

# Određivanje botulinum toksina

---

Žiha, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:475821>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Karla Žiha

Određivanje botulinum toksina

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2023.

## Sažetak

Prema dosadašnjim istraživanjima, botulinum toksini su najjača identificirana skupina prirodnih toksina, a proizvode ih vrste bakterija roda *Clostridium* koje uzrokuju razvoj bolesti zvane botulizam s karakterističnom akutnom simetričnom paralizom. Zbog jačine simptoma koju izazivaju kod čovjek ove bakterije s mogućim fatalnim ishodom po čovjeka, smatra se važnom svaka prevencija bolesti botulizma za što je potrebno razvijanje kvalitetnih metoda određivanja botulinum toksina. Svrha je rada analizirati postojeće metode određivanja botulinum toksina pri čemu se one dijele na *in vivo* i *in vitro* metode. Smatra se da *in vivo* metode, iako osiguravaju veliku preciznost, zahtijevaju i duže vremenske periode za određivanje što kod određenih tipova toksina iznosi i do par dana. Osim navedenog, *in vivo* metode su skuplje u odnosu na *in vitro* metode zbog korištenja većeg broja živih laboratorijskih životinja. Za razliku od njih, *in vitro* metode skraćuju vrijeme potrebno za analizu, no često pokazuju nedovoljnu osjetljivost. Napretkom tehnologije problematika točnosti i efikasnosti metoda se sve više rješava te znanstvenici uspješno razvijaju *in vitro* metode određivanja s velikom osjetljivošću i preciznošću. Neke od najkvalitetnijih *in vitro* metoda su imunoanaliza, analize temeljene na biosenzorima i fluorescencijske analize.

Ključne riječi: botulizam, *Clostridium*, paraliza, metode određivanja, *in vivo*, *in vitro*

## Abstract

According to today's research, botulinum toxins are the strongest identified group of natural toxins, and they are produced by species of bacteria of the genus *Clostridium* that cause the development of a disease called botulism with characteristic acute symmetrical paralysis. Due to the severity of the symptoms caused by these bacteria in humans, with a possible fatal outcome for humans, any prevention of botulism disease is considered important, which requires the development of quality methods for determining botulinum toxin. The purpose of the work is to analyse the existing methods for determining botulinum toxin, whereby they are divided into *in vivo* and *in vitro* methods. It is considered that *in vivo* methods, although they ensure great precision, require longer periods of time for determination, which for certain types of toxins amount up to a couple of days. In addition to the above, *in vivo* methods are more expensive than *in vitro* methods due to the use of a larger number of living laboratory animals. In contrast to them, *in vitro* methods shorten the time required for analysis, but often show insufficient sensitivity. With the advancement of technology, the problems of accuracy and efficiency of methods are increasingly being solved, and scientists are successfully developing *in vitro* determination methods with great sensitivity and precision. Some of the best *in vitro* methods are immunoassays, analyses based on biosensors and fluorescence analyses.

Key words: botulism, *Clostridium*, paralysis, determination, *in vivo*, *in vitro*

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Botulin.....	2
2.1. <i>Clostridium botulinum</i> .....	2
2.2. Tipovi botulina.....	3
2.3. Strukturne karakteristike botulinum toksina.....	5
2.4. Genetske karakteristike.....	6
3. Botulizam.....	7
3.1. Simptomi.....	7
3.2. Botulizam dojenčadi.....	8
3.3. Botulizam prenesen hranom.....	9
3.4. Botulizam rana.....	10
3.5. Životinjski botulizam.....	11
3.6. Liječenje.....	12
4. Određivanje botulinum toksina.....	14
4.1. <i>In vivo</i> metode određivanja botulinum toksina.....	14
4.2. <i>In vitro</i> metode određivanja botulinum toksina.....	15
4.2.1. Određivanje botulinum toksina imunoanalizom.....	15
4.2.2. Određivanje botulinum toksina lančanom reakcijom polimeraze.....	17
4.2.3. Određivanje botulinum toksina protočnom citometrijom i imunokromatografskim testovima.....	17
4.3. Određivanje botulinum toksina analizom temeljenom na biosenzorima.....	18
4.4. Određivanje botulinum toksina fluorescencijskim analizama.....	19
5. Zaključak.....	21
6. Literatura.....	22

## 1. Uvod

Za čovjeka su toksini uvijek predstavljali prijetnju i zato su konstantna fascinacija znanstvenika diljem svijeta. Toksini su tvari koje proizvode živi organizmi i mogu uzrokovati teške bolesti pri kontaktu s tkivima ili organima. Proizvodi ih širok spektar organizama, poput bakterija, gljivica, biljaka pa čak i životinja. Riječ je o širokom spektru tvari – od malih molekula i peptida pa do proteina. Toksini su u prirodi prisutni od davnina i s godinama su znatno evoluirali u puno specifičnije i opasnije oblike. Prvi put su službeno prepoznati u 19. stoljeću, konkretno se prvi put spominju 1817. godine kada je Friedrich Stromeyer utvrdio toksična djelovanja žive. Nešto kasnije se, 1860. godine, zahvaljujući Louisu Pasteuru prepoznala važnost higijene i pravilne obrade hrane te je u praksu uvedena pasterizacija, odnosno proces uništavanja vegetativnih oblika mikroorganizama uz istovremenu inaktivaciju enzima u hrani. Određivanje toksina se ne provodi jednom univerzalnom tehnikom jer svaki toksin je jedinstven i ponaša se specifično. Iz toga razloga se metode određivanja razvijaju ovisno o karakteristikama ispitivanih toksina. Botulinum toksini (toksini odgovorni za razvoj bolesti zvane botulizam) pripadaju bakterijskim toksinima. Razlikuje se sedam tipova botulinum toksina i svaki od njih, iako su općenito gledano slični, ima neka specifična djelovanja zahvaljujući jedinstvenim biološkim i kemijskim karakteristikama. Jedni su od najopasnijih i najpotentniji toksina poznatih čovjeku te mogu u periodu od jednog dana uzrokovati po život opasne posljedice. Botulizam, iako je nekad bio češća pojava, predstavlja veliku opasnost javnom zdravstvu i zahtjeva preciznu dokumentaciju i istraživanja kemijskih mehanizama djelovanja toksina u svrhu pravilne prevencije i primjene pravilnih terapija. Tijekom godina provedena istraživanja pružila su bolji pogled u strukturu toksina, a time i u način njihova djelovanja na neuromuskularni sustav. Zbog svoje velike specifičnosti, s velikom preciznošću djeluju inhibirajući neurotransmitere, konkretno acetilkolin, neurotransmitter potreban za pravilnu kontrakciju mišića. Drugim riječima, botulinum toksini uzrokuju snažnu, potencijalno smrtonosnu paralizu cijeloga tijela. Do zaraze dolazi već nakon unosa vrlo malih koncentracija toksina. Kako bi se zaraza botulizmom prevenirala, potrebno je razviti pravilne metode određivanja botulinum toksina koje će brzo, precizno i jeftino moći detektirati prisutnost toksina u prehrambenim proizvodima. Iako se danas zna znatno više o botulinum toksinu, zahvaljujući napretku tehnologije znanstvenici konstantno pronalaze nove, poboljšane načine njegova određivanja.

## 2. Botulin

Botulin, bolje poznat kao botulinum toksin, je neurotoksični protein kojeg proizvodi bakterija *Clostridium botulinum*. Specifičan je po tome što je u znanosti poznat kao najpotentniji toksin i iako ima izražena toksična djelovanja, može se koristiti u medicinske i kozmetičke svrhe. Botulin se dijeli na sedam tipova, s oznakama od A do G [1].

