

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Kazimir B. Matović

**UTVRĐIVANJE PRISUSTVA  
*CLOSTRIDIUM BOTULINUM* U  
UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH  
PČELA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

BELGRADE UNIVERSITY  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Kazimir B. Matović

**THE INVESTIGATION OF THE  
PRESENCE OF *CLOSTRIDIUM*  
*BOTULINUM* IN HONEY AND HONEY  
BEE SAMPLES**

Ph.D. thesis

Belgrade, 2013.

Mentor: Prof.dr Milan Baltić, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Dr Lazar Ranin, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr Neđeljko Karabasil, docent  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
3. Dr Dušan Mišić, docent  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
4. Dr Nebojša Nedić, docent  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane magistarske teze:

Beograd, 2013.

*Senima oca, predaka i majci koji mi udahnuše život  
i ostaviše da budem ono što jesam  
i ne budem ono što nisam.*

## Utvrđivanje prisustva *Clostridium botulinum* u uzorcima meda i medonosnih pčela

### Kratak sadržaj

U ovom radu vršeno je ispitivanje prisustva spora *Clostridium botulinum* u uzorcima različitih vrsta meda i medonosnih pčela. Ispitano je ukupno 59 uzoraka meda i 61 uzorak medonosnih pčela, poreklom iz različitih regona Republike Srbije.

Pored klasičnih mikrobioloških metoda u laboratorijskim ispitivanjima je posle postupka dilucije, predobogaćenja, centrifugovanja i membranske filtracije primenjena metoda multipleks PCR i PCR. Određivanje broja spora, u PCR pozitivnim uzorcima, rađeno je metodom najverovatnijeg mogućeg broja (MPN).

Prisustvo spora *Clostridium botulinum*, metodom multipleks PCR i PCR-a, utvrđeno je u 5 uzoraka (8,47%) meda i jednom (1,64%) uzorku medonosnih pčela. Broj spora u pozitivnim uzorcima meda bio je od 20/kg do 204/kg, a u uzorku medonosnih pčela 110/kg.

U jednom uzorku meda detektovane su spore B tipa *C. botulinum*, u jednom uzorku je detektovan E tip, u dva uzorka su detektovane spore istovremeno dva tipa *C. botulinum* (A, E) i u jednom uzorku istovremeno tri tipa *C. botulinum* (A, B, E). Spore *Clostridium botulinum* tipa E dokazane su u jednom uzorku medonosnih pčela. U istim uzorcima meda, odnosno medonosnih pčela, klasičnim kvalitativno-kvantitativnim metodama nije dokazano prisustvo spora *Clostridium botulinum*.

Detekcija spora *Clostridium botulinum* direktno iz neobrađenih uzoraka meda i medonosnih pčela, bez predobogaćenja, nije moguća primenom metoda PCR i klasičnih metoda mikrobiologije.

Klasične metode mikrobiologije, uključujući i metodu SRPS ISO 15213:2011, nisu podesne za detekciju spora *Clostridium botulinum* u uzorcima meda. Zbog niske osetljivosti navedene metode daju lažno negativne rezultate. U uzorku meda koji je služio kao pozitivna kontrola i koji je prethodno namerno kontaminiran referentnim sojem *Clostridium botulinum* NCTC 7272, PCR metodom može da se dokaže jedna spora/g meda.

U cilju detekcije spora *Clostridium botulinum* u uzorcima meda i medonosnih pčela primenom metode PCR, za svaki ispitujući uzorak moraju se izvoditi višestruka ponovljanja, ispitivanja jednog istog uzorka, zbog malog broja i/ili neravnomerne raspoređenosti spora u uzorcima.

Ključne reči: Med; Medonosna pčela; *Clostridium botulinum*; PCR

Naučna oblast: Veterinarska medicina  
Uža naučna oblast: Mikrobiologija namirnica  
UDK broj: 638:579

## The investigation of the presence of *Clostridium botulinum* in honey and honey bee samples

### Abstract

In this study, the presence of *Clostridium botulinum* spores in different types of honey and honey bees was examined. The sum of 59 honey and 61 honey bee samples was included in this investigation and samples originated from different regions of the Republic of Serbia.

In addition to classical microbiological methods, after the dilution, enrichment, spinning and membrane filtration, PCR and multiplex PCR methods were used. Determination the number of spores in the PCR positive samples, was done using the most likely possible number (MPN) methodology.

According to the results obtained by conventional microbiological methods and multiplex PCR, the presence of *Clostridium botulinum* spores, was detected in 5 honey samples (8.47%) and 1 (1.64%) honey bee sample. Number of spores in positive honey samples was from 20/kg to 204/kg, and in a sample of honey bees was 110/kg.

In one honey sample, spores of type B *C. botulinum* were detected, in one honey sample spores of type E, in two honey samples spores of types A and E, and in one sample spores of three types of *C. botulinum* (A, B, E) were detected. Type E *Clostridium botulinum* spores were detected in a sample of honey bees. In the same samples of honey or honey bees, using conventional qualitative and quantitative microbiological methods, spores of *Clostridium botulinum* were not detected.

The detection of *Clostridium botulinum* spores with PCR, multiplex PCR and conventional microbiological methods in honey and honey bee samples is not possible without preenrichment.

Conventional microbiological methods, including SRPS ISO 15213:2011, are not suitable for the detection of *Clostridium botulinum* spores in honey samples. Due to the low sensitivity of these methods, they can lead to false negative results. In the honey samples which served as a positive control and which were contaminated with *Clostridium botulinum* NCTC 7272 strain, the PCR method may prove a presence of one spore/g of honey.

In order to detect *Clostridium botulinum* spores in honey and honey bees samples using PCR method, due to the small and/or unequal distribution of spores in the samples, the test had to be repeated at least three times for each sample.

Key words: Honey; Honey bee; *Clostridium botulinum*; PCR

Scientific field: Veterinary medicine

Major: Microbiology of food

UDK number: 638:579

## SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	2
2.1.	ISTORIJAT	2
2.2.	KLASIFIKACIJA I METABOLIZAM <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	4
2.3.	BOTULINUSNI NEUROTOKSIN	5
2.4.	PREVALENCIJA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> I ZASTUPLJENOST BOTULIZMA	7
2.5.	PATOGENEZA I SIMPTOMI BOLESTI	7
2.6.	FORME BOLESTI	10
2.7.	DETEKCIJA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> I DIJAGNOSTIKA BOTULIZMA	19
2.7.1.	KLASIČNE METODE IZOLACIJE, IDENTIFIKACIJE I TIPIZACIJE <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	19
2.7.2.	IMUNOLOŠKE METODE	20
2.7.3.	METODE MOLEKULARNE DETEKCIJE I TIPIZACIJE <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> I BoNT-a	21
2.7.4.	ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> U UZORCIMA	24
2.7.5.	KLINIČKA DIJAGNOSTIKA BOTULIZMA	24
2.7.6.	BIOLOŠKI OGLAD NA MIŠEVIMA	25
2.8.	<i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> I PČELARSTVO	26
2.8.1.	MEDONOSNA PČELA I PROIZVODNJA MEDA	26
2.8.2.	MED I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE MEDA	27
2.8.3.	PUTEVI KONTAMINACIJE UZORAKA SPORAMA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> I PREVALENCIJA U UZORCIMA KOJI POTIČU IZ PČELARSKE PROIZVODNJE	30
3.	CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	36
4.	MATERIJAL I METODE RADA	37
4.1.	MATERIJAL	37
4.1.1.	REFERENTAN SOJ I SPECIFIČNI GENSKI FRAGMENTI <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	37
4.1.2.	UZORCI MEDA I MEDONOSNIH PČELA	37
4.1.3.	RASTVORI, REAGENSI, PUFERI, HRANLJIVE PODLOGE I DIJAGNOSTIKUMI KORIŠĆENI U ISPITIVANJIMA	42
4.2.	METODE RADA	47
4.2.1.	PRIPREMA UZORAKA MEDA ZA UTVRĐIVANJE PRISUSTVA SPORA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	47
4.2.2.	PRIPREMA UZORAKA MEDONOSNIH PČELA ZA UTVRĐIVANJE PRISUSTVA SPORA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	48

4.2.3.	AKTIVIRANJE REFERENTNOG SOJA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> NCTC 7272	49
4.2.4.	KONTAMINACIJA UZORKA MEDA REFERENTNIM SOJEM <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> NCTC 7272	49
4.2.5.	POTVRĐIVANJE REFERENTNOG SOJA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> NCTC 7272	53
4.2.6.	UTVRĐIVANJE PRISUSTVA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> U UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA PRIMENOM KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH METODA	53
4.2.7.	UTVRĐIVANJE PRISUSTVA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> U UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA, METODOM PCR	54
4.2.8.	UTVRĐIVANJE NAJVEROVATNIJEG MOGUĆEG BROJA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> U POZITIVNIM UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA (MPN METODA)	56
<b>5.</b>	<b>REZULTATI RADA</b>	<b>56</b>
5.1.	REZULTATI ISPITIVANJA UZORKA MEDA KONTAMINIRANOG REFERENTNIM SOJEM <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> NCTC 7272	56
5.2.	REZULTATI ISPITIVANJA PRISUSTVA SPORA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> U UZORCIMA MEDA	57
5.3.	REZULTATI KVANTITATIVNOG UTVRĐIVANJA UKUPNOG BROJA SPORA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> U UZORCIMA MEDA, METODOM MPN	62
5.4.	REZULTATI ISPITIVANJA MEDONOSNIH PČELA NA PRISUSTVO SPORA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	62
<b>6.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>SPISAK LITERATURE</b>	<b>67</b>



## 1. UVOD

U poslednjih pedeset godina potvrđeno je da je *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) jedna od najpatogenijih bakterija zbog svoje sposobnosti da proizvodi smrtonosni botulinusni neurotoksin (BoNT). Ovu toksičnost botulinusnog neurotoksina, vojna industrija je upotrebila za proizvodnju biološkog oružja. Mehanizam dejstva botulinusnog neurotoksina iskoristila je i farmaceutska industrija, odnosno medicina pa BoNT *C. botulinum* tipa A, upotrebljavaju kao lek u terapiji oftalmoloških, neuroloških i dermatoloških oboljenja, odnosno Botoks (Botox) se koristi u kozmetologiji (dovodi do privremenog zatezanja kože i nestanka bora) (143, 176, 187).

Spore bakterija *C. botulinum* su široko rasprostranjene u prirodi. Spore su prisutne kako u digestivnom traktu sisara i ptica tako i unutrašnjim organima riba. Takođe se, u zavisnosti od tradicije, načina i higijene obrade namirnica, mogu naći u mesu, kobasicama, ribi, povrću, medu. Imajući u vidu inhibitorna svojstva meda, mikroorganizmi koji se mogu naći u medu su kvasci i sporulirajuće bakterije. Pored spora kvasaca, spore bakterija roda *Bacillus* su gotovo redovan nalaz u medu, a spore klostridija, odnosno i spore *C. botulinum* se takođe mogu naći u medu.

