

# **Toxiny bakterií rodu *Clostridium***

Věra Kašpárková

Bakalářská práce  
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav potravinářského inženýrství  
akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Věra KAŠPÁRKOVÁ**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Téma práce: **Toxiny bakterií rodu Clostridium**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

- Toxiny.
- Charakteristika rodu Clostridium.
- Neurotoxiny.
- Histotoxiny.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] HRDINA, Vratislav; HRDINA, Jaromír; Jahodář, Luděk . Přírodní toxiny a jedy, Praha, 2004.

[2] VOTAVA, Miroslav a kol. Lékařská mikrobiologie speciálníneptun, Brno, 2003.

[3] Prokeš, Jaroslav a kol. Základy toxikologie, Praha, 2005.

[4] <http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/bakterie.php>.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Magda Doležalová**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

**18. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2009**

Ve Zlíně dne 31. května 2009

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*vedoucí katedry*

## ABSTRAKT

Většina klostridií je schopna tvořit toxiny, které způsobují onemocnění lidí i zvířat. Tyto toxiny jsou proteinové povahy. Klostridia tvoří buď neurotoxiny nebo histotoxiny. Ke skupině neurotoxinů patří botulotoxin produkovaný *Clostridium botulinum* a způsobující onemocnění zvané botulismus a tetanospasmin produkovaný *Clostridium tetani*, které způsobuje onemocnění zvané tetanus. Tyto dva toxiny patří mezi nejnebezpečnější bakteriální toxiny. I velmi malé dávky způsobují smrt organismu. Výskyt tetanu je dnes již omezen díky očkování a botulismus není tak častý, díky vysokým mikrobiálních kontrolách potravin. Ke skupině histotoxinů patří toxiny produkované *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi A*, *Clostridium septicum* a *Clostridium difficile*. Tyto druhy způsobují klostridiové myonekrózy, alimentární intoxikace, průjemy a pseudomembránové enterokolitidy. I přes svou vysokou toxicitu je možno klostridia použít v lékařství jako léčbu dětské mozkové obrny a nebo při průmyslové výrobě bioetanolu.

Klíčová slova: *Clostridium*, toxiny, botulotoxin, tetanospasmin, neurotoxiny, histotoxiny.

## ABSTRACT

Most of *Clostridium* bacteria produce proteinaceous toxins causing human or animals diseases. *Clostridium* can produce neurotoxins or histotoxins. The group of neurotoxins includes botulotoxin produced by *Clostridium botulinum*. It causes botulism and tetanospasmin produced by *Clostridium tetani* causes tetanus. All of these toxins are the most dangerous bacterial toxins. Just very low doses can cause the death of organism. Incidence of tetanus is limited due to vaccination and the incidence of botulism is not so high because of food safety. The second group of toxins are histotoxins produced by *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi A*, *Clostridium septicum* and *Clostridium difficile*. These toxins cause clostridial myonecrosis, food-borne intoxication, diarrhoea or pseudomembranous enterocolitis. On the other hand *Clostridium* can be used in medicine for treatment of child cerebral palsy or in production of bioethanol.

Keywords: *Clostridium*, toxin, botulotoxin, tetanospasmin, neurotoxin, histotoxin.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Magdě Doležalové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

# OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>1 TOXINY .....</b>	<b>10</b>
1.1 DEFINICE .....	10
1.2 STAVBA TOXINŮ .....	10
1.2.1 Endotoxin .....	10
1.2.2 Exotoxin .....	10
1.3 ÚČINEK .....	11
1.4 INTOXIKACE .....	12
<b>2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA KLOSTRIDIÍ .....</b>	<b>13</b>
2.1 TAXONOMIE .....	13
2.2 MORFOLOGIE.....	13
2.2.1 Morfologické znaky nejrozšířenějších klostridií.....	13
2.3 VÝSKYT.....	14
2.4 METABOLIZMUS .....	14
2.5 CITLIVOST K ANTIBIOTIKŮM .....	15
2.6 PATOGENITA.....	15
2.7 VLASTNOSTI.....	15
2.8 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ KLOSTRIDIÍ .....	16
<b>3 HISTOTOXINY .....</b>	<b>17</b>
3.1 <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> .....	17
3.1.1 Toxin A .....	17
3.1.2 Toxin B.....	17
3.2 <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> .....	18
3.2.1 Intoxikace .....	18
3.2.2 $\alpha$ -toxin.....	18
3.2.3 $\theta$ -toxin .....	19
3.2.4 $\beta$ -toxin.....	19
3.2.5 $\delta$ -toxin .....	19
3.2.6 $\kappa$ -toxin .....	19
3.2.7 Enterotoxin.....	20
3.3 <i>CLOSTRIDIUM SEPTICUM</i> .....	20
3.3.1 $\alpha$ -toxin.....	20
3.4 <i>CLOSTRIDIUM NOVI</i> .....	20
3.5 LÉČBA HISTOTOXICKÝCH INTOXIKACÍ .....	20
<b>4 NEUROTOXINY.....</b>	<b>21</b>

4.1	BOTULOTOXIN .....	22
4.1.1	Geny kódující botulotoxin.....	22
4.1.2	Struktura botulotoxinu .....	22
4.1.3	Mechanismus aktivace botulotoxinu a intoxikace .....	23
4.1.4	Účinky botulotoxinu.....	25
4.1.5	Patogeneze.....	25
4.1.6	Léčba .....	26
4.1.7	Historie objevu botulotoxinu.....	26
4.2	TETANOTOXIN .....	27
4.2.1	Struktura tetanospasminu .....	27
4.2.2	Intoxikace .....	28
4.2.3	Mechanismus účinku tetanospasminu.....	28
4.2.4	Účinky tetanospasminu .....	29
4.2.5	Tetanus .....	31
4.2.6	Léčba .....	31
4.2.7	Prevence .....	32
4.2.8	Výskyt tetanu.....	32
4.2.9	Historie objevu tetanotoxinu .....	32
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>33</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>34</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>37</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>38</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>39</b>

## ÚVOD

Bakterie rodu *Clostridium* jsou anaeroby, které jsou schopny produkovat toxiny. Tyto toxiny jsou nebezpečné pro člověka i mnohé jiné živočichy. Každý druh tvoří jiný typ toxinu, které si nejsou podobné svou stavbou ovšem mohou mít podobný účinek.

Pro člověka jsou nejnebezpečnější toxiny, které tvoří *Clostridium botulinum* a *Clostridium tetani*. Tyto toxiny patří mezi neurotoxiny, což jsou toxiny, které ovlivňují nervovou soustavu. *Cl. botulinum* produkuje botulotoxin, který se do těla dostává požitím kontaminované potravy, nejčastěji z domácích konzerv a kompotů a způsobuje intoxikaci zvanou botulismus. Podle Státního zdravotnického ústavu se každoročně v ČR objeví několik případů botulizmu (mezi lety 1960-2001 bylo evidováno 104 případů, z nichž 5 bylo smrtelných) a většina nakažených se vyléčí. *Cl. tetani* produkuje tetanospasmin, který způsobuje onemocnění zvané tetanu. Člověk je infikován spory *Cl. tetani*, které jsou zaneseny do rány nejčastěji kontaminovanou půdou. Tato intoxikace byla dříve velmi rozšířena, dnes však ustupuje díky plošnému očkování. Od roku 1974 (kdy bylo v ČR celostátní očkování proti tetanu) klesl výskyt tetanu v ČR na 0-3 případy ročně. Od roku 2002 do roku 2007 nebyl hlášen žádný případ onemocnění. Ve světě je tetanus nejvíce rozšířen v rozvojových zemích Afriky. Podle WHO se dnes tetanus vyskytuje v 52 zemích světa, v ostatních vymizel díky řádnému očkování [1].

Ostatní druhy klostridií produkují histotoxiny, které způsobují myonekrózy, průjemy a pseudomembránové enterokolitidy. Tyto nemoci jsou celkem snadno léčitelné při dodržování hygienických pravidel. Proto se tyto nemoci vyskytují nejčastěji v oblastech s nedostatečnými hygienickými návyky.



## TEORETICKÁ ČÁST

# 1 TOXINY

## 1.1 Definice

Toxin můžeme definovat jako chemickou látku biologického původu, schopnou poškodit živý organismus svým zásahem do biochemizmu jeho fyziologických funkcí. Biologické vlastnosti toxinů jsou vztahovány ke člověku nebo k jiným organismům, které jsou předmětem jeho zájmu. Vnímavost organismů k toxinům záleží na přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických receptorů na povrchu buněk [2, 3].

## 1.2 Stavba toxinů

Ne všechny toxiny mají stejnou stavbu. Toxiny, které jsou složkou buněčné membrány a uvolňují se až po zániku bakteriální buňky - endotoxiny, jsou po chemické stránce lipopolysacharidy. Toxiny produkované vně buňky, které se do prostředí uvolňují ze živých bakteriálních buněk - exotoxiny, jsou po chemické stránce proteiny složené ze dvou podjednotek, lehkého (L) a těžkého (H) peptidového řetězce. Z nichž jeden řetězec zabezpečuje průnik toxinu do buňky přes buněčnou membránu a druhý řetězec je nositelem vlastního toxického účinku [3, 4].

