komerčním názvem Neurobloc®.

Jsou dohady o vzájemné rozdílnosti mezi přípravky Dystort® a Botox®, jejich bezpečnosti a účinnosti. Botox® má být údajně bezpečnější, protože je ve větším komplexu (s přídatnými proteiny) a tedy nedochází k takové difuzi do vzdálenějších míst od vpichu.[47] Toto je však zpochybněno v práci [48] tím, že po vpichu, ve fyziologických podmínkách, dochází k okamžité disociaci a tedy zde již není žádný rozdíl ve velikosti molekul.

Je však prokázán rozdíl v množství potřebného k vyvolání stejného účinku, udává se, že přípravku Botox® je zapotřebí použít čtyřikrát méně, než přípravku Dystort®.[49]

3.2 Využití

Přestože v medicíně nachází botulotoxin neustále nová použití, od léčby strabismu (šilhání) klinicky provedené A. Scottem v osmdesátých letech, přes léčbu migrén, blefarospasmů[50] až po možné užití v léčbě epilepsie[51], v kosmetice se stále nejčastěji využívá k odstranění vrásek, nejčastěji v oblasti čela a mezi obočím - “mračivek”, a nověji také k potlačení pocení.

3.2.1 Odstranění vrásek

Dynamické změny v tváři jsou způsobeny hypertonickým prostředím ve svalu a projeví se jako linky v oblasti čela nebo glabelárních oblastí (příčné vrásky mezi obočím).

Změny v pokožce jsou dány vnitřními i vnějšími faktory. Mezi vnitřní faktory patří hlavně genetická výbava člověka, ovlivňující hormonální a biochemické procesy způsobující nevratné změny v pokožce. Mezi vnější faktory pak patří vlivy životního prostředí, především UV záření, které poškozují kůži a kompromituje její integritu.

Samotný účinek botulotoxinu souvisí s ochrnutím, denervací postižených svalů, není do něj možné převést nervový impuls a sval se uvolní, čímž se vyhladí okolní kůže.[52]

Tento účinek se projevuje během 24 až 72 hodin, přičemž maxima dosahuje během jednoho měsíce a vydrží po tři až čtyři měsíce. Toto souvisí s opětovnou inervací svalů, regenerací buněk. Bylo zaznamenáno, že opakované injekce prodlužují klinický efekt. Naproti tomu však je možný vznik protilátek.

Mezi hlavní samostatné zákroky patří pseudo-Crouzonův syndrom (crow's feet), což jsou jemné mimické vrásky nacházející se v zevním očním koutku (svým tvarem připomínají vraní nohu), vrásky na hřbetě nosu, poklesnutí obočí apod.[53]

Odstraněním vrásek bylo také dosaženo podstatného zlepšení nálady u pacientů, z důvodu nemožnosti vyjádřit negativní afekty kvůli paralýze svalů a tedy nemožnosti "vraštit čelo".[54]

3.2.2 Potlačení pocení

Aplikace botulotoxinu je používáno pro potlačení pocení z důvodu zdravotních u nadměrného pocení i z důvodu kosmetických. Oproti chirurgickému řešení je to jednoduchá, velmi účinná a bezpečná metoda.[55]

Botulotoxin se neomezuje pouze na paralýzu nervosvalových spojení, ale blokuje i autonomní cholinergní vlákna, včetně vláken sympatiku vedoucí do potních žláz. Tento účinek je potvrzen u potních žláz v podpaží a i na rukou.[56]

Při injekci 1,75 MU („mouse unit“, dávka, které zabije 50 % myši) do kůže je potlačena sekrece potních žláz po více než tři týdny, při 17,5 MU po delší dobu než tři měsíce a při 50 MU déle než šest měsíců.

Botulotoxin typu A je k tomuto účelu až dvacetkrát účinnější než botulotoxin typu B.[49]

3.3 Bezpečnost

Na stránkách klinik (např.[57]) provádějících tyto kosmetické zákroky se lze dočíst, že použití přípravku Dysport® i Botox® je v případě „přesného precizního provedení školeným a zkušeným odborníkem naprosto bezpečné“. Už při popisu forem botulismu jsem však napsal, že jedna z forem přímo souvisí s intramuskulární aplikací botulotoxinu.