Do danas je poznato nekoliko formi botulizma: alimentarni botulizam (trovanje hranom, neurointoksikacija), botulizam nastao inficiranjem rana, inhalacioni, infantilni, crevni i jatrogeni botulizam koji nastaje usled neželjenih reakcija kod aplikacije toksina u kozmetičke i dijagnostičke svrhe (14, 61, 190). Stopa smrtnosti od botulizma je dosta niska. Međutim botulizam može biti pogrešno dijagnostikovano i zamenjeno različitim diferencijalno dijagnostičkim stanjima kao što su sepsa, različiti neurološki poremećaji i sindrom iznenadne smrti novorođenčadi (sudden infant death syndrome), SIDS (88, 120).

U Republici Srbiji do danas nisu vršena studijska ispitivanja prisustva *C. botulinum* u medu. Zbog svih ovih činjenica neophodno je uvođenje savremenih molekularnih metoda u dijagnostici botulizma. Pored toga, navedenim ispitivanjima utvrdila bi se genetska raznovrsnost prisustva spora *C. botulinum*. Podaci o genetskoj raznovrsnosti izolata mogu se koristiti u otkrivanju puteva kontaminacije meda.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. ISTORIJAT

Nemački lekar i pesnik Kerner je u periodu 1817-1822. godine u Nemačkoj pokrajini Virtemberg, ne znajući uzročnika, opisivao botulizam kao bolest, izazvanu nedovoljno sušenim i kuvanim kobasicama. On je prvi opisao potpune i tačne simptome alimentarnog botulizma i izneo ideju o mogućoj terapijskoj upotrebi otrova (toksina) (93). Pošto je trovanje izazavano kobasicama, (na latinskom reč "botulus" znači kobasica), nemački lekar Miler je 1870. godine nazvao bolest botulizam (189). Krajem devetnaestog veka posle veće epidemije botulizma nastale putem kontaminirane šunke, u Belgiji, Emilie Pierre Marie van Ermengem je iz šunke i creva čoveka, koji je umro od botulizma, izolovao istu bakteriju i nazvao je *Bacillus botulinum* (192). Uzročnik je kasnije preimenovan u *Clostridium botulinum*, anaerobnu sporogenu bakteriju koja proizvodi najmoćniji biološki otrov, BoNT, koji dovodi do smrti usled paralize disajne muskulature. U dvadesetom veku otkriveno je još nekoliko formi botulizma: botulizam nastao infekcijom rana, inhalacioni, infantilni i crevni botulizam (164). Dvadesetih godina prošlog veka postavljena je sumnja mogućnosti nastanka botulizma kod inficiranih rana, a 1951. godine prvi put je opisan ovaj oblik botulizma (41, 51, 165). U Nemačkoj, 1962. godine, zabeleženo je trovanje tri veterinarska laboratorijska radnika raspršenim toksinom *C. botulinum*, tipa A čime je otvorena mogućnost nastanka botulizma inhalacionim putem (81). Infantilni botulizam je prvi put dijagnostikovao tokom 1976. godine, ali to je danas jedan od glavnih oblika botulizma u SAD (121, 146). S obzirom na moguću kolonizaciju digestivnog trakta sporama *C. botulinum*,

istina u ređim slučajevima (poremećaj mikrobioma), 1988. godine zabeležena je proizvodnja toksina u lumenu creva i pojava intestinalnog botulizma kod dece starije od godinu dana, odnosno odraslih osoba (116). Krajem dvadesetog i početkom dvadesetprvog veka otkriven je jatrogeni botulizma koji nastaje usled neželjenih reakcija kod aplikacije toksina u kozmetičke i dijagnostičke svrhe (14, 18, 60, 191).

Epidemije botulizma zabeležene su u Mičigenu 1977. godine, Njujorku i Izraelu 1987. godine, Italiji 1995. i 2004. godine, Aljasci od 1950-2000. godine, Nemačkoj, Francuskoj, Norveškoj, Španiji. Ovi slučajevi alimentarne toksoinfekcije vezani su za isranu ljutim sosom koji je u sebi sadržao usitnjenu papriku, sušenom ribom, plavim patlidžanom, maslinama, suvim šunkama (15, 30, 166, 172, 184).

Pojava velike smrtnosti kod svih formi botulizma i posebno mogućnost nastanka aerosolne toksoinfekcije doveli su do mogućnosti upotrebe *C. botulinum* kao biološkog agensa (169). U Japanu je 1930. godine priznato testiranje botulinusnog neurotoksina hranjenjem zatvorenika hranom u kojoj se nalazio BoNT (8). Proizvodnja ovog biološkog oružja pokušana je u Nemačkoj tokom Drugog svetskog rata, ali bezuspešno. Programi proizvodnje BoNT-a bili su pokrenuti u Kanadi, Velikoj Britaniji, bivšem SSSR-u i SAD (168). Godine 1992., Irak je u Ujedinjenim Nacijama priznao da je imao proizvedeno 19.000 litara koncentrovanog BoNT-a, a nešto od ovoga je bilo ubačeno u oružje (209). U Tokiju su od 1990-1995. godine od strane japanskih terorista, u najmanje tri navrata, izvedeni teroristički napadi sojevima kultura *C. botulinum* koje proizvode BoNT. Ovi pokušaji su bili bezuspešni (102).

U periodu od 1973-1990. godine počinje proizvodnja i primena prečišćenog BoNT-a, tipa A (Botox) prvo na životinjama, a zatim na ljudima u lečenju strabizma, blefarospazma i drugih dermatološko-neuroloških poremećaja (160). Krajem devetnaestog i početkom dvadesetog veka Američka agencija za hranu i lekove (FDA) dozvolila je upotrebu Botox-a u kozmetologiji.

## 2.2. KLASIFIKACIJA I METABOLIZAM *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

*Clostridium botulinum* je Gram-pozitivna, anaerobna štapićasta bakterija, širine 0.5-2.4  $\mu\text{m}$ , dužine 1.6-22.0  $\mu\text{m}$ , sporogena, sa ovalnim, subterminalno postavljenim sporama koje mogu u nepovoljnim uslovima opstati i ostati spremne za isključavanje preko 30 godina (29). Sojevi ove bakterije rastu pri pH od 4.6 do 7. Optimalna temperatura rasta *C. botulinum* iznosi od 18 do 40 °C, maksimalna se kreće od 45 do 50 °C, dok je slab rast zabeležen i na temperaturi od 3,3 °C. Sojevi *C. botulinum* spadaju u halofilne bakterije i mogu se razmnožavati u sredini sa 10% NaCl-a.

Karakteristika sojeva *C. botulinum* je proizvodnja botulinusnog neurotoksina (BoNT), u prirodi najpoznatijeg i najmoćnijeg biološkog toksina. U sredini gde je pH vrednost manja od 4.6, i pri aktivnosti vode ( $a_w$ ) manjoj od 0.94, *C. botulinum* neće proizvoditi toksine.

Na osnovu antigenskih karakteristika toksina, koje ova bakterija stvara u anaerobnim uslovima, razlikuje se osam tipova *C. botulinum* (A, B, C1, C2, D, E, F, G). Na osnovu genotipskih i fenotipskih karakteristika tipovi bakterije *C. botulinum* su svrstani u četiri grupe (I-IV). Grupu I čine proteolitički sojevi *C. botulinum*, tipova A, B i F čije su spore otporne na visoke temperature. Grupu II predstavljaju neproteolitički sojevi *C. botulinum* tipova B, E i F sa niskom otpornošću spora na visoke temperature. Grupi III pripadaju sojevi *C. botulinum* tipa C i D sa varijabilnom proteolitičkom aktivnošću i grupu IV čine sojevi tipa G koji imaju proteolitičku aktivnost, ali za razliku od svih ostalih tipova *C. botulinum* nemaju lipolitičku aktivnost. Pored navedenih karakteristika tipovi bakterija unutar grupa se razlikuju i po vrsti toksina koji luče, optimalnoj temperaturi rasta, stepenu otpornosti spora na visoke temperature i drugim fenotipsko-genotipskim karakteristikama (Tabela 1). Pored *C. botulinum* poznato je da i neki srodni sojevi klostridija, *Clostridium butyricum* i *Clostridium baratii*, proizvode BoNT tipa E odnosno F (144).

Tabela 1. Fenotipsko-genotipske karakteristike klostridija koje proizvode BoNT

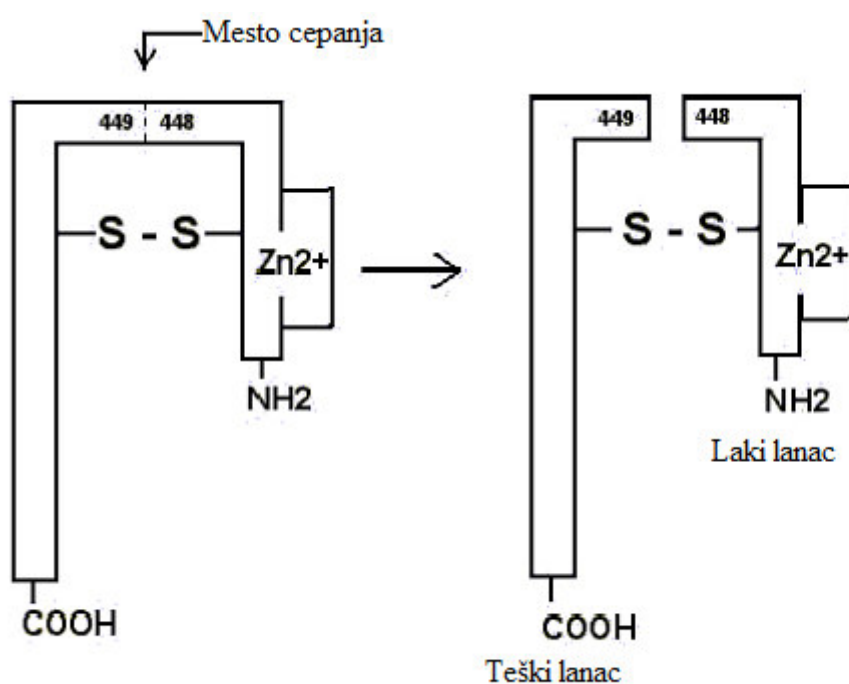
Osobine	Grupa					
	<i>Clostridium botulinum</i>				<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium baratii</i>
	I	II	III	IV		
Optimalna t (°C) rasta	35-40	18-30	37-40	25-45	30-45	30-37
Minimalna t (°C) rasta	12	3.3	15	/	10	/
Otpornost spora (°C)/ D vrednost (min)*	112/ 1.23	80/ 0.6-1.25	104/ 0.1-0.9	104/ 0.8-1.2	/	/
Tip toksina	A,B,F	B,E,F	C,D	G	E	F
Proteolitička aktivnost	+	—	— (+)	+	—	—
Lipolitička aktivnost	+	+	+	—	—	—
Saharolitička aktivnost	—	+	—	+	+	+
Min. a <sub>w</sub>	0.93	0.93	/	/	/	/
Minimum pH	4.6	5.0	5.1	/	/	/
Maksimum pH	9	9	/	/	/	/
Maksimalni slanitet	10	4.5-6.0	/	/	/	/