### 1.2.1 Endotoxin

Je složkou vnější buněčné membrány G- bakterií a uvolňuje se z povrchu lýzou nebo desintegrací bakterie in vitro. Endotoxin je připojen k buněčné membráně molekulou lipidu A (Obrázek 1). Kovalentně je na něj navázán sacharid s osmi atomy uhlíku a ketodeoxyoktonát, navázaný na oligosacharidy. Nositelem toxického účinku je lipid A, který je silným aktivátorem makrofágů, jež regulují imunitní a zánětlivou odpověď a odpovídají za patologické změny v organismu [4]. K masivnímu uvolňování endotoxinů dochází teprve po zániku bakteriální buňky. Pokud k tomu dojde v krevním řečišti hostitele, pak vyvolávají horečku a zánětlivé reakce (Tab. 1) [5].

### 1.2.2 Exotoxin

Je difuzibilní polypeptid uvolňován do vnějšího prostředí. Některé toxiny se po částečné denaturaci (např. formaldehydem) mění v toxoidy, které již nemají toxický účinek.

Endotoxiny způsobují symptomy gastrointestinálních onemocnění, průjmy a zvracení. Někdy je onemocnění způsobeno požitím již hotového toxinu v potravíně, většinou však onemocnění předchází pomnožení kolonií bakterií ve střevech. Exotoxiny jsou termolabilnější než endotoxiny, ale zároveň jsou toxičtější (Tab. 1) [4, 5].

Tab. 1. Rozdíly mezi exotoxiny a endotoxiny [5]

	exotoxiny	endotoxiny
chemicky	polypeptid	lipopolysacharid
bakterie, které produkují tyto toxiny	<i>Clostridium Botulinum, Schihella dysenteriae, Clostridium tetani</i>	<i>Schihella dysenteriae, Salmonella typhimurium</i>
odolnost vůči vysokým teplotám	termolabilní	termostabilní
antigeny	jsou to dobré antigeny, lze je přeměnit na toxoidy	jsou antigeně méně hodnotné
toxicita	vysoká toxicita	nízká toxicita
inkubační doba	působí v závislosti na množství toxinu po určité době	nepředchází obvykle delší inkubační doba
příznaky intoxikace	specifická toxicita typická pro jednotlivé druhy	působí obdobným způsobem, vyvolávají horečku, vazomotorické a metabolické poruchy

### 1.3 Účinek

Toxiny mohou působit přímo na cílovou buňku nebo na systém, který pak uvolňuje imunologické mediátory, jež mají za následek změnu fyziologických funkcí v organismu. Účinek toxinu nemusí mít vždy za následek smrt buňky, může však zasáhnout její funkci [6]. Toxiny zasahují do metabolických a regulačních funkcí buňky a blokují proteosyntézu.

Váží se také na epitel střevní sliznice, ledvin a výstelku krevních kapilár. Intoxikace je doprovázena masivními průjmy, rychlou ztrátou tekutin a rozvratem metabolismu minerálů. Člověk umírá v důsledku dehydratace organismu [3]. Účinek toxinu se udává jako číslo  $LD_{50}$ , což určuje dávku toxinu, která po aplikaci usmrtí 50 % testovaných zvířecích jedinců. Podle hodnoty  $LD_{50}$  lze určit míru toxicity (Tab. 2).

*Tab. 2. Rozdělení látek podle stupně toxicity [6].*

$LD_{50}$	kategorie
> 15 g/kg	prakticky netoxické
5-10 g/kg	málo toxické
0,5-5 g/kg	mírně toxické
0,05-0,5 g/kg	silně toxické
5-50 mg/kg	extrémně toxické
<5 mg/kg	Supertoxické

## 1.4 Intoxikace

Je to celkové poškození organismu působením vstřebané toxické látky. Látky se do organismu dostávají trávicím ústrojím nebo dýchacím ústrojím nebo průnikem přímo do krve nejčastěji přes kůži. Projevy intoxikace a její závažnost jsou závislé na druhu a množství uvolněného toxinu, lokalizaci a hloubce poranění, vnímavosti jedince, rychlosti metabolismu, zdravotním stavu a pohlaví jedince a na řadě dalších faktorů [5, 6].

Jako sekundární intoxikace je považovaná intoxikace způsobená jiným organismem, který byl intoxikován jež předtím. K takové situaci dochází obvykle při požití nakaženého zvířete nebo rostliny ošetřené pesticidy při nerespektování ochranné lhůty [5].

## 2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA KLOSTRIDIÍ

### 2.1 Taxonomie

Dle taxonomického členění patří rod *Clostridium* do domény *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Clostridia*, řád *Clostridiales* a čeleď *Clostridiaceae*. Rod *Clostridium* zahrnuje přes 60 druhů grampozitivních anaerobních sporulujících tyčinek [5, 7]. Většinou jsou saprofyté. Pro člověka mají význam jako producenti hospodářsky užitelných metabolitů (např. octa nebo různých enzymů). Jen několik málo druhů je schopno vyvolat infekční onemocnění u lidí a zvířat prostřednictvím četných exotoxinů proteinové povahy [8].

### 2.2 Morfologie

Vegetativní formy klostridií se jeví jako různě dlouhé a široké tyčinky, většinou rovné a jejich uspořádání je charakteristické pro jednotlivé druhy [7, 8]. Většinou jsou díky peritrichálně uloženým bičíkům pohyblivé. Jejich charakteristickou vlastností je tvorba oválných či kulatých endospor. Podle umístění spory v buňce se rozlišují bakterie se sporami centrálními, subterminálními a terminálními. U většiny druhů spory vydouvají buňku, ale v některých případech tomu tak být nemusí [8, 9]. Spory jsou klidovým stádiem bakterie, obvykle mají velmi silné stěny, odolné vůči fyzikálním i chemickým vlivům. Ve formě spor přežívají klostridia nepříznivé podmínky po velmi dlouhou dobu [10].

#### 2.2.1 Morfologické znaky nejrozšířenějších klostridií

*Clostridium tetani* - štíhlé, středně dlouhé (kolem  $0,5 \times 5-7 \mu\text{m}$ ) tyčinky tvořící terminální kulaté spory [11].

*Clostridium botulinum* - rovné, pohyblivé tyčinky o šířce něco přes  $1 \mu\text{m}$  a délky kolem  $10 \mu\text{m}$ . Tvoří oválné spory, které jsou subterminální a vydouvají tyčinku. Jsou termorezistentní a mohou vydržet i několikahodinový var [12].

*Clostridium difficile* - vyskytují se ve 2 formách jako štíhlé, rovné tyčinky s cylindrickými, tyčinku málo vydouvajícími sporami (asi  $0,6 \times 4-6 \mu\text{m}$ ) nebo jako robustní tyčinky, rozměrů asi  $1,2-1,6 \times 6-16 \mu\text{m}$  tvořící subterminální spory. Spory jsou málo termorezistentní [13].

*Clostridium perfringens* - nepohyblivé tyčinky většinou silné (přes 1  $\mu\text{m}$ ), krátké 2-4 mm nebo dlouhé (přes 10  $\mu\text{m}$ ). Někdy opouzdřené polysacharidovým pouzdem. Spory jsou oválné, subterminální a vydouvají tyčinku. Jsou termorezistentní [14].

### 2.3 Výskyt

Klostridia se vyskytují v půdě, bahně, mořských sedimentech, rozkládajícím se rostlinném materiálu nebo ve střevech člověka a zvířat. Sekundárně se vyskytují v siláži, mléce, sýrech nebo v konzervách [5, 7].

*Clostridium tetani* - je součástí mikroflóry se střevěch savců, zejména koní. Někdy se může vyskytovat i ve střevě člověka. Také se velmi často nachází v obdělávané půdě. *Cl. tetani* je saprofyt střeva domácích zvířat, zejména koní a skotu. Spory se hnojením chlévskou mrvou dostávají do půdy. Vysoce odolné spory se nacházejí v půdě a prachu [5, 11].

*Clostridium botulinum* se vyskytuje převážně v půdě a spory velmi často na čerstvém ovoci a zelenině. Pokud se zjistí v lidském střevě, znamená to kontaminaci z potravin [5].

*Clostridium perfringens* je také pravidelnou součástí střevního obsahu člověka a mnoha domácích a divoce žijících zvířat. S výkaly se dostává do půdy, kde jeho spory přežívají velmi dlouho. Vyskytuje se často i na sliznici vaginy [3, 5].

### 2.4 Metabolismus

Pro klostridie je typický anoxibiotický metabolismus s mimořádnou citlivostí na kyslík. Intenzita této citlivosti je druhově odlišná, ale žádná klostridia se nemnoží za přítomnosti kyslíku. Klostridia používají při svých oxidoredukčních procesech enzymy s  $\text{Fe}^{2+}$  v molekule, které začínají fungovat až při záporném oxidoredukčním potenciálu (eH) v prostředí (mezi -100 až -200 mV). Proto se začínají množit, až když prostředí této hodnoty dosáhne. energii pro své životní procesy získávají klostridie z anaerobní glykolýzy. Nefermentující klostridie mohou získat energii z oxidoredukce mezi dvěma aminokyselinami. Podle toho, z jakých substrátů klostridie získávají energii, lze je rozdělit do několika skupin:

1. klostridie fermentující sacharidy
2. klostridie štěpící aminokyseliny z bílkovin a peptonů
3. klostridie schopné využívat jak sacharidy tak bílkoviny

4. klostridie pro něž jsou hlavním substrátem puriny a pyrimidiny [8].

