

Received: 10.03.2019
Accepted: 14.01.2020
Published: 15.05.2020

Metody stosowane do wykrywania i identyfikacji toksyn botulinowych w próbkach klinicznych i żywności*

Detection methods of botulinum neurotoxins in clinical and food samples

Karolina Rudnicka¹, Karolina Durka¹, Paweł Chwaluk^{2,3}, Magdalena Chmiela¹

¹ Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

² Wojewódzki Szpital Specjalistyczny w Białej Podlaskiej, Biała Podlaska

³ Zakład Biomedycznych Podstaw Nauk o Zdrowiu, Katedra Nauk o Zdrowiu, Wydział Turystyki i Zdrowia w Białej Podlaskiej, Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie, Biała Podlaska

Streszczenie

Botulizm to ciężka choroba porażenna, wywoływana przez toksynę botulinową, wytwarzaną przez beztlenową Gram-dodatnią laseczkę *Clostridium botulinum*. Wyróżniono siedem serotypów neurotoksyny BoNT: A-G, u człowieka znaczącą rolę odgrywają BoNT A/B/D/E. Botulizm pokarmowy (klasyczny) występujący po spożyciu żywności zawierającej toksynę botulinową jest najczęściej występującą postacią zatrucia jadem kiełbasianym. Diagnostyka botulizmu opiera się na objawach klinicznych, natomiast badania laboratoryjne prowadzi się w celu potwierdzenia etiologii objawów i identyfikacji typu BoNT wywołującego chorobę. W artykule omówiono metody laboratoryjne stosowane w diagnostyce zatruc jadem kiełbasianym, opisując zarówno testy rekomendowane przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC), jak i alternatywne techniki molekularne. Posługując się danymi epidemiologicznymi Państwowego Zakładu Higieny (PZH) oraz kronikami *Przeglądu Epidemiologicznego*, przedstawiono częstotliwość występowania botulizmu pokarmowego w Polsce w ciągu ostatnich 18 lat. Poszukując alternatywnych metod identyfikacji BoNT w próbkach klinicznych, zgromadzono i przeanalizowano literaturę na temat nowoczesnych technik molekularnych stosowanych do wykrywania toksyny botulinowej oraz porównano ich czułość i swoistość do nadal stosowanych testów biologicznych.

Słowa kluczowe:

toksyna botulinowa • *Clostridium botulinum* • zatrucie jadem kiełbasianym • botulizm pokarmowy • diagnostyka mikrobiologiczna

Summary

Botulism is a severe neuroparalytic illness, which affects the nervous system. It is caused by botulinum neurotoxins (BoNTs), produced by anaerobic gram-positive bacteria *Clostridium botulinum*. There are 7 serotypes of BoNT A-G, but BoNT A/B/D/E plays a major role

*This article is based upon work from COST Action CA18113, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology) www.cost.eu.

in botulism affecting humans. Foodborne botulism (classic botulism) is the most frequent clinical manifestation occurring after consumption of food containing botulinum neurotoxins. The diagnosis of botulism is based on clinical symptoms; however, recommended and alternative laboratory methods are used to confirm the etiology of symptoms and the identification of BoNT toxin type. The aim of this work was to present the epidemiology of foodborne botulism in Poland and to gather and analyze the available diagnostic methods that allow us to detect BoNT in clinical samples. Using the epidemiological reports of National Institute of Hygiene in Poland and findings presented in the Przegląd Epidemiologiczny, the incidence of classical botulism in Poland has been presented over a period of recent 18 years. Searching for the optimal diagnostic method for BoNT identification in various samples, we have confronted the sensitivity and specificity of recently available alternative methods with classical biological assay.

Keywords: botulinum toxin • Clostridium botulinum • intoxication • foodborn botulism • microbiological diagnostics

GICID: 01.3001.0014.1439
DOI: 10.5604/01.3001.0014.1439
Word count: 8605
Tables: 3
Figures: 4
References: 112

Adres autorki: dr Karolina Rudnicka, Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail: karolina.rudnicka@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ALISA** – test z dużym obszarem immunosorbentu (assay with a large immuno-sorbent surface area); **AFLP** – polimorfizm długości powielanych fragmentów DNA (amplified fragments length polymorphism); **ANTP** – powiązane nietoksyczne białka (associated non-toxic proteins); **AOAC** – Stowarzyszenie Analityków Chemicznych (Association of Official Analytical Chemists); **BoNT** – toksyna botulinowa (Botulinum NeuroToxin); **CDC** – Centrum Kontroli i Zwalczenia Chorób (Center for Disease Control and Prevention); **DIG-ELISA** – wzmocniony test ELISA (digoxigenin ELISA); **ECL** – elektrochemiluminescencja (electrochemiluminescence); **EDL** – prostownik długi palców (extensor digitorum longus); **ELISA** – test immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay); **EPS** – skuteczny wynik paraliżu (effective paralysis score); **ESI** – jonizacja przez elektrorozpylanie (electrospray ionization); **FDA** – Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration); **FDC** – funkcjonalna podwójna powłoka (functional dual coating); **FRET** – transfer energii rezonansu fluorescencji (fluorescence resonance energy transfer); **GBS** – żelatynowy płyn zbierający buforowany fosforanami (gelatin phosphate buffered collecting fluid); **HA** – hemaglutynina (hemagglutinin); **HC** – łańcuch ciężki (heavy chain); **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (high-performance liquid chromatography); **LC** – łańcuch lekki (light chain); **LFA** – test przepływu bocznego (lateral flow assay); **MALDI-TOF** – desorpcja laserowa wspomaganą matrycą z użyciem analizatora czasu przelotu jonów (matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight); **MBA** – test biologiczny na myszach (mouse bioassay); **MLD₅₀** – najmniejsza dawka wywołująca śmierć 50% zwierząt (minimum lethal dose); **MS/MS** – tandemowa spektrofotometria mas (mass spectrometry); **NIZP-PZH** – Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny; **NSF** – czynnik wrażliwy na działanie N-etylomaleimidu (N-ethylmaleimide-sensitive factor); **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction); **PZH** – Państwowy Zakład Higieny; **RAPD** – analiza polimorfizmu losowo powielanych fragmentów DNA (random amplified polymorphic DNA); **RT-PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (reverse transcription polymerase chain reaction); **SNAP-25** – 25 białko związane synaptosomalnie (synaptosomal-associated protein 25); **SNARE** – rozpuszczalny receptor białkowy wiążący NSF (soluble NSF attachment protein receptor).

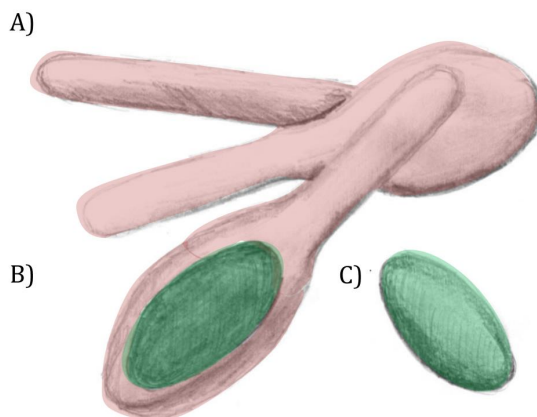
CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Wzmianki na temat zatruc pokarmowych wywołanych jadem kiełbasianym z towarzyszącą im chorobą porażenną sięgają XIX w., kiedy belgijski mikrobiolog Emile Pierre Marie van Ermengem oraz niemiecki poeta i lekarz medycyny Justinus Kerner opisywali przypadki zatruc pokarmowych o nieokreślonej etiologii. Dziś czynnik etiologiczny botulizmu jest dobrze poznany [3, 8].

Clostridium botulinum (*C.botulinum*) jest ściśle beztlenową, przetrwalnikującą, Gram-dodatnią laseczką wytwarzającą owalne, umiejscowione subterminalnie spory odporne na czynniki środowiskowe (ryc. 1). *C. botulinum* to odrębny gatunek, składający się z co najmniej trzech grup zróżnicowanych genetycznie [14, 47, 52, 63, 74]. Ta kosmopolityczna grupa bakterii występuje w glebie, osadach morskich, mułach rzecznych oraz jeziornych. Kolonizuje przewód pokarmowy ssaków, ptaków i ryb, zanieczyszcza przetwory warzywne, mięsne, rybne, miody i syropy [16, 54, 70, 74, 86, 87]. Laseczki *C. botulinum* wytwarzają jedną z najsilniejszych toksyn bakteryjnych – toksynę botulinową BoNT (Botulinum NeuroToxin), która łącząc się z płytką nerwowo-mięśniową, zaburza przekazywanie między synaptyczne. Zidentyfikowano siedem serotypów toksyny BoNT: A-G różniących się budową antygenową, lecz wykazujących niemal identyczne działanie farmakologiczne. Za objawy botulizmu u ludzi odpowiadają BoNT A/B/E/F, a u zwierząt BoNT C/D. Większość serotypów ulega również podziałom wewnątrz swojej grupy [8, 14, 52] (tabela 1).

POSTACIE KLINICZNE BOTULIZMU

Botulizm to rzadka choroba o ciężkim przebiegu, atakująca układ nerwowy ludzi i zwierząt. W pierwszych etapach dochodzi do porażenia nerwów czaszkowych, co objawia się m.in. zaburzeniami widzenia, a następnie wystąpienia ostrego, symetrycznego, zstępującego i obustronnego wiotkiego porażenia mięśni. Nielezione



Ryc. 1. Morfologia laseczek *C. botulinum*: A) laseczka niezawierająca przetrwalnika; B) laseczka z charakterystycznie zlokalizowanym przetrwalnikiem (endosporą); C) egzospora poza komórką macierzystą

zatrucie jadem kiełbasianym może doprowadzić do zatrzymania oddychania lub pracy mięśnia sercowego i śmierci. Wskaźnik śmiertelności botulizmu pokarmowego wynosi średnio 5–10% [2, 14, 18, 21]. W zależności od drogi przedostawania się toksyny BoNT do organizmu wyróżniono sześć typów klinicznych botulizmu: pokarmowy, niemowlęcy, przyranny, jatrogenny, inhalacyjny oraz botulizm pochodzenia jelitowego u dorosłych [11, 12, 14, 86]. Do najczęściej występujących postaci botulizmu, poza botulizmem pokarmowym, jest botulizm niemowląt, któremu poświęcono odrębne prace przeglądowe [1, 11, 76, 86, 87].