### 2.1. *Clostridium botulinum*

*Clostridium* jest rod sporogenih, anaerobnih bakterije koje su široko rasprostranjene u prašini, tlu, među biljkama te se mogu pronaći i u probavnom traktu ljudi i životinja. Rod obuhvaća preko 100 vrsta, različitih fenotipa i genotipa. Bakterije pripadnice ovog roda koje mogu razvijati botulinum neurotoksine obično su ravne ili blago zakrivljene štapičaste bakterije dimenzija 0,6 do 2 mikrometra u širini te 2 do 22 mikrometra u dužini. Spore su im ovalne subterminalne ili centralne. Karakteristično za kulture bakterija koje su izložene uobičajenim anaerobnim uvjetima tekućih medija je da dolazi do razvoja plina. Temperature pri kojima dolazi do razvoja određenih vrsta bakterija koje razvijaju botulinum neurotoksine te druge morfološke karakteristike prikazane su u Tablici 1 [2].

Vrsta bakterije koja pripada ovom rodu je *Clostridium botulinum*, koja djeluje tako što remeti prenošenje impulsa u živčanim završecima. Ova štapičasta anaerobna bakterija je gram–pozitivna, što znači da nakon metode bojanja po Gramu postaje tamnoljubičasta. Najčešća staništa su joj tla, sedimenti i talozi te općenito vodena staništa diljem svijeta. Bakterije stvaraju spore koje imaju izrazito izdrživu građu što im omogućuje preživljavanje u lošim, nepovoljnim uvjetima poput visokih temperatura, nedostatka nutrijenata (okolina siromašna soli i šećerom) i niskog pH okoline. Postoji nekoliko različitih sojeva ove bakterije koji ovisno o svojim karakteristikama daju različite vrste botulina. Vrste koje izazivaju botulizam kod ljudi su A, B, E i F [2]. *C. botulinum*, s obzirom na fiziološke karakteristike, dijeli se na četiri glavne grupe (označene rimskim brojevima: I, II, III, IV) [2].

Tablica 1. Morfološke karakteristike bakterija *Clostridium botulinum* [1]

	<i>C. tetani</i>	<i>C. botulinum</i>			<i>C. argentinense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
		Grupa I	Grupa II	Grupa III			
Tip toksina	TeNT	BoNT/A, B, F	BoNT/B, E	BoNT/C, D	BoNT/G	BuNT/E	BaNT/F
Pozicija spora	T	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Pokretljivost	+	+	+	+	+	+	-
Hidroliza želatine	-	+	-	-	+	-	-
Lipaza	+	+	+	+	+	-	-
Lecitinaza	-	-	-	-	-	-	+
Hidroliza eskulina	-	+	-	-	-	+	+
Proizvodnja indola	+	-	-	+/-	-	-	-
Proizvodnja H <sub>2</sub> S	+	+	-	+/-	+	-	-
Zakiseljavanje glukoze	+	+	+	+	-	+	+
Zakiseljavanje fruktoze	-	-	+	-	-	+	+
Zakiseljavanje saharoze	-	-	+	-	-	+	+
Optimalna temperatura rasta / °C	35-38	30-40	25-30	30-37	30-37	30-37	30-37
Otpornost spora na temperaturu/ °C		104-121	77-82	104	82-120		
Srodne ne-neurotoksične vrste	<i>C. tetanomorphus</i> i <i>C. cochlearium</i>	<i>C. sporogenes</i>		<i>C. oedematiens</i>	<i>C. subterminale</i>		

## 2.2. Tipovi botulina

Botulin A, odnosno botulinum toksin tipa A, jedan je od najpoznatijih tipova botulina zbog svoje uloge u kozmetičkoj industriji, gdje se pronalazi pod nazivom botoks. Definira se kao protein koji se sastoji od teškog i lakog lanca međusobno povezanih disulfidnom vezom. Teški lanac odgovoran je za sposobnost vezanja proteina za specifične receptore živčanih stanica, a laki lanac upravlja enzimskom aktivnošću čime regulira cijepanje proteina koji su potrebni za oslobađanje neurotransmitera. Ukupna masa molekule botulina A iznosi otprilike 150 kDa. Pripada grupi I što znači da ima izraženu proteolitičku aktivnosti te ne uzrokuje pojačavanje kiselosti ugljikohidrata. Vrlo je efektivan u blokiranju otpuštanja acetilkolina, poznatog neurotransmitera koji je izravno odgovoran za kontrakciju mišića. Zbog toga može uzrokovati kratkotrajnu paralizu. Ipak, to djelovanje se može koristiti u dobre svrhe, te se upravo zato u medicini koristi za liječenje grčeva u mišićima uzrokovanih raznim bolestima poput cervikalne distonije (nekontrolirani trzaji mišića vrata), mišićne spastičnosti (nekontrolirani spazmi ekstremiteta), blefarospazma (nekontrolirano stiskanje očnih kapaka) i sličnog. Osim toga, koristi se i u svrhu liječenja kroničnih migrena te inkontinencije mokraćnog mjehura. Unatoč svojoj ulozi u medicini, botulin A je i dalje najbolje poznat kao botoks. Botoks je pročišćeni i razrijeđeni oblik ovoga toksina i koristi se u obliku injekcija. Djeluje na način da privremeno paralizira tretirane mišiće, što kao rezultat daje zaglađenu, mladolikiju kožu, odnosno izgled. Proces tretiranja botoksom relativno je brz i vrlo često ne zahtjeva korištenje anestezije. Efekt tretmana uočljiv je već za par dana pa najviše do jednog tjedna, a može trajati



i po nekoliko mjeseci. Općenito govoreći, smatra se da je botulin A siguran za regularno korištenje, no to ne znači da će uvijek proći bez nuspojava. Najčešće od njih su kratkotrajna slabost mišića, naticanje i bol u području tretiranja, ali i glavobolje te simptomi poput gripe. Vrlo rijetke, ali ipak moguće, su alergijske reakcije. Optimalna temperatura za razvoj botulina A je 37 °C, a termootpornost je najčešće visoka te doseže do temperature od 120 °C. Stjenke su u velikom postotku izgrađene od glukoze [2, 4].

Botulinum toksin tipa B kao i botoks, djeluje na neuromuskularni sustav na način da inhibira proizvodnju acetilkolina. Svrstava se u grupu II koju karakterizira sposobnost zakiseljavanja raznih ugljikohidratnih supstrata, kao što su amigdalin, dekstrin, fruktoza, galaktoza, glukoza, glikogen, maltoza, riboza i slični. Baš poput tipa A, koristi se u medicini u svrhu liječenja bolesti nekontroliranog grčenja mišića, poremećaja u kretanju te migrena. Na tržištu je plasiran kao lijek pod imenom Myobloc, odnosno NeuroBloc, te se koristi intramuskularno. Trajanje jedne doze terapije je do nekoliko mjeseci, ovisno o jačini i vrsti bolesti koju se tretira. Nuspojave ovim lijekovima su jednake kao i botoksu [2, 4].

Botulinum toksin tipa C ima isto inhibirajuće djelovanje na proizvodnju acetilkolina, kao prethodna dva tipa botulin toksina. Za razliku od njih, još se dijeli na nekoliko podtipova, od kojih su bolje istraženi C1, C2 i C3. Konkretni broj podtipova nije poznat budući da su istraživanja nepotpuna i nedovršena, ali je poznato da su im kemijska svojstva i druge karakteristike slične. Botulin tipa C ima izrazitu neurotoksičnost i zato vrlo lako izaziva botulizam, bolest koja ima snažno negativno djelovanje na živčani sustav. Ipak, botulizam koji je uzrokovan tipom C, rjeđi je u ljudi u odnosu na botulizam uzrokovan tipovima A i B. Za razliku od tipa A koji ima jako izražena proteolitička svojstva, tip C pripada grupi III te ih zbog toga gotovo nema ili u potpunosti nema. Također, u suprotnosti tipu A, u sastavu stjenki stanica nema tragova šećera. Optimalna temperatura rasta varira od 30 do 37 °C, ali su zabilježeni slučajevi uspješnog razvoja i pri 45 °C, što tip C čini nadprosječno tolerantnim na povišene temperature. Za sada, botulinum toksin tipa C je i dalje relativno neistraženog biokemijskog značenja i potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo može li se ovaj tip koristiti u neke medicinske svrhe [4].