Přes dávky v řádu nanogramů aplikovaných intramuskulárně, z nichž se do systémového oběhu dostane jen velmi málo, občas se mohou vyskytnout systémové komplikace, zahrnující žízeň, chřipce podobnou nemoc, neurologické poruchy, výjimečně jsou hlášeny případy anafylaxe a srdeční zástavy.

Rozhodně by tyto zákroky neměly podstupovat ženy těhotné, v období laktace, s přecitlivělostí na lidský albumin, a léčící se aminoglykosidovými antibiotiky. Zákroky se provádí pouze u lidí starších 18 let a mladších let 65.[53]

Byl také zaznamenán případ v listopadu 2004, kdy byl čtyřem ženám aplikován nelicencovaný, vysoce koncentrovaný preparát botulotoxinu typu A. Ženy měly příznaky typické pro alimentární botulismus, byla jim pravděpodobně vpravena dávka 2857krát větší než je předpokládaná smrtelná dávka pro člověka, hladina toxinu v séru u tří ze čtyř žen byla ekvivalentní 21 až 43krát větší dávce než je předpokládaná smrtelná dávka pro člověka. Ve „100-mikrog“ lahvičce, kterou vyšetřovatelé vzali ze stejné šarže, jako ta, jež byla aplikovaná ženám, obsahovala množství toxinu, které by zabilo 14 286 dospělých lidí.[58]

ZÁVĚR

Toxiny produkované bakterií *Clostridium botulinum* jsou nejtoxičtějším jedem známým člověku. Jedná se o proteasy, jejichž biologická aktivita je založena na štěpení proteinů nutných k přenosu nervového impulsu.

Bez ohledu na rychlý vývoj v oblasti analytické chemie a rozvoji imunologických metod je stále standardní metodou pro detekci botulotoxinu test na myších, začíná se sice často uplatňovat mnohem rychlejší metoda ELISA, u které je však stále nutno její výsledky potvrzovat testem na myších

Zatím není známa metoda, která by sama o sobě mohla test na myších nahradit. Je však možné, že kombinací některých metod by mohla být vytvořena dostatečně selektivní a senzitivní metoda.

Celkem bylo popsáno 24 případů botulismu, nejčastěji se jednalo o botulotoxin A v 14 případech, dále botulotoxin B v 6, typ E ve 4, F v jednom a nerozpoznané ve třech případech.

Nelze však z této četnosti vyvozovat žádné závěry, protože rozhodně nebyly popsány všechny případy a rozhodně se nejedná o statistický, randomizovaný vzorek – autoři si vybíraly na základě subjektivních měřítek.

Jelikož v mnoha případech botulismu šlo o lidské selhání (podávání několik měsíců starých oliv bez řádné konzervace, v pokojové teplotě nechané potraviny, které mají být zmražené), nebo neznalost lidí a konzumaci potraviny k tomuto účelu zcela nevhodné (několik týdnů, ne-li měsíců, mrtvá běluha ležící volně na pláži, jogurt, který byl dlouhou dobu ve styku s hlínou, zelené, fermentované maso, které má standardně bílou barvu, z volně žijící kozy), svědčí to o skutečnosti, že je nutno v tomto směru vzdělávat veřejnost. Ostatně i samotné označení „klobásový jed“ je velmi zavádějící a u veřejnosti vyvolává dojem, že ostatní potraviny jsou této hrozby uchráněny, přičemž v této práci byla valná většina případů botulismu A i B (u E se jedná takřka výhradně o ryby, což lze vyvodit i z této práce, kdy typ E nebyl v žádné jiné potravíně) způsobena kontaminovanou nemasovou potravinou a to i takovými, které jsou obecně považovány za velmi zdravé a málokdo by v nich čekal kontaminaci (mrkvový džus a potraviny zeleninového či ovocného původu celkově) a uzenina ve smyslu klobás či párků nebyla ani v jednom případě kontaminována.

Také je potřeba zavést častější kontroly v potravinářských podnicích a nejlépe zákonem zavést povinnost chránit potraviny, pokud je to možné, více než jen jednou bariérou, aby při porušení jedné z ochran byla potravina stále chráněna. V USA například po propuknutí vícečetného botulismu po požití česneku v oleji byla dána povinnost snižování pH v tomto výrobku kyselinou citrónovou, popř. fosforečnou.

Dále byly shrnuty poznatky o botulotoxinu v oblasti kosmetiky, typy přípravků a zákroků a jejich bezpečnost.