## 2.5 Citlivost k antibiotikům

Všechny druhy klostridií jsou rezistentní vůči aminoglykosidovým,  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, zejména ke krystalickému penicilinu G. Inhibují je rovněž cefalosporiny, clindamycin, vankomycin, tetracykliny a imodazolové preparáty. Citlivost k těmto antibiotikům je rozdílná u jednotlivých druhů, ale také v rámci druhů se vyskytují kmeny s přirozenou rezistencí. Může také dojít k získané rezistenci [8, 15].

## 2.6 Patogenita

Jen pár druhů klostridií je schopno vyvolat onemocnění lidí a zvířat. Klostridia vyvolávají 3 druhy onemocnění: neurointoxikace (*Cl. tetani*, *Cl. botulinum*), nekrotizující infekce měkkých tkání a nitrobřišních orgánů obsahujících svalovinu a chorobné procesy odehrávající se ve střevě [8, 9].

## 2.7 Vlastnosti

*Clostridium tetani* se dobře kultivuje na kultivačních půdách. Na půdě se 2 % agaru a s krví roste v jemném povlaku, pod kterým je vidět nevýraznou hemolýzu. Na půdě s vyšším obsahem agaru roste v transparentních, laločnatých koloniích. V biochemických testech se chová značně inertně. Štěpí sice glukózu, ale půdu neokyseluje. Velmi pomalu hydrolyzuje želatinu a albumin [11].

*Clostridium botulinum* na krevním agaru pro anaeroby tvoří kruhové, bělavé, necharakteristické kolonie obklopené u všech typů zónou úplné hemolýzy. Sacharolytické typy štěpí omezený počet sacharidů, přitom pH půdy klesá jen mírně. Všechny typy až na typ G produkují lipázu. Proteolytické typy, k nimž patří také typ G, hydrolyzují želatinu a natravují masové částičky vložené do tekuté půdy [12].

*Clostridium difficile* rostou jako okrouhlé kolonie. Krevní ani žloutkový agar nemění. Kvasí řadu sacharidů, z bílkovin hydrolyzuje pouze želatinu nejdříve za 48 hodin. Je vysoce citlivý na vankomycin, ale na rozdíl od ostatních klostridií je rezistentní na cefoxitin a většina kmenů také na klindamycin [13].

*Clostridium perfringens* roste ve 3 typech kolonií, které na krevním agaru jsou obklopeny v případě typu A dvojitou zónou hemolýzy. Zevní s neúplnou hemolýzou patří toxické lecithináze. Na žlutkovém agaru se účinek tohoto enzymu projevuje zónou opalescence. *Cl. perfringens* štěpí řadu sacharidů s okyselením půdy až pod pH 4,5 a rychle hydrolyzuje želatinu [14].

## 2.8 Průmyslové využití klostridií

Výroba bioetanolu - v posledním období je ve výzkumu a vývoji věnována pozornost postupům k získání alkoholu ze surovin obsahujících celulózu. Ta se chemicky hydrolyzuje kyselinami nebo louhy při zvýšeném tlaku a teplotách. Jde o velmi nákladnou technologii, proto se hledají další možnosti jako např. využití hub štěpících celulózu (př. *Trichoderma viride*), nebo termofilní kmeny klostridií, kdy celulóza kvasí na etanol při teplotě okolo 60 až 70 °C [16].

Využití v lékařství - v roce 1990 se objevuje první studie o využití botulotoxinu v léčbě spastických pacientů. O tři roky později jsou známy další zkušenosti v terapii dětí s dětskou mozkovou obrnou, zejména diparetickou formou. Botulotoxin příznivě ovlivňuje růst ošetřených svalů a může pomoci předcházet rozvoji svalových kontraktur a trvalých kostních deformací. V některých případech je tak možno oddálit potřebnou ortopedickou korekci na pozdější dobu nebo nabízí šanci operačnímu řešení předejít. V současné době je vytvořena přesná standardizace dávkování, frekvence aplikace botulotoxinu a samozřejmě i vyhodnocování terapeutického efektu účinné látky (u nás pod názvem Dysport) [17].

Dále se také botulotoxin využívá v kosmetice na vyhlazení vrásek a snížení sekrece potu [18].

Dnes se také uvažuje o možnosti použití klostridiálního bakteriofágu jako součást konzervantu pro silážování [19].



### 3 HISTOTOXINY

Histotoxiny jsou toxiny produkovaná některými druhy klostridií, které způsobují infekce měkkých tkání, stěn žlučníku, dělohy a střeva, a jako průjmová onemocnění alimentárního původu. Histotoxiny produkují především *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi A*, *Clostridium septicum*, *Clostridium difficile* [8].

#### 3.1 *Clostridium difficile*

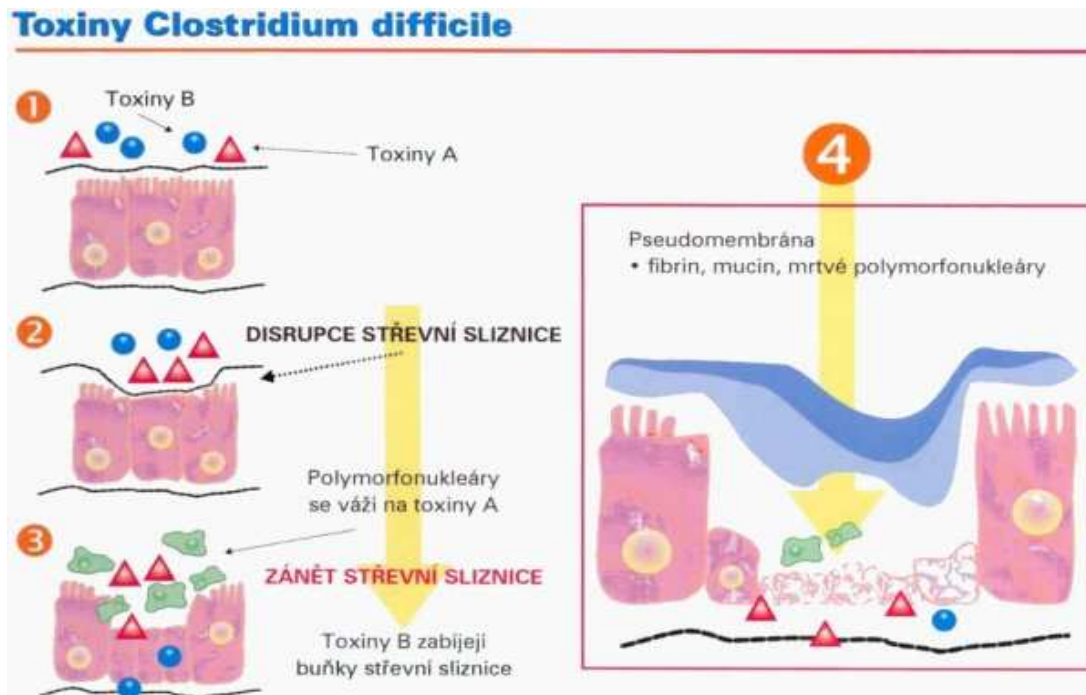
*Clostridium difficile* produkuje 2 termolabilní proteinové toxiny, které se do prostředí dostávají po rozpadu buněk. Toxin A je enterotoxinem, který vyvolává vodnaté, někdy mírně hemoragické průjmy. Toxin B je nekrotizujícím cytotoxinem. Oba aglutinují erythrocyty králíků, ale nikoli jiných druhů. U lidí často vyvolává lehčí průjmová onemocnění, ale také závažnější pseudomembranózní enterokolitidy [9, 13].

##### 3.1.1 Toxin A

Toxin A způsobuje dysfunkci buněk střevního epitelu, které nemohou již déle z důvodu velkého množství viskózní tekutiny v buňkách optimálně zabezpečovat kontrolu pohybu vody. Toxiny A zničí povrchové struktury buněk střevní sliznice. Je pravděpodobnou příčinou průjmů, které jsou prvním symptomem pseudomembranózní enterokolitidy. Toxin A je toxický pro většinu buněk imunitního systému, protože vyvolá disrupci cytoskeletálních komponent [15, 20].

##### 3.1.2 Toxin B

Toxin B nevykazuje enterotoxickou aktivitu. Zabíjí však jak buňky ve tkáňových kulturách, tak i buňky střevního epitelu. Je zhruba 100 – 1000x toxičtější než toxin A. Toxin B je látka bílkovinného charakteru. Buňky střevní sliznice jsou zničeny jen tehdy, jsou-li přítomny zároveň oba dva toxiny. Toxiny A zničí povrchové struktury buněk střevní sliznice a tím umožňují molekulám toxinu B úspěšně zaútočit na buňky střevního epitelu (Obr. 1) [15, 20].



Obr. 1. Působení toxinů *Cl. difficile* na stěnu střevní sliznice [20].