\* D-decimalno redukciono vreme (vreme potrebno da se smanji broj bakterija za jedan log ciklus)

### 2.3. BOTULINUSNI NEUROTOKSIN

Botulinusni toksin je najmoćniji, u prirodi poznati biološki otrov. Bakterija *C. botulinum* proizvodi osam tipova neurotoksina: (A, B, C1, C2, D, E, F, G). Svi botulinusni neurotoksini su sintetisani kao pojedinačni polipeptidni lanci, molekulske mase oko 150 kDa i sadrže tri proteinska dela (40, 141, 207). Sastoje se od teškog (heavy-H) i lakog (light-L) lanca koji su povezani disulfidnom vezom (Slika 1) (143). Treću komponentu čine netoksična ne-hemaglutinaciona i tri netoksične hemaglutinacione komponente (HA1, HA2 i HA3) različitog aminokiselinskog sastava i molekulske mase u zavisnosti od tipa *C. botulinum* (75). Njihova proizvodnja se odvija u bakterijskom citosolu kao neaktivan polipeptid koji se oslobađa nakon lize ćelije (195). Oslobodjeni molekuli (neaktivni polipeptidi) u hrani se sastoje od nervnog toksina u pratnji netoksične komponente koja je različitih molekulskih masa, a čiji je zadatak da

zaštiti neurotoksin od kiselosti i enzima koji se mogu naći u hrani i digestivnom traktu (141). Neaktivni polipeptidi se aktiviraju delovanjem enzima proteinaza na teški lanac, molekulske mase 100 i laki, molekulske mase 50 kDa. Bakterije proteolitičkih tipova *C. botulinum* proizvode sami proteinaze koje aktiviraju toksin, dok se aktivacija toksina kod neproteolitičkih tipova *C. botulinum* odvija pod dejstvom proteolitičkih enzima u digestivnom traktu (tripsin) zbog čega su oni slabiji od toksina proteolitičkih tipova (125, 173). BoNT predstavlja metaloendoproteinazu koji sadrži atom cinka (Zn) vezan za laki lanac koji poseduje proteinaznu aktivnost (141, 158).



Slika 1. Botulinusni neurotoksin pre i posle dejstva enzima, preuzeto, referenca (143)

## **2.4. PREVALENCIJA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* I ZASTUPLJENOST BOTULIZMA**

Spore bakterija *C. botulinum* rasprostranjene su u prirodi i mogu se naći u kultivisanom i šumskom zemljištu, na biljkama, u prašini, vodi, blatu što je potvrđeno i u dosadašnjim istraživanjima (19, 138, 139). Spore su prisutne kako u digestivnom traktu sisara i ptica tako i unutrašnjim organima riba (80, 98, 131, 152).

Kao posledica visoke prevalencije u životnoj sredini, spore ove bakterije mogu kontaminirati sirovu hranu, a posebno ribu. U zavisnosti od tradicije, načina i higijene obrade namirnica, botulinusni toksin može naći u konzervisanom kukuruzu, paprici, boraniji, pečurkama, plavom patlidžanu, zelenim maslinama, spanaću, siru, tunjevini, piletini, pilećoj jetri, jetrenoj pašteti, mesu, šunkama, kobasicama, dimljenoj i usoljenoj ribi, medu (30, 52, 104, 135, 161, 162, 194, 196).

Neproteolitički sojevi *C. botulinum* tipova B i E su dominantno zastupljeni u Evropi, severu SAD, Aljasci, Japanu (123). Prevalencija *C. botulinum* tipa E je nešto veća u Nordijskim nego u centralnim evropskim zemljama gde preovladava *C. botulinum* tipa B (123). Na severnoameričkom kontinentu je prijavljen manji broj slučajeva botulizma, ali sa nepovoljnijom prognozom za razliku od Evrope gde je veći broj prijavljenih slučajeva, ali sa povoljnim ishodom. Ovo se može dovesti u vezu sa većom prevalencijom proteolitičkih sojeva *C. botulinum* tipa A i B (188).

## **2.5. PATOGENEZA I SIMPTOMI BOLESTI**

Botulizam ljudi najčešće izazivaju *C. botulinum* grupe I i II (tipovi A, B, E i F) dok su kod životinja uzročnici botulizma uglavnom klostridije iz grupe III (tip C i D) (20, 63).

Vrste neurotoksina i njihova patogenost za pojedine vrste sisara i ptica prikazani su u tabeli 2 (33).

Tabela 2. Tipovi botulinusnog toksina i njihova patogenost za sisare i ptice, preuzeto, referenca (33)

Sisari/ptice	Tip neurotoksina						
	A	B	C1 & C2	D	E	F	G
Čovek	√	√			√	√	
Konj		√	√				
Goveče		√	√	√			
Ovca			√				
Psi			√	√			
Živina			√		√		
Lasice	√		√		√		

Botulinusni neurotoksin je najpoznatija otrovna supstanca na svetu. Srednja letalna doza za miševе iznosi oko 0.5-1 ng/kg dok je za čoveka oko 1 ng/kg (67).

Samo 1 g kristalnog toksina potencijalno može da ubije milion ljudi (8, 27, 82). Procenjena letalna doza za čoveka telesne mase 70 kg, prečišćenog neurotoksina tipa A iznosi, 0.09-0.15 µg aplikovana intravenski ili intramuskularno, 0.70-0.90 µg inhalaciono, odnosno 70 µg aplikovano per os (8).

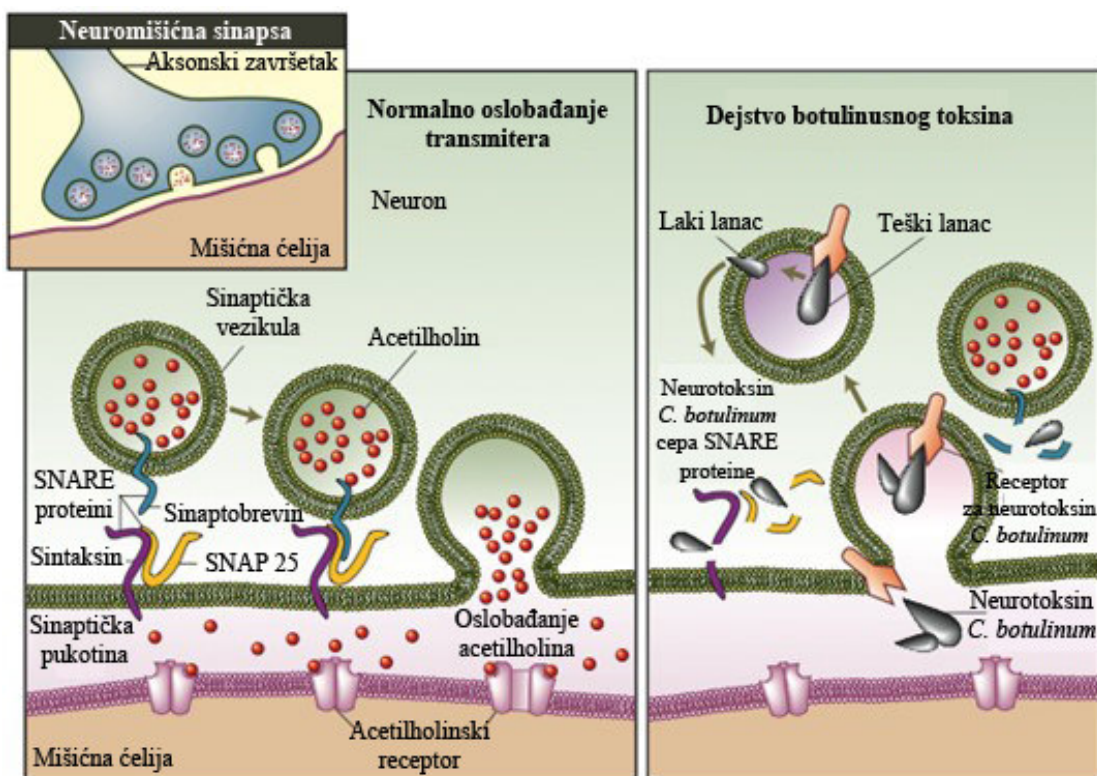
Kod ljudi nije dokazano prisustvo alimentarnih intoksikacija neurotoksinom tipa D, *C. botulinum*. Nije potvrđena ni klinička slika botulizma kod ljudi i životinja koju izazva neurotoksin *C. botulinum* tipa G.

Mogućnost pojedinih tipova *C. botulinum* da izazovu bolest zavisi od sposobnosti njihovih neurotoksina da prođu epitelne ćelije creva pri čemu su toksini tipova A i B efikasniji nego tipa C (165). Patogeneza kod *C. botulinum* intoksikacija je slična bez obzira na način i puteve izlaganja organizma neurotoksinima. Pro toksin (kompletan neurotoksin) se sastoji od nervnog toksina i netoksične komponente koja je različitih molekulskih masa, a čiji je zadatak da zaštiti neurotoksin od kiselosti i enzima koji se mogu naći u hrani i digestivnom traktu. Pro toksin uzet hranom prolazi kroz želudac i resorbuje se u prednjim partijama tankog creva. Opstanak neurotoksina u želudcu zavisi od netoksične komponente koja je veoma otporna na pepsin i nizak pH želudačnog soka. Netoksična komponenta pro toksina može imati ulogu u apsorpciji toksina iz tankog creva. Po apsorpciji, u limfnim sudovima dolazi do odvajanja



netoksične komponente od neurotoksina. Oslobođeni neurotoksin putem limfnih i krvnih sudova dolazi do ciljnih ćelija.