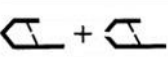

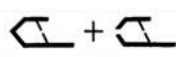





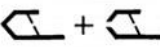

Ostale četiri vrste botulinum toksina nemaju značajna djelovanja, već su poznate samo kao uzročnici botulizma. Botulinum toksin tipa D specifično je poznat primarno kao uzročnik botulizma među ptičjim vrstama (najizraženije među vodenim i divljim vrstama). Botulinum toksin tipa E veže se s botulizmom koji potječe iz hrane. Kako bi se izbjegao, potrebno je pravilno skladištiti morske plodove (kako konzervirane tako i svježe). Botulinum toksin tipa F

također uzrokuje botulizam, no vrlo je rijedak. Može se zadobiti konzumacijom kontaminirane hrane ili kao posljedica izlaganja otvorenih rana bakterijama. Nastaje iz psihotropne podvrste bakterije *Clostridium botulinum*. Naposljetku postoji i botulinum toksin tipa G. Informacije o ovom tipu botulina su slabe i ograničene. Vrlo rijetko je uzrok botulizma u ljudi te se iz toga razloga nisu provodila istraživanja. Informacije koje postoje vezane su uz botulizam dojenčadi koji nastaje kao posljedica izlaganja sporama i bakteriji *Clostridium botulinum* [4].

### 2.3. Strukturne karakteristike botulinum toksina

Prema podacima iz nekoliko provedenih istraživanja kreirana je tablica koja prikazuje strukturne karakteristike antigenski različitih vrsta. Mjerenja provedena na bakterijskim kulturama podijeljena su na razdoblje inkubacije od jednog do četiri dana te na razdoblje inkubacije od četiri do sedam dana. U Tablici 2, debele neisprekidane linije predstavljaju jednolančane polipeptide, a debele na sredini prekinute linije predstavljaju dvolančane polipeptide. Tanka isprekidana linija koja povezuje lance predstavlja disulfidnu vezu. Kod botulinu toksina A, C i D u periodu duže inkubacije zabilježene su samo dvolančane strukture što znači da enzim prisutan u kulturama bakterija cijepa jednostruke lance. Dva zanimljiva odudaranja pri istraživanjima primijećena su kod botulinum toksina tipa B i C2. Kod tipa B pri inkubaciji bakterijskih kultura u periodu od četiri do sedam dana ima prisutnih jednolančanih i dvolančanih struktura neurotoksina, dok u periodu od jednog do četiri dana njih uopće nema. Točan razlog ovoj pojavi nije otkriven. Tip C2 karakterističan je po tome što u prvoj fazi inkubacije, dvolančani polipeptid nije spojen disulfidnom vezom, a za razliku od njega tip C1 ima prisutnu disulfidnu vezu, kao i ostatak tipova toksina. Stoeov radijus botulinum toksina tipa A određen je gel filtracijom i iznosi 48 Å [5].

Tablica 2. Polipeptidni lanci neurotoksina izvedenih iz bakterijskih kultura [5]

	1 do 4 dana	4 do 7 dana
A		
B		
C	 [c <sub>2</sub> ]	 [c <sub>1</sub> ]
D		
E		
F		

## 2.4. Genetske karakteristike

Sve bakterije roda *Clostridium* koje proizvode botulinum neurotoksine pripadaju skupini I 23S homologije rRNA. Usporedbom sa 16S rRNA utvrđeno je da su pripadnice skupine I homogene te tvore zasebnu filogenetsku granu. Genetske studije provedene pomoću metode DNA/DNA hibridizacije pokazale su da fiziološke skupine *C. botulinuma* tvore četiri različita klastera homologije DNA. Dokazano je da su svi sojevi, bez obzira na vrstu toksina, blisko povezani unutar grupa, no povezanost sojeva između grupa je slaba ili nepostojana. Botulinum toksini tipa B, E i F pokazuju homogenost DNA/DNA hibridizacijom te je utvrđeno da tvoje jednu zajedničku filogenetsku skupinu s 99,6 – 99,7 % sličnosti sekvence 16S rRNA. Analizom grupe III utvrđena je određena genetska raznolikost te se prvo botulinum toksin tipa C podijelio na dva podtipa, no danas se sumnja da postoje još neistraženi tipovi [2].

### 3. Botulizam

Botulizam je vrlo rijetka, ali opasna bolest uzrokovana prethodno spomenutim toksinom koji napada živce te uzrokuje poteškoće s disanjem, paralizu mišića pa i smrt. Osnovna podjela botulizma je na ljudski i životinjski. Ljudski botulizam se s obzirom na način zaraze dijeli na botulizam dojenčadi, botulizam prenesen hranom, botulizam rana i inhalacijski botulizam [6, 7]. Botulizam je prvi put dokumentiran 1895. godine kada se smatralo da do zaraze dolazi konzumacijom kobasica. Naziv botulizam prvi je upotrijebio John Müller 1870. godine kao izvedenicu iz latinske riječi za kobasicu (*botulus*). Do tog naziva došlo je zbog masovnih trovanja uzrokovanih konzumacijom nepravilno skladištenih suhomesnatih proizvoda, najčešće kobasica i šunki. Prilikom masovnih trovanja u 19. stoljeću, njemački mikrobiolog Emile-Pierre-Marie Van Ermengem, sakupljao je uzorke mesa za koje se sumnjalo da je uzrokovalo trovanje kao i uzorke organa preminulih od posljedica trovanja. Provođenjem toksikoloških i bakterioloških ispitivanja, pomoću metoda koje je ovo povijesno razdoblje poznavalo, Van Ermengem utvrdio je da je uzrok anaerobna bakterija koja je vrlo vjerojatno u meso životinje dospjela poslije klanja. Bakteriju je nazvao *Bacillus botulinum*, no taj se naziv prestao koristiti kad se bakterija uvrstila u rod *Clostridium* (grč. *kloster*, što znači vreteno). Također, od 1997. godine Jeff Aronson redefinirao je značenje naziva botulinum, izjavivši da naziv treba povezivati s tim da bakterija ima oblik sličan obliku kobasice, a ne s tim da bakterija potječe iz kobasica [8, 9].

#### 3.1. Simptomi

Simptomi botulizma pojavljuju se, ovisno o vrsti botulizma, od dvanaest sati pa do nekoliko tjedana nakon zaraze. Najbrže se razvija botulizam dojenčadi pa nakon njega botulizam prenesen hranom, koji se razvija od dvanaest pa do trideset i šest sati nakon zaraze. Glavni simptomi su slabost mišića, respiratorni problemi, paraliza, gastrointestinalni problemi, pomućenje vida te poremećaji autonomnih funkcija. Slabost mišića se najprije razvija u području lica zbog čega oboljeli mogu primijetiti spuštene, otežane kapke (Slika 1) te razvoj problema s govorom i gutanjem. Kako bolest uznapreduje, slabost mišića prelazi u paralizu najprije glave i vrata pa onda simetrično zahvaća udove. Krajnja faza paralize je zahvaćanje respiratornog sustava zbog čega kod pacijenata dolazi do plitkog, kratkog disanja, ali može doći i do respiratornog zastoja. Od autonomnih disfunkcija može doći do razvoja naglih promjena u tlaku i otkucajima srca, vrtoglavice te prekomjernog znojenja. Za dijagnozu botulizma nije dovoljna samo pojava prethodno navedenih simptoma jer se botulizam i druge bolesti poput

Guillain-Barréovog sindroma te miastenija gravis, očituju jednakim simptomima kao botulizam. Zato je potrebno provesti niz dodatnih pretraga kao što su CT glave, ispitivanje spinalne tekućine ili elektromiografija [10]. Nažalost, često se događa pogrešna dijagnoza pacijenata oboljelih botulizmom, od kojih čak 10,5 % bude pogrešno dijagnosticirano s Guillain-Barréovim sindromom, 6,2 % s trovanjem hranom te 3 % s trovanjem ugljikovim monoksidom. Zbog pogrešnih dijagnoza, oboljeli na vrijeme ne dobivaju adekvatno liječenje te je vrijeme oporavka u konačnici duže i teže, a zbog ovakvih pogrešaka može doći i do smrtnih slučajeva [11].