### 3.2 Clostridium perfringens

*Clostridium perfringens* se vyskytuje v 5 typech A-E. Produkuje tyto exotoxiny:  $\alpha$ -toxin (fosfolipáza C),  $\beta$ -toxin,  $\delta$ -toxin,  $\epsilon$ -toxin,  $\theta$ -toxin (perfringolysin O)  $\iota$ -toxin,  $\kappa$ -toxin (kolagenóza) a termolabilní enterotoxin [5]. Tyto toxiny se dají velice jednoduše určit, protože je přesně znám gen kódující tyto toxiny. K tomu je využívána metoda multiplex PCR, který jednoduše detekuje geny [21].

#### 3.2.1 Intoxikace

Infekce se dostává do rány s kontaminovaným prachem či půdou, což je časté u válečných poranění. Ke kontaminaci rány může dojít také vlastním střevním obsahem, popř. vzestupem z vagíny do dělohy po gynekologických operacích, špatně provedených potratech a podobně. Vstupní branou může tedy být poranění, operační rána nebo zcela vzácně střevní perforace [5].

#### 3.2.2 $\alpha$ -toxin

$\alpha$ -toxin čili fosfolipáza C je prvním toxinem, který byl identifikován jako enzym. Podílí se na rozpadu povrchových membrán svalových buněk a leukocytů tak, že způsobuje lyzi

fosfolipidů buněčných membrán. Podílí se také na rozvoji infekcí měkkých tkání. Přímo potlačuje kontraktilitu srdečního svalu a to vede k šoku u plynaté sněti, v níž  $\alpha$ -toxin spolu s  $\theta$ -toxinem hraje hlavní roli. Ke svému účinku potřebuje ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a pH prostředí 7,0-7,6. V molekule této bílkoviny je Zn. Vychytání  $\text{Zn}^{2+}$  iontů z prostředí některými cheláty způsobí, že nejsou syntetizovány toxické molekuly. Inaktivuje jej také nadbytek dvojmocných iontů železa [5, 9, 14, 22].

### 3.2.3 $\theta$ -toxin

$\theta$ -toxin čili perfringolysin O je po chemické stránce polypeptid. Váže se na cholesterol v buněčných membránách. Membrány, které neobsahují cholesterol jsou vůči němu odolné. Perfringolysin O vytváří póry v membránách a je faktorem rozhodujícím o virulenci *Cl. perfringens*. Spolu s  $\alpha$ -toxinem hraje hlavní roli u traumatické plynaté sněti (klostridiové myonekrózy) [5, 23].

### 3.2.4 $\beta$ -toxin

$\beta$ -toxin je produkován převážně kmeny *Cl. perfringens* typu C a D. Molekulárně genetické studie objevily, že jde o dva odlišné toxiny, nyní nazývané  $\beta_1$  a  $\beta_2$ .  $\beta$ -toxin vyvolává nekrotizující enteritidy zvířat (prasat a koní) i lidí [5, 23].

### 3.2.5 $\delta$ -toxin

$\delta$ -toxin působí hemolyticky na erytrocyty sudokopytníků. Jeho cytolytický efekt se však neomezuje jen na erytrocyty, ale postihuje i jiné typy buněk, např. králičí, lidské a morčecí destičky, a zabíjí některé typy králičích leukocytů [5].

### 3.2.6 $\kappa$ -toxin

$\kappa$ -toxin neboli kolagenóza hydrolyzuje kolagen v podkožních tkání a ve svalech a usnadňuje pronikání *Cl. perfringens* do okolních tkání u plynaté sněti (klostridiové myonekrózy) [5].

### 3.2.7 Enterotoxin

Termolabilní enterotoxin je polypeptid, který zvyšuje permeabilitu kapilár, porušuje transport tekutin a iontů přes membránu střevních buněk. To vyvolává nahromadění tekutiny ve střevních kličkách, tedy průjem [14].

## 3.3 *Clostridium septicum*

*Clostridium septicum* produkuje tyto toxiny:  $\alpha$ -toxin,  $\beta$ -toxin (deoxyribunukleáza),  $\delta$ -toxin (septicolysin) [5].

### 3.3.1 $\alpha$ -toxin

$\alpha$ -toxin vytváří v buněčných membránách iontové kanály a je důležitým faktorem virulence tohoto mikroorganismu. Váže se na glykosylfosfatidylinositolové receptory. Má hemolytické, nekrotizující a cytotoxické účinky, které jsou hlavním faktorem u plynaté sněti vyvolané *Cl. septicum*.  $\alpha$ -toxin je uvolňován z buněk jako inaktivní protoxin. Teprve proteolytickým štěpením (in vitro trypsinem) je převeden do aktivní formy [5].

## 3.4 *Clostridium novyi*

*Clostridium novyi* se vyskytuje ve 4 typech: A, B, C, D. V patologii má význam pouze typ A, protože způsobuje onemocnění zvané plynová gangréna. *Cl. novyi* produkuje  $\alpha$ -toxin,  $\beta$ -toxin,  $\delta$ -toxin,  $\epsilon$ -toxin, které mohou mít letální, hemolytický nebo nekrotický účinek [5, 23].

## 3.5 Léčba histotoxických intoxikací

U intoxikací způsobujících nekrózy je nejčastější léčbou chirurgické otevření rány a odstranění nekrotizující tkáně a podání antibiotik (vysoké dávky krystalického penicilinu G nebo klindamicinu). Často je velmi účinná léčba kyslíkem v hyperbarické komoře. U enterokolitid se podávají antibiotika (metronidazol, vankomycin) a podporuje se množení přirozené střevní mikroflóry prebiotiky. Enterotoxikózy se léčí symptomaticky [8, 9].

## 4 NEUROTOXINY

Neurotoxiny jsou proteinové toxiny, které poškozují nervovou tkáň. Mezi klostridia produkující neurotoxiny patří *Clostridium botulinum* produkující botulotoxin a *Clostridium tetani* produkující tetanotoxin. Produkce botulotoxinu byla také prokázána i u jiných druhů klostridií, a to *Clostridium butyricum* (neurotoxin typu E) a *Clostridium baratii* (neurotoxin typu F) [9, 10].

Botulotoxin, který působí na periferní cholinergní synapse, eliminuje nervové vzruchy v synapsích nervových buňkách. Tetanotoxin, blokuje uvolnění inhibitorového mediátoru v synapsích míšních kořenů a v jádrech mozkových nervů. Neurotoxiny jsou produkovány jako proteinový komplex (BoNT), hemaglutinin a netoxický nonhemaglutinin. Klostridia produkují pouze jeden druh neurotoxinu (Tab. 3). Některé kmeny však mohou produkovat 2 typy toxinů; jeden ve větším množství, druhý v menším množství. Bylo také popsáno několik kmenů *Cl. botulinum* produkující neurotoxin typu A a zároveň nesoucí geny pro neurotoxin typu B, ale tyto geny nejsou obvykle vyjadřovány. Na chromozomu jsou ve formě tzv. spících genů [24].

Tab. 3. Přehled neurotoxinů produkovaných bakteriemi rodu *Clostridium* [24].

Typ neurotoxinu	Produkuje	Vnímavý organismus	Geografický výskyt
BoNT/A	<i>Clostridium botulinum</i>	lidé	USA, Čína
BoNT/B	<i>Clostridium botulinum</i>	lidé	Evropa, Čína
BoNT/C	<i>Clostridium botulinum</i>	zvířata	globálně
BoNT/D	<i>Clostridium botulinum</i>	zvířata	globálně
BoNT/E	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium butyricum</i>	ryby lidé	globálně
BoNT/F	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium baratii</i>	zvířata	globálně
BoNT/G	<i>Clostridium botulinum</i>	vzácně lidé	Argentina
TeNT	<i>Clostridium tetani</i>	lidé zvířata	globálně

## 4.1 Botulotoxin

Neurotoxiny produkované bakterií *Clostridium botulinum* se vyskytují v 8 antigenních typech (A, B, C1, C2, D, E, F a G). Do prostředí jsou uvolňovány z buněk při jejich rozpadu. Nachází se také ve sporách [12].

Botulotoxin je lidově zván klobásovým jedem. Spory *Cl. botulinum* se velice často vyskytují jak na čerstvých, tak i v průmyslově zpracovávaných poživatinách hlavně v nedostatečně sterilizovaných masových konzervách, zeleninových a ovocných konzervách. Po požití takto kontaminované potraviny dochází k otravě nazývané botulismus. Onemocnění lidí je vyvoláno hlavně toxiny typu A, B, E a zřídka F a G. Typy C a D jsou účinné pouze na zvířata [5, 24, 25].

### 4.1.1 Geny kódující botulotoxin

Genetický materiál kódující produkci BoNT typu C a D není genetickým materiálem buňky produkující tento toxin, nýbrž je cizorodým genetickým materiálem. Gen kódující BoNT je původně součástí genomu lyzogenního bakteriofága, který se po začlenění do bakteriální DNA mění v profága. Pouze infikovaná bakteriální buňka je schopna tvorby botulotoxinu. Fágová konverze byla popsána u sérovarů C a D *Cl. botulinum*. Bakteriální buňky sérovarů C a D neobsahující profága však mohou být infikovány fágy, čímž se stávají plně toxigenními [2].