U neuromišićnoj sinapsi prvo dolazi do vezivanja neurotoksina preko teškog lanca za receptore na presinaptičkoj membrani nervnih završetaka, holinergičnih, motornih neurona (35, 145). Zatim dolazi do endocitoze (unošenja) neurotoksina u ćeliju neurona nakon čega laki lanac izaziva neurotoksične efekte unutar ćelije. Laki lanci poseduju aktivnost cink-zavisne endopeptidaze, cepaju proteinske komponente rastvorljivih SNARE proteina (Synaptobrevin, SNAP-25, Syntaxin i dr.) čime sprečavaju da se sekretorne vezikule sa neurotransmitterom, acetilholinom, vežu za presinaptičku membranu i oslobode neurotransmitter u sinaptičku pukotinu (65, 155). Usled nedostatka acetilholina koji će se vezati na postsinaptičke receptore na mišićnoj ćeliji nastaje prekid u prenošenju impulsa, odnosno dolazi do paralize mišića (Slika 2) (128).



Slika 2. Mehanizam dejstva BoNT (desno) u odnosu na normalne ćelije (levo), preuzeto, referenca (155)

S obzirom da BoNT ne prolazi kroz moždano-krvnu barijeru simptomi nastaju usled promena na holinergičnim nervnim završetcima.

Prvi i najčešći znaci bolesti su umor i mišićna slabost. Zatim dolazi do poremećaja govora, vida, gutanja (dysarthria, diplopia, dysphagia) i suvoće jezika. Navedeni simptomi se pojavljuju simetrično, a poremećaj vida koji je praćen zamagljenim i dvostrukim vidom, ptozom očnih kapaka klinički se uglavnom prvo primeti (96). Kod alimentarnih formi botulizma navedenoj simptomatologiji mogu prethoditi gastrointestinalni poremećaji kao što su povraćanje, mučnina, zatvor. Kod nelečenih pacijenata smrt nastupa kao posledica opstrukcije disajnih puteva (paralize mišića ždrela, međurebarnih i mišića dijafragme) (35, 171).

Faza oporavka od botulizma počinje formiranjem mreže novih nervnih izdanaka koji dovode do obnavljanja mišićnih kontrakcija. Kod potpunog oporavka kada je uspostavljena funkcionalna sposobnost već postojećih nervnih završetaka, novonastali nervni izdanci regresiraju (44).

S obzirom na visoku potentnost BoNT-a, količina toksina koja je neophdna da izazove bolest je manja od potrebne količine toksina da izazove imunološki odgovor, pa po preležanoj bolesti praktično nema imuniteta, odnosno pacijent može ponovo oboleti od botulizma (16).

## 2.6. FORME BOLESTI

Do danas je potvrđeno nekoliko kliničkih formi botulizma (35).

Klasičan oblik botulizma, alimentarni botulizam, nastaje unošenjem hrane koja sadrži toksin *C. botulinum* (32, 33). S obzirom da su prvi slučajevi bolesti povezani sa trovanjem hranom iz mesa (kobasica), i bolest dobijaju ime botulizam (*botulism*) (56). Alimentarni botulizam je najstariji i najčešći oblik botulizma (10, 21, 66, 100, 185, 193). Pojava toksina u hrani vezana je za kontaminaciju hrane sporama *C. botulinum* koje su dosta otporne na toplotu, a sposobne su za isključavanje i proizvodnju toksina u neadekvatno prerađenim namirnicama, posebno u okviru domaće radinosti. Otuda su izvori botulizma sve namirnice koje su neadekvatno pripremane i konzervisane najčešće

u domaćinstvima, odnosno one koje tokom proizvodnje nisu podvrgnute postupcima koji inaktiviraju spore *C. botulinum* ili sprečavaju stvaranje toksina iz vegetativnih oblika ove bakterije (suve šunke, krvavice, kobasice, suvo svinjsko meso, jetrena pašteta, sušena riba, konzerve mesa, ribe i povrća) (194).

Neproteolitički sojevi *C. botulinum* grupe II predstavljaju opasnost u namirnicama koje se industrijski obrađuju na nižim temperaturnim režimima. Sve manja upotreba soli i aditiva u industrijskoj proizvodnji, a favorizovanje hermetičkog zatvaranja proizvoda i njegovo čuvanje na temperaturi frižidera, koja je često iznad minimalne temperature rasta spora *C. botulinum*, pogoduje rastu spora *C. botulinum* (104, 107). Ograničeni faktori razmnožavanja *C. botulinum* i proizvodnje toksina su temperatura, pH,  $a_w$  vrednost, redoks potencijal, konzervansi i kompetitivna bakterijska mikroflora (94). Alimentarnu formu botulizma može da izazove samo 30 ng neurotoksina, odnosno 0,1 g namirnice koja sadrži ove toksine (144). Posle unošenja neurotoksina, prvi simptomi bolesti se mogu razviti za nekoliko sati, ali najčešće se pojavljuju od 12-72 časa (8). Oni najčešće počinju kao gastrointestinalni, posebno kod tipa E i uključuju mučninu, povraćanje, grčeve u stomaku ili proliv. Zatvor se obično pojavljuje posle pojave neuroloških simptoma. Promene kranijalnih nerva nastaju simetrično i šire se descedentno na gornje ekstremitete, respiratorni mišići i na kraju na donje ekstremitete. Komplikacije najčešće nastaju usled respiratorne insuficijencije koja može povećati rizik i dovesti do nastanka drugih zdravstvenih poremećaja pa i smrti.

Za razliku od alimentarnog botulizma, infantilni botulizam se javlja isključivo kod dece ispod jedne godine starosti. Prvi slučaj bolesti opisan je krajem 1976., kao poseban klinički entitet, zarazna bolest, izazvana apsorpcijom botulinusnog toksina proizvedenog u lumenu creva bebe mađe od jedne godine (121, 146). Uzrast je jedini poznati predisponirajući faktor kada je u pitanju infantilni botulizam. Najveći broj prijavljenih slučajeva botulizma bio je kod pacijenata mlađih od šest meseci, odnosno mlađih od godinu dana (114, 157). Kod navedene populacije zbog nezrelosti crevne mikroflore, spore *C. botulinum* u crevnom kanalu mogu klijeti, razmnožavati se i proizvoditi toksin *in vivo* (4, 5, 59). Ljudi dobrog zdravstvenog stanja, kao i deca starija od godinu dana, mogu uneti spore *C. botulinum* putem kontaminirane hrane, ali se kod njih ne razvija bolest. Razlog tome je što je njihova crevna mikroflora kvantitativno i

kvalitativno drugačijeg sastava, složenija je od flore dece mlađe od godinu dana, i kao takva sprečava kolonizaciju neurotoksin produkujućih klostridija i razvoj botulizma. Specifičan način ishrane (ishrana mlekom i tečnom kašastom hranom) kod odjčadi prouzrokuje takav sastav mikroflore koji ne sprečava isključavanje spora *C. botulinum* njeno naseljavanje i razmnožavanje u digestivnom traktu. Spore preživljavaju kiseli pH u želucu i dospevaju do nedovoljno razvijenog intestinalnog tkiva domaćina koje omogućava sporama da isključaju. Bakterije se naseljavaju u crevima, umnožavaju i stvaraju toksin koji se oslobađa u lumen creva. Toksin se resorbuje u crevima i putem krvotoka dospeva do završetaka perifernih nerava, gde se vezuje za specifične "target" proteine (receptore) sprečavajući oslobađenje neurotransmitera acetilholina. Na osnovu težine bolesti, dečiji botulizam se može podeliti u tri forme i to: (A) blaga, ambulatna forma bolesti "nemogućnost napredovanja", (B) paraliza, kada je neophodna hospitalizacija i (C) iznenadna, neočekivana smrt odojčeta (5).

Klinička slika karakteriše se pojavom opštih simptoma, slabost, opstipacija, uporno plakanje, gubitak apetita. U kasnijim stadijumima bolesti javlja se hipotonija mišića, sa posledičnom komom i paralizom respiratornog sistema. Ukoliko se ne pruži medicinska pomoć dolazi do smrti. Bolest može trajati nekoliko sati, kada dolazi do iznenadne smrti, ili nekoliko nedelja. Usled pojave većeg broja nespecifičnih simptoma kao što su zatvor, slabo napredovanje ili čak iznenadna smrt novorođenčeta, slučajevi infantilnog botulizma često budu zanemareni. Nedostatak primene lakih i brzih testova u dijagnostici dečjeg botulizma takođe dovode do velikog broja nerasvetljenih slučajeva bolesti. Zbog svega ovoga predloženo je da infanilni botulizam bude jedan od uzroka sindroma iznenadne smrti novorođenčadi (SIDS), a na osnovu istraženih 280 slučajeva smrti umrle dece 1978. godine. U navedenim ispitivanjima od 211 slučajeva tretiranih kao SIDS u 4,3% uzoraka otkriveno je prisustvo *C. botulinum* (7).

Spominje se takođe da na razvoj botulizma kod odojčadi, pored specifičnog sastava mikroflore, može uticati i nedovoljno razvijen imunski sistem kao i smanjena pokretljivost creva koja povećava rizik dužeg zadržavanja spora, a samim tim povećava mogućnost kolonizacije klostridija u intestinalnom traktu dece mlađe od godinu dana. Iako okolina (prljavština, prašina) kao i drugi napitci, odnosno dodaci hrani za bebe imaju značajnu ulogu kada je u pitanju izvor za pojavu botulizma kod dece, med je jedan od najčešćih izvora klostridija koji je do sada često povezivan sa pojavom

infantilnog botulizma (6, 12, 39, 76, 99, 157). Zabeležena je pojava botulizma kod odojčadi u Velikoj Britaniji koja su konzumirala mleko u prahu kontaminirano sporama klostridija. Postoje nekoliko načina na koji deca mlađa od godinu dana mogu doći u kontakt sa sporama klostridija poreklom iz meda. Prvi način je kada majke neposredno pre dojenja nanose med na bradavice. Drugi način na koji ova kritična grupa može doći u kontakt sa sporama je kada roditelji namažu usne ili cuclu (varalicu) odojčadima kontaminiranim medom. Treći način je kada se u ishrani beba koristi kontaminirani med kao dodatak hrani. U celom svetu je do sada ukupno prijavljeno preko 1000 slučajeva infantilnog botulizma. Botulizam kod dece nije zabeležen u Africi, a u preko 90% slučajeva javljao se u Americi. U Evropi je prvi slučaj infantilnog botulizma zabeležen 1978. godine. Od tada je prijavljeno preko 50 slučajeva pojave botulizma kod beba, a od tog broja većina pacijenata je u svojoj ishrani koristila med (12). Sve inficirane bebe bile su mlađe od godinu dana, a od tog broja čak 93% odojčadi je bilo mlađe od šest meseci. Najveći broj slučajeva infantilnog botulizma izazvan je sa *C. botulinum* tipovima B i A. *Clostridium butyricum* i *Clostridium baratii* koji proizvode botulinusne toksine tipa E odnosno F, takođe su prijavljeni kao uzročnici infantilnog botulizma. U Italiji je zabeležen jedan slučaj botulizma kod deteta koji je bio izazvan sa *Clostridium butyricum* tipa E, a slučajevi botulizma izazvani sa *Clostridium baratii* tipa F prijavljeni su u Mađarskoj i Novom Meksiku. U državama Skandinavije je od 1995. do 1999. godine zabeleženo pet slučajeva infantilnog botulizma, a dokazano je da su sva obolela deca neposredno pre infekcije konzumirala med (135). Na osnovu podataka koje je 1998. objavio američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) u SAD se na svakih 100.000 novorođenčadi infantilni botulizam javlja kod dvoje (32).