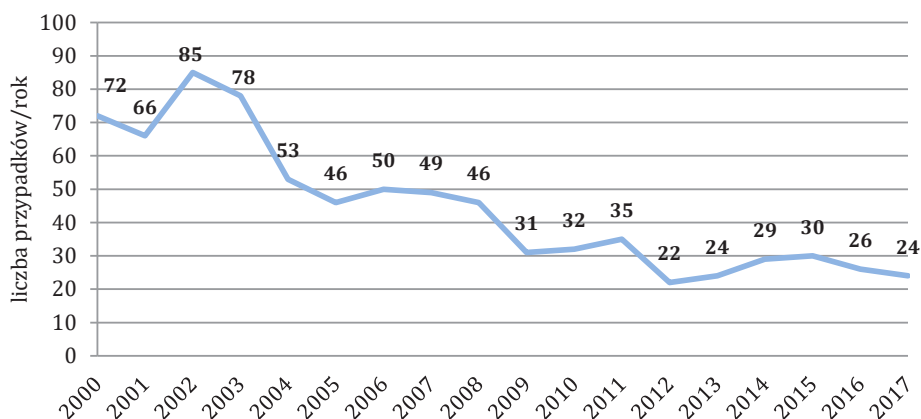
EPIDEMIOLOGIA ZATRUC JADEM KIEŁBASIANYM W POLSCE NA PRZESTRZENI OSTATNIH DZIESIĘCIOLECI

Polska od wielu lat znajduje się w czołówce krajów o największym odsetku występowania botulizmu pokarmowego i zajmuje niechlubne pierwsze miejsce w Europie

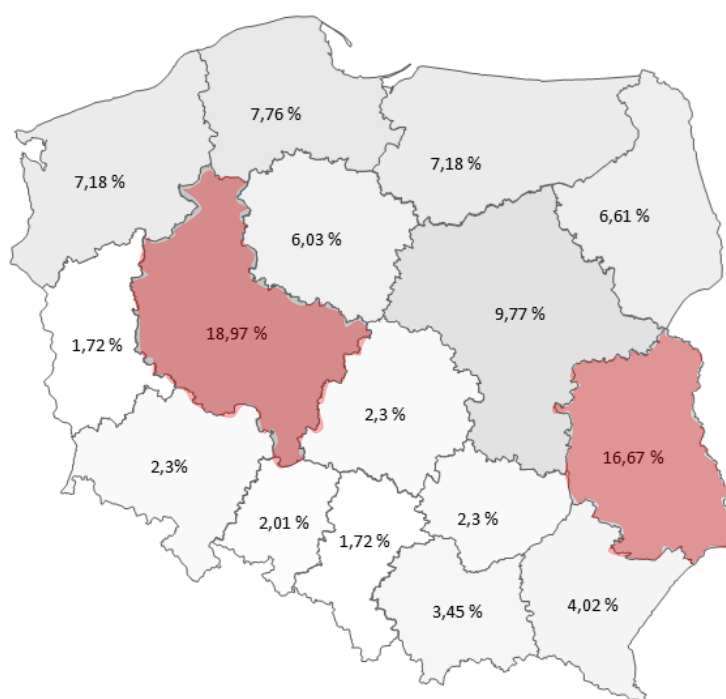
Tabela 1. Wybrane właściwości *C. botulinum* grupy I i II (zmodyfikowano na podst. [53])

Właściwości		Grupa I	Grupa II
typ neurotoksyny		A, B, F	B, E, F
botulizm u ludzi		+	+
stężenie NaCl hamujące wzrost		10%	5%
temperatura wzrostu	minimalna	10°C	3,3°C
	optymalna	35-40°C	18-25°C
D 100°C/spor		25 min.	<0,1 min.
D 121°C/spor		0,1-0,2 min.	<0,001 min.
Występowanie		powszechne, typ A dominuje w Zach stanach USA, typ B dominuje w Azji, Europie, Wschodnich stanach USA	powszechne, typ E osady morskie na całym świecie

D (dziesięciokrotna redukcja) – czas niezbędny do eliminacji 90% bakterii w danej temperaturze.



Ryc. 2. Liczba przypadków zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w latach 2000–2017 (opracowano na podstawie danych pochodzących z biuletynów NIZP-PZH)



Ryc. 3. Średni odsetek przypadków botulizmu pokarmowego odgotowywany w Polsce, w poszczególnych województwach, w latach 2007–2017. Opracowano na podstawie danych pochodzących z biuletynów Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (PZH 2007–2017)

w rankingu European Centre for Disease Prevention and Control. W Polsce notuje się ponad 27% wszystkich przypadków botulizmu pokarmowego [67]. Mimo to, od ponad dekady liczba przypadków botulizmu nie przekracza 35 rocznie. Według danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie liczba zgłoszonych przypadków botulizmu ludzi w Polsce zmniejszyła się kilkukrotnie w ostatnich 20 latach (ryc. 2). Przyczyną tego może być m.in. poprawa stanu wiedzy na temat przyczyn zatrucia jadem kiełbasianym oraz prawidłowego konserwowania żywności [26, 27, 63].

Najczęstszą przyczyną zatrucia rejestrowanych przez PZH było spożycie przetworów domowej produkcji, szczególnie konserw zawierających mięso wieprzowe czy produkowanych przemysłowo konserw rybnych. Zwykle przyczyną botulizmu była toksyna botulinowa typu B. Zachorowania spowodowane toksyną typu A lub E stwierdza się w Polsce sporadycznie. W minionych latach obserwowano sezonowość zachorowań na botulizm z największą liczbą zdarzeń w miesiącach letnich, jednak obecnie nie obserwuje się tego zjawiska z powodu zbyt małej liczby przypadków [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. Średnio 2–3 razy częściej na botulizm pokar-

mowy zapadają mężczyźni po 40. r. ż. Wśród wszystkich przypadków botulizmu, największy odsetek stanowią osoby zamieszkujące rejony wiejskie. Powyższe zależności wynikają prawdopodobnie z zachowań kulturowych i kulinarnych tradycji kultywowanych na prowincji, tj. przygotowywania domowych konserw mięsnych, rybnych, długo przechowywanych i spożywanych zimą. Do zatruc dochodzi poza miejscem zamieszkania podczas podróży zagranicznych lub wśród studentów. Najwyższy odsetek przypadków botulizmu pokarmowego odnotowano w województwach: wielkopolskim (18,97%) i lubelskim (16,67%), natomiast w województwach lubuskim i śląskim, w ciągu 18 lat zatruciu uległo tylko 6 osób (1,72%) [23] (ryc. 3).

LECZENIE ZATRUTYCH JADEM KIEŁBASIANYM

Jedyną ukierunkowaną metodą leczenia wszystkich postaci botulizmu pozostaje podanie dożylnie wieloważnej antytoksyny botulinowej (A+B+E) pochodzenia końskiego. W następnym etapie, po przeprowadzeniu diagnostyki w kierunku typu toksyny, która spowodowała zatrucie, pacjent otrzymuje wyższe dawki swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko wykrytej w surowicy toksynie BoNT. Im wcześniej surowice zostaną podane, tym większa korzyść terapeutyczna z ich zastosowania [63, 93, 98]. Dawka antytoksyny uzależniona jest od ciężkości zachorowania i wynosi od 50–150 cm³ podawanych w ciągu jednego, dwóch lub trzech dni [12]. W przypadku botulizmu pokarmowego nie należy wprowadzać antybiotykoterapii. Podanie antybiotyku może wywołać autolizę komórek bakteryjnych i uwolnienie jeszcze większej ilości toksyny. Zaburzenia połykania związane z porażeniem nerwów czaszkowych odpowiedzialnych za ten proces mogą być przyczyną zachyłkowego zapalenia płuc. Zaburzenia opróżniania pęcherza moczowego sprzyjają rozwojowi infekcji dróg moczowych [69, 109]. Odrębnym problemem jest botulizm inhalacyjny oraz zagrożenia związane z celowym zastosowaniem BoNT w postaci broni biologicznej.

Objawy zatrucia jadem kiełbasianym nie zawsze są oczywiste i bezspeczne, a to może opóźnić wdrożenie ukierunkowanego leczenia [3, 25]. U pacjentów wprawdzie rzadko dochodzi do nadwrażliwości czy anafilaksji na obcogatunkową surowicę, jednak ze względu na potencjalną ciężkość tych reakcji, zawsze należy dokładnie przeanalizować stosunek korzyści i ryzyka leczenia surowicą [98]. Analizę taką znakomicie ułatwiłby dostępny, szybki i trafny test laboratoryjny.

DIAGNOSTYKA ZATRUC JADEM KIEŁBASIANYM

W artykule omówiono rekomendowane i alternatywne metody laboratoryjne stosowane w diagnostyce zatrucia jadem kiełbasianym. Standardowe postępowanie diagnostyczne zestawiono z przydatnością dostępnych nowoczesnych technik molekularnych. Przedstawiono i porównano czułość, swoistość oraz czas wykonania poszczególnych technik diagnostycznych w odniesieniu do testu biologicznego na zwierzętach.

Diagnostyka kliniczna – klasyfikacja i definicja przypadków botulizmu w oparciu o objawy kliniczne

W rozpoznaniu botulizmu ważną rolę odgrywiają charakterystyczne objawy kliniczne. Chcąc potwierdzić lub wykluczyć zatrucie toksyną BoNT, w oparciu o wywiad lekarski, należy uwzględnić możliwość wystąpienia m.in. zespołu Guillaina-Barrégo, udaru, guza mózgu, choroby psychicznej czy zatrucia chemicznego np. metanolem lub atropiną. Najważniejsza jest informacja na temat spożycia przetworów domowej produkcji. Do objawów występujących w ciężkim przebiegu botulizmu pokarmowego należą m.in.: niewyraźne widzenie, zaburzenia połykania, suchość śluzówki jamy ustnej, osłabienie siły mięśniowej, zaparcia, wymioty, podwójne widzenie. Przebieg zatrucia, zwłaszcza u osób starszych, może być łagodny, ze skąpo wyrażonymi objawami [12, 16, 18, 23, 25, 43]. O różnorodności symptomów decyduje zarówno stężenie toksyny, która przedostała się do organizmu, stadium choroby, wiek chorego, jak i towarzyszące choroby podstawowe [12, 48, 63].

Według PZH przypadki botulizmu należy klasyfikować jako potwierdzone, prawdopodobne lub możliwe. Kryterium „przypadku potwierdzonego” jest spełnione, gdy ogólny obraz choroby jest zgodny z wzorcem i potwierdzony testami laboratoryjnymi na obecność toksyny w materiale badanym, pobranym od pacjenta. Przypadek „prawdopodobny” zachodzi, gdy obraz kliniczny jest charakterystyczny dla objawów botulizmu i w szczegółowym wywiadzie lekarskim ujawniono powiązanie epidemiologiczne. Natomiast z przypadkiem „możliwym” mamy do czynienia wtedy, gdy lekarz, na podstawie objawów, podejrzewa wystąpienie botulizmu, a przeprowadzony wywiad z pacjentem potwierdzi możliwość wystąpienia choroby oraz zostaną spełnione kryteria kliniczne [35].