U jiných sérovarů *Cl. botulinum* nebyl potvrzen přenos genetického materiálu pomocí fágové konverze. U sérovarů B a G *Cl. botulinum* byla naproti tomu potvrzena přítomnost genu pro BoNT na plazmidu [2].

### 4.1.2 Struktura botulotoxinu

Klostridiální botulinické neurotoxiny jsou produkovány bakteriálními buňkami ve formě inaktivních protoxinů - proteinových řetězců o molekulové váze 150 kDa spojených proteáza-senzitivní kličkou. Skládá se ze tří bílkovinných domén. Působením endogenních a exogenních proteáz jsou tyto řetězce štěpeny do formy dvou aktivních dvouřetězcových bílkovin spojených navzájem disulfidickými vazbami. Jeden řetězec je označen jako L (light) řetězec (50 kDa) a druhý jako H (heavy) řetězec skládající se ze dvou 50 kDa domén ( $H_C$  a  $H_N$  doména). Tyto tři bílkovinné domény mají rozdílnou funkci při pronikání

do buňky.  $H_C$  doména je odpovědná za vazbu neurotoxinu na buněčný povrch, zatímco  $H_N$  doména odpovídá za průnik L-řetězce do cytoplazmy. Nositelem toxického účinku je L řetězec [5, 9, 24, 25, 26].

#### 4.1.3 Mechanismus aktivace botulotoxinu a intoxikace

Botulotoxin může do organismu vstupovat přes gastrointestinální trakt nebo plícemi při vdechnutí aerosolu. Spory *Cl. botulinum* přežívají několikahodinový var a umožňují tak "přežítí" těchto mikroorganismů v nepříznivých podmínkách [24].

Toxin se aktivuje v trávicím traktu proteolytickými enzymy, kdy se štěpí na 2 řetězce a teprve pak nabývá toxicity (Obr. 1). U proteolytických kmenů se toto štěpení odehrává již v bakteriální buňce vlastními proteázami, u sacharolytických kmenů k němu dochází až účinkem trypsinu v tenkém střevě. Resorpci toxinu umožňuje relativní odolnost BoNT vůči nízkému pH a proteolytickým enzymům v tenkém střevě [2, 12]. Poté se BoNT vstřebává do lymfy a krve, odkud se šíří do centrálního nervového systému až k zakončení motorických nervů. Uvnitř nervových buněk dochází k redukci bílkovinného komplexu. Tato redukce uvolňuje L řetězec, což je v podstatě zinek- endopeptidáza. Přítomnost tohoto bílkovinného segmentu je zodpovědná za to, že botulinické neurotoxiny inhibují uvolňování acetylcholinu do synapse a tím dochází k přerušení vedení signálu z neuronu na neuron [9, 24, 26]. Tímto způsobem neurotoxiny katalyzují hydrolyzu minimálně jedné ze tří bílkovin hrajících zásadní roli v neuroexocytóze acetylcholinu:

- VAMP (vesicle associated membrane protein);
- SNAP (synaptosomal-associated protein);
- syntaxin (membrane II protein), který je umístěn v aktivní zóně presynaptické membrány [24].

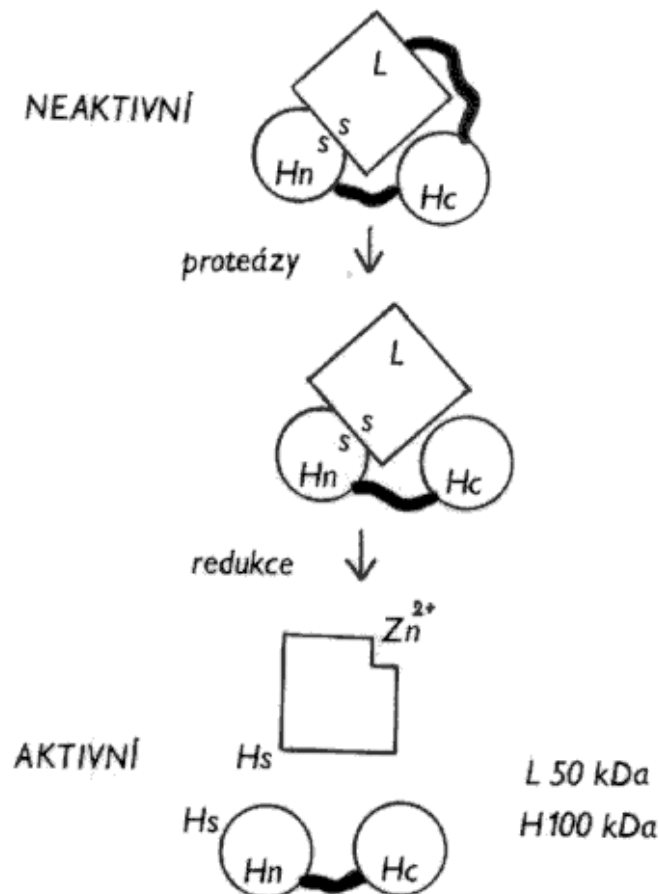
Vlastní mechanismus intoxikace buněk neurotoxiny sestává ze 4 po sobě následujících kroků:

1. Vazba botulinického neurotoxinu na povrch nervové buňky.
2. Specifická vazba na VAMP-SNAP-Syntaxin bílkovinný komplex.
3. Membránová translokace neurotoxinu.

4. Enzymaticky cílená hydrolýza bílkovin odpovědných za proliferaci acetylcholinu [24].

Dochází k přerušení vedení vzruchu v cholinergních nervových vláknech v synapsích. Vzruch nemůže být převeden, protože v napadené presynaptické membráně je snížena vnímavost na ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a acetylcholinový mediátor nemůže být přes ni přenesen. To se projeví po inkubační době, nejčastěji po 18 až 36 hodinách typickými klinickými příznaky. Inkubační doba však může trvat pouze 2 hodiny nebo až 8 dní v závislosti na velikosti infekční dávky [9, 12].

Většinu otrav botulotoxiny dnes tvoří otravy z požití komerčně vyráběných poživatin, které jsou prodávány jak v plastových obalech, tak i v konzervách. Skladování těchto poživatin v chladničkách sice zabraňuje pomnožování případné bakteriální flóry, ale nijak neeliminuje ani vegetativní buňky, ani spory či samotné neurotoxiny *Cl. botulinum* [9, 24].



Obr. 2. Schéma struktury a mechanismu aktivace botulinických neurotoxinů [24].



#### 4.1.4 Účinky botulotoxinu

Smrtelná dávka pro člověka je 1 ng/kg živé váhy ( $LD_{50}=1$  ng/kg). Na "vyhubení" lidstva jako živočišného druhu, jež dnes čítá zhruba 5,7 miliardy jedinců, by stačilo pouhých 39 g botulotoxinu. Botulotoxin je 800 milionkrát účinnější než kyanid, 400 milionkrát účinnější než arzenik a 100 milionkrát účinnější než hadí jed (*Ophiophagus hannah*). Různí živočichové jsou různě vnímaví k botulotoxinu. K nejvnmavějším živočichům patří myši. Naproti tomu na želvy a ostatní studenokrevné živočichy botulotoxin nepůsobí vůbec [24].

Účinky botulotoxinu se projevují hlavně na perifériích: paralýza příčně pruhovaných svalů způsobena bloádou přenosu nervového vzruchu na neuromuskulární ploténce a reakce vegetativního nervového systému, která je dána postižením eferentních cholinergních nervů. K trvalému postižení svalových nebo nervových buněk nedochází. Důsledkem jsou chabé obrny nejdříve svalů inervovaných mozkovými nervy. Dochází k dvojitému vidění, k poklesu víček, ovlivnění polykání, slinění, sekrece ve střevě a k postupným obrnám kosterních svalů. Proces končí poruchami dýchání a zástavou srdce z bulbární paralýzy. [9, 12]

Od 80. let dvacátého století se botulotoxin používá k terapeutickým účinkům např. k léčbě blepharospasmu (křečový stah víček) a při chorobách, u nichž dochází k abnormálnímu vzestupu svalového tonusu [9]. V dermatologii je botulotoxin typu A používán ve dvou základních indikacích. Ke kosmetickému ovlivnění hyperfunkčních mimických vrásek a funkčnímu dočasnému snížení sekrece potu. Při vyhlazování vrásek se aplikace provádí nitrosvalově tam, kde je účelem přerušit svalovou aktivitu. Ke snížení sekrece potu se botulotoxin aplikuje intradermálně nebo subepidermálně do axil, dlaní a chodidel [18].