Botulizam nastao preko inficiranih rana prvi put je opisan 1951. godine, mada se o mogućnosti nastanka botuliza kao posledica zaražavanja rana raspravljalo još dvadesetih godina prošlog veka (41, 51, 174). Može se definisati kao klinički dokaz botulizma nakon lezija, a u slučaju zaražavanja rana *C. botulinum*. Nastaje kao posledica proizvodnje BoNT, *in vivo*, a nakon kolonizacije povređenog tkiva sporama *C. botulinum*. Dovoljno je 10 spora *C. botulinum* tipa A da izazove botulizam rana kod miševa (46). Ovaj oblik botulizma se najčešće dovodi u vezu sa ranama od fizičkih povreda, operacija, korišćenja droge putem injekcija ili zapaljenja nazalnih puteva usled

ušmrkavanja kokaina (32). *C. botulinum* tip A je najčešći izazivač botulizma preko inficiranih rana (197, 200). Poslednjih nekoliko godina, broj slučajeva botulizma rana se drastično povećao zbog sve većeg broja uličnih narkomana koji sve više koriste crni, katran heroin (BTH) intramuskularno ili subkutano, ne intravenski (22, 23, 200). BTH se najčešće rastvara u rastvaraču kao što su voda, sok od limuna ili neka druga slaba kiselina, zagreva u kašičici da se otopi, a zatim filtrira kroz pamučnu krpu ili filter cigarete i uvlači u špric (42). Kod intravenskih aplikacija narkotika aerobno okruženje ne dozvoljava razvoj spora i proizvodnju BoNT (42). Injekcije sa kiselinama dovode do razmekšavanja i nekroze tkiva, smanjuju sadržaj kiseonika u mišićima, a grejanje može izazvati aktiviranje spora koje se mogu nalaziti u heroinu (1, 9, 22, 42, 200). Izuzev gastrointestinalnih simptoma, kliničke manifestacije su slične onima kod alimentarnog botulizma. Međutim, period inkubacije je mnogo duži jer je vreme potrebno za aktiviranje spora, rast *C. botulinum* i oslobađanje toksina od 4 do 14 dana.

Botulizam može nastati i udisanjem čestica botulinusnog neurotoksina raspršenih u aerosolu (81). Postoji zabrinutost zbog mogućnosti nastanka inhalacionog botulizma, koji se za sada ne pojavljuje, ali može nastati aerosolizacijom navedenog neurotoksina. S obzirom na potentnost neurotoksina, u poslednjih nekoliko godina pridaje se veliki značaj uzročniku botulizma koji je kao potencijalno biološko oružje svrstan u kategoriju A bioloških agenasa (117, 118, 209).

Botulizam nastao preko creva obično se javlja kod odraslih pacijenata koji imaju abnormalnosti u crevnom traktu koji omogućava kolonizaciju i isključivanje spora *C. botulinum* (95). Dejstvo antimikrobnih supstanci kao i izloženost hirurškim intervencijama abdominalnih partija mogu dovesti do izmenjene gastrointestinalne flore koja je predisponirajući faktor za kolonizaciju navedenih prostora uzročnikom botulizma. Kliničke karakteristike crevnog botulizma su slične onima kod alimentarnih formi osim početne gastrointestinalne simptomatologije. Inkubacioni period kod ove forme bolesti može trajati od nekoliko dana pa do nekoliko meseci.

Iako retko jatrogeni botulizam se javlja sa simptomima kao kod alimentarne forme bolesti, a nastaje usled neželjenih reakcija kod intramuskularnih aplikacija

toksina, tipa A u kozmetičke i dijagnostičke svrhe (mogućnost prolaska toksina u krv) (18, 36, 190).

Jedina specifična terapija za botulizam je botulinusni antiserum (antidot-antitoksin). Trovalentni hiperimuni serum sadrži antitela na tipove A, B i E, a dobija se imunizacijom konja. Kod dece se ne primenjuje (heterologi serum) jer može dovesti do ozbiljnijih alergija i anafilaktičkih reakcija. Serum može neutralisati slobodne molekule neurotoksina u serumu i sprečiti njihovo vezivanje za nervne završetke. Dokazano je da se kod nege u okviru hospitalizacije, koja često uključuje i veštačku ventilaciju stanje poboljšava u odnosu na standardnu negu i skraćuje se broj dana neophodnih za oporavak. Nedavno je u Americi (2010. godine) trovalentni botulinusni antitoksin zamenjen sedmovalentnim (A-E).

Kod botulizma nastalog inficiranjem rana uključena je temeljna hirurška obrada rane, gde će se otkloniti spore, sprečiti njihovo klijanje i lučenje toksina, uz upotrebu antibiotika.

Kod infantilnog botulizma od velikog je značaja intenzivna nega pacijenata, a posebna pažnja se obraća na ishranu i respiratorne funkcije pacijenata. Od 2003. godine u SAD-u se u terapiji infantilnog botulizma koristi humani petovalentni (A-E) imunoglobulina, "BabyBIG-IV" (111, 186).

Ključ za kontrolu i sprečavanje botulizma je adekvatna obrada i skladištenje namirnica čime se uništavaju spore i sprečava njihovo klijanje odnosno proizvodnja toksina. Kod obrade i konzervisanja namirnica uvek treba imati u vidu elemente koji inhibiraju rast, umnožavanje i produkcija toksina *C. botulinum*, a to su pH ispod 4.6, temperature iznad 121 °C ili ispod 3.3 °C,  $a_w$  ispod 0.93. Do sprečavanje rasta vegetativnih oblika bakterija dovode veće količine soli, a nitriti mogu inhibirati isključavanje spora. Namirnice pakovane u vakuum pakovanjima mogu podstaći rast anaerobnih mikroorganizama, ali postoji mogućnost da je proizvodnja BoNT-a nastala i pre kvara namirnice, kada je kvar već uočljiv organoleptički. Spore *C. botulinum* ne mogu se uništiti kuvanjem ali se mogu uništiti na temperaturi od 121 °C, pod pritiskom za 2.5 minuta (69, 123). Već formirani botulinusni toksin je za razliku od spora dosta

termolabilan i može se inaktivirati kuvanjem, odnosno zagrevanjem na 80 °C za 30 minuta ili na 100 °C za 10 minuta (31, 69, 163, 186).

Sposobnost botulinusnog toksina da blokira oslobađanje acetilholina u nervnim završecima i tako onemogućava neuromišićnu transmisiju iskoristila je medicina u terapijske i kozmetičke svrhe. Kod botulizma dolazi do generalizovane paralize mišića, ali kada se ovaj neurotoksin aplikuje lokalno on može izazvati učinak samo na mestu delovanja (86, 176). Ovu mogućnost je u terapijske svrhe prvi iskoristio Alan Scott, koji je počeo da ga upotrebljava u eksperimentima na majmunima, a kasnije u korekciji strabizma kod ljudi (160). Od tog vremena botulinusni toksin se koristi u lečenju mnogih neuroloških, oftalmoloških i dermatoloških bolesti. Tako je našao svoje mesto u terapiji spastičnosti, različitih formi distonije, hemifacijalnog spazma i hiperhidroze. Krajem devetnaestog i početkom dvadesetog veka Američka agencija za hranu i lekove dozvolila je upotrebu Botox-a u kozmetologiji. Tako je prečišćeni botulinusni toksin tipa A (Botox) postao i jedan od "alata" koji se koristi u kozmetologiji ("zatezanje" linija bora, linija mrštenja kože lica predela čela, korena nosa, asimetrije i spuštanja obrva i dr.) (24, 87). Godine 1993., Bushara i Park su utvrdili da primena injekcija botulinusnog toksina, tipa A, može sprečiti znojenje (26). Iako se *C. botulinum* i njegovi toksini proučavaju preko sto godina, istraživanja se nastavljaju i danas da bi se došlo do što boljeg razumevanja mehanizama njegovog dejstva, a sve u cilju pronalaženja novih aplikativnih učinaka u medicini.

Od botulizma mogu oboleti i životinjske vrste među kojima su najčešće goveda, ovce, konji, lasice, divlje ptice i živina. Psi i svinje su dosta otporniji na bolest, u odnosu na prethodno navedene vrste, dok kod mačaka nema dokumentovanih podataka o ovoj bolesti (167).

Kod goveda i ovaca, bolest je obično posledica unošenja neurotoksina preko kontaminirane hrane za životinje, a može nastati u prvih sedam dana po rođenju (jedinke u perinatalnom periodu) kao i kod grla u puerperijumu (20, 98, 107, 152). Najčešći izvori trovanja su nepravilno uskladištena i čuvana silaža odnosno sporedni proizvodi pivarske industrije. Kod nedostatka minerala i pojave alotriofagije životinje mogu lizati i uzimati zemlju i tako se inficirati. Uzročnik bolesti se može naći i u baliranom, odnosno peletiranom senu. Kod goveda su najčešće zastupljena trovanja



neurotoksinima *C. botulinum* tipova B, C i D dok u većini slučajeva kod ovaca bolest izazivaju toksini *C. botulinum* tipa C. Inkubacioni period je od 24 časa do 7 dana.

Simptomi uglavnom počinju lošom probavom gde se smenjuju zatvor i proliv. Prisutni su znaci kranijalne nervne disfunkcije, kao što su disfagija, pareza jezika i mišića lica. Dolazi do smanjenja pupillarnog refleksa, ptoze očnih kapaka i midrijaze. Nakon toga dolazi do nezaraznog akutnog laminitisa što dovodi do ataksije, apatije, nemogućnosti ustajanja (paralize), otoka vimena i nogu, otežanog disanja i smrti.