Diagnostyka laboratoryjna

W ocenie przydatności metod do wykrywania neurotoksyn botulinowych należy uwzględnić ich czułość, swoistość, czas i łatwość wykonania, wpływ czynników zewnętrznych na uzyskane wyniki oraz postać wykrywanej toksyny (aktywny enzym vs struktura antygenowa), a także koszt badania.

Testy służące wykrywaniu BoNT w próbkach żywności powinny wykrywać przynajmniej takie ilości toksyny w jednej porcji pokarmu, jakie wywołują pierwsze objawy. Dawka śmiertelna (LD) neurotoksyny botulinowej wynosi 1 ng/kg masy ciała lub średnio 70 ng BoNT spożytej przez dorosłego człowieka [13, 18, 21, 52]. Dawka wywołująca pierwsze objawy, a nie śmierć jest 10-krotnie niższa i wynosi średnio 7 ng w 100 ml pokarmu. Jednak czułość testów przeznaczonych do wykrywania toksyn w próbkach klinicznych, takich jak surowica powinna być znacznie (100-krotnie) wyższa niż metod przeznaczonych do detekcji neurotoksyny

w próbkach żywności. Na podstawie badań prowadzonych na modelach zwierzęcych oraz w oparciu o próbki izolowane od pacjentów wywnioskowano, że obecność 2–200 ng w krążeniu dorosłego człowieka prowadzi do śmierci [16, 18, 21]. Zatem testy diagnostyczne przeznaczone do wykrywania toksyny botulinowej w surowicy pacjenta powinny charakteryzować się czułością mierzoną w pg/ml.

Zidentyfikowano siedem serotypów oraz 32 podtypów toksyny BoNT. Swoistość testów diagnostycznych powinna umożliwić wykrycie co najmniej tych serotypów, które najczęściej w danym regionie wywołują zatrucia pokarmowe. Ten sam typ toksyny BoNT może wykazywać różnice w sekwencji aminokwasów sięgającej 70%. Taka różnorodność genetyczna jest wyzwaniem dla zachowania wysokiej swoistości testów genetycznych i immunoenzymatycznych oraz może doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych [52, 99].

Materiał do badań i jego opracowanie

Podstawą diagnostyki mikrobiologicznej zatrucia jadem kiełbasianym jest wykrycie neurotoksyny. Najczęstszym materiałem klinicznym przeznaczonym do badań na obecność toksyny botulinowej jest surowica pobierana przed podaniem antytoksyny botulinowej przynajmniej godzinę po jej podaniu [16]. Dwukrotne pobranie próbki ma na celu zbadanie, czy przeciwciała podane z antytoksyną zneutralizowały neurotoksynę BoNT krążącą we krwi. Objętość surowicy uzyskiwanej od dorosłego pacjenta i noworodka wynosi odpowiednio 10 ml i 0,5 ml. Do celów epidemiologicznych i przy innych postaciach botulizmu, poza surowicą, do badań przyjmuje się kał, treść żołądkową oraz produkty spożywcze [3, 16, 25, 75]. U dzieci poniżej 1. r.ż. z podejrzeniem botulizmu niemowlęcego poza surowicą badane są próbki kału na obecność laseczek *C. botulinum*. Według Centrum Zwalczenia i Kontroli Chorób CDC (Centers for Disease Control and Prevention) surowica nie jest odpowiednim materiałem klinicznym do badań botulizmu niemowlęcego, ponieważ zawartość toksyny w organizmie i jej stężenie w surowicy jest niewystarczające do wykrycia BoNT w krwiobiegu testami serologicznymi [86, 87]. Odpowiednio zabezpieczone i opisane próbki surowicy oraz kału przesyłane do laboratorium referencyjnego powinny być schłodzone lub zamrożone. Niska temperatura nie wpływa na szansę wykrycia toksyny, jednak znacznie obniża możliwość wyprowadzenia hodowli *C. botulinum* z próbek kału [16].

Przed przystąpieniem do badania żywności lub kału, próbki należy odpowiednio przygotować. W tym celu do 1 g materiału należy dodać 1 ml rozcieńczalnika (0,2% żelatyna, 0,4% Na_2PO_4 ; pH = 6,4), mieszać na mieszadle rotacyjnym, a następnie inkubować w 4°C od 30 min do kilku dni. Supernatant uzyskany po odwirowaniu próbki (12000 x g, 20 min, 4°C) jest używany do badań. W celu uzyskania homogennej próbki, do żywności o stałej konsystencji należy dodać sterylny piasek lub kulki szklane,

natomiast kał poddaje się dodatkowym badaniom termolabilności toksyny oraz jej wrażliwości na trypsynizację. Tak uzyskane ekstrakty są materiałem do testu biologicznego. Surowica oraz nadsącz z hodowli płynnych *C. botulinum* nie wymagają uprzedniej obróbki.

Każdy materiał przeznaczony do badań w kierunku toksyny botulinowej powinien być traktowany jako niebezpieczny i opracowywany jedynie w laboratorium wyposażonym w komorę z laminarnym przepływem powietrza. W razie przypadkowego rozlania materiału potencjalnie zawierającego jad kiełbasiany należy natychmiast zneutralizować toksynę 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu lub wybielaczem rozcieńczonym wodą w stosunku 1:10, wylewając go na zanieczyszczoną powierzchnię i pozostawiając na 15–20 min [16].

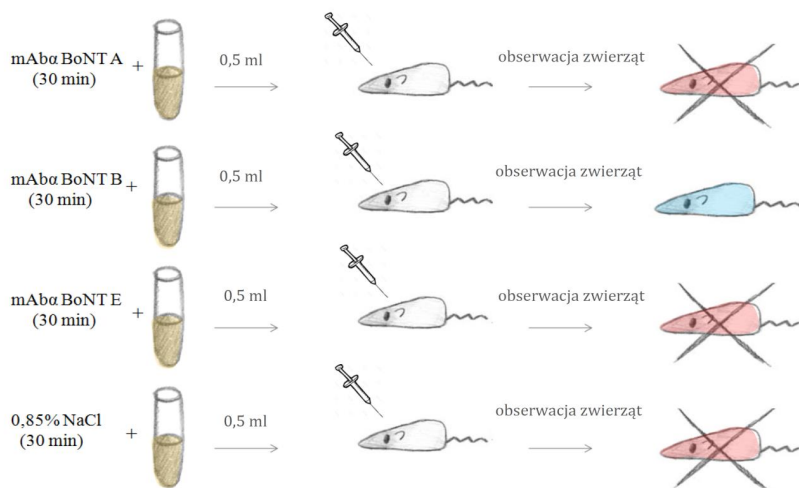
Testy biologiczne z użyciem zwierząt laboratoryjnych

Nadal jedyną referencyjną metodą wykrywania toksyny botulinowej jest test biologiczny przeprowadzany na myszach – MBA (mouse bioassay) [46, 91]. Badanie to jest rekomendowane przez amerykańską agencję CDC i uznawane za „złoty standard” w diagnostyce zatruc toksyną botulinową [16, 75]. Test MBA ma wiele zalet, które czynią go „złotym standardem”. Cechuje go duża czułość: 10–100 pg/ml, w zależności od serotypu czy podtypu toksyny [78, 96]. Badanie umożliwia śledzenie wszystkich czterech etapów działania toksyny i jej skutków fizjologicznych: wiązania, wychwytu, translokacji przez błonę komórkową i enzymatycznego cięcia jednego z białek SNARE, skutkiem czego jest zahamowanie uwalniania neuroprzekaznika i paraliż mięśni. Umożliwia wykrycie wszystkich serotypów i podtypów toksyny, zarówno w postaci związanej, jak i wolnej [21, 37, 79]. Badaniu można poddać niemal wszystkie materiały biologiczne: surowicę, nadsącz z hodowli bakteryjnej oraz odpowiednio opracowaną treść żołądka, produkty spożywcze czy kał [37].

Test biologiczny na zwierzętach – „złoty standard”

Próba biologiczna na zwierzętach umożliwia wyznaczenie minimalnej dawki śmiertelnej MLD (minimal lethal dose), czyli stężenia BoNT wywołującego śmierć wszystkich zwierząt lub parametru MLD_{50} – dawki toksyny (rozcieńczenia próbki) powodującej śmierć 50% zwierząt. MLD_{50} toksyny botulinowej wynosi 5–10 pg, natomiast najmniejsze wykrywalne stężenie toksyny wynosi 10 pg/ml i zależy od typu toksyny. Czułość testu biologicznego zawiera się w granicach 20–30 pg/ml dla BoNT/A, 10–20 pg/ml dla BoNT/B [44, 79, 110]. Materiałem do badań w teście biologicznym na myszach jest surowica, nadsącz z hodowli bakteryjnej lub odpowiednio opracowane próbki kału, treści żołądka oraz produkty spożywcze i ekstrakty.

W pierwszym etapie, w celu ilościowego wykrycia toksyny, określa się największe rozcieńczenie badanej próbki, które jeszcze wywoła objawy u zwierząt oraz takie rozcieńczenie, które nie wywoła charakterystycznych obja-



Ryc. 4. Procedura biologicznego testu neutralizacji przeprowadzanego na myszach rasy ICR stosowanego do wykrywania toksyny botulinowej (BoNT). Przedstawiony wynik testu przy założeniu, że w surowicy pacjenta znajdowała się toksyna botulinowa typu B; mAbα BoNT - monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko toksynie botulinowej odpowiednio typu A, B lub E

wów porażenych. Następnie w celu określenia typu toksyny zwierzętom podaje się próbki preinkubowane z antytoksynami zawierającymi przeciwciała skierowane przeciwko konkretnym typom toksyn BoNT [13, 21, 104]. W tym celu do osobnych próbek zawierających materiał badany (1 ml) wprowadza się po 0,25 ml antytoksyny botulinowej zawierającej przeciwciała swoiste wobec toksyny BoNT A lub BoNT B, lub BoNT E, lub BoNT F, lub wieloważnej antytoksyny botulinowej zawierającej przeciwciała przeciwko wszystkim czterem toksynom. Tak przygotowane próby inkubuje się 30–60 min, a następnie dootrzewnowo wprowadza zwierzętom laboratoryjnym (0,5 ml). Myszy obserwuje się co kilka godzin przez 4 dni, kolejno w 4, 8, 12, 18 i 24 godzinie po iniekcji, a następnie 2 razy na dobę. Zazwyczaj objawy pojawiają się już kilka godzin po podaniu próbki i są to: nastroszenie sierści, osłabienie mięśni kończyn i szyi, trudności w oddychaniu czy powstawanie tzw. talii osy poprzedzającej śmierć zwierzęcia, która następuje wskutek niewydolności oddechowej, z powodu wiotkiego paraliżu przepony [15, 16, 56, 67, 71]. Interpretacja wyniku wymaga porównania stanu zwierząt wszystkich grup. Jeśli u zwierząt grupy badanej wystąpią objawy botulizmu, lecz nie zauważono ich w próbie kontrolnej (otrzymującej surowicę antytoksylną preinkubowaną z badaną próbka), oznacza to, że w materiale znajdowała się toksyna botulinowa o serotypie odpowiadającym antytoksynie podawanej zwierzęciu, u którego objawów nie zaobserwowano (przeciwciała związały i zneutralizowały toksynę) (ryc. 4). Wykonanie testu neutralizacji BoNT z użyciem pełnego panelu przeciwciał monoklonalnych pozwala ponadto na wykrycie obecności w jednej próbce kilku rodzajów toksyn [8, 41, 71].