Slika 1. Pacijent sa simptomima botulizma, paraliza mišića lica [12]

### 3.2. Botulizam dojenčadi

Botulizam dojenčadi se ne razvija kao posljedica konzumacije hrane s razvijenim toksinom, već kao posljedica kontakta s *C. botulinum* sporama koje onda kličaju, razmnožavaju se te stvaraju botulinum neurotoksine u gastrointestinalnom traktu dojenčadi. Da bi do toga došlo, minimalna infektivna doza varira od 10 do 100 spora. Zadržavanje tragova botulina u organizmu dojenčeta može biti čak do 158 dana nakon zaraze. Botulinum toksini tipa A i B su pretežno odgovorni za razvoj ove vrste botulizma zbog njihove predispozicije za lakši razvoj u probavnom traktu. Izolacijom toksina tipa A iz dojenčeta zahvaćenog botulizmom (uzorak 1) i toksina tipa A iz pacijenta oboljelog od botulizma prenesenog hranom (uzorak 2), uočeno je da toksin iz uzorka 1 ne sadrži hemaglutininsku komponentu dok ju toksin iz uzorka 2 sadrži. Slučajevi ovog oblika botulizma zabilježeni su kod djece u dobi od 1 do 6 mjeseci u gotovo svim državama svijeta, a najviše ih je zabilježeno u SAD-u. Fatalnost oblika u korelaciji je s načinom prehrane dojenčadi – ona koja su hranjena dojenjem imaju veći izgled preživljavanja, no simptomi su kroničnijeg oblika. Za razliku od njih, kod djece dojenačke dobi hranjene formulom zabilježen je znatno veći postotak smrtnih slučajeva. Pretpostavlja se da ulogu u tome ima razlika u nutritivnom sadržaju prehrane koja izravno utječe na jačinu imuniteta djeteta. Prvi

simptom koji se pojavljuje kod djeteta oboljelog botulizmom je hipotonija zbog koje dijete drži noge u položaju žabljeg kraka, nakon čega s uznapredovanjem bolesti dolazi do problema s hranjenjem i pojačanog slinjenja zbog čega se djetetu postavlja želučana sonda kako bi olakšala hranjenje. Daljnjim razvojem bolesti dolazi do paralize mišića glave i vrata, ali i cijeloga tijela (Slika 2) [2].



Slika 2. Dojenče s paralizom mišića vrata, glave i udova kao posljedice zaraze botulizmom [13]

### 3.3. Botulizam prenesen hranom

Ovaj oblik botulizma zahtjeva unos kontaminirane hrane u organizam te varira od blagih simptoma pa sve do fatalnih posljedica unutar jednog dana. Pretežno zahvaća odrasle osobe, neovisno o spolu. Za zarazu su uglavnom odgovorni botulinum toksini tipa A, B i E, dok ima samo desetak zabilježenih slučajeva gdje je došlo do zaraze tipovima C i F. Do pojave botulizma iz toksina tipa E dolazi pretežno u hladnijim područjima svijeta poput Aljaske, Grenlanda, Kanade, Skandinavije i Rusije. Razlog tome je vrsta prehrane koja se ondje pretežno konzumira, a to su ribe i druge vrste vodenih životinja, neovisno je li riječ o konzerviranim ili svježim namirnicama. Botulizam nastao kao posljedica tipa A i B zabilježen je u područjima umjerene klime poput SAD-a, Argentine i Kine, a u Europi je najčešće riječ o zarazama uzrokovanim tipom B te je ondje kontaminirano meso glavna preteča zaraze. Najveći broj zaraza ovog tipa nastaje konzumacijom domaće konzerviranih, nedovoljno kiselih namirnica (voća, povrća, ribe i mesa) [2, 10]. Općenito, uvjeti pogodni za razvoj botulizma u hrani su anaerobna okolina, malih koncentracija soli i šećera, pH većeg od 4,6 te temperatura u rasponu od 4 do 45 °C. Do razvoja bolesti dolazi tako što *C. botulinum* proizvodi polipeptidne toksine koji djeluju specifično na neuromuskularne spojnice i kolinergičke sinapse s autonomnim živčanim sustavom (uključuje sve ganglijske sinapse i postganglijske parasimpatičke sinapse).

Djeluju tako što se najprije vežu na receptore koji su smješteni na presinaptičkoj membrani, nakon čega slijedi endocitoza i kompleksan proces koji uključuje translokaciju laganih lanaca u citosol te cijepanje topljivih N-etilmaleimid-osjetljivih proteinskih receptora za pričvršćivanje faktora, aktivnošću metaloproteinaze laganog lanca. Prisutan toksin potom blokira normalno kvantno otpuštanje acetilkolina s presinaptičkih završetaka. U prvom stadiju razvoja bolesti, primarno su zahvaćeni moždani živci i mišići te se pretpostavlja da su tome glavni razlog njihove tri karakteristike. Prva karakteristika koja pogoduje je kratka duljina neurona koji prožimaju moždane mišiće, zbog čega je onda slab tercijarni depozit acetilkolina. Druga bitna karakteristika je ta da su mišići lica konstantno aktivni, čak i za vrijeme sna, što toksinu omogućuje da se vrlo brzo proširi i djeluje. Posljednja karakteristika je ta da nekolicina receptora postsinaptičke mišićne membrane lica brzo pate od nedostatka acetilkolina te ne mogu bez njega pravilno djelovati. Oporavak je moguć jedino razvojem novih završetaka aksona pri čemu novonastali akson stvara vezu s izvornim sinaptičkim mjestima. Vrijeme oporavka može varirati i ovisi o jačini oboljenja te o sposobnosti regeneracije živčanih završetaka i presinaptičkih membrana. Do zahvaćanja središnjeg živčanog sustava ne može doći i toksin ne može proći placentu. Dijagnoza botulizma općenito je prilično teška i vrlo često dolazi do krive dijagnoze. Kako bi se ona olakšala, utvrđene su glavne razlike između bolesti sa sličnim simptomima, koje onda mogu ubrzati proces dijagnoze. Najčešće se događa zamjena botulizma prenesenog hranom s Guillain-Barréovim sindromom, odnosno s njegovom varijantom Miller-Fisher sindromom. [12].

### 3.4. Botulizam rana

Botulizam rana rijedak je oblik botulizma koji nastaje kao posljedica kontakta botulinum toksina ili spora s otvorenim ranama. Za ovaj oblik su opet primarno odgovorni botulinum toksini tipa A i B, koji su izrazito potentni u razmnožavanju u organima. Zaraza se počinje češće pojavljivati među ovisnicima o drogama koje se unose intravenozno, iako je prvi botulizam rana dijagnosticiran 1943. godine kao posljedica inficiranih kirurških rana. Danas je u porastu među ovisnicima o crnom katranu heroinu, s najvišim postotkom oboljelih u Kaliforniji, SAD [10]. Prema svojim karakteristikama, od svih vrsta botulizma, ovaj je najviše analogan tetanusu. U razdoblju od 1943. do 1990. godine u SAD-u je zabilježeno 47 slučajeva botulizma rana, od kojih 46 imaju poznati uzrok. Od 46 oboljelih, 7 ih je preminulo od posljedica botulizma, što odgovara uobičajenom postotku smrtnosti od 15 %. Do botulizma je

u 68,2 % slučajeva došlo preko traumatskih rana, 11,4 % preko kirurških rana, 15,9 % preko intravenoznog unosa nezakonitih droga i 4,5 % preko intranazalne konzumacije kokaina [2].