Konji, a posebno ždrebad, su veoma osetljivi na botulinusni toksin. Najčešći uzročnici bolesti su *C. botulinum* tipova B i C (74, 154). Period inkubacije je od 24 sata do 7 dana. Najčešći izvori botulizma su kontaminirana hrana ili infekcije od strane bakterija koje se mogu naći u otvorenim ranama. Od kliničkih znakova javlja se dispneja, opušten rep, drhtanje mišića, opušten jezik zbog čega životinja balavi. Kod ždrebadi se botulizam javlja najčešće u periodu od 2 nedelje do 8 meseci starosti i povezan je uglavnom sa ishranom. Unešene spore preko kontaminirane hrane isključavaju, uzročnik se umnožava u gastrointestinalnom traktu gde dolazi do otpuštanja neurotoksina. Kod ždrebadi je najčešći uzročnik botulizma BoNT tip B. Kod bolesti dolazi do pojave pareza, podrhtavanja mišića, disfagije, ptoze očnih kapaka, midrijaze, oslabljenog pupillarnog refleksa. Kasnije dolazi do ileusa, zatvora, retencije mokraće, a smrt nastupa usled paralize respiratorne muskulature.

Botulinusna infekcija ptičjih vrsta najčešće se zove bolest "opuštenih vratova" (33).



Slika 3. Bolest "opuštenih vratova", preuzeto, referenca (33)

Najčešći tip neurotoksina pronađen kod ptica močvara i ptica obalskih predela mora i jezera, posebno pataka u zapadnom delu SAD-a je tip C. Tip E neurotoksina je ustanovljen kod galebova (151). Najčešći izvor botulizma kod divljih ptica predstavljaju vegetacija i beskičmenjaci u fazi raspadanja (stvaranje anaerobnih uslova). Ptice tako konzumiraju toksin ili beskičmenjake sa toksinima (alimentarna neurointoksikacija). Često se javljaju i epidemije kada u toku jedne epidemije može uginuti i preko hiljadu ptica. Klinički znaci botulizma se pojavljuju od 12 do 48 sati nakon uzimanja toksina. Karakterističan simptom, po kome je bolest dobila ime je opušten vrat sa opuštenom glavom, a ptice izgledaju kao da su pospane. Zbog nemogućnosti korišćenja krila i nogu ptice se najčešće udave, a smrt može nastupiti i usled respiratorne insuficijencije.

Lasice i kanadske lasice su posebno osetljive životinjske vrste na botulizam. Najčešći izvor bolesti je *C. botulinum* tipa C, ali je kod obolelih i uginulih jedinki ustanovljeno i prisustvo *C. botulinum* tipa E. Najčešći izvori bolesti su usitnjeno sirovo meso i riba (130).

Botulizam kod pasa je dosta retka bolest, ali u većini slučajeva botulizam pasa uzrokovan je neurotoksinima tipa C, u manjem broju neurotoksinom tipa D. Najčešće dolazi do alimentarne neurointoksikacije kontaminiranim leševima ili lovačkih pasa u

močvarnim predelima sa epidemijama ptičijeg botulizma. Period inkubacije se kreće od nekoliko sati do 6 dana. Trajanje bolesti je od 14-24 dana. Klinički simptomi uključuju progresivnu ascedentnu paralizu koja može dovesti i do kvadriplegije, a smrt nastupa zbog paralize respiratorne muskulature.

## **2.7. DETEKCIJA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* I DIJAGNOSTIKA BOTULIZMA**

### **2.7.1. KLASIČNE METODE IZOLACIJE, IDENTIFIKACIJE I TIPIZACIJE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM***

Zbog postojanja većeg broja tipova *C. botulinum* koji poseduju različite genotipsko-fenotipske odnosno antigenske karakteristike, javlja se veliki broj poteškoća u izolaciji, identifikaciji i tipizaciji uzročnika. Postojanje ne-toksinogenih sojeva u hrani i uzorcima iz okruženja, koji su slični *C. botulinum*, dovode takođe do poteškoća u izolovanju *C. botulinum* (25, 108). Imajući ovo u vidu ni jedan hranljivi medijum i ni jedan postupak nisu istovremeno idealni za izolovanje svih toksinogenih sojeva *C. botulinum*. Istovremeno utvrđivanje spora *C. botulinum* u uzorcima hrane i okruženju bez dokazivanja toksina često nema dijagnostičkog značaja s obzirom da su spore ubikvitari i mogu se naći u prerađenoj hrani i/ili sirovinama (84). Međutim utvrđivanje *C. botulinum* u uzorcima fecesa, želudačnom sadržaju, eventualno drugom materijalu poreklom od obolelog čoveka često je od pomoći u dijagnostici bolesti jer je uzročnik često povezan sa bolešću (49).

Najzastupljenije neselektivne podloge za obogaćenje *C. botulinum* predstavljaju Robertsonov bujon ili bujoni koji sadrže ekstrakt mesa/seckano meso odnosno triptoza-pepton-glukoza-kvasac bujon (TPGY) (32, 103). Kulture se zatim presejavaju na neku od neselektivnih čvrstih podloga Zeissler-ov krvni agar, žumančetni agar (EYA) ili modifikovani McClung-Toabe EYA agar (32). Kada se izolacija koristi za otkrivanje spora *C. botulinum* neophodno je uzorke pre zasejavanja termički obraditi da se unište vegetativni oblici ostalih bakterija (32). Svi medijumi u toku izolacije se inkubiraju

isključivo u anaerobnoj sredini, a u zavisnosti od tipa *C. botulinum* na temperaturi od 35-37 °C, odnosno 27-30 °C. Poželjno je da materijal pre obrade, preko noći, bude izložen anaerobnim uslovima. Za izolovanje pojedinih sojeva *C. botulinum* u hranljivu podlogu se mogu dodavati inhibitorne materije kao što su sulfonamidi i antibiotici (sulfametoksazol, trimetoprim, cikloserin) (177). Za biohemijsku identifikaciju i potvrdu izolovanih kultura *C. botulinum* mogu se koristiti brzi komercijalni testovi (Api 20 A, Rapid ID 32, BBL Crystal Identification Systems - Anaerobe ID Kit) pri čemu sredina, vreme inkubacije kao i koncentracija ćelija značajno utiču na tačnost rezultata (115, 110).

Po završenoj izolaciji toksičnost dobijenih bakterijskih kultura se dokazuje testovima na miševima (92).

### 2.7.2. IMUNOLOŠKE METODE

U cilju utvrđivanja prisustva BoNT ili antitela protiv BoNT-a, a u cilju pronalaženja alternativnih testova biološkom ogledu na miševima, razvijeno je više imunoloških metoda (gel difuzioni test, pasivni hemaglutinacioni test-PHA, radioimunodifuzioni test-RIA i imunoenzimski test (ELISA) (53). Međutim, većina ovih testova (gel difuzioni test, PHA i RIA) je male osetljivosti i specifičnosti tako da je njihova dijagnostičku vrednost u detekciji BoNT-a mala (182). U poredjenju sa biološkim ogledom na miševima, to su brzi testovi, ali je njihov kapacitet ograničen zbog nemogućnosti da razlikuju biološki aktivne od neaktivnih toksina (53). Najveću primenu u praksi ima imunoenzimski test (ELISA) sa različitim modifikacijama, koji mogu dostići osetljivost sličnu osetljivosti biološkom ogledu na miševima (48, 60, 153, 182). Modifikovani ELISA testovi obuhvataju imunoenzimski koagulacijski test (ELISA-ELCA) imunoenzuimski test na bazi hemiluminescencije (CLISA) i immunomagnetno odvajanje (magnetna perla-ELISA) (70, 97, 101, 153).

Ne tako davno osetljivost ELISA testova je poboljšana korišćenjem imuno-PCR testa za tip A *C. botulinum*, odnosno PCR-ELISA za tipove, B, E i F u kom se za detekciju antigena koristi molekul dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) kao marker (58, 206).

ELISA testovi se mogu koristiti za utvrđivanje BoNT-a direktno u uzorcima kliničkog materijala, u uzorcima hrane nakon obogaćenja, bakterijskim kolonijama koje proizvode toksine ili kao testovi za utvrđivanje antitela u serumu (47, 89, 98, 147, 151, 152).

Činjenica da BoNT poseduje specifičnu enzimsku (cink-endopeptidaza) aktivnost prema membranama sinaptičkih vezikula dovela je do razvoja testa za njegovo otkrivanje *in vitro* (Endopeptidaza test). Endopeptidazni test sa zasniva na specifičnom odvajanju SNARE proteina od BoNT-a (54, 55, 72, 202). To je brz test, velike osetljivosti čak i veće od biološkog oglada na miševima i do sada nije utvrđena unakrsna reakcija na različite tipove BoNT-a (203).

Međutim, kod endopeptidaznog testa sa BoNT-om tipa B postoji mogućnost pojave lažno negativnih rezultata zbog tipske razlike BoNT-a tipa B, proizvedenog od strane proteolitičkih i neproteolitičkih sojeva.

### **2.7.3. METODE MOLEKULARNE DETEKCIJE I TIPIZACIJE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* I BoNT-a**

Pod molekularnom detekcijom *C. botulinum* najčešće se podrazumeva detekcija gena koji kodira produkciju BoNT-a, što ukazuje na prisustvo mikroorganizma u ispitivanom uzorku. Upotreba molekularnih metoda omogućava analizu genoma bakterija koja ima značaja u proučavanju genetike i pronalaženju uzročnika u toku epidemija botulizma (78, 79). Zbog prisustva malog broja spora *C. botulinum* u kontaminiranim uzorcima i njihove velike otpornosti u aerobnim uslovima, a radi dobijanja brzih i pouzdanih rezultata laboratorijskih ispitivanja pristupilo se izvođenju molekularnih metoda, direktno iz uzoraka, bez predobogaćenja (9, 64, 85, 108). Molekularni pristupi u dijagnostici uključuju osetljive i specifične testove lančane reakcije polimeraze (PCR), lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR) i metoda gel-elektroforeze u pilzirajućem električnom polju (Pulse-Field Gel Elektrophoresis–PFGE) (136, 137).