Kosmetické zákroky využívající botulotoxin rozhodně nejsou zcela bezpečnými, což je samozřejmé už čistě ze skutečnosti, že je do těla vpravována takto toxická látka, ale oproti ekvivalentně účinným chirurgickým zákrokům jsou vzhledem k minimální invazivnosti bezpečnější a oproti „mastím omlazujícím plet“ apod. jsou zase mnohem efektivnější.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Erbguth, F.J. : *Historical notes on botulism, Clostridium botulinum, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin*, *Movements disorders* 2004, vol.19, no.S8, 2-6
- [2] Prymula, R., et al. : *Biologický a chemický terorismus*, Grada, Praha 2002, 152 s.
- [3] Bednář M. Fraňková V. Schindler J. Souček A. Vávra J. : *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, Praha 1997
- [4] Patočka F. et al. : *Lékařská mikrobiologie*. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha 1970, 900/68 s.
- [5] Baron. S. ed. : *Medical Microbiology*, 4. vyd., Available online: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/>
- [6] Zhuji Fu, Sheng Chen, Baldwin M.R., Boldt G.E., Crawford A., Janda K.A., Barbieri J.T., Kim Jung-Ja P. : *Light chain of botulinum neurotoxin serotype A: Structural resolution of a catalytic intermediate*, *Biochemistry*, 2006, vol.45, no.29, 8903-8911
- [7] Schmidt J.J., Sartyamoorthy V., Dasgupta B.R. : *Partial amino acid sequence of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin type A*, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1984, no.119, 900-904
- [8] Dasgupta B.R., Datta A. : *Botulinum neurotoxin type B (strain 657): partial sequence and similarity with tetanus toxin*, *Biochimie* 1988, no.70, 811-817
- [9] Schmidt J.J., Sathyamoorthy V., Dasgupta B.R. : *Partial amino acid sequences of botulinum neurotoxins types B and E.*, *Arch. Biochem. Biophys* 1985, no.238, 544-548
- [10] Boldt, G.E., Kennedy, J.P., Janda, K.D. : *Identification of a potent botulinum neurotoxin A protease inhibitor using in situ lead identification chemistry*, *Org. Lett.*, 2006, vol.8, no.8, 1729-1732
- [11] Burke, R. : *Counter-Terrorism for Emergency Responders*. CRC Press 2000, 346 s.
- [12] Boldt, G.E., Kennedy, J.P., Hixon, S.H., McAllister, L.A., Barbieri, J.T., Tzipori, S., Janda, K.D. : *Synthesis, Characterization and Development of a High-Throughput Methodology for the Discovery of Botulinum Neurotoxin A Inhibitors*, *J. Comb. Chem.*, 2006, vol.8, no.4, 513-521

- [13] Lobovská, A. : *Infekční nemoci*, Karolinum, Praha 2001, 264 s.
- [14] Cherington, M. MD. *Clinical spectrum of botulism*. Muscle & Nerve, 1998, vol.21, 701-710
- [15] Guglielmo-Viret, V., Attree, O., Blanco-Gros, V., Thullier, P. : *Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of Clostridium botulinum type B neurotoxin*. Journal of Immunological Methods 2005, no.301, 164–172
- [16] Scarlatos, A., Welt, B.A., Cooper, B., Archer, D., DeMarse, T., Chau, K.V. : *Methods for Detecting Botulinum Toxin with Applicability to Screening Foods Against Biological Terrorist Attacks*. 2005, vol.70, no.8, 122-130
- [17] Food and Drug Administration : *Bacteriological analytical manual online*, January 2001, Available online: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mm.html>
- [18] Botana, L. M. (Ed.) : *Seafood and Freshwater Toxins : Pharmacology, Physiology, and Detection*. Marcel Dekker 2000, 804 s.
- [19] Lequin, R.M. : *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem 2005, no.51, 2415-2418
- [20] McMeekin, T. A. (Ed.) : *Detecting Pathogens in Food*. Woodhead Publishing 2003, 392 s.
- [21] Center for Disease Control and Prevention (CDC) : *Botulism associated with commercially canned chili sauce--Texas and Indiana, July 2007*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2007 Aug. 3; vol.56, no.30, 767-9
- [22] Kalluri, P., Crowe, C., Reller, M., Gaul, L., Hayslett, J., Barth, S., Eliasberg, S., Ferreira, J., Holt, K., Bengston, S., Hendricks, K., Sobel, J. : *An outbreak of foodborne botulism associated with food sold at a salvage store in Texas*, CID 2003, vol.37, 1490-1495
- [23] Armada, M., Love, S., Barrett, E., Monroe, J., Peery, D., Sobel, J. : *Foodborne botulism in a six-month-old infant caused by home-canned baby food*, Ann Emerg Med. 2003, vol.42, 226-229
- [24] Center for Disease Control and Prevention (CDC). *Botulism from Home-Canned Bamboo Shoots --- Nan Province, Thailand, March 2006*. MMWR vol.55, no.14, 389-392