#### 4.1.5 Patogeneze

Nejčastější formou botulizmu je alimentární intoxikace botulotoxinem již vytvořeným v potravě, nejčastěji v domácích masových, rybích i zeleninových konzervách a v komerčně vyráběných tzv. polokonzervách včetně různých omáček. Botulizmus jako toxoinfekce má 2 formy: otravu vycházející z rány infikované sporymi *Cl. botulinum* a botulizmus kojenců. Kojenecký botulizmus se vyznačuje tím, že se v krvi kojence nedaří prokázat botulotoxin. V tlustém střevě dochází k výraznému pomnožení *Cl. botulinum* a k produkci toxinu. Jako zdroj infekce kojence se někdy uvádí včelí med. Asi 10 % vzorků

među obsahuje spory *Cl. botulinum*. Po 9. měsíci věku se tento typ botulizmu nevyskytuje. *Cl. botulinum* prakticky nekolonizuje povrch střevní sliznice ve střevech dospělého člověka (i když v poslední době byly popsány výjimky). Velice vzácné jsou případy otrav botulotoxinem přímo z infikované rány [2, 12, 26].

Otravy botulotoxinem jsou nejčastější u doma připravovaných pokrmů. Botulotoxiny jsou inaktivovány teplem, světlem a silně alkalickým prostředím. Hodnota pH menší než 5, vyšší koncentrace soli (více než 10 %) nebo cukru (více než 30 %) efektivně zamezují růstu *Cl. botulinum* [25].

#### 4.1.6 Léčba

Základem terapie je včasná aplikace polyvalentního antitoxického imunoglobulinu intravenózně obsahujícího antitoxiny A, B a E na bázi koňského séra a také symptomatická terapie [5]. Dnes se zkoumají nové účinnější a bezpečnější vakcíny. Jsou také známy malé molekuly, které jsou schopny inhibovat butulotoxin [27]. Protilátky proti botulotoxinům se aplikují jak u alimentárního botulizmu, tak i po expozici aerosolu. Antitoxin se podává 2-3x denně do vymizení příznaků [5, 9]. Toxin můžeme detekovat ve zvracích a především ve zbytcích podezřelé potraviny. Nejspolehlivější průkaz toxinu se provádí pokusem na zvířeti (myši). U traumatického botulizmu je třeba provést chirurgickou revizi rány [9, 10].

#### 4.1.7 Historie objevu botulotoxinu

Otravy klobásovým jedem sužovaly lidstvo od nepaměti. Historie objevu jejího původce sahá do roku 1884, kdy ve vsi Ellenzells v Belgii (z hlediska tohoto objevu) památná hostina členů místního Hudebního Pohřebního Spolku. Druhého dne po této hostině těžce onemocnělo 34 účastníků této hostiny, z nichž 3 krátce na to zemřeli. Tehdy ještě zcela neznámý bakteriolog van Emerghen se začal zajímat o tento případ. Zaměřil svou pozornost na společný pokrm účastníků hostiny. Mezi zbytky jídla zůstalo hodně již notně zapáchající uzené šunky, kterou doktor van Emerghen vyluhoval a s takto získaným eluátem naočkoval různá zvířata. Již po několika hodinách bylo možné zaregistrovat různé příznaky, které byly shodné s příznaky u postižených osob [2].

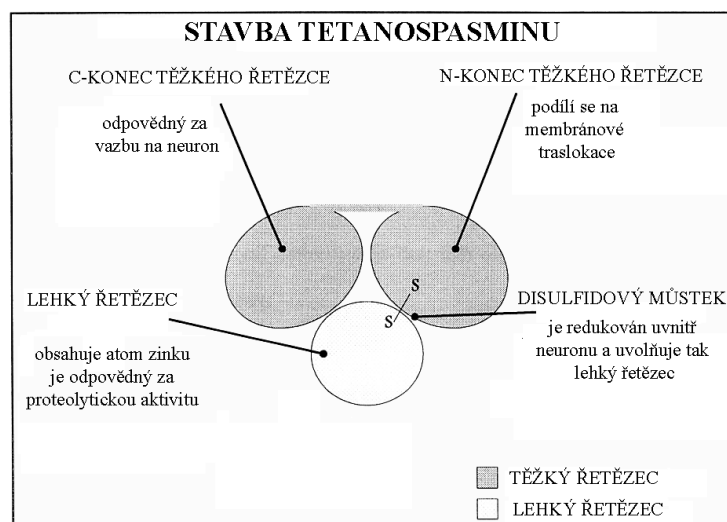
## 4.2 Tetanotoxin

*Costridium tetani* se nachází jako saprofyt ve střevě savců, zejména koní, jako součást jejich mikroflóry. S výkaly se dostává do půdy, sporuluje a vysoce rezistentní spory v půdě přežívají po léta i staletí. Člověk se infikuje sporami, které jsou zaneseny do rány, a infekce se nazývá tetanus. Vedle exogenních zdrojů infekce (půda) známe také tetanus endogenní, kdy zdrojem spor je střevo nebo vagina člověka. Dnes je výskyt tetanu omezen očkováním [9, 11].

Toxin *Cl. tetani* má 3 složky: tetanospasmin, který je vlastním neurotoxinem; tetanolyzin, který má hemolytické vlastnosti (je to hemolyzin typu streptolyzinu O s podobným účinkem) a neúčastní se patogenezě tetanu; a enzym reninového účinku. Tetanolyzin se na patogenezě tetanu neúčastní. Je dermonekrotický a leukocidní. Jeho receptorem je cholesterol [5, 9, 11].

### 4.2.1 Struktura tetanospasminu

Tetanospasmin se v netoxické formě hromadí v tyčinkách *Cl. tetani*, v nichž může tvořit 5-10 % jejich váhy. Působením proteáz nabývá tetanospasmin toxické aktivity [5]. Skládá se ze dvou peptidových řetězců, z lehkého  $\alpha$ -řetězce (50 kDa) a těžkého  $\beta$ -řetězce (100 kDa) spojených navzájem disulfidickým můstkem (Obr. 2). Proteázami se rozštěpí na terminální karboxylový fragment (C-fragment) a zbytek  $\beta$ -řetězce zůstává spojen disulfidovým můstkem s  $\alpha$ -řetězcem a nazývá se B-fragment [3, 11].



Obr. 3. Stavba tetanospasminu[28].

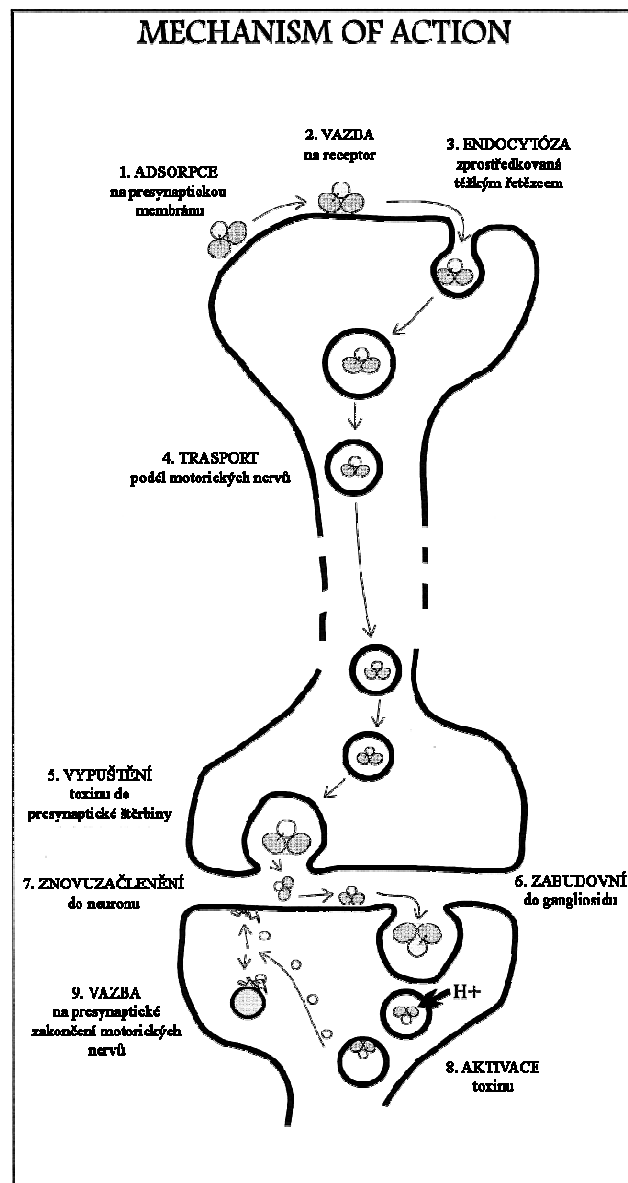
#### 4.2.2 Intoxikace

Vstupní branou infekce jsou obvykle hlubší znečištěné rány, méně často může být místem vstupu infekce i popálenina, bércový vřed, pahýl pupečníku, operační rána (operace střeva) a nesterilní vpichy u toxikomanů. Důležitými faktory pro vznik tetanu v místě poranění jsou nekrotické tkáně, hnisavý proces a přítomnost cizího předmětu. Přítomností těchto faktorů se vytváří anaerobní prostředí a snižuje se oxidoredukční potenciál, což podporuje klíčení klostridiových spor a následně tvorbu tetanospasminu ve vegetativních bakteriálních buňkách [5, 9].

#### 4.2.3 Mechanismus účinku tetanospasminu

V hostitelské tkáni se *Cl. tetani* pomnožuje a bakteriální buňky zůstávají v ráně a do těla se šíří pouze toxiny. Do prostředí se toxiny uvolňují autolýzou bakteriálních buněk. Z rány se tetanospasmin vstřebává do krve a lymfy kde je vychytáván nervovými zakončeními a transportován do centrálního nervového systému až k neuronům míchy rychlostí 7-25 cm za 24 hodin [9].