Wyniki fałszywie dodatnie testu MBA mogą być spowodowane obecnością innych neurotoksyn np. tetanospasminy wytwarzanej przez *C. tetanii* lub endotoksyn – lipopolisacharydów bakterii Gram-ujemnych [11]. Natomiast wyniki

fałszywie ujemne mogą być skutkiem degradacji neurotoksyny, wskutek niewłaściwego transportu lub przygotowania próbki, a w przypadku kału wynikiem degradacji przez enzymy proteolityczne [15, 16].

MBA jest testem czasochłonnym, ponieważ pełna procedura diagnostyczna zajmuje 4–6 dni. Pojedynczy test wymaga dużej liczby zwierząt (co najmniej 10 myszy), przez co staje się drogi i kontrowersyjny pod względem etycznym. Wymaga dobrze wyszkolonego personelu oraz specjalistycznego laboratorium, mimo to jego czułość i swoistość są punktem odniesienia dla nowo opracowywanych metod alternatywnych [47, 55, 66, 74, 111].

Test odruchowy mięśnia prostownika palców

Ze względu na ograniczenia, wymienione w poprzednim podrozdziale, poszukuje się testów alternatywnych, które charakteryzowałyby się zbliżoną czułością i swoistością do testu biologicznego MBA. Alternatywą może być test, w którym do mięśnia prostownika palców długich EDL (extensor digitorum longus), jednej z kończyn myszy, wprowadza się surowicę badaną na obecność toksyny, a następnie na podstawie odruchu odrzutu palców wizualnie określa poziom paraliżu mięśnia [15, 20, 84, 111]. Do drugiej kończyny, jako kontrolę ujemną, podaje się żelatynowy płyn buforowany fosforanami GBS (gelatin phosphate-buffered collecting fluid). W czasie $T = 0$, $T = 8$ oraz $T = 24$ godz. oznacza się zarówno długość, jak i szerokość kończyny zwierzęcia. Z pomocą tych parametrów wyznacza się współczynnik rozpostarcia palców stanowiący stosunek szerokości do długości kończyny, po jej uprzednim pobudzeniu. Natomiast wskaźnik efektywnego paraliżu – EPS (effective paralysis score) oceniany po 24 godzinach, oblicza się, odejmując współczynnik rozpostarcia palców prawej od lewej kończyny po jej pobudzeniu. Jeśli indeks EPS przekracza 0,30 można

wnioskować, że toksyna znajduje się w próbie badanej. Czulość modelu odruchowego palca jest porównywalna z czulością testu MBA, ponieważ obrazuje wyniki działania BoNT, dzięki czemu ma przewagę nad innymi testami *in vitro*, opierającymi się na wykryciu toksyny, a nie jej aktywności. Jednak obserwowane objawy nie są swoiste wyłącznie dla toksyny botulinowej i mogą być przejawem działania innych neurotoksyn [16, 20, 40, 84, 111]. Podobnie jak próba biologiczna na myszach, test odruchowy prostownika palców nie nadaje się do oceny stężenia toksyny botulinowej i nie może być stosowany rutynowo w laboratoriach diagnostycznych.

Metody serologiczne

Monoklonaalne przeciwciała o wysokim powinowactwie i swoistości względem poszczególnych serotypów toksyny BoNT, przeciwciała poliklonaalne lub koktajle przeciwciał swoistych wobec wszystkich serotypów BoNT stosowane w diagnostyce zatruczeń jadem kiełbasianym znajdują szerokie zastosowanie w laboratoriach diagnostycznych [46]. Przeciwciała takie są stosowane w tradycyjnych testach ELISA, ich modyfikacjach (tzw. amplified-ELISA, sd-ELISA, peptide-ELISA, liposom-ELISA) technice immuno-PCR, mikromacierzach oraz metodach łączących techniki serologiczne z innymi metodami biologii molekularnej [21, 44, 54, 89, 97, 100, 102].

Test immunoenzymatyczny ELISA oraz metody pokrewne

Najczęściej stosowanym serologicznym testem do wykrywania toksyny botulinowej jest immunoenzymatyczny test fazy stałej ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) tzw. kanapkowy (sandwich) test ELISA. Zaletą metody jest możliwość wykrycia determinantów antygenowych BoNT z użyciem swoistych przeciwciał monoklonaalnych, wiążących toksynę obecną w badanym materiale [64, 67, 97, 101, 102, 111]. Podobnie jak w teście MBA, najlepszym materiałem do badań w teście ELISA jest surowica, a po odpowiednim opracowaniu również kał, treść żołądka lub nadsącz z hodowli płynnej. Wykonanie testu ELISA od etapu opłaszczenia do odczytu trwa w zależności od zastosowanego testu od 5–6 godzin do 2 dni, a jego czulość w klasycznej postaci jest 10–100 razy niższa od testu MBA [44, 89, 90]. W tej metodzie można posłużyć się zarówno przeciwciałami monoklonaalnymi, jak i poliklonaalnymi, jednak częściej w celach przesiewowych stosuje się przeciwciała poliklonaalne przeciwko najczęstszym serotypom toksyny BoNT, ze względu na większą dostępność i niższe koszty [11, 13, 47, 72]. Dopiero po uzyskaniu wyniku dodatniego, wykonuje się test ELISA z użyciem przeciwciał monoklonaalnych skierowanych przeciwko toksynie BoNT A, BoNT B lub BoNT E. Testem opracowanym przez Amerykańską Agencję Leków i Żywności FDA (Food and Drug Administration) i zaakceptowanym przez Centrum Kontroli Chorób Zakaźnych CDC jest wzmocniony test ELISA – digoxigenin ELISA (DIG-ELISA), stosowany rutynowo w laboratoriach klinicznych. Przeciwciała wychytujące

i detekcyjne to immunoglobuliny poliklonaalne, wykrywane trzeciorzędowymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową [95]. Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane obecnością niektórych składników pokarmowych i enzymów proteolitycznych w próbkach żywności lub kału rozkładających BoNT [11, 99]. W udoskonalonej postaci dedykowanej do wykrywania BoNT A/B/E/F w próbkach żywności, uzyskano wysokie poziomy czulości, uzależnione od serotypu wykrywanej toksyny oraz rodzaju materiału przeznaczanego do badań: BoNT/A (60 pg/ml), BoNT/B (176 pg/ml), BoNT/E (163–117 pg/ml) [7, 11, 72, 95, 96]. Zastosowanie wysoko oczyszczonych mAb skierowanych przeciwko BoNT/A i BoNT/B pozwoliło na wykrycie toksyn o stężeniu 0,5–25 pg/ml w próbkach żywności [100, 101].

Techniką zbliżoną do klasycznego testu ELISA jest test elektrochemiluminescencji ECL (electrochemiluminescence), polegający na zastosowaniu drugorzędowych przeciwciał związanych ze znacznikiem elektrochemiluminescencyjnym np. kompleksem rutenu(II): *tris*-(2,2'-bipyridylo)ruten (II), dzięki czemu w polu elektrycznym dochodzi do emisji luminescencji. Test ECL przeprowadza się z wykorzystaniem cząstek magnetycznych opłaszczonych monoklonaalnymi przeciwciałami wychytującymi toksynę BoNT [49, 85]. Po związaniu toksyny z przeciwciałami znakowanymi rutenem, cząstki magnetyczne są kierowane przez magnes do elektrody, gdzie zachodzi reakcja ECL. Zastosowanie tej metody umożliwia wykrycie toksyny botulinowej BoNT A, B, E i F z czulością od 50 pg/ml do 5 ng/ml. Metoda jest prosta w użyciu i szybka (2–3 godziny), jednak relatywnie kosztowna oraz wymagająca specjalistycznego czytnika [12, 37, 47, 64, 87]. Metoda ALISSA (assay with a large immuno-sorbent surface area) przez zastosowanie setek tysięcy mikroskopijnej wielkości kulek opłaszczonych przeciwciałami monoklonaalnymi pozwoliła aż 30-krotnie zwiększyć powierzchnię adsorpcji do fazy stałej, co przełożyło się na wzrost czulości testów immunoenzymatycznych do poziomu atto-, femtomoli BoNT A i E w próbkach klinicznych i żywności [5, 6, 97]. Metoda ALISSA, mimo podniesienia poziomu czulości, nie znalazła zastosowania w laboratoriach diagnostycznych, prawdopodobnie przez wysokie koszty wykonania testu (15\$/studzienkę). W kolejnych latach zaproponowano metodę immunobiochemiczną FDC (functional dual coating) wykrywającą zarówno domenę ciężką H toksyny BoNT, jak i aktywność łańcucha L endopeptydazy, osiągając czulość przewyższającą test biologiczny [56]. Zastosowanie testu immunoenzymatycznego w skali mikro, z zastosowaniem mikrofluidyki, pozwoliło natomiast na opracowanie metody wykrywania toksyn botulinowych w małych objętościach (5 µl), już w czasie 75 min. z czulością 32 pg/ml [4].

Testy immunochromatograficzne

Testy przepływu bocznego LFA (lateral flow assay), podobnie jak metoda ELISA, opierają się na swoistej reakcji antygenu, w tym przypadku toksyny BoNT, ze swoistymi przeciwciałami immobilizowanymi na membranie

nitrocelulozowej. Znajduje zastosowanie w jakościowych lub półilościowych szybkich zestawach identyfikacyjnych, niewymagających dodatkowych odczynników ani wyspecjalizowanego sprzętu. Kasetka składa się z 4 części: miejsca naniesienia próby badanej, wkładki koniugacyjnej, nitrocelulozowej membrany reakcyjnej zawierającej linię testową i kontrolną oraz wkładki adsorbującej, zatrzymującej nadmiar odczynników i próbki. W teście LFA wykorzystuje się swoistość przeciwciał: IgG znakowanych nanocząstkami (np. koloidalnym złotem lub kolorowymi kulkami lateksu), swoistych względem toksyny BoNT, unieruchomionych na wkładce koniugacyjnej (przeciwciała reakcyjne), przeciwciał IgG niezwiązanych z nanocząstkami i immobilizowanych na linii testowej (przeciwciała wykrywające) oraz przeciwciał swoistych gatunkowo wiążących przeciwciała, które nie związały toksyny, znajdujące się w miejscu linii kontrolnej [7, 45, 97]. Test odczytywany jest po kilku minutach, materiałem do badań jest surowica [17] lub przesącz z hodowli *C. botulinum* [45]. Największą wadą testu przepływu bocznego jest niska czułość, kilka lub nawet kilkanaście razy niższa w porównaniu do testu ELISA. Zaletami metody są niski koszt oraz łatwość i szybkość wykonania (10–20 min.).