### 3.5. Životinjski botulizam

Botulizam, osim kod ljudi, može predstavljati probleme i među životinjama. Botulizmu mogu podležiti sisavci, ribe i ptice. Kod ptica, botulizam napreduje kranijalno od nogu, potom uključujući krila, vrat i očne kapke. U početnom stadiju bolesti, ptice postaju preslabe za let, odnosno nisu više sposobne koordinirano i pravilno letjeti. Doimaju se hromo te većinu vremena nepomično sjede s opuštenim, paraliziranim krilima. Kako bolest uznapreduje tako paraliza počinje zahvaćati područje vratnih mišića i mišića glave zbog čega se ptice može pronaći s pognutim glavama, presavijenih vratova te se mogu doimati uginulo (Slika 3). Najveći broj zaraza botulizmom kod ptica dolazi u vrijeme mitarenja. To otežava razlikovanje zdravih ptica od zaraženih, no generalno je pravilo da je zdrave ptice teško uloviti, dok zaražene nisu sposobne lagano pobjeći. Ukoliko se tretira, botulizam kod ptica ima velik postotak izlječenja. Kod goveda, prvi znak zaraze botulizmom je bezvoljno, nezainteresirano ponašanje te manjak kretanja. Također, u ranom stadiju dolazi do slabosti u stražnjim udovima što im otežava ustajanje zbog čega vrijeme provode ležeći. Disfagija, pojava otežanog gutanja, razvija se kod gotovo sve zaražene stoke, a do nje dolazi zbog smanjenja snage jezika te paralize ždrijela. U početnoj fazi, kao i kod ljudi, goveda su budna i prisebna te mogu do neke razine reagirati na vanjske podražaje. Kasnije dolazi do razvijanja fotofobije i potpune paralize zbog čega se goveda pozicioniraju u ležeći položaj i nisu u mogućnosti samostalno piti i jesti. U nekim težim slučajevima dolazi do povraćanja i prekomjernog lučenja sline. Diferencijalna dijagnoza uključuje hipokalcemiju, hipomagnezijemiju, preopterećenje ugljikohidratima i toksikozu, uključujući mikotoksine, olovo, nitrate, organofosfate, atropin ili alkaloid sličan atropinu, paralizu uzrokovanu krpeljima i paralitičku bjesnoću. Konji razvijaju vrlo slične simptome kao goveda, s nešto izraženijom generalnom slabošću mišića i pojavom midrijaze. Primjetna je i razlika u tipu botulinum toksina. Ukoliko je riječ o zarazi botulinum toksinom tipa C dolazi do vrlo izražene midrijaze i jače otežanog disanja, nego što je slučaj prilikom zaraze tipom A ili B. Diferencijalna dijagnoza uključuje trovanje otrovnim biljkama, intoksikaciju organofosfatima, virusni encefalitis konja, traumatu središnjeg živčanog sustava, protozoalni mijeloencefalitis konja, nenormalnu migraciju ličinki prilikom *post mortem* pregleda i hiperamonijemiju. Kao i kod ljudi, dijagnoza je brža i lakša ukoliko je došlo do većeg broja slučajeva na nekom području. *Post mortem* pregled se u većini slučajeva ne prakticira jer



rezultati vrlo često nisu dosljedni ili dovoljni za pravilnu dijagnozu. Također, za pravilne rezultate trebalo bi provesti veći broj takvih pregleda, što najčešće nije moguće ili isplativo. Laboratorijska potvrda koristi se u svrhu dokazivanja botulinum neurotoksina ili klostridija koje stvaraju botulinum neurotoksine u serumu, gastrointestinalnom sadržaju, jetri ili rani. U svrhu liječenja, većinom se koristi terapija polivalentnim antitoksinom, no bitno je da se s primjenom terapije krene što ranije jer je ovaj oblik liječenja učinkovit prije nego što se toksin fiksira na neuromuskularne spojeve. Uporaba antibiotika se izbjegava, no ipak se primjenjuju ukoliko se sumnja na unos botulina inhalacijom ili preko otvorenih rana. Kako bi se životinjski botulizam spriječio, potrebno je koristiti provjerene izvore prehrane, pravilno skladištiti istu te redovito provjeravati ispravnost vode koju životinje konzumiraju [15].



Slika 3. Ptica s paralizom uzrokovanom botulizmom [13]

### 3.6. Liječenje

Za liječenje botulizma bitna je dekontaminacija, korištenje specifičnog protuotrova i u ekstremnijim slučajevima podrška pravilnom radu respiratornog sustava. Nakon što je utvrđen izvor zaraze botulizmom, odnosno nakon što je prekinuta prehrana potencijalno zaraženim namirnicama, kako bi se uklonili tragovi spora i toksina zadržanih u organizmu provodi se ispiranje želudca i/ili klistiranje. Ove metode se vrše ukoliko je zaraza bila relativno nedavna ili ukoliko je došlo do zatvora kao posljedica antikolinergičkog učinka. Drugi pristup je uporaba specifičnog protuotrova, no ovaj pristup je vrlo rijedak i neistražen te je u uporabi većinom kod životinjskog botulizma jer se kod ljudi zbog neučestalih pojava zaraza i zbog kasnih dijagnoza protuotrov ne može koristiti kao oblik terapije s obzirom da u uznapredovanom stadiju botulizma takav pristup nije efikasan. Ipak, dokazano je da su, ukoliko se protuotrov koristi unutar 24 sata od zaraze, kasnije razvijani simptomi puno blaži te je ukupan oporavak brži i lakši. Prosječan boravak u bolnici pacijenata koji su primili protuotrov unutar jednog dana od zaraze iznosi 10 dana, a hospitalizacija pacijenata koji ga nisu primili u prosjeku iznosi 56 dana. U korelaciji s protuotrovom je i stopa smrtnosti, koja kod pacijenata koji su primili protuotrov

iznosi oko 10 do 15 %, dok kod onih koji nisu iznosi čak 46 %. Specifični protuotrov pripravlja se iz krvnog seruma konja koji su stvorili imunost na botulinum toksine. Protuotrov tako sadrži antitijela koja se vežu za molekule toksina, sprječavajući nepoželjno vezanje toksina na neurotransmitere odgovorne za kontrakciju mišića. Postoje dva glavna tipa protuotrova, a to su trovalentni i heptavalentni antitoksin. Kao što je vidljivo iz imena, trovalentni antitoksin djeluje na tri tipa botulinum toksina, konkretno na tipove A, B i E, dok heptavalentni antitoksin djeluje na sedam tipova, odnosno na sve tipove botulinum toksina (A, B, C, D, E, F, G). Ova vrsta terapije primjenjuje se intravenozno i nije uvijek dostupna u svim zdravstvenim sustavima. Zbog podrijetla, može uzrokovati neželjene nuspojave, a može doći i do anafilaksije, no takva reakcija je vrlo rijetka i može se spriječiti poznavanjem alergija pacijenata. Ovisno o vrsti botulizma te o razvijenom simptomima, pacijentu može biti potrebno pomoći s prehranom zbog razvoja disfagije te se tada nužne nutritivne vrijednosti unose intravenoznom prehranom ili ugradnjom cijevi za hranjenje. Ukoliko je izvor zaraze rana, nju je potrebno pravilno očistiti i debridirati. U težim oblicima zaraze, dolazi do paralize mišića respiratornog sustava te u pravilu do 20 do 30 % pacijenata završi na nekom obliku respiratorne potpore [12].

## 4. Određivanje botulinum toksina

Uspješno i precizno određivanje botulinum toksina izrazito je važno za prevenciju zaraze botulizmom, ali i za pravilnu dijagnozu te tretman oboljelih. Određivanje se provodi laboratorijski, a metode određivanja se temelje na detektiranju samoga toksina ili pak na detektiranju prepoznatljivog utjecaja toksina na pojedine atome ili molekule. Metode određivanja dijele se na dvije glavne skupine. Prva su *in vivo* metode, među kojima je dominantan biotest na miševima. U drugu skupinu ubrajaju se *in vitro* metode, a to su imunoanaliza, analiza toksina lančanom reakcijom polimeraze, analiza toksina protočnom citometrijom i imunokromatografskim testovima, analize temeljene na biosenzorima te fluorescencijska analiza. Razvoj novih metoda određivanja botulinum toksina od velike je važnosti za prehrambenu industriju, osiguravanje biološke sigurnosti te u svrhu razvoja novih kliničkih metoda [16].