Potvrđeno je da je PCR amplifikacija brža, operativnija, osetljivija i jednostavnija, a istovremeno pouzdana zamena standardnom biološkom ogledu na

miševima za utvrđivanje prisustva BoNT-a (57, 135, 179, 180). PCR se može koristiti za detekciju bakterija u materijalu bez obogaćenja, nakon obogaćenja ili samo gena koji kodira proizvodnju toksina u delovima bakterijskih ćelija (179, 181, 204). Otkrivanje gena koji kodira proizvodnju toksina u bakterijskim sporama je od velikog značaja u slučaju da uzorci potiču iz životne sredine odnosno u uzorcima gde se primenjuje obogaćenje koje može dovesti do rasta konkurentnih mikroorganizama koji mogu kočiti rast ciljnog mikroorganizma (156). PCR metodologijom se mogu obrađivati uzorci koji potiču iz životne sredine, hrane, biološkog materijala, crevnog sadržaja i uzorci fekalnog porekla (80, 106, 131, 135). Uglavnom se u PCR protokolu koristi jedan par specifičnih prajmera za utvrđivanje jednog tipa klostridija. Međutim postoje PCR protokoli gde se u istom trenutku može koristiti više parova specifičnih prajmera gde se istovremeno u jednoj reakcionoj smeši detektuje više tipova klostridija (multipleks PCR) (106). Da bi se povećala osetljivost PCR testova mogu se koristiti nested PCR protokoli, koji uključuju nekoliko naknadnih amplifikacija. Nested PCR uključuje dva seta prajmera, koji se koriste u dva uzastopna PCR-a. U poređenju sa običnim PCR, nested-PCR povećava osetljivost i specifičnost detekcije (90). Kod izvođenja reakcije PCR mora se računati i na postojanje lažno negativnih rezultata. Ovo je najčešće povezano sa prisustvom toksina, a odsustvom ćelija ili spora *C. botulinum*, odnosno prisustvom PCR inhibitora (57). Takođe se mogu pojaviti i nespecifični, lažno pozitivni rezultati. Tako se može javiti unakrsna reaktivnost unutar različitih tipova *C. botulinum*, odnosno otkriti gen nekih od toksina *C. botulinum* u kulturama drugih klostridija (64). Postoji nekoliko faktora koji mogu uticati na rezultate PCR-a. Jedan od glavnih faktora je način pripreme, izolacije i koncentrisanja dovoljnih količina DNK iz uzoraka za PCR analizu (181). Jedan od bitnih momenata je i naknadno prečišćavanje ekstrahovane DNK jer bi u suprotnom prisustvo drugih organskih inhibitornih materija, uz DNK, inhibiralo enzimsku aktivnost u toku PCR-a (204). Od velikog je značaja i upotreba visoko specifičnih prajmera u PCR protokolima (28). Metoda se izvodi po proceduri koja podrazumeva ekstrakciju bakterijske DNK i njenu denaturaciju u termalnom sajkleru na temperaturi od 95 °C u vremenskom periodu od 3-10 minuta. Pri navedenoj temperaturi dolazi do reverzibilnog prekida vodoničnih veza između komplementarnih lanaca DNK koji se razdvajaju. Sledeći korak u postupku izvođenja PCR-a je vezivanje prajmera (annealing) kada termalni sajkler naglo snižava temperaturu da bi se prajmeri

vezali za razdvojene lance DNK. Zbog visoke koncentracije prajmera u reakcionoj smeši sparivnje prajmera sa komplementarnim lancem ispitujuće DNK odvija se brže nego što bi se dva lanca DNK spojila. Sledi proces elongacije kada DNK polimeraza počinje da kopira DNK lance. Temperatura u ovom koraku zavisi od osobina same DNK polimeraze i obično se kreće oko 72 °C. Dužina trajanja ovog procesa zavisi od dužine sekvence koja se amplifikuje, a pravilo je jedan minut na svakih 1000 baznih parova. Posle završetka svih ciklusa primenjuje se finalna elongacija u trajanju od 3 minuta koja omogućava preostalim jednolančanim molekulima DNK da budu kopirani.

Razdvajanje dobijenih PCR proizvoda izvodi se metodom agarozna-gel elektroforeze, a očitavanje dobijenih proizvoda vrši očitavanjem primenom UV svetlosti. Metoda se zasniva na različitoj brzini kretanja negativno naelektrisanih molekula DNK (pri neutralnom pH) ka pozitivnom polu kroz agarozni matriks, pri čemu molekuli manje veličine (manje baznih parova) prolaze brže, a veći molekuli kreću se sporije. Da bi se trake DNK proizvoda uočile u agarozna-gelu, neophodno je u pomenuti gel dodati etidijum-bromid, boju koja se veže za DNK i pod uticajem UV svetlosti fluorescira.

Real-Time PCR metoda podrazumeva detekciju PCR amplifikacije tokom rane faze reakcije, upotrebom specifičnih ili obeleženih prajmera što omogućuje praćenje toka reakcije i kvantifikaciju proizvoda. Merenje kinetike reakcije u ranoj fazi PCR amplifikacije, predstavlja prednost u odnosu na klasičnu PCR detekciju gde se PCR amplifikat detektuje naknado pomoću agaroznog gela (85).

U dijagnostici botulizma koristi se i gel-elektroforeza u pilzirajućem električnom polju (PFGE). PFGE se koristi za identifikaciju, karakterizaciju i dodatnu diskriminaciju prisutnih tipova *C. botulinum* u ispitivanim uzorcima. Metoda PFGE se zasniva na razdvajanju (fragmenataciji) cirkularne bakterijske DNK nakon digestije restriktivnim enzimima. Po dobijanju većeg broja fragmenata, različitih dužina, neophodno je njihovo razdvajanje. Kako su ovi fragmenti isuviše veliki da bi se razdvojili klasičnom elektroforezom u agaroznom gelu primenjuje se metoda pulsirajućeg električnog polja. U navedenom električnom polju koje menja pravac i dužinu trajanja, manji fragmenti se

brže kreću kroz agarozu od većih tako da nakom digestije i PFGE elektroforeze dolazi do profilisanja bakterija na jedan ili više klonova (78, 136, 137).

#### **2.7.4. ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* U UZORCIMA**

U određivanju broja *C. botulinum* mogu biti korišćene klasične mikrobiološke metode gde se pored izolacije radi i brojanje kolonija na pločama ili u epruvetama i izražava kao broj formiranih bakterija po gramu/mililitru - CFU/g(ml) (68, 124). Jedna od korišćenih metoda je i metoda utvrđivanja najverovatnijeg mogućeg broja (most probable number), MPN u uzorcima koji su reagovali pozitivno. MPN metod je zasnovan na podeli uzorka i otkrivanju rasta određenog mikroorganizma u jednoj ili više epruveta u nizu koje sadrže poznate količine/razređenja uzorka. Za razliku od bakterijske identifikacije kolonija na ploči ili u epruveti, MPN metodom se radi procena broja bakterija/spora u pozitivnim uzorcima tako da rezultate dobijene ovom metodom treba uzeti sa rezervom (80).

Pored detekcije, Real-Time PCR-om se istovremeno radi i kvantifikacija mikroorganizama tako da se i ova molekularna metoda može koristiti u kvantifikaciji *C. botulinum* (2, 80, 208).

#### **2.7.5. KLINIČKA DIJAGNOSTIKA BOTULIZMA**

Dijagnostika botulizma je prvenstveno zasnovana na anamnezi koja obuhvata podatke o ishrani obolelih jedinki i druge činjenice vezane za poremećaje fiziološkog statusa. Od pomoći u dijagnostici je i klinička slika bolesti odnosno podaci o epidemiološkoj situaciji. Svakako da utvrđivanje *C. botulinum* u kliničkom materijalu i uzorcima hrane može biti od koristi u dijagnostici (32). S obzirom da se diferencijalno dijagnostički bolest može zameniti sa drugim neurološkim poremećajima, u postavljanju dijagnoze može pomoći elektromiograf (EMG) (32, 142). Problemi u dijagnostici



bolesti postoje zbog činjenice da ne postoji ni jedna osetljiva i specifična metoda, koja se može primeniti *in vitro* za otkrivanje BoNT-a.

#### **2.7.6. BIOLOŠKI OGLED NA MIŠEVIMA**

Detekcija toksina u hrani i uzorcima kliničkog materijala, poreklom od ljudi ili životinja predstavlja definitivnu dijagnozu botulizma jer samo prisustvo *C. botulinum* često ne mora imati značaja u dijagnostici. Jedina standardna metoda za otkrivanje, identifikaciju i tipiziranje BoNT-a je biološki ogled na miševima (32, 167). Toksin u uzorku (uzorak) se rastvori u fosfatnom puferu i ubrizgava intraperitonealno miševima. Jednoj grupi miševa se aplikuju toksini sa antitoksinima (antitelima), a drugoj samo toksin. Mora se računati i na dodatak enzima (tripsina) kod sumnje na prisustvo sojeva *C. botulinum* koji nemaju proteolitičku aktivnost. Ukoliko u ispitivanom uzorku postoji BoNT, miševi pokazuju tipične znake botulizma, uključujući nakostrešenost dlake, mišićnu slabost i respiratornu insuficijenciju. U zavisnosti od vrste i količine BoNT-a promene nastaju u periodu od jedan do nekoliko dana kada dolazi do bolesti, odnosno uginuća miševa koji nisu primili antitela protiv specifičnog BoNT-a. Miševi koji su primili odgovarajuću vrstu antitoksina ostaju bez simptoma.

Međutim ova vrsta testiranja je sve više ograničena zbog velikog, zahtevnog, skupog i dugotrajnog vremenskog postupka testiranja. Prisustvo nekih drugih toksičnih supstanci, bakterijskih uzročnika, nekrotičnih materija, a sve u zavisnosti od prirode uzorka, može izazvati probleme u eksperimentu i nemogućnost izolacije *C. botulinum*, odnosno utvrđivanje prisustva BoNT-a (180). Metoda često nije dovoljno osetljiva pa ne može detektovati veoma niske nivoe toksina u uzorcima za testiranje (178). Pored navedenog, ove vrste testiranja zatevaju posebno obučeno osoblje i odgovarajuće prostore za životinja, a sa današnjeg etičkog aspekta ova testiranja su ograničena i diskutabilna.

## 2.8. CLOSTRIDIUM BOTULINUM I PČELARSTVO

### 2.8.1. MEDONOSNA PČELA I PROIZVODNJA MEDA

Pčele imaju vitalnu ulogu u održavanju našeg okruženja i biodiverziteta ukupnog poljoprivrednog sistema. Između poljoprivrede i pčela postoji delikatna simbiotska veza, a većina gajenih biljnih kultura u Svetu zavisi od oprašivanja i oplodnje insektima. Veliki je značaj oprašivanja (polinacije) za održavanje biodiverziteta, ukupna godišnja monetarna vrednost oprašivanja je procenjena na više stotina milijardi evra - indirektna dobit. Postoji i direktna dobit koja se ogleda u proizvodnji pčelinjih proizvoda u koje spadaju proizvodnja voska, propolisa, polena, mleča, pčelinjeg otrova i meda, a ona je i do dvadeset puta manja od indirektno dobiti (polinacije).

Još od 2000 godina, pre Nove ere, pčelinje zajednice su opstale i održale proizvodnju meda, voska i propolisa. Pčelarstvo je nekada predstavljalo isključivo hobi, dok je danas, sve više zastupljeno kao organizovani oblik industrijske proizvodnje. Medonosne pčele (*Apis mellifera*) prikupljaju nektar od cvetova biljaka ili medonosne sastojke sa živih delova biljaka, dodaju mu sopstvene specifične materije, transformišu i odlažu u ćelije saća da sazri.