Granica wykrywalności BoNT B w klasycznych testach przepływu bocznego w surowicy wynosi 50 ng/ml, a w próbkach żywności 20 ng/ml dla BoNT B i 10 ng/ml dla BoNTA [7, 22, 45, 94, 97]. W ostatnich latach testy kasetkowe znacznie udoskonalono, uzyskując czułość 20 pg/ml [68]. W badaniach próbek weterynaryjnych często korzysta się z testu Badd Botulinum Toxin Test, który pozwala wykryć nie tylko toksynę botulinową BoNT A/B (granica wykrywalności 33–500 ng/ml), ale również inne toksyny np. wytwarzane przez pałeczki *Yersinia pestis*, laseczki wąglika *Bacillus anthracis* czy gronkowcową enterotoksynę B SEB (staphylococcal enterotoxin B) [45].

Testy oparte na enzymatycznych właściwościach BoNT

W wielu molekularnych testach przeznaczonych do wykrywania toksyn botulinowych wykorzystano aktywność łańcucha lekkiego cynkozależnej endopeptydazy jadu kiełbasianego. Metody te opierają się na różnicach w swoistości substratowej endopeptydaz. Substratem dla wszystkich BoNT są białka kompleksu rozpuszczalnych receptorów białkowych wiążących NSF SNARE (soluble NSF attachment protein receptor). Produkty cięcia proteolitycznego tych białek są w następnym etapie identyfikowane metodami serologicznymi lub fluorescencyjnymi [37, 39, 57]. Substratami toksyn botulinowych są trzy rodzaje białek SNARE, jednak w botulizmie pokarmowym rolę odgrywają dwa z nich: białko SNAP-25 oraz VAMP-2 (synaptobrewina), hydrolizowane odpowiednio przez BoNT A i E lub BoNT B i F [9]. Metody te pozwalają na wykrycie tylko aktywnych postaci toksyny, dlatego znajdują zastosowanie zarówno w diagnostyce klinicznej, jak i mikrobiologicznym badaniu żywności, ale mają mniejsze znaczenie w postępowaniu epidemiologicznym. Do testów opierających się na swoistości

substratowej endopeptydaz BoNT należą test fluorescencyjny oraz test transferu energii rezonansu fluorescencji FRET (fluorescence resonance energy transfer).

Testy fluorescencyjne

Podstawą działania tych technik są fluorescencyjnie znakowane substraty, których rozpad pod wpływem endopeptydaz botulinowych powoduje spadek sygnału fluorescencji. Peptyd znakuje się fluoresceiną i unieruchamia na stałym nośniku, a następnie do układu wprowadza badaną próbkę. Po inkubacji i rozszczepieniu substratu, znakowany fragment peptydowy zostaje uwolniony, a jego stężenie określa się poprzez intensywność fluorescencji [18, 37, 92].

Substratem stosowanym w teście FRET są białka SNARE – oligopeptydowe substraty endopeptydaz BoNT (VAMP--2, SNAP25, syntaksyna), które zawierają dwa znaczniki: wygaszacz fluorescencji oraz donor fluorescencyjny. Gdy białka SNARE pozostają nienaruszone, a oba znaczniki są blisko siebie, wygaszacz neutralizuje donor, co powoduje zahamowanie fluorescencji. W wyniku hydrolizy substratu znaczniki oddalają się od siebie, fluorescencja nie jest już hamowana przez wygaszacz i można ją ocenić ilościowo. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do aktywności endopeptydaz, a ta zależna od stężenia toksyny. Identyfikacja toksyny botulinowej tą metodą trwa 2–4 godzin i znajduje zastosowanie w wykrywaniu zarówno toksyny BoNT A, jak i B [37, 49, 50, 83]. Wzbogacenie tej techniki w etap oczyszczania próbek żywności, immunoprecypitację z użyciem kulek paramagnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty-BoNT, a następnie fluorescencyjne wykrywanie aktywności proteolitycznej toksyny BoNT A doprowadziło do zoptymalizowania szybkiego (2–26 godz.) testu rapid BoNT, którego czułość jest zbliżona do testu biologicznego [39] oraz metody z użyciem złota koloidalnego zastosowanego jako nośnika i detektora enzymatycznej hydrolizy białek detekcyjnych [22, 50, 51].

Spektrofotometria masowa – Endopep-Mass

Stosunkowo niedawno opracowano alternatywną metodę wykrywania, różnicowania i ilościowego oznaczenia jadu kiełbasianego za pomocą spektrofotometrii masowej (MS), która opiera się na identyfikacji produktów białkowych, będących wynikiem swoistej aktywności endopeptydaz toksyn botulinowych. Stąd popularna nazwa tej techniki to Endopep-Mass. Każdy serotyp BoNT hydrolizuje substrat w innym, charakterystycznym i unikatowym miejscu polipeptydu, przez co generuje różną kompozycję produktów [9, 58, 59, 82, 107] (tabela 2). Do wykrywania produktów rozszczepienia stosuje się metodę desorpcji/ionizacji laserowej MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry) [82] lub metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (high-performance liquid chromatography),

Tabela 2. Substraty i produkty hydrolizy poszczególnych serotypów toksyny botulinowej –BoNT (zmodyfikowano na podst. [78])

	Neurotoksyna botulinowa (BoNT)			
	BoNT A	BoNT B	BoNT E	BoNT F
substrat	Ac-RGSNKPKIDAGNQRATR(Norleucyne) LGGR-NH ₂	LSELD DR ADALQAGASQ FE SSAAKLRKRYWWKNLK	H ₂ N- WWWAKLGQEIDTRNRQKD (hR)IMAKADSNKR-NH ₂	TSNRRLLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDK VLERDQK L SELD DR ADAL
masa (Da)	2406	4026,8	3615	5112
produkt N-końcowy	Ac-RGSNKPKIDAGN Q	LSELD DR ADALQAGAS Q	H ₂ N- WWWAKLGQEIDTRNRQKD (hR)	TSNRRLLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDK VLERD Q
masa (Da)	988	1759	1132	1345
produkt C-końcowy	R ATR(Norleucyna)LGGR-NH ₂	F ESSAAKLRKRYWWKNLK	I MAKADSNKR-NH ₂	K LSELD DR ADAL
masa (Da)	1426	2283	2500	3783

BoNT – toksyna botulinowa (botulinum neurotoxin).

jonizacji przez elektrorozpylanie ESI (electrospray ionization) i tandemowej spektrometrii masowej (MS/MS) – HPLCESI/MS/MS. Do oceny jakościowej wykorzystuje się produkty hydrolizy substratu o unikatowych masach, które wskazują na obecność określonego typu toksyny BoNT. Technika Endopep-Mass charakteryzuje się czułością w zakresie 0,05–0,5 MLD₅₀ i różni się w zależności od serotypu BoNT [24, 58, 59, 60, 61], w tym dla próbek kału, zakres czułości wynosi 0,2–1 MLD₅₀/ml [61, 62, 107]. Wykazano ponadto, że metoda ta pozwala na wykrycie toksyny BoNT/A z wykorzystaniem białka substratowego SNAPtide, w próbkach mleka z czułością 5 pg/ml [24, 52, 58, 60]. Nieswoiste endogenne proteazy lub peptydazy znajdujące się w kale mogą hydrolizować substraty niezależnie od toksyn BoNT, odszczepiając substraty peptydowe i zmniejszając czułość metody [108]. W celu wykluczenia takich reakcji, próbki kału są wstępnie oczyszczane przez preinkubację z przeciwciałami immobilizowanymi na cząstkach streptawidynowych [106] lub przemylane odpowiednim buforem w celu pozbycia się proteaz kałowych [107]. Metoda Endopep-Mass może służyć do badań ilościowych, należy wówczas wykonać również krzywą kalibracyjną dla określonych stężeń BoNT. Produkty hydrolizy wyznacza się na podstawie stosunku skupisk izotypów piku MS produktu N-końcowego lub produktu C-końcowego do piku pochodzącego z wewnętrznego standardu. Poziom badanej toksyny musi się mieścić w granicach krzywej kalibracyjnej.

Endopep-MS szybko (poniżej 6 godzin) i dokładnie wykrywa oraz rozróżnia wszystkie typy toksyn BoNT [9, 37, 53, 106, 107]. Charakteryzuje się co najmniej dwukrotnie wyższą czułością od testu biologicznego MBA. Jednak wymaga drogiego, specjalistycznego sprzętu i wnikliwej analizy wyników, przez co technika ta nie jest stosowana powszechnie w laboratoriach klinicznych i nie jest metodą referencyjną.

METODY GENETYCZNE

Do celów epidemiologicznych stosuje się testy molekularne, umożliwiające identyfikację genów neurotoksyny BoNT (*bont*), które wraz z genami kodującymi związane nietoksyczne białka ANTP (associated non-toxic proteins) występują w formie klastra genów tzw. locus botuliny [3, 38]. Najczęściej stosowaną metodą jest amplifikacja materiału genetycznego w reakcji zależnej od termostabilnej polimerazy PCR (polymerase chain reaction). Wynik dodatni świadczy o obecności poszukiwanego genu niezależnie od tego, czy uległ ekspresji, nie jest więc podstawą do wnioskowania o obecności BoNT w badanej próbce. Do amplifikacji wybranego genu lub jego fragmentu konieczna jest obecność w materiale badanym drobnoustroju lub pochodzącego z niego DNA, dlatego metoda ta może znaleźć zastosowanie w innej niż pokarmowa, odmianie botulizmu np. botulizmie niemowląt lub do celów epidemiologicznych. Wyniki fałszywie dodatnie lub ujemne mogą wynikać z pojawienia się mutacji lub występowania naturalnej zmienności genetycznej [11]. Jednorazowo w próbce materiału poszukuje się toksyny BoNT jednego typu. Metodami genetycznymi stosowanymi najczęściej w epidemiologii zatruczeń jadłem kielbasianym są reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR (reversed transcriptase PCR) oraz immuno-PCR [3]. Oparta na metodzie PCR technika RT-PCR pozwala na wykrycie i ilościowe oznaczenie mRNA kodującego toksynę botulinową obecnie wyłącznie w żywych komórkach. Real-time PCR jest ilościową odmianą PCR, w której zastosowanie odpowiednich barwników lub sond (po przeprowadzeniu kilku następujących po sobie kolejnych cykli reakcji PCR) umożliwia obserwację w czasie rzeczywistym przyrostu poszukiwanego fragmentu DNA. Procedura umożliwia wykrycie danej sekwencji genów nawet przy niskim stężeniu wyjściowym matrycy. Jest znacznie czulsza i szybsza od klasycznej reakcji PCR [42]. Natomiast test immuno-PCR

łączący amplifikację DNA ze swoistością testu ELISA, ma zastosowanie w wykrywaniu toksyny BoNT A z czułością 1000-krotnie wyższą niż klasyczny test ELISA [65]. W teście stosuje się reporterowy, dwuniciowy fragment DNA sprzężony z przeciwciałami mAb α -BoNT A. Po dodaniu badanej próbki i związaniu przeciwciał monoklonalnych z toksyną dochodzi do etapu amplifikacji reporterowego fragmentu DNA i pośredniej oceny ilości BoNT A [17, 77]. Niektórzy autorzy wskazują, że udoskonalona metoda Immuno-PCR jest 10^3 - 10^5 -krotnie czulsza od klasycznego testu ELISA [17]. Do pozostałych metod genetycznych wykrywania genów toksyny botulinowej należą rybotyping, polimorfizm długości powielanych fragmentów DNA (AFLP), analiza polimorfizmu losowo powielanych fragmentów DNA (RAPD) i Rep-PCR (repetitive element sequence-based PCR).