### 4.1. *In vivo* metode određivanja botulinum toksina

Povijesno gledano, biotest na miševima najšire je korištena metoda određivanja botulinum toksina te se može nazvati „zlatnim standardom metoda“. Miševima se daje intraperitonealna injekciju uzorka zaraženim botulizmom nakon čega se provodi promatranje miševa u svrhu uočavanja nekih od glavnih simptoma zaraze botulizmom poput paralize. Uzorci koji se ubrizgavaju su najvećim dijelom hrana, ali se provode istraživanja i s uzorcima fekalne tvari, želučanog sadržaja, sadržaja rana i seruma. Ovisno o brzini uočene zaraze ili fatalnosti simptoma moguće je odrediti jačinu toksina. Ovom metodom moguće je odrediti do 10 pg/mL, količine jednake letalnoj dozi za miševima. Promatranje uobičajeno traje od dva do četiri dana, s mogućom potrebom produljenja za koji dan ovisno o tipu botulinum toksina na koji se sumnja. Osim intraperitonealnih injekcija, dio istraživanja na miševima prije gotovo dva desetljeća provodio se davanjem intramuskularne injekcije s toksinom (0-200 U/kg tjelesne mase). Zaraženi miševi pružaju svoje stražnje udove te se, ovisno o jačini zaraze, primjećuje stezanje, odnosno uvijanje prstiju. Drugim riječima, što je testni miš više prstiju uvio, to je veća jačina zaraze. Treća metoda promatra sposobnost kretanja zaraženih miševa. Toksin se ovdje također daje intramuskularno u stražnje udove u dozama manjim od letalne (0,2-0,8 LD<sub>50</sub>). Promatra se količina aktivnosti miševa na kotačima za vježbanje te se ovisno o tome utvrđuje jačina uzrokovane paralize. Prednosti ove metode su potreba za manjim brojem testnih subjekata te smanjenje boli kroz koju prolaze [16, 17].

Test složenog mišićnog akcijskog potencijala (eng. *Compound muscle action potential assay*, CMAP) primjenjuje se kod štakora i izravna je mjera prijenosa neuromuskularnog signala za kvantifikaciju botulinum toksina. Prilikom provođenja testa promatraju se promjene u kontrakciji mišićnih vlakana te se sukladno tome bilježi promjena u mikro struji. Ovaj tip testa, za razliku od prethodno navedenih testova, nije široko primijenjen u prehrambenoj industriji [17].

Neuromuskularni biotest je vrsta *ex vivo* metode koja koristi čitave preparate hemidijafragme s prisutnim ošitnim živcem miša ili štakora. Ovo je, od do sada navedenih, najefektnija metoda. U odnosu na biotestove na miševima je znatno kraća te je za cijeli biotest potrebna samo jedna životinja što ga čini i ekonomski prihvatljivijim. Zahvaljujući ovoj metodi uspješno je pronađen antagonist botulinum toksina te je uspješno provedena potpuna analiza antitijela istog [17].

Do sada navedene metode su, zbog korištenja živih, odnosno životinjskih subjekata, izrazito skuplje od *in vitro* metoda. Osim toga, u zadnjih desetak godina sve više se ovakve metode smatra zastarjelima i okrutnima zbog rada na životinjama. Iz tih razloga, *in vitro* metode doživljavaju velik napredak i omogućuju znatno kraći vremenski period potreban za analizu [17].

## 4.2. *In vitro* metode određivanja botulinum toksina

*In vitro*, što znači u staklu, laboratorijske su metode koje se izvršavaju izvan živih bića, odnosno vrše se na izoliranim tkivima, organima ili stanicama. Osim svoje moralne prednosti, *in vitro* metode znatno su jeftinije i omogućuju brže postizanje rezultata. Ove metode se najčešće koriste u svrhu određivanja sigurnosti prehrambenih preparata [18].

### 4.2.1. Određivanje botulinum toksina imunoanalizom

Imunoanalize koriste antitijela za prepoznavanje i vezanje na epitope koji se pronalaze na površini trodimenzionalne strukture toksina. Općenito, ova skupina metoda bazira se na različitim strukturama toksina, a među njima za ovu vrstu toksina se najviše koristi enzimsko imunološka analiza. Analiza započinje dodavanjem uzorka na pločicu prekrivenu hvatajućim antitijelima. Potom se dodaje još antitijela obilježenih s enzimom nakon čega se dodaje supstrat koji uzrokuje promjenu boje uzorka ukoliko je u njemu prisutan toksin. Glavna prednost

ovakvih metoda je skraćivanje vremena određivanja s par dana na nekoliko sati. Podvrsta imunoanalize je imunoenzimski test (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). ELISA se koristi proteklih 30 godina u svrhu određivanja botulinum toksina, ponajviše za određivanje točnog tipa toksina. „Sendvič“ ELISA kao podvrsta metode temelji se na antigen-antitijelo interakcijama, na način da se upotrebljavaju dva specifična antitijela toksina, primarno i sekundarno. Primarno antitijelo služi kao prihvatno antitijelo, odnosno služi za „hvatanje“ antigena, a sekundarno antitijelo se naknadno dodaje u svrhu detekcije na način da se veže s nastalim kompleksom antitijela i antigena. Sekundarno antitijelo uobičajeno je konjugirano za enzim koji cijepa specifični supstrat što rezultira stvaranjem obojenog ili luminiscentnog signala. Količina toksina prisutna u uzorku je u pravilu proporcionalna jačini signala koji nastaje. Osim za enzim, sekundarno antitijelo se može vezati za biotin koji se naknadno veže za konjugat streptavidina, proteina pročišćenog iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Tijekom godina provedeno je nekoliko dorada ELISA analize čime je pojačana osjetljivost analize na botulinum toksin, a time je olakšana detekcija istog. Zahvaljujući monoklonskim antitijelima visokog afiniteta postignuto je pojednostavljenje metoda imunoanalize povećanjem osjetljivosti na toksin, odnosno pri znatno manjim količinama dolazi do detekcije botulinum toksina tipa A i B [16, 17].

Tip ELISA analize koji se češće koristi za određivanje botulinum toksina je pojačana ELISA, konkretno digoksigenin-ELISA (DIG-ELISA). Temelji se na amplifikaciji produkta enzimske reakcije te može biti jednokratna ili reakcija u više koraka, ovisno o potrebama analize. Ovaj tip analize je razvila Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) i primjenjuje se u javnom zdravstvu i prehrambenoj industriji. DIG-ELISA-om moguće je utvrditi botulinum toksine tipa A, B, E i/ili F. Prepoznavanje navedenih tipova toksina moguće je preko poliklonskih protutijela koja su specifična za svaki zasebni tip. Granica detekcije iznosi od 1 do 10 MLD ovisno o tipu toksina. Trajanje analize je najviše šest sati. Peptid-ELISA tehnika je koja zahtjeva samo 3 sata za određivanje botulinum toksina tipa A. Koristi polipeptid C11-019, ciklički specifični peptid koji veže toksin za matricu polietilen maleinskog anhidrida. Vezanjem dolazi do faze hvatanja nakon čega poliklonska antitijela odgovarajuća tipu A služe kao reagens za detekciju. Granica detekcije ove vrste analize iznosi 1pg/mL. Metoda koja nije zaživjela zbog svojih nedostataka je liposomska-ELISA ili skraćeno L-ELISA. Ova metoda se razlikuje od ostalih po tome što se koriste liposomi koji sadrže ganglioide umjesto antitijela. Nažalost, nedostatak metode je pojava lažnih signala, tj. lažno pozitivnih rezultata zbog nespecifičnosti liposoma [17].