- [25] Center for Disease Control and Prevention (CDC). *Foodborne Botulism Associated With Home-Canned Bamboo Shoots -- Thailand, 1998*, MMWR vol.48, no.21,437-439
- [26] Wongtanate, M., Sucharitchan, N., Tantisiriwit, K., Oranrigsupak, P., Chuesuwan, A., Toykeaw, S., Suputtamongkol, Y. : *Signs and Symptoms Predictive of Respiratory Failure in Patients with Foodborne Botulism in Thailand*, Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007, vol.77, no.2, 386-389
- [27] Frean, J., Arntzen, L., Heever, J.v.d., Perovic, O. : *Fatal type A botulism in South Africa*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2004, no.98, 290-295
- [28] Center for Disease Control and Prevention (CDC) : *Botulinum asociated with commercial carrot juice – Georgia and Florida, September 2006*. MMWR 2006, vol.55, no.40, 1098-1099
- [29] King L.A., the French multidisciplinary outbreak investigation team : *Two severe cases of botulism associated with industrially produced chicken enchiladas, France, August 2008*. Euro Surveill. 2008; vol.13, no.37, Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18978>
- [30] Central for Disease Control and Prevention (CDC) : *Brief Report: Foodborne Botulism from Home-Prepared Fermented Tofu --- California, 2006*. MMWR 2007, vol.56, no.05, 96-97
- [31] Vugia, D.J., Mase, S.R., Cole, B., Stiles, J., Rosenberg, J., Velasquez, L., Radner, A., Inami, G. : *Botulism from drinking pruno*. Emerging Infectious Diseases 2009, vol.15, no.1, 69-71
- [32] Akdeniz, H., Buzgan, T., Tekin, M., Karsen, H., Karahocagil, M.K. : *An outbreak of botulism in a family in Eastern Anatolia associated with eating suzme yoghurt buried under soil*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2007, 39, 108-114
- [33] Krusell, L., Lohse, N. : *A case of human botulism in Denmark after consumption of garlic in chilli oil dressing produced in Germany*. Euro Surveill. 2003, vol.7, no.7, Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2163>

- [34] Lindström, M., Hielm, S., Nevas, M., Tuisku, S., Korkeala, H. : *Proteolytic Clostridium botulinum type B in the gastric content of a patient with type E botulism due to whitefish eggs*. Foodborne Pathog Dis 2004; no.1, 53-57
- [35] Espié, E., Vaillant, V., de Valk, H., Popoff, M.R. : *France recalls internationally distributed halal meat products from the plant implicated as the source of a type B botulism outbreak*. Euro Surveill. 2003, vol.7, no.38, Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2295>
- [36] Tseng, C.-K., Tsai, C.-H., Tseng, C.-H., Tseng, Y.-C., Lee, F.-Y., Huang, W.-S. : *An outbreak of foodborne botulism in Taiwan*. Int. J. Hyg. Environ. Health 2009, vol.212, 82-86
- [37] Loutfy, M.R., Austin, J.W., Blanchfield, B., Fong, I.W. : *An outbreak of foodborne botulism in Ontario*. Can J Infect Dis 2003, vol.14 no.4, 206-209
- [38] Cawthorne, A., Celentano, L.P., D'Ancona, F., Bella, A., Massari, M., Anniballi, F., Fenicia, L., Aurelli, P., Salmoso, S. : *Botulism and preserved green olives*. Emerging Infectious Diseases 2005, vol.11, no.5, 781-782
- [39] Lindström, M., Vuorela, M., Hinderink, K., Korkeala, H., Dahlsten, E., Raahenmaa, M., Kuusi, M. : *Botulism associated with vacuum-packed smoked whitefish in Finland*. Euro Surveill 2006. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3004>
- [40] Sobel, J., Malavet, M., John, S. : *Outbreak of clinically mild botulism type E illness from home-salted fish in patients presenting predominantly gastrointestinal symptoms*, CID, 2007, vol.45, 14-16
- [41] Eriksen, T., Brantsaeter, A.B., Kiehl, W., Steffens, I. : *Botulism infection after eating fish in Norway and Germany: two outbreak reports*. Euro Surveill. 2004. vol.8, no.3. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2366>
- [42] Dixon, B. : *Whale meat again*. The Lancet infectious diseases 2003, vol.3, 522
- [43] McLaughlin, J.B., Sobel, J., Lynn, T., Funk, E., Middaugh, J.P. : *Botulism type E outbreak associated with eating a beached whale, Alaska*. Emerging Infectious Diseases 2004, vol.10, 1685-1687