Proteázy rozštěpí molekulu tetanospasminu na dva fragmenty, čímž je toxin aktivován. Průnik toxinu do buněčných struktur zprostředkovává při kyselém pH (pod 5,0) dusíkem ukončený fragment těžkého řetězce, který se naváže na membránové receptory, čímž se změní permeabilita buněčných membrán a dochází k vytvoření tzv. iontového kanálu, kterým proniká aktivní část neurotoxinu do buňky. Toxin se váže v míše na presynaptická zakončení motorických nervů, kde blokuje uvolňování glycinu a kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné zodpovědné za neuromuskulární převod k inhibičním motorickým nervům (Obr. 3). Výsledkem je trvalá svalová kontrakce. Vazba toxinu na centrální nervovou soustavu je ireverzibilní [3, 9]. Tetanospasmin dále působí i na sympatický nervový systém. V důsledku toho se objevuje pocení, změny srdečního rytmu, hypertenze na začátku a hypotenze na konci onemocnění. To se projeví po inkubační době, v intervalu od 3 do 30 dnů, obvykle po 7-14 dnech typickými klinickými příznaky [5, 11].



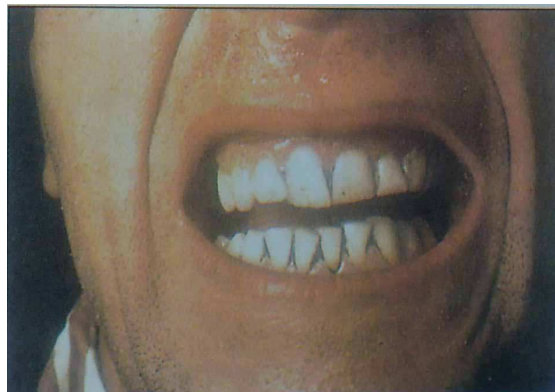
Obr. 4. Mechanismus působení tetanospasminu na nervovou buňku [29]

#### 4.2.4 Účinky tetanospasminu

Smrtelná dávka pro člověka je 2 ng/kg živé váhy ( $LD_{50}=2$  ng/kg). Kdyby byl 1 mg tetanotoxinu rozpuštěn v 1,5 mil. litrů vody, ještě 1 ml tohoto roztoku by způsobil uhynutí dvacetigramové myši. K účinku tetanospasminu jsou vnímaví teplokrevní živočichové, studenkrevní živočichové teprve po zvýšení tělesné teploty. Nejcitlivější jsou morče, myš a kůň. Vysoce vnímavý je i člověk na druhou stranu ptáci a kočky jsou rezistentní [2, 11].

Blokádou inhibice motorických neuronů dochází ke vzniku tonických křečí, často bolestivých, které se postupem času prodlužují a jejich frekvence vzrůstá. Postižení žvýkacích svalů vede ke křečím znemožňujícím otevření úst - *trismus* (Obr. 4). Dochází ke křečím mimických svalů - *risus sardonicus*, křečím hrtanu vedoucí k neprůchodnosti horních cest dýchacích. Křeče svalů trupu jsou zodpovědné za vznik typických příznaků jako je prknovitá ztuhlost břišních svalů a lukovité prohnutí těla - *opisthotonus* (Obr. 5), způsobené kontrakcí zádočných svalů. Následkem mohutných křečí může dojít k zástavě srdce [9, 11].

Asi polovina mocných umírá. Zhoršená prognóza je u dětí, starších osob, kardiaků a u osob, u kterých se onemocnění projeví dříve než je inkubační doba [23].



Obr. 5. *Trismus s nemožností otevřít ústa* [30].



Obr. 6. *Lukovité prohnutí těla - opisthotonus* [11].

#### 4.2.5 Tetanus

Tetanus je infekce charakterizovaná lokálními škubavými křečemi kosterního svalstva. Křeče postihují nejdříve obličejové svaly „sardonický úsměv“ a pak se šíří i na ostatní kosterní svaly, nejdříve z nich postihují svaly zádové [11].

U tetanu rozlišujeme 4 klinické formy: generalizovanou, lokalizovanou, cefalickou a tetanus neonatorum.

Generalizovaný tetanus je nejčastější. Onemocnění začíná symetrickou křečí žvýkacích a krčních svalů (*trismus*), zvýšenou dráždivostí, neklidem, pocením, poruchou polykání. Trismus může přejít do charakteristického sardonického úsměvu. Křeč zádového svalstva přechází do křečového vypnutí celého těla od hlavy až k nohám do oblouku se zapojením svalů šíje, břicha a nohou. Ruce jsou zaťaty v pěst.

Lokalizovaný tetanus - nejčastěji jde o ránu na končetině. K příznakům svalové ztuhlosti a křečím dochází jen na poraněné straně.

Cefalický tetanus - následuje po poranění hlavy nebo při zavlečení spor *Cl. tetani* do středního ucha. Jsou postiženy kraniální motorické nervy. Inkubační doba je pouze 1-2 dny.

Tetanus neonatorum - se vyskytuje v rozvojových zemích, kde nejsou dodržovány hygienické principy při ošetření pupečního pahýlu [5].

Prodělané onemocnění nezanechává imunitu, protože toxin je rychle vychytán nervovou tkání a k imunokompetentním buňkám se nedostane [11].

#### 4.2.6 Léčba

Specifická léčba tetanu se děje opakovaným podáváním antitoxického lidského hyperimunního globulinu (TEGA), který by měl být podán co nejdříve, aby se dosáhlo neutralizace toxinu před jeho vstupem do neuronu [5, 10]. K zástavě množení *Cl. tetani* v ráně se podávají penicilin a metronidazol. Antibiotika a antitoxin se podávají co nejdříve, nejlépe ještě před chirurgickým ošetřením. Další léčba spočívá v řádné chirurgické revizi a ošetření rány, v podpoře dýchání a v medikamentózním snížení dráždivosti [9]. Přesto je úmrtnost stále vysoká, zejména u dětí a starších lidí. Pro prokázání toxinu se provádí pokus na laboratorních myších [4, 10].

#### 4.2.7 Prevence

Účinnou prevencí tetanu v České Republice je povinné očkování. Děti jsou očkovány proti tetanu v rámci hexavakcíny třemi dávkami od započetí třináctého týdne po narození dítěte. Všechny tyto tři dávky jsou podány do jednoho roku dítěte. Čtvrtá dávka je podána nejméně šest měsíců po podání 3. dávky a nejpozději pře dovršením 18. měsíce věku dítěte.[31,32]. Následné přeočkování se provede pouze tetanickým toxoidem, což je tetanotoxin zbavený toxického účinku. Neurotoxin se nejčastěji převádí na toxoid formalinem [5]. Přeočkování se následně provádí mezi 14. až 15. rokem dítěte a následně po 10 až 15 letech další přeočkování [31, 32]. Důležité je každé podezřelé poranění řádně chirurgicky ošetřit a přeočkovat toxoidem [10].

#### 4.2.8 Výskyt tetanu

Onemocnění se vyskytuje všude na světě. Nejvyšší je v rozvojových zemích, kde ještě v současnosti se vyskytuje novorozenecký tetanus. Světová zdravotnická organizace odhaduje, že v těchto zemích dochází z tohoto důvodu k více než 500 000 úmrtím novorozenců ročně. V České republice byl sestupný trend výskytu novorozeneckého tetanu ukončen již v roce 1961 [33]. Úmrtí způsobené novorozeneckým tetanem se snížilo z 800 000 případů na celém světě z roku 1980 na 180 000 případů v roce 2002. Novorozenecký tetanus se dnes vyskytuje asi v 52 zemích [34].

Díky celostátním očkovacím akcím v roce 1974-5, 1984-5, 1994-2001 klesl výskyt tetanu v ČR na minimum (0-3 případy ročně), od roku 2002 do roku 2007 nebyl hlášen žádný případ onemocnění. Postiženy bývaly osoby nejvyšších věkových skupin s převahou žen. V řadě případů se jednalo o ženy, kde bránou vstupu byl bércový vřed. Většina z nich byla neočkovaných [33].

#### 4.2.9 Historie objevu tetanotoxinu

O tetanu se již zmiňoval Hippokrates. Toto onemocnění bylo již tehdy dáno do souvislosti s ranami. Byly hledány příčiny charakteristických příznaků tohoto onemocnění, tetanus byl dokonce dlouhou dobu považován za psychickou chorobu. Izolace čisté kultury původce tetanu pomocí anaerobní kultivace se poprvé podařila Japonci Kitsatovi v roce 1891, který rovněž zjistil, že tato bakterie produkuje toxin a že i naočkování kultivační tekutiny bez bakteriálních buněk vyvolává tuto infekci [2].



## ZÁVĚR

Toxiny, které produkují bakterie rodu *Clostridium* jsou dvojího typu - histotoxiny, neurotoxiny. Histotoxiny produkuje několik druhů klostridií a přestože mají podobný účinek, jsou to po chemické stránce různorodé látky. Histotoxiny způsobují myonekrózy a narušení střevní stěny doprovázené průjmami. Často dochází k znečištění otevřené rány a tyto nečistoty obsahují spory klostridií. Tato onemocnění patří mezi méně závažná.