#### 4.2.2. Određivanje botulinum toksina lančanom reakcijom polimeraze

Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR) je postupak vrlo brzog umnažanja malih dijelova DNA ponavljanjem ciklusa sinteze *in vitro* pomoću DNA-polimeraze. PCR pojednostavljuje promatranje ispitivanih dijelova DNA. Tehnika je razvijena osamdesetih godina prošlog stoljeća, no u svrhu određivanja botulinum toksina koristi se tek zadnjih desetak godina. Točna metoda određivanja naziva se imuno-PCR te je slična ELISA metodama. Razlika leži u sekundarnim antitijelima, koja su kod imuno-PCR-a konjugirana s reporterskom DNA molekulom umjesto s enzimom. Fragment DNA konjugiran sa sekundarnim antitijelom koje ima svrhu specifičnog otkrivanja toksina lako se umnožava korištenjem normalnog PCR-a ili PCR-a u stvarnom vremenu. Imuno-PCR metoda pojačava osjetljivost određivanja toksina za tisuću puta, a rezultati analize botulinum toksina tipa A konkuriraju biotestovima na miševima. Granica detekcije iznosi 1 pg/mL [17, 19].

#### 4.2.3. Određivanje botulinum toksina protočnom citometrijom i imunokromatografskim testovima

Protočna citometrija je metoda kojom se mjere fizikalne i imunokemijske osobine bioloških čestica i stanica tijekom njihovog prolaska kroz mjerni uređaj u struji tekućine. Stanice se obasjaju laserskom svjetlošću, a stupanj raspršenosti svjetla pokazatelj je karakteristika proučavanih čestica. Mjeri se intenzitet fluorescencije pojedinačnih čestica. Multipleksirana protočna citometrija koristi se za određivanje botulinum toksina tipa A i B u uzorcima hrane. Određivanje se vrši uz pomoć fluorescentnih magnetskih kuglica s granicom detekcije od 21 pg/mL za tip A i 73 pg/mL za tip B. Dodatno poboljšanje protočne citometrije omogućeno je primjenom automatizirane fluidne platforme za obradu uzorka te ispiranje matrice uzorka, koja sadrži i specifična antitijela, pri čemu se postiže osjetljivost od 50 pg/mL [17].

U slučaju nedostupnosti kompleksne aparature i manjka osoblja kvalificiranog za baratanje istim, imunokromatografski testovi idealna su vrsta metoda. U imunokromatografske testove ubrajaju se imunološko ispitivanje bočnog protoka (eng. *Lateral flow assays*, LFA) i ispitivanje pomoću kolone (eng. *Column flow assays*, CFA). LFA metode provode se pomoću testnih štapića načinjenih od nitroceluloznih traka. Na njima je naznačena linija za primarna antitijela, a ostali reagensi poput sekundarnih antitijela, pufera i kontrolnih antitijela su osušeni u zoni uzorka. Uzorak toksina kojeg se određuje nanosi se u obliku kapi na označenu zonu uzorka, nakon čega se zahvaljujući hidrataciji reagensa omogućuje vezanje toksina sa

sekundarnim antitijelima. Tako vezani toksin sa sekundarnim antitijelom migrira iz zone uzorka u zonu detekcije gdje ga „hvata“ primarno antitijelo. Ukoliko je toksin prisutan u uzorku, kao rezultat opisanog vezanja s označenim sekundarnim antitijelom, na štapiću je vidljiva obojena linija. Najčešće je riječ o crvenoj liniji koja nastaje zbog korištenja koloidnog zlata za označavanje. Rezultati LFA metoda nastaju unutar 15 minuta, a granica detekcije iznosi od 5 do 50 ng/mL, ovisno o tipu botulinum toksina. Problem metoda je nedovoljna specifičnost ukoliko se za označavanje koristi koloidno zlato ili zlatne nanočestice. Trenutno rješenje je zamjena koloidnog zlata s peroksidazom hrena, zahvaljujući kojoj se osjetljivost smanjuje na 1 do 2 ng/mL te se sprječava unakrsna reaktivnosti između tipova A, B i E. CFA su nešto osjetljivije metode u odnosu na LFA i također ne zahtijevaju složenu tehnologiju za provođenje testova. Primjer CFA za određivanje botulinum toksina je imunoafinitetna kromatografija (eng. *immunoaffinity chromatography*, IAC). Kod nje se koristi kolona prethodno napunjena matricom povezanom s primarnim antitijelima. Uzorak se zatim nanosi na kolonu, nakon čega slijedi ispiranje i nanošenje sekundarnih antitijela kako bi došlo do razvitka boje. Intenzitet razvijene boje proporcionalan je koncentraciji toksina u uzorku. Granica detekcije za IAC iznosi od 0,5 do 50 ng za botulinum toksine tipa A, B, E i F. Ova vrsta analize idealna je ukoliko je toksin prisutan u niskim koncentracijama i velikom volumenu te je iz tog razloga potrebno brzo „obogaćenje“ toksina [17].

### 4.3. Određivanje botulinum toksina analizom temeljenom na biosenzorima

Analize temeljene na biosenzorima metode su korištene u raznolikim područjima istraživanja. Primjenjuju se za brzo određivanje botulinum toksina te su temeljene na površinskog plazmonske rezonanciji, refraktometriji i fluorescenciji. Analize temeljene na biosenzorima koje se koriste za dokazivanje botulinum toksina su analize biosenzorima s bidifrakcijskom rešetkom (eng. *bidiffractive grating* (BDG) *biosensor assay*), niz analiza biosenzorima, ELISA na čipu i aptamer-elektrokemijski test [17].

Analize biosenzorima s bidifrakcijskom rešetkom provode se koristeći aparaturu građenu od plastičnog čipa s dvostrukom mikroreljefnom rešetkom. Struktura dvostruke rešetke načinjena je od dvije uniformne rešetke načinjene linearnom polarizacijom. Kontaktom molekula s površinom senzora nastaje promjena u indeksu loma svjetlosti koja se širi. Ovom metodom moguće je odrediti 100 ng/mL botulinum toksina tipa A ili B. Nažalost, ova metoda ima značajne nedostatke u osjetljivosti zbog čega su vrlo česte pogreške pri mjerenjima [17].

Metoda niza analiza biosenzorima temelji se na formiranju niza imobiliziranih reagensa za „hvatanje“ što ovu metodu čini pogodnom za određivanje višestrukih analita. Sustav koji tvori niz analiza biosenzorima dijeli se na dvije skupine. U prvoj skupini se nalaze polimeri nukleotida ili aminokiselina u nizovima koji se koriste za genetske provjere i provjere lijekova. Druga skupina se sastoji od većih molekula poput duljih lanaca nukleinskih kiselina ili antitijela u svrhu postizanja veće specifičnosti vezanja. Senzorski nizovi korišteni u ovoj metodi koriste optičke detektore. Granica detekcije botulinum toksina iznosi od 20 do 500 ng/mL.

ELISA na čipu nastala je križanjem dvije metode – ELISA i LFA. Aparatura se sastoji od dvije plastične ploče, gornje i donje, napravljene prešanjem polikarbonata. Gornja ploča se sastoji od dva unakrsna kanala urezana na donjoj strani, vodoravnog dijela za apsorpciju protoka te imunotrakice položene između gornje i donje ploče. Dijelovi aparature su povezani UV osjetljivim ljepilom. Imunotrakice sadrže dva monoklonska antitijela specifična za teški lanac botulinum toksina tipa A. Jedno monoklonsko antitijelo koristi se kao primarno i imobilizirano je na nitroceluloznu membranu. Drugo, u kombinaciji s peroksidazom hrena, koristi se kao sekundarno antitijelo za detekciju. Nastali obojeni signal proporcionalan je koncentraciji toksina u uzorku. Granica detekcije iznosi 2 ng/mL za botulinum toksin tipa A što je znatno ispod granice tradicionalne ELISA metode [17].

Aptamer-elektrokemijski test metoda je koja kombinira elektrokemijsku metodu uz enzimsko pojačanje i aptamer sondu koja prolazi kroz induciranu konformacijsku promjenu nakon vezanja toksina. Aptameri su molekule oligonukleinske kiseline ili peptida koje se vežu na specifičnu molekulu te se s obzirom na to dijele na DNA/RNA i na peptidne aptamere. Kod ove metode, aptamer je dvostruko obilježen biotinom i fluoresceinom. Granica detekcije ove metode iznosi 40 pg/mL za botulinum toksin tipa A [17, 20].

#### **4.4. Određivanje botulinum toksina fluorescencijskim analizama**

Fluorescencijske analize razvijene su u svrhu visokoučinkovitog određivanja botulinum toksina tipova A, B, E i F. Temeljene su na serotip specifičnim promjenama fluorescencije specifičnog supstrata uzrokovanim enzimskim djelovanjem. Analize na temelju fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije (eng. *Fluorescence resonance energy transfer*, FRET) kao supstrat koriste oligopeptid s dvije oznake – fluorescentnim prigušivačem na jednom i fluorescentnim donatorom na drugom kraju. Dok su krajevi u kontaktu signal je jak zbog slobodnog prijenosa fluorescentne energije. U kontaktu s toksinom dolazi do cijepanja supstrata



i time do razdvajanja krajeva zbog čega FRET slabi. Slabljenje signala proporcionalno je s koncentracijom prisutnog toksina u uzorku. Sve metode koje pripadaju fluorescentnim analizama izrazito su osjetljive i brze. Granica detekcije kod većine iznosi 1 do 3 pg/mL, a vrijeme potrebno za analizu može varirati od samo 15 minuta pa do 3 sata [17].

## 5. Zaključak

Botulinum toksini su jedni od najopasnijih otrova poznatih čovjeku. Potječu iz bakterija roda *Clostridium* i uzrokuju bolest zvanu botulizam. Iako u početku znanstvenici nisu prepoznali izvore zaraze, pokazalo se da su glavna prijetnja nepravilno konzervirani domaći proizvodi poput domaćih zirnica ili suhomesnatih proizvoda. Veliki problem ova je bolest predstavljala u vrijeme svjetskih ratova, kada su zbog nestašica hrane, građani posezali za konzerviranim namirnicama koje su vrlo lako i često bile zaražene. Od sedam vrsta botulinum toksina, tipovi A, B i E predstavljaju glavnu prijetnju čovjeku. Napretkom industrije, botulizam je većim dijelom iskorijenjen i nije više onako česta pojava kao što je bio do 19. stoljeća. Osim hranom, botulizam se može zadobiti inhalacijom toksina ili preko otvorenih rana. Nažalost, s urbanizacijom društva raste i problem s raznim vrstama ovisnosti te se sukladno tome povećava problem izbijanja botulizma rana među ovisnicima. Pojavljuje se najviše među ovisnicima o heroinu, koji kao posljedicu konstantnog intravenoznog unosa droga, posjeduju otvorene, netretirane rane koje su savršeno mjesto razvoja botulizma. Iako je medicina znatno napredovala, dijagnostika botulizma i dalje je relativno komplicirana zbog sličnosti simptoma s drugim vrstama paraliza. Za pravilnu dijagnozu neophodna je laboratorijska analiza. Određivanje botulinum toksina započelo je s biotestovima na miševima, metodom koja se pokazala točnom, no ne dovoljno brzom. Također, velika mana je potreba za većim brojem testnih subjekata što metodu čini ekonomski nepogodnom. Danas, zbog potrebe za bržom analizom i jeftinijim rješenjima, ali i zbog velikog utjecaja aktivista na znanost, sve više se koriste *in vitro* metode. Problem u razvoju ovih metoda uglavnom je predstavljalo postizanje specifičnosti na botulinum toksin. Imunoanaliza pokazuje velik potencijal unazad desetak godina. Uglavnom se koriste antitijela kako bi se dokazao toksin te su uspješno razvijene metode koje, uz veliku specifičnost i osjetljivost, zahtijevaju vrlo kratke vremenske periode za dokazivanje (od jednog do šest sati). Osim nje, velik potencijal leži u fluorescentnim analizama koje karakteriziraju visoka osjetljivost i preciznost, ali i kratki vremenski period potreban za dokazivanje. Iako *in vivo* metode osiguravaju preciznost u svojim rezultatima i osiguravaju širok spektar mogućnosti pri istraživanju, napretkom tehnologije *in vitro* metode uspješno daju pozitivne rezultate o kojima se do prije trideset godina nije moglo ni sanjati. Postignuta napredovanja u određivanju botulinum toksina osiguravaju napredak u prehrambenoj te u medicinskoj, odnosno kozmetičkoj industriji, a time i u poboljšanju kvalitete života ljudi.

## 6. Literatura

- [1] World Health Organization: Natural toxins in food  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/natural-toxins-in-food> (20.5.2023.)
- [2] C. Montecucco, *Clostridial Neurotoxins*, Springer, Padova, Italija, 1995
- [3] Centers for Disease Control and Prevention, *Botulism* <https://www.cdc.gov/botulism/general.html> (20.5.2023.)
- [4] A. Carruthers, J. Carruthers, *Botulinum Toxin Type A: History and Current Cosmetic Use in the Upper Face*, Seminars in cutaneous medicine and surgery, WB Saunders 20 (2001) 71-84
- [5] G. E. Lewis JR., *Biochemical Aspects of Botulism*, Academic Press, Inc., New York, SAD, 1981
- [6] World Health Organization: Botulizam  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism> (29.6.2023.)
- [7] M. Pirazzini, O. Rossetto, R. Eleopra, C. Montecucco, *Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology*, Pharmacological Reviews 69 (2017) 200-235
- [8] R. Maki, *Origin of the name: Clostridium botulinum*, University of Pittsburgh  
<http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/clostridium-botulinum.asp> (5.7.2023.)
- [9] J. Aronson, *When I use a word...: Sausages*, BMJ, 1997
- [10] J. N. Parker, P. M. Parker, *The Official Patient's Sourcebook on Botulism*, ICON Health Publications; San Diego, SAD, 2002
- [11] D. Lonati, A. Schicchi, M. Crevani, E. Buscaglia, G. Scaravaggi, F. Maida, M. Cirronis, V. M. Petrolini, C. A. Locatelli, *Foodborne Botulism: Clinical Diagnosis and Medical Treatment*, Toxins 12 (2020) 509
- [12] <https://en.wikipedia.org/wiki/Botulism> (29.6.2023.)
- [13] D. Emmeluth, *Deadly Diseases and Epidemics: Botulism*, Chelsea House Publishers, New York, SAD, 2010
- [14] D. J. Passaro, S. Benson Werner, J. McGee, W. R. Mac Kenzie, D. J. Vugia, *Wound Botulism Associated With Black Tar Heroin Among Injecting Drug Users*, JAMA 279 (1998) 895-863
- [15] F. Anniballi, A. Fiore, C. Löfström, H. Skarin, B. Auricchio, C. Woudstra, L. Bano, B. Segerman, M. Koene, V. Båverud, T. Hansen, P. Fach, A. Tevell Aberg, M. Hedeland, E. Olsson Engvall, D. De

Medici, *Management of Animal Botulism Outbreaks: From Clinical Suspicion to Practical Countermeasures to Prevent or Minimize Outbreaks*, Health Security 11 (2013) 191-199

[16] J. W. Grate, M. G. Warner, C. J. Bruckner-Lea, R. M. Ozanich, *Advances in assays and analytical approaches for botulinum-toxin detection*, Trends in Analytical Chemistry 29 (2010) 1137-1156

[17] A. J. Singh, L. H. Stanker, S. K. Sharma, *Botulinum neurotoxin: Where are we with detection technologies?*, Critical Reviews in Microbiology 39 (2012) 43-56

[18] G. Eisenbrand, B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B. J. Blaauboer, A. Boobis, A. Carere, S. Kevekordes, J. C. Lhuguenot, R. Pieters, J. Kleiner, *Methods of in vitro toxicology*, Food and Chemical Toxicology 40 (2002) 193-236

[19] National Human Genome Research Institute: POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction> (25.8.2023.)

[20] B. O'Farrell, *Lateral Flow Immunoassay Systems*, The Immunoassay Handbook, Elsevier, 2013, 89-107