METODY KOMÓRKOWE *IN VITRO*

Potrzeba zastąpienia modeli zwierzęcych w diagnostyce botulizmu oraz badania mierzące do oceny aktywności toksyn botulinowych stosowanych w medycynie estetycznej zaowocowały opracowaniem dwóch metod *in vitro* zaaprobowanych przez agencję FDA. Obie opierają się na zastosowaniu wrażliwych komórek docelowych w hodowlach *in vitro* [43, 73, 102]. W następnych latach inne grupy badawcze opracowały testy komórkowe (Allergan, Ipsen) o podobnej czułości, które uzyskały akceptację w krajach Unii Europejskiej [103]. Najczulszym biosensorem do wykrywania BoNT są neurony izolowane z rdzeni kręgowych ptaków i gryzoni, natomiast linie immortalizowane charakteryzują się mniejszą czułością. Zasada zastosowania wrażliwych komórek do wykrywania toksyn botulinowych polega na ich inkubacji z badaną próbką, a następnie wykrywaniu produktów hydrolizy białka SNAP25 w lizatach komórkowych [53]. Modele komórkowe, podobnie jak test MBA, umożliwiają wykrycie aktywnych postaci toksyny botulinowej, a także prześledzenie wszystkich etapów jej działania na poziomie komórkowym, od wiązania, przez endocytozę i hydrolizę białek docelowych. Charakteryzują się wysoką czułością (1–10 pg/ml), jednak wymagają sprzętu i wyposażenia typowego dla pracowni komórkowej [10, 36, 40, 80, 81, 88, 112].

PODSUMOWANIE

Szybki rozwój choroby, silna toksyczność toksyn botulinowych i brak sposobów odwracającego skutki zatrucia sprawiają, że poszukuje się szybkiej, czulej i niekosztownej metody diagnostycznej, która mogłaby być wprowadzona do rutynowej diagnostyki botulizmu [19, 53, 97, 105].

Metodą referencyjną w diagnostyce botulizmu pokarmowego, nadal uznawaną za „złoty standard”, jest test biologiczny, który umożliwia zbadanie niemal wszystkich materiałów biologicznych i wykrycie wszystkich aktywnych podtypów toksyny z dużą czułością. Ze względu na koszty, długi czas wykonania oraz obiekty etyczne, testy na zwierzętach zastępuje się testami mniej inwazyjnymi.

Jednym z nich jest test pomiaru stopnia paraliżu mięśnia prostownika palców u myszy. Ta metoda, wykrywająca jedynie neurotoksyny typu A, B i E, ma porównywalną czułość do testu biologicznego MBA, jednak jej wykonanie wymaga dostępu do zwierząt laboratoryjnych, odpowiedniej zgody etycznej, specjalistycznego sprzętu i umiejętności [41, 44, 47, 55, 102, 105, 111].

Do diagnostyki botulizmu wprowadza się alternatywne testy serologiczne, molekularne, a także oparte na ocenie aktywności toksyny botulinowej których czułość może konkurować z modelem zwierzęcym (tabela 3). Technikami najczęściej stosowanymi są immunoenzymatyczne testy ELISA, których wykonanie, w zależności od typu zajmuje od 5 godzin do 2 dni. Wadą metody jest ryzyko uzyskania fałszywie dodatnich wyników. Dla porównania test elektrochemiluminescencji, trwający 2-3 godziny, charakteryzuje się czułością 2-krotnie wyższą niż test ELISA, jednak jej ograniczeniem, podobnie jak testu ELISA, jest możliwość wykrycia zarówno aktywnej, jak i nieaktywnej postaci toksyny [13, 44, 49, 64, 95, 97, 100, 101]. Natomiast metoda transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET), która opiera się na ocenie aktywności endopeptydazowej oraz swoistości substratowej poszczególnych toksyn botulinowych, jest bardzo szybka, czuła i swoista w porównaniu do testu ELISA i metod biologicznych. Wadą testu jest potrzeba identyfikacji odpowiedniego substratu dla każdego serotypu BoNT, co gwarantuje wysoką czułość [24, 49, 50, 83]. Test przepływu bocznego, mimo łatwości i szybkości wykonania, charakteryzuje się niewystarczającym poziomem czułości (nawet kilkukrotnie niższym niż w testach ELISA) [7, 22, 45, 94, 97]. Jeden z najnowszych testów – Endopep-Mass jest czulszy niż „złoty standard”, szybszy (do 17 godzin) i podobnie jak test biologiczny, umożliwia wykrycie wszystkich serotypów jadu kiełbasianego. Niestety, wymaga drogiego sprzętu oraz wysoce wykwalifikowanego personelu [9, 19, 21, 58, 59, 61, 62, 106, 107, 108]. Metody genetyczne opierające się na reakcji PCR pozwalają na wykrycie genów kodujących toksynę botulinową w czasie 4–8 godzin, ale ich identyfikacja nie jest równoznaczna z ekspresją białek botulinowych. Użycie techniki RT-PCR rozwiązuje powyższy problem i umożliwia wykrycie mRNA toksyny botulinowej [3, 37, 75]. W każdej z wyżej wymienionych metod materiałem do badań jest surowica. Test immuno-PCR umożliwia wykrycie tylko jednego z czterech serotypów toksyny (BoNT A) z czułością ok. 5 pg/ml. Klasyczne metody hodowli i identyfikacji *C. botulinum* nie są konieczne i nie są rekomendowane przez PZH. Jednak izolacja drobnoustroju z próbek kału oraz żywności ma znaczenie w diagnostyce botulizmu niemowlęcego i w postępowaniu epidemiologicznym [17, 70, 77, 86, 87]. Państwowy Instytut Badawczy, będący częścią Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, realizuje badanie próbek zwierzęcych w kierunku *C. botulinum* oraz toksyny botulinowej, głównie w oparciu o metody genetyczne (PCR, qPCR) oraz testem Badd Botulinum Toxin Test. Choć żadna z alternatywnych metod nie osiąga standardowej czułości testu biologicznego MBA, to dalsze doskonalenie testów

Tabela 3. Porównanie wybranych metod stosowanych do wykrywania i identyfikacji toksyn botulinowych w próbkach klinicznych i żywności

Metoda	Czas wykonania	Typ toksyny	Czułość	Materiał przeznaczony do badania
test biologiczny na zwierzętach (MBA)	0,5–4 dni	A–G	10–30 pg/ml	surowica, żywność, kał, nadsącz z hodowli płynnej
test przeponowy myszy	2–4 dni	A, B, E	20–600 pg/ml	nadsącz z hodowli płynnej
test ELISA (poliklonalne przeciwciała)	5 godz.–2 dni	A–G	60–200 pg/ml	surowica, żywność, kał, nadsącz z hodowli płynnej
test ELISA (monoklonalne przeciwciała)	5–7 godz.	A–F	1–1000 pg/ml	surowica, żywność, nadsącz z hodowli płynnej
test elektrochemiluminescencji	2–3 godz.	A, B, E, F	50–5000 pg/ml	surowica, żywność,
test immunochromatograficzny	10–30 min 2–4 godz.	A, B, D, E	10–500 ng/ml	głównie żywność
test Endopep-MS	4–17 godz.	A–G	5–50 pg/mL	surowica, żywność, kał, nadsącz z hodowli płynnej
spektrometria masowa	8–14 godz.	A–G	49–375 ng/ml	surowica, żywność, kał, nadsącz z hodowli płynnej
reakcja PCR	0,5–4 godz.	A–G	10 ³ –10 ⁵ GE/ml 10–100 GE	kał, surowica, nadsącz z hodowli płynnej
test immuno-PCR	3–10 godz.	A	0,02–4000 fg/mL	głównie żywność
immunochromatografia	40 min	A–F	0,01–50 ng/ml	surowica, żywność, nadsącz z hodowli płynnej
test fluorescencyjny FRET	15 min– 20 godz.	A–G	0,035–150 ng/ml	surowica
wykrywanie neoepitopu	4–24 godz.	A, B, C, E	0,04–200 pg/ml	surowica, żywność, nadsącz z hodowli płynnej
test immuno-FRET	3–6 godz.	A, B, E	0,5–500 fg/ml 0,5–38 ng/ml	surowica, żywność, nadsącz z hodowli płynnej

ELISA – test immunoenzymatyczny fazy stałej (enzyme-linked immunosorbent assay), FRET – transfer energii rezonansu fluorescencji (fluorescence resonance energy transfer), GE/ml (odpowiedniki genomu na mililitr genome-equivalents per milliliter), LFA – test przepływu bocznego (lateral flow assay), PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction).

diagnostycznych i ich łączenie może się przyczynić do stopniowego zastępowania klasycznego testu MBA. Optymalny test diagnostyczny powinien cechować się czułością przekraczającą czułość testu MBA, swoistością powyżej 95%, wykrywać aktywną postać każdej toksyny, być szybki i prosty w interpretacji. Spośród opracowanych do tej pory alternatywnych metod diagnostycznych reporterowe linie komórkowe oraz metody oparte na mikrofluidyce dorównują testom biologicznym pod względem czułości oraz testom ELISA pod względem szybkości wykonania [4, 43, 110].

PIŚMIENNICTWO

[1] Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. 2006. Report on minimally processed infant weaning foods and the risk of infant botulism. https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/infantbotulismreport.pdf (28.08.2019)

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pragną podziękować dr hab. Bożenie Dziadek, prof. UŁ oraz dr Agnieszce Matusiak z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, dr Annie Szosland-Fałtyn z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie oraz Prof. dr hab. Barbarze Wróblewskiej z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie za konsultacje i cenne wskazówki uwzględnione w niniejszej pracy.