Neurotoxiny produkují pouze *Clostridium botulinum*, jehož neurotoxin se nazývá botulotoxin a *Clostridium tetani*, jehož neurotoxin je tetanospasmin, který způsobuje onemocnění zvané tetanus. Botulotoxin je polypeptid složený ze dvou řetězců - lehkého a těžkého spojené disulfidickým můstkem. Těžký řetězec je odpovědný za vazbu na membránu neuronu a průnik lehkého řetězce do neuronu a lehký řetězec je vlastním nositelem toxicity. Nejčastější intoxikace botulotoxinem jsou způsobeny špatně tepelně ošetřenými domácími masnými výrobky, konzervami a polokonzervami. Do těla se dostávají přes gastrointestinální trakt a odtud do krve a lymfy až k zakončení motorických nervů, kde způsobí přerušování vedení signálu z neuronu na neuron. Botulismus se léčí vakcínami. Dnes se již botulizmu vyskytuje převážně požitím špatně sterilovaných domácích konzerv. Tetanospasmin je polypeptid složený ze dvou řetězců - lehkého a těžkého, které jsou navzájem spojeny disulfidickým můstkem. Těžký řetězec je odpovědný za vazbu na membránu neuronu a průnik lehkého řetězce do neuronu a lehký řetězec je vlastním nositelem toxicity. Nejčastější intoxikace je hlubší znečištěná rána, která hnisá nebo je v ní nějaký předmět. Toxiny z rány se vstřebávají do krve a lymfy a odtud jsou transportovány k neuronům míchy. Toxin se váže na presynaptická zakončení motorických nervů. Prevence vzniku tetanu je řádné očkování a v případě poranění, u kterého je podezření na možný rozvoj tetanu, je jedinec znovu naočkován. Výskyt tetanu je dnes již omezen a vyskytuje se převážně v zemích třetího světa.

Díky prevencím jako jsou očkování u tetanu, a nebo mikrobiální kontrola potravin v případě botulizmu, onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Clostridium* pozvolna stagnuje. Stále však platí, že to jsou jedny z nejnebezpečnějších toxinů, které by se daly zneužít jako bojová látka. Přestože jsou tyto toxiny pro vnímavé organizmy smrtelné, v menších dávkách se mohou využívat v lékařství nebo kosmetice.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] *Výskyt botulizmu v ČR* [online]. [cit. 2009-05-13]. Dostupný z www: <http://toaster.szu.cz/cem/aktu/archaktu/vyskyt.htm>
- [2] *Bakteriální supertoxiny* [online]. [cit. 2009-02-16]. Dostupný z www: <http://www.zuova.cz/informace/nrlpab10.php>.
- [3] *Toxiny mikrobiálního původu* [online]. [cit. 2009-02-16]. Dostupný z www: [http://toxicology.emtrading.cz/\\_soubory/dokumenty/toxiny.php.htm](http://toxicology.emtrading.cz/_soubory/dokumenty/toxiny.php.htm)
- [4] GREENWOOD, D.; SLACK, R.C.B.; PEUTHERER, J.F. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Jiří Schindler. Londýn : Churchill Livingstone, 1992. 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
- [5] HRDINA, V.; et al. *Přírodní jedy a toxiny*. Praha: Galén, 2004. 302 s. ISBN 80-7262-256-0.
- [6] PROKEŠ, J.; et al. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén, 2005. 248 s. ISBN 80-7262-301-X.
- [7] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [8] BEDNÁŘ, M.; et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1999. 558 s.
- [9] VOTAVA, M.; et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [10] KRAMÁŘ, R. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: [s.n.], 2007
- [11] *Clostridium tetani* [online]. [cit. 2009-02-16]. Dostupný z www: [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium\\_tetani.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_tetani.php).
- [12] *Clostridium botulinum* [online]. [cit. 2009-02-16]. Dostupný z www: [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium\\_botulinum.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_botulinum.php).
- [13] *Clostridium difficile* [online]. [cit. 2009-02-16]. Dostupný z www: [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium\\_difficile.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_difficile.php)

- [14] *Clostridium perfringens* [online]. [cit. 2009-02-16]. Dostupný z www:  
[http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium\\_perfringens.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_perfringens.php)
- [15] ZAHRADNICKÝ, J.; et al. *Mikrobiologie a epidemiologie I*. Martin: Osveta, 1991. 608 s. ISBN 80-217-0326-1.
- [16] *Výroba bioetanolu* [online]. [cit. 2009-03-16]. Dostupný z www:  
[http://etext.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul\\_key=85&idkapitola=11](http://etext.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul_key=85&idkapitola=11)
- [17] *Botulotoxin v léčbě dětí s DMO* [online]. [cit. 2009-03-16]. Dostupný z www:  
[http://www.mnof.cz/drs/s20030318/05botulotoxin\\_z\\_pohledu\\_fyzioterapeuta.doc](http://www.mnof.cz/drs/s20030318/05botulotoxin_z_pohledu_fyzioterapeuta.doc)
- [18] *Botulotoxin a jeho využití v dermatologii* [online]. [cit. 2009-05-13]. Dostupný z www:  
<http://www.solen.cz/artkey/med-200811-0011.php>
- [19] *Vědecký výbor pro potraviny* [online]. [cit. 2009-03-16]. Dostupný z www:  
[http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/stanoviska/stan\\_2003\\_2\\_deklas\\_fagy.pdf](http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/stanoviska/stan_2003_2_deklas_fagy.pdf)
- [20] *Toxiny Clostridium difficile* [online]. [cit. 2009-03-16]. Dostupný z www:  
<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab15.php>
- [21] ASTEN, A.J.A.M., et al. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*. 2009, 121 (1-2) s. 411-412.
- [22] URBINA, P.; et al. Phospholipase C and sphingomyelinase activities of the *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2009, 159 (1), s. 51-57.
- [23] HAVLÍK, J. *Infektologie : učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum, 1990. 377 s. ISBN 80-201-0062-8.
- [24] *Botulinické neurotoxiny* [online]. [cit. 2009-03-13]. Dostupný z www:  
<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab13.php>.
- [25] PATOČKA, J.; et al. *Nutriční toxikologie*. České Budějovice: [s.n.], 2008. 71 s. ISBN 978-80-7394-055-3.
- [26] MURRAY, P.R. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: ASM, 1995. 1482 s. ISBN 1-55581-086-1.

- [27] MOE, S.T.; et al. Botulinum neurotoxin serotype A inhibitors: Small-molecule. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009, 17 (8), s. 3072-3079.
- [28] *Struktura tetanospasminu* [online]. [cit. 2009-03-19]. Dostupný z www: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram\\_of\\_structure\\_of\\_tetanospasmin.gif](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_of_structure_of_tetanospasmin.gif)
- [29] *Mechanismus účinku tetanospasminu* [online]. [cit. 2009-03-19]. Dostupný z ww: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/Mechanism\\_of\\_action\\_of\\_tetanospasmin.gif](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/Mechanism_of_action_of_tetanospasmin.gif)
- [30] HAVLÍK, J.; et al. *Infekční nemoci*. Praha: Galén, 2002. 186 s. ISBN 80-7262-173-4.
- [31] *Vakcíny* [online]. [cit. 2009-03-19]. Dostupný z www: [http://www.vakciny.net/normy/norma\\_p8.htm](http://www.vakciny.net/normy/norma_p8.htm)
- [32] *Očkování* [online]. [cit. 2009-03-19]. Dostupný z www: <http://www.ockovacentrum.cz/?p=ockovani-pro-deti-pravidelne>
- [33] *Tetanus* [online]. [cit. 2009-03-18]. Dostupný z www: <http://www.szu.cz/tema/prevence/tetanus-aktualizovany-manual-iv>
- [34] *Tetanus ve světě* [online]. [cit. 2009-05-12]. Dostupný z www: [http://www.unicef.org/publications/files/5524\\_Unicef\\_6pg\\_final.pdf](http://www.unicef.org/publications/files/5524_Unicef_6pg_final.pdf)

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

WHO Světová zdravotnická organizace

BoNT Botulotoxin

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Působení toxinů <i>Cl. difficile</i> na stěnu střevní sliznice</i> .....	18
<i>Obr. 2. Schéma struktury a mechanismu aktivace botulinických neurotoxinů</i> .....	24
<i>Obr. 3. Stavba tetanospasminu</i> .....	27
<i>Obr. 4. Mechanismus působení tetanospasminu na nervovou buňku</i> .....	29
<i>Obr. 5. Trismus s nemožností otevřít ústa</i> .....	30
<i>Obr. 6. Lukovité prohnutí těla - opisthotonus</i> .....	30

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Rozdíly mezi exotoxiny a endotoxiny .....</i>	11
<i>Tab. 2. Rozdělení látek podle stupně toxicity.....</i>	12
<i>Tab. 3. Přehled neurotoxinů produkovaných bakteriemi rodu Clostridium.....</i>	21