- [44] Richardson, W.H., Frei, S.S., Williams, S.R. : *A case of type F in Souther California*. 2004, vol.42, no.4, 383–387
- [45] Meusburger, S., Reichert, S., Heibl, S., Nagl, M., Karner, F., Schachinger, I., Allerberger, F. : *Outbreak of foodborne botulism linked to barbecue, Austria, 2006*. Euro Surveill 2006. vol.11, no.50. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3097>
- [46] Cengiz, M., Yilmaz, M., Dosemeci, L., Ramazanoglu, A. : *A botulism outbreak from roasted canned mushrooms*. Human & Experimental Toxicology 2006, vol.25, 273-278
- [47] Brin, M.F. : *Basic and clinical aspects of BOTOX®*. Toxicon 2009, 1-6
- [48] Pickett, A. : *Dysport®: Pharmacological properties and factors that influence toxin action*. Toxicon 2009, 1-7
- [49] Schlereth, T., Mouka, I., Eisenbarth, G., Winterholer, M., Birklein, F. : *Botulinum toxin A (Botox®) and sweating-dose efficacy and comparison to other BoTN preparations*. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 2005, no.117, 120-126
- [50] Krhut, J. : *Botulotoxin – struktura, mechanismus účinku a klinické použití*. Urolog pro Praxi 2006, no.5, 278-282
- [51] Rogawski, M.A. : *Convention-enhanced delivery in the treatment of epilepsy*. Neurotherapeutics 2009, vol.6, no.2, 344-351
- [52] Sadick, N.S., Karcher, C., Palmisano, L. : *Cosmetic dermatology of the aging face*. Clinics in dermatology 2009, no.27, 3-12
- [53] Simon, G.J.B., McCann, J.D. : *Cosmetic eyelid and facial surgery*, Survey of ophthalmology 2008, vol.53, no.5, 426-442
- [54] Lewis, M.B., Bowler, P.J. : *Botulinum toxin cosmetic therapy correlates with a more positive mood*. Journal of Cosmetic Dermatology. 2009, vol.8, no.1, 24-26
- [55] Naumann, M., Hamm, H. : *Treatment of axillary hyperhidrosis*. British journal of surgery 2002, no.89, 259-261
- [56] Bushara, K.O., Jonec, J.C., Schutta, H.S. : *Botulinum toxin for axillary and palmar hyperhidrosis*. Journal of the Neurological Sciences 1997, vol.150, 71

[57] <http://www.asklepion.cz/anevs-asklepion-news/anevs-2006-news/anevs-2006-03-1/botox-nebo-dysport.html>

[58] Chertow, D.S., Tan, E.T., Maslanka, S.E., Schulte, J., Bresnitz, E.A., Weisman, R.S., Bernstein, J., Marcus, S.M., Kumar, S., Malecki, J., Sobel, J., Braden, C.R. : *Botulism in 4 adults following cosmetic injections with an unlicensed, highly concentrated botulinum preparation*. JAMA 2006, vol.22, 2476-2479

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	Aminokyselina
BoTN	Botulinum neurotoxin (botulotoxin)
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CDC	Center of Disease Control and Prevention
EEG	Electroencefalogram
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
HC	Těžký řetězec
KDa	Kilodalton
LC	Lehký řetězec
LD ₅₀	Letální dávka pro 50 % pokusných zvířat
MU	Mouse unit
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion
PCR	Polymerase chain reaction
rtg	Rentgenové záření
SIDS	Sudden infant death syndrome
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptors
USA	United States of America
UV	Ultra violet

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM TABULEK

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: NÁZEV PŘÍLOHY