[2] Angulo F.J., Getz J., Taylor J.P., Hendricks K.A., Hatheway C.L., Barth S.S., Solomon H.M., Larson A.E., Johnson E.A., Nickey L.N., Ries A.A.: A large outbreak of botulism: the hazardous baked potato. *J. Infect. Dis.*, 1998; 178: 172–177

- [3] Artin I.: Real-time PCR for diagnosis of botulism and quantification of neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum*. PhD thesis, Division of Medical Microbiology, Lund University, 2008
- [4] Babrak L., Lin A., Stanker L.H., McGarvey J., Hnasko R.: Rapid microfluidic assay for the detection of botulinum neurotoxin in animal sera. *Toxins*, 2016; 8: 13
- [5] Bagramyan K., Barash J.R., Arnon S.S., Kalkum M.: Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices. *PLoS One*, 2008; 3: e2041
- [6] Bagramyan K., Kalkum M.: Ultrasensitive detection of botulinum neurotoxins and anthrax lethal factor in biological samples by ALISSA. *Methods Mol. Biol.*, 2011; 739: 23-36
- [7] Bahadır E.B., Sezgin M.K.: Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *Trends Anal. Chem.*, 2016; 82: 286-306
- [8] Barash, J.R., Arnon, S.S.: A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J. Infect. Dis.* 2014; 209: 183-191
- [9] Barr J.R., Moura H., Boyer A.E., Woolfitt A.R., Kalb S.R., Pavlopoulos A., McWilliams L.G., Schmidt J.G., Martinez R.A., Ashley D.L.: Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005; 11: 1578-1583
- [10] Basavanna U., Muruvanda T., Brown E.W., Sharma S.K.: Development of a cell-based functional assay for the detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin types A and E. *Int. J. Microbiol.*, 2013; 2013: 593219
- [11] Bielec D., Modrzewska R.: Zatrucie jadem kiełbasianym dawniej i dziś – aspekty kliniczne. *Przegl. Epidemiol.*, 2007; 61: 505-512
- [12] Bielec D., Semczuk G., Lis J., Firych J., Modrzewska R., Janowski R.: Epidemiologia i klinika zatruc jadem kiełbasianym chorych leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej w Lublinie w latach 1990-2000. *Przegl. Epidemiol.*, 2002; 56: 435-442
- [13] Čapek P., Dickerson T.J.: Sensing the deadliest toxin: Technologies for botulinum neurotoxin detection. *Toxins*, 2010; 2: 24-53
- [14] Carter A.T., Peck M.W.: Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* group I and group II. *Res Microbiol.*, 2015; 166: 303-317
- [15] Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). *Bacteriological Analytical Manual*, U.S. Food and Drug Administration, Washington, 2011
- [16] Centers for Disease Control and Prevention: *Botulism in the United States, 1899-1996 Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers*. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, 1998
- [17] Chao H.Y., Wang Y.C., Tang S.S., Liu H.W.: A highly sensitive immune-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicol.*, 2004; 43: 27-34
- [18] Cheng L.W., Henderson T.D.: Comparison of oral toxicological properties of botulinum neurotoxin serotypes A and B. *Toxicol.*, 2011; 58: 62-67
- [19] Cheng L.W., Land K.M., Stanker L.H.: Current methods for detecting the presence of botulinum neurotoxins in food and other biological samples. W: *Bioterrorism*, red.: S.A. Morse, InTechOpen, London 201: 1-16
- [20] Cheng L.W., Land K.M., Tam C., Brandon D.L., Stanker L.H.: Technologies for detecting botulinum neurotoxins in biological and environmental matrices. W: *Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases*, red.: H. Makun. InTechOpen, London 2016, 125-144
- [21] Cheng L.W., Onisko B., Johnson E.A., Reader J.R., Griffey S.M., Larson A.E., Tepp W.H., Stanker L.H., Brandon D.L., Carter J.M.: Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A. *Toxicology*, 2008; 249: 123-129
- [22] Chiao D.J., Shyu R.H., Hu C.S., Chiang H.Y., Tang S.S.: Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004; 809: 37-41
- [23] *Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce (biuletyn roczny)*. http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (15.05.2018)
- [24] Christian T., Suryadi K., Shine N.: Ultra Sensitive HPLC Detection Assay for Botulinum Neurotoxin Type A. Presented at the 47th Annual Interagency Botulinum Research Coordinating Committee Meeting, Atlanta, 2010
- [25] Chwałuk P., Chwałuk A.: Trudności diagnostyczne w zatruciu jadem kiełbasianym – opis przypadków i przegląd piśmiennictwa. *Przegl. Lek.*, 2007; 64: 348-351
- [26] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2007 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2009; 63: 237-240
- [27] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2008 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2010; 64: 231-234
- [28] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2009 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2011; 65: 251-254
- [29] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2010 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2012; 66: 267-271
- [30] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2011 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2013; 67: 343-345
- [31] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2012 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2014; 68: 357-359
- [32] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2013 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2015; 69: 363-365
- [33] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2014 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2016; 70: 217-223
- [34] Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucia jadem kiełbasianym w Polsce w 2015 roku. *Przegl. Epidemiol.*, 2017; 71: 339-344
- [35] Definicje przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego. http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_4.pdf (27.03.2018)
- [36] Dong M., Tepp W.H., Johnson E.A., Chapman E.R.: Using fluorescent sensors to detect botulinum neurotoxin activity *in vitro* and in living cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 14701-14706
- [37] Dorner M. B., Schulz K.M., Kull S., Dorner B.G.: Complexity of botulinum neurotoxin: Challenges for detection technology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2013; 364: 219-255
- [38] Drożdżyńska M., Sobieraj-Garbiak I., Chlasta A., Jastrzębska M.: Toksyna botulinowa i jej zastosowanie w medycynie. *Diagn. Lab.*, 2015; 51: 139-146
- [39] Dunning F.M., Piazza T.M., Zeytin F.N., Tucker W.C.: Isolation and quantification of botulinum neurotoxin from complex matrices using the BoTest matrix assays. *J. Vis. Exp.*, 2014; 2014: e51170
- [40] Eckle V.S., Drexler B., Grasshoff C., Seeger T., Thiermann H., Antkowiak B.: Spinal cord – skeletal muscle cocultures detect muscle-relaxant action of botulinum neurotoxin A. *ALTEX*, 2014; 31: 433-440
- [41] Fan Y., Barash J.R., Lou J., Conrad F., Marks J.D., Arnon, S.S.: Immunological characterization and neutralizing ability of monoclonal antibodies directed against botulinum neurotoxin type H. *J. Infect. Dis.*, 2016; 213: 1606-1614
- [42] Fenić L., Anniballi F., De Medici D., Delibato E., Aureli P.: SYBR Green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 2891-2896
- [43] Fernández-Salas E., Wang J., Molina Y., Nelson J.B., Jacky B.P.S., Aoki K.R.: Botulinum neurotoxin serotype a specific cell-based potency assay to replace the mouse bioassay. *PLoS One*, 2012; 7: e49516
- [44] Ferreira J.L., Eliasberg S.J., Edmonds P., Harrison M.A.: Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinum toxin in food. *J. Food Prot.*, 2004; 67: 203-206