Pretvaranje nektara u med je složen proces u kojem učestvuju pčele radilice iz pčelinjeg društva. Pčele sakupljačice, pošto su napunile svoju mednu voljku nektarom, vraćaju se u košnicu gde ih dočekuju mlade pčele radilice i preuzimaju nektar. U toku obrade nektar gubi znatan deo svog vodenog sadržaja, a prima enzime, koje luče pljuvačne žlezde pčela, između ostalih i invertazu koja razlaže saharozu na glukozu i fruktozu. Tri do pet dana takav nektar sazreva u mednim ćelijama saća pčelinjeg legla i posle zgušnjavanja se pretvara u zreo med. Neophodna ventilacija potrebna za tu obradu meda postiže se pomoću brzog i neprekidnog lepezanja krila pčela. Tako se od nektara sa dosta visokom sadržajem vode od oko 55%, u saću umanjuje sadržaj vode na 17-18%, odnosno dobija zreo med.

Da bi došli do meda nekada su ljudi morali gušiti pčele. Prelaskom na proizvodnju meda dolazi do zamene prirodnih staništa pčele, najpre košnicama sa nepokretnim saćem, dubinama i pletarama-trmke. Razvojem pčelarske proizvodnje u

proizvodnu praksu ušle su savremene košnice sa nastavcima i pokretnim saćem. Nastavci košnica su izgrađeni od različitog materijala, stiropora ili lakog drveta, u kojima se uglavnom nalazi različiti broj ramova. Telo košnice u proizvodnji se sastoji od najmanje dva nastavka, od kojih je u jednom, najčešće donjem, plodište (pored razvoja legla sakupljanja se rezerva hrane za leglo i pčele) i gornji nastavak, medište, gde pčele sakupljaju višak meda. Da bi proizvodnja meda bila efikasnija, medonosnim pčelama se na ramovima dodaju voštano-satne osnove sa šestouganim osnovama radiličkih ćelija. Koristeći ovu voštano-satnu osnovu kao bazu, pčele grade voštane ćelije u kojima skladište med i polen, odnosno polažu jaja za razvoj novih jedinki. Kada je med zreo, pčele poklapaju ćelije saća sa pčelinjim voskom i tako čuvaju med od upijanja vlage iz vazduha i kvarenja.

Med se prikuplja tako što se posebnim alatima ili uređajima otvaraju ćelije saća sa medom, a zatim ram saća stavlja u centrifugu koja izdvaja med iz saća u cilindar centrifuge (vrcanje, ceđenje meda). Izdvojeni med iz cilindra centrifuge prazni se kroz slavinu u posude za prikupljanje meda. Pre ulaska u posude, med prolazi kroz cediljku gde se radi gruba filtracija (izbacivanje delova mrtvih pčela, voštanih otpadaka i drugih mehaničkih nečistoća). Stajanjem vrcanog meda u posudama brzo dolazi do odvajanja manjih partikula saća na površinu, koje se pre pakovanja meda u tegle uklanjaju. Prazni ramovi sa saćem se ili vraćaju u pčelinju zajednicu za novo prikupljanje meda ili, ukoliko je staro, saće se iseća i pretapa u vosak, odnosno priprema za proizvodnju novih voštano-satnih osnova.

## **2.8.2. MED I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE MEDA**

Med predstavlja visokovrednu namirnicu izuzetnog sastava i svojstava.

Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za med, druge pčelinje proizvode, preparate na bazi meda i drugih pčelinjih proizvoda definiše med kao sladak, gust, kristalisan, viskozan proizvod koji medonosne pčele proizvode iz nektara cvetova medonosnih biljaka ili iz sekreta sa živih delova biljaka (četinara i lišćara) koji pčele sakupljaju, dodaju mu sopstvene specifične materije, transformišu i odlažu u ćelije saća da sazri (148). Codex standard definiše med kao prirodni slatki proizvod koga

proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) od nektara biljaka ili od sekreta živih delova biljaka, ili biljnih ekskreta koje izbaciju insekti na žive delove biljaka, koji pčele skupljaju, transformišu i kombinuju sa specifičnim vlastitim proizvodima, odlažu, dehidruju, skladište i ostavljaju u ćelije saća da odstoji i sazri (37, 38). Navedenim formulacijama definisano je praktično dvostruko poreklo meda kao namirnice biljnog i životinjskog porekla.

Navedena prirodna supstanca uglavnom je sastavljena od različitih šećera, najviše od monosaharida fruktoze i glukoze, kao glavnih komponenti u ukupnom učešću od 45-70% (38, 149, 201). Pored fruktoze i glukoze u medu je prisutno i preko 20 različitih disaharida odnosno oligosaharida u procentu od oko 10-12%. Posle ugljenih hidrata voda je drugi najzastupljeniji sastojak meda i njen udeo je najviše do 25% (38). Ostatak meda, sa oko 0,5-1,5%, u malim količinama čine druge supstance, kao što su proteini, vitamini, minerali, enzimi, organske kiseline, antioksidansi, flavonoidi i hidroksimetilfurfural (HMF). Različite vrste meda, kao i medovi unutar jedne vrste razlikuju se po svom sastavu u zavisnosti od geografskog i biljnog porekla meda, klimatskih uslova pčelarenja, rase pčela i sposobnosti pčelara da doradi i skladišti med (201).

Sadržaj vlage u kvalitetnom medu je uglavnom od 15-18%, i ne bi smeo prelaziti 20% izuzev medova od vrieska i deteline do 25% (38). Nivo HMF-a, koji govori o starosti i uslovima čuvanja meda odnosno eventualno termičkim tretmanima meda, ne sme prelaziti 40 mg/kg, izuzev meda proizvedenog u tropskim oblastima, gde je najviši dozvoljeni nivo HMF-a 80 mg/kg (37, 38). Zbog velikog viskoziteta, niske aktivnosti vode (0.5-0.6) i malih pH vrednosti, oko 3.9, med je nepodesan medijum za razvoj i rast mikroorganizama (201). Inhibitorna aktivnost meda protiv različitih bakterijskih uzročnika do sada je objavljena u više studija (3, 13, 112, 126, 129, 183, 205). Med ne nadražuje zidove želuca i creva, brzo i lako se asimilira u organizmu (glukoza i fruktoza se bez varenja resorbuju u krv), a zbog antibakterijskog dejstva na patogene u crevima ima povoljan terapijski efekat (13). *Helicobacter pylori* (uzročnik čira želuca) je osetljiv na med. Konzumirani med čoveku vraća vitalnost, a pri lečenju obezbeđuje brži oporavak organizma. Lako se metaboliše pa je najlakši za pravilan rad bubrega, ima opuštajuće, smirujuće dejstvo na ceo organizam, posebno deluje smirujuće na nervni sistem, a ima i antiseptički efekat (199). Med je eliksir lepote i ima izuzetna kozmetička

svojstva, izuzetnu prolaznost kroz kožu, hrani mišićne slojeve i odlaže starenje. Od davnina je korišćen u lečenju inficiranih rana (deluje antibakterijski, smanjuje ožiljke). Mada, do sada nema prijavljenih slučajeva botulizma rana usled korišćenja meda postoji mogućnost nastanka botulizma i na ovaj način (112). Med snižava holesterol i smanjuje masnoće u krvi, sprečava komplikacije zračenja (mučnine, reaktivna zapaljenja na zračenim mestima, smanjuje bakterijske infekcije). Takođe med sprečava karijes i krvarenje desni, a deluje i lokalno protiv herpes virusa. Imajući u vidu inhibitorna svojstva meda, (Tabela 3) mikroorganizmi koji se mogu naći u medu su kvasci i sporulirajuće bakterije (170). Pored spora kvasaca, spore bakterija roda *Bacillus* su gotovo redovan nalaz u medu, a spore klostridija, odnosno i spore *C. botulinum* se takođe mogu naći u medu. Sa povećanjem sadržaja vode preko 20% stvaraju se uslovi za klijanje spora kvasaca koji mogu dovesti do fermentacije i kvara meda (170).

Tabela 3. Faktori antimikrobne aktivnosti meda

- 
- Visoka osmotski pritisak kao posledica visokog sadržaja šećera
  - Niska aktivnost vode (0.5-0.6)
  - Nizak sadržaj belančevina
  - Niska pH vrednost (3.9)
  - Nizak redoks potencijal, zbog velikog broja redukujućih šećera
  - Veliki viskozitet
  - Glukoza oksidaza sistem učestvuje u formiranju  $H_2O_2$
  - Ostali antimikrobni principi kao što su flavonoidi, lizozim, fenolna kiselina, terpentin, eterična ulja
- 

Priroda, poreklo, sastav i fizičko-hemijske karakteristike meda značajno otežavaju pripremu, obradu i korišćenje uzoraka meda, kako u primeni klasičnih tako i molekularnih metoda laboratorijske dijagnostike.

### **2.8.3. PUTEVI KONTAMINACIJE UZORAKA SPORAMA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* I PREVALENCIJA U UZORCIMA KOJI POTIČU IZ PČELARSKE PROIZVODNJE**

Spore bakterija *C. botulinum* široko su rasprostranjene u prirodi (19, 80, 98, 131, 138, 152). Njihovo prisustvo u prašini odnosno digestivnom traktu životinja i ljudi govori o mogućnosti zagađenja različitih poljoprivrednih proizvoda i životnih namirnica.

Kao i ostale namirnice, med može biti kontaminiran mikroorganizmima (170). Izvori kontaminacije meda mikroorganizmima mogu se podeliti na primarne i sekundarne. Primarni izvori kontaminacije meda mikroorganizmima mogu biti polen, digestivni trakt pčela, prašina, vazduh, zemlja. Kontaminacija poreklom iz ovih izvora ne može se kontrolisati, s obzirom da ona potiče "od medonosne pčele". Sekundarni izvori kontaminacije meda predstavljaju košnice, oprema, pčelari, unakrsna kontaminacija i vazduh. Kontaminacija u ovim slučajevima nastaje najčešće zbog nepravilnih postupaka u toku i posle vađenja, vrcanja i pakovanja meda iz košnica. Za razliku od primarnih izvora, kontaminaciju meda, poreklom iz sekundarnih izvora je moguće kontrolisati, i to pre svega principima dobre proizvođačke prakse (GMP). Putevi kontaminacije meda sporama *C. botulinum* do sada nisu identifikovani, ali imajući u vidu prirodnu distribuciju navedenih spora, odnosno podatke pojedinih autora, u izvore moguće kontaminacije mogu biti uključeni polen, prašina i vazduh (170). Dokazano je takođe da spore *C. botulinum* pod anaerobnim uslovima mogu klijati u leševima pčela i mrtvim larvama i tako predstavljati izvor kontaminacije unutar košnice (132). Eksperimentalno je dokazano prenošenje spora *C. botulinum* iz šećernog sirupa koji je sadržavao  $