- [45] Gessler F., Pagel Wieder S., Avondet M.A., Böhnelt H.: Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007; 57: 243–249
- [46] Grate J.W., Ozanich R.M., Jr., Warner M.G., Bruckner-Lea C.J., Marks J.D.: Advances in assays and analytical approaches for botulinum-toxin detection. *Trends Anal. Chem.*, 2010; 29: 1137–1156
- [47] Grenda T., Kukier E., Kwiatek K.: Methods and difficulties in detection of *Clostridium botulinum* and its toxins. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2014; 17: 195–205
- [48] Grygorczuk S., Pancewicz S., Kondrusik M., Zajkowska J.: Zatrucie toksyną botulinową – trudności diagnostyczne. *Pol. Merk. Lek.*, 2000; 50: 572
- [49] Guglielmo-Viret V., Attrée O., Blanco-Gros V., Thullier P.: Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. *J. Immunol. Methods*, 2005; 301: 164–172
- [50] Guo J., Xu C., Li X., Chen S.: A simple, rapid and sensitive FRET assay for botulinum neurotoxin serotype B detection. *PLoS One*, 2014; 9: e114124
- [51] Halliwell J., Gwenin C.: A label free colorimetric assay for the detection of active botulinum neurotoxin type A by SNAP-25 conjugated colloidal gold. *Toxins*, 2013; 5: 1381–1391
- [52] Hill K.K., Smith T.J., Helma C.H., Ticknor L.O., Foley B.T., Svensson R.T., Brown J.L., Johnson E.A., Smith L.A., Okinaka R.T., Jackson P.J., Marks J.D.: Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 818–832
- [53] Hobbs R.J., Thomas C.A., Halliwell J., Gwenin C.D.: Rapid detection of botulinum neurotoxins – a review. *Toxins*, 2019; 11: 418
- [54] Hörman A., Nevas M., Lindström M., Hänninen M.L., Korkeala H.: Elimination of botulinum neurotoxin (BoNT) type B from drinking water by small-scale (personal-use) water purification devices and detection of BoNT in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 1941–1945
- [55] Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM): Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM Scientific Workshop on Alternative Methods to Refine, Reduce or Replace the Mouse LD₅₀ Assay for Botulinum Toxin Testing. NIH Publication 08-6416
- [56] Jones R.G., Marks J.D.: Use of a new functional dual coating (FDC) assay to measure low toxin levels in serum and food samples following an outbreak of human botulism. *J. Med. Microbiol.*, 2013; 62: 828–835
- [57] Jones R.G., Ochiai M., Liu Y., Ekong T., Sesardic D.: Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *J. Immunol. Methods*, 2008; 329: 92–101
- [58] Kalb S.R., Baudys J., Wang D., Barr J.R.: Recommended mass spectrometry-based strategies to identify botulinum neurotoxin-containing samples. *Toxins*, 2015; 7: 1765–1778
- [59] Kalb S.R., Garcia-Rodriguez C., Lou J., Baudys J., Smith T.J., Marks J.D., Smith L.A., Pirkle J.L., Barr J.R.: Extraction of BoNT/A, B, E, and F with a single, high affinity monoclonal antibody for detection of botulinum neurotoxin by Endopep-MS. *PLoS One*, 2010; 5: e12237
- [60] Kalb S.R., Goodnough M.C., Malizio C.J., Pirkle J.L., Barr J.R.: Detection of botulinum neurotoxin A in a spiked milk sample with subtype identification through toxin proteomics. *Anal. Chem.*, 2005; 77: 6140–6146
- [61] Kalb S.R., Moura H., Boyer A.E., McWilliams L.G., Pirkle J.L., Barr J.R.: The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.*, 2006; 351: 84–92
- [62] Kalb S.R., Santana W.I., Pirkle J.L., Barr J.R.: Detection, differentiation, and subtyping of botulinum toxins A, B, E, and F by mass spectrometry. *Botulinum J.*, 2012; 2: 119–134
- [63] Kizerwetter-Świda M., Binek M.: Zatrucie jadem kielbasianym – problem wciąż aktualny. *Post. Mikrobiol.*, 2010; 49: 75–85
- [64] Koh C.Y., Schaff U.Y., Piccini M.E., Stanker L.H., Cheng L.W., Ravichandran E., Singh B.R., Sommer G.J., Singh A.K.: Centrifugal microfluidic platform for ultrasensitive detection of botulinum toxin. *Anal. Chem.*, 2015; 87: 922–928
- [65] Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Ryabko A.K., Shemyakin I.G.: Ultrasensitive detection of protease activity of anthrax and botulinum toxins by a new PCR-based assay. *Pathog. Dis.*, 2016; 74: 112
- [66] Kukier E., Kwiatek K., Grenda T., Goldsztejn M., Dębski J.: Botulizm – patogeneza i diagnostyka choroby. *Życie Wet.*, 2015; 90: 163–166
- [67] Kukier E., Goldsztejn M., Kozieł N., Kwiatek K., Zacharczuk K.: *Clostridium botulinum* i toksyny botulinowe. Potencjalne zagrożenie w mleku i produktach mlecznych. *Przem. Spoż.*, 2017; 71: 28–33
- [68] Liu J., Gao S., Kang L., Ji B., Xin W., Kang J., Li P., Gao J., Wang H., Wang J., Yang H.: An ultrasensitive gold nanoparticle-based lateral flow test for the detection of active botulinum neurotoxin type A. *Nanoscale Res. Lett.*, 2017; 12: 227
- [69] Loutfy M.R., Austin J.W., Blanchfield B., Fong I.W.: An outbreak of foodborne botulism in Ontario. *Can J. Infect. Dis.*, 2003 14: 206–209
- [70] Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D.: *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby Elsevier, Philadelphia 2013
- [71] Maslanka S.E., Lúquez C., Dykes J.K., Tepp W.H., Pier C.L., Pellett S., Raphael B.H., Kalb S.R., Barr J.R., Rao A., Johnson E.A.: A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *J. Infect. Dis.*, 2016; 213: 379–385
- [72] Maslanka S.E., Luquez C., Raphael H.B., Dykes J.K., Joseph L.A.: Utility of botulinum toxin ELISA A, B, E, F kits for clinical laboratory investigation of human botulism. *Botulinum J.*, 2011; 2: 72–92
- [73] Merz Pharma GmbH, landmark change for botulinum neurotoxin: alternative test method approved in the U.S. [https://www.merz.com/Ablog/news/botulinum-neurotoxin/\(24.08.2019\)](https://www.merz.com/Ablog/news/botulinum-neurotoxin/(24.08.2019))
- [74] Nantel A.J.: *Clostridium botulinum* – International programme on chemical safety poisons information monograph (858 Bacteria). <http://www.who.int/csr/delibepidemics/clostridiumbotulism.pdf> (10.04.2018)
- [75] NCFCA, Nordic Committee on Food Analysis. 1991. Botulinum toxin. Detection in foods, blood, and other materials. NCFCA method no 80 2nd ed. Espoo, Finland
- [76] Nevas M.: *Clostridium botulinum* in honey production with respect to infant botulism. Doctoral dissertation. University of Helsinki. Helsinki, 2006
- [77] Niemeyer C.M., Adler M., Wacker R.: Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol.*, 2005; 23: 208–216
- [78] Ohishi I., Sakaguchi G.: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type C and D toxins of different molecular sizes. *Infect. Immun.*, 1980; 28: 303–309
- [79] Peck M.W., Smith T.J., Anniballi F., Austin J.W., Bano L., Bradshaw M., Cuervo P., Cheng L.W., Derman Y., Dorner B.G., Fisher A., Hill K.K., Kalb S.R., Korkeala H., Lindström M. i wsp.: Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins*, 2017; 9: 38
- [80] Pellett S., Tepp W.H., Johnson E.A., Sesardic D.: Assessment of ELISA as endpoint in neuronal cell-based assay for BoNT detection using hiPSC derived neurons. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2017; 88: 1–6
- [81] Pellett S., Tepp W.H., Toth S.I., Johnson E.A.: Comparison of the primary rat spinal cord cell (RSC) assay and the mouse bioassay for botulinum neurotoxin type A potency determination. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2010; 61: 304–310

- [82] Perry M.J., Centurioni D.A., Davis S.W., Hannett G.E., Musser K.A., Egan C.T.: Implementing the Bruker MALDI Biotyper in the Public Health Laboratory for *C. botulinum* neurotoxin detection. *Toxins*, 2017; 9: 94
- [83] Pires-Alves M., Ho M., Aberle K.K., Janda K.D., Wilson B.A.: Tandem fluorescent proteins as enhanced FRET-based substrates for botulinum neurotoxin activity. *Toxicon*, 2009; 53: 392–399
- [84] Rasetti-Escargueil C., Jones R.G., Liu Y., Sesardic D.: Measurement of botulinum types A, B and E neurotoxicity using the phrenic nerve-hemidiaphragm: improved precision with in-bred mice. *Toxicon*, 2009; 53: 503–511
- [85] Rivera V.R., Gamez F.J., Keener W.K., White J.A., Poli M.A.: Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxins A, B, E, and F in clinical samples, selected food matrices, and buffer using paramagnetic bead-based electrochemiluminescence detection. *Anal. Biochem.*, 2006; 353: 248–256
- [86] Rudnicka K., Kwiatkowska P., Gajewski A., Chmiela M.: Mikroflora miodu jako źródło spor *C. botulinum* i przyczyna rozwoju botulizmu niemowląt – rozważania na temat zasadności oczyszczania miodu w kontekście obowiązującego prawa. *Post. Mikrobiol.*, 2015; 54: 184–194
- [87] Rudnicka K., Tenderenda M., Chmiela M.: Etiologia i epidemiologia botulizmu niemowląt. *Ped. Pol.*, 2014; 89: 198–202
- [88] Rust A., Doran C., Hart R., Binz T., Stickings P., Sesardic D., Peden A.A., Davletov B.: A cell line for detection of botulinum neurotoxin type B. *Front. Pharmacol.*, 2017; 8: 796
- [89] Sarita R., Ponmariappan S., Sharma A., Kamboj D.V., Jain A.K.: Development of immunodetection system for botulinum neurotoxin serotype E. *Indian J. Med. Res.*, 2018; 147: 603–610
- [90] Scarlatos A., Welt B.A., Cooper B.Y., Archer D., DeMarse T., Chau K.V.: Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J. Food Sci.*, 2005; 70: 121–130
- [91] Schantz E.J., Kautter D.A.: Standardized assay for *Clostridium botulinum* toxins. *J. AOAC Int.*, 1978; 61: 96–99
- [92] Schmidt J.J., Stafford R.G., Millard C.B.: High-throughput assays for botulinum neurotoxin proteolytic activity: serotypes A, B, D, and F. *Anal. Biochem.*, 2001; 296: 130–137
- [93] Shapiro R.L., Hatheway C., Becher J., Swerdlow D.L.: Botulism surveillance and emergency response: a public health strategy for a global challenge. *JAMA*, 1997; 278: 433–435
- [94] Sharma S.K., Eblen B.S., Bull R.L., Burr D.H., Whiting R.C.: Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 3935–3941
- [95] Sharma S.K., Ferreira J.L., Eblen B.S., Whiting R.C.: Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006; 72: 1231–1238
- [96] Sharma S.K., Whiting R.C.: Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods. *J. Food Prot.*, 2005; 68: 1256–1263
- [97] Singh A.K., Stanker L.H., Sharma S.K.: Botulinum neurotoxin: where are we with detection technologies? *Crit. Rev. Microbiol.*, 2013; 39: 43–56
- [98] Śliwińska-Mossoń M., Małolepsza K.: Diagnostyka i leczenie zatruc toksyną botulinową. *Fam. Med. Prim. Care Rev.*, 2011; 13: 68–73
- [99] Smith T.J., Lou J., Geren I.N., Forsyth C.M., Tsai R., Laporte S.L., Tepp W.H., Bradshaw M., Johnson E.A., Smith L.A., Marks J.D.: Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 5450–5457
- [100] Stanker L.H., Merrill P., Scotcher M.C., Cheng L.W.: Development and partial characterization of high-affinity monoclonal antibodies for botulinum toxin type A and their use in analysis of milk by sandwich ELISA. *J. Immunol. Methods*, 2008; 336: 1–8
- [101] Stanker L.H., Scotcher M.C., Cheng L., Ching K., McGarvey J., Hodge D., Hnasko R.: A monoclonal antibody based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. *Toxins*, 2013; 5: 2212–2226
- [102] Stern D., von Berg L., Skiba M., Dorner M.B., Dorner B.G.: Replacing the mouse bioassay for diagnostics and potential testing of botulinum neurotoxins – progress and challenges. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 2018; 131: 375–394
- [103] Taylor K., Gericke C., Alvarez L.R.: Botulinum toxin testing on animals is still a Europe-wide issue. *ALTEX*, 2019; 36: 81–90
- [104] Thirunavukkarasu N., Johnson E., Pillai S., Hodge D., Stanker L., Wentz T., Singh B., Venkateswaran K., McNutt P., Adler M., Brown E., Hammack T., Burr D., Sharma S.: Botulinum neurotoxin detection methods for Public Health Response and surveillance. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2018; 6: 80
- [105] Truant A.L., Tang Y.W., Waites K.B., Bébéar C., Rennie R.P.: *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology: International Edition*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Hoboken 2016
- [106] Wang D., Baudys J., Kalb S.R., Barr J.R.: Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 2011; 412: 67–73
- [107] Wang D., Baudys J., Ye Y., Rees J.C., Barr J.R., Pirkle J.L., Kalb S.R.: Improved detection of botulinum neurotoxin serotype A by Endopep-MS through peptide substrate modification. *Anal. Biochem.*, 2013; 432: 115–123
- [108] Wang D., Krilich J., Baudys J., Barr J.R., Kalb S.R.: Optimization of peptide substrates for botulinum neurotoxin E improves detection sensitivity in the Endopep-MS assay. *Anal. Biochem.*, 2015; 468: 15–21
- [109] Wenham T., Cohen A.: Botulism. Continuing education in anaesthesia. *Crit. Care Pain*, 2008; 8: 21–25
- [110] Wictome M., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K., Shone C.: Development of an *in vitro* bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65: 3787–3792
- [111] Wilder-Kofie T.D., Lúquez C., Adler M., Dykes J., Coleman J.K., Coleman J.D., Maslanka S.E.: An alternative *in vivo* method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection. *Comp. Med.*, 2011; 61: 235–242
- [112] Yadirgi G., Stickings P., Rajagopal S., Liu Y., Sesardic D.: Immuno-detection of cleaved SNAP-25 from differentiated mouse embryonic stem cells provides a sensitive assay for determination of botulinum A toxin and antitoxin potency. *J. Immunol. Methods*, 2017; 451: 90–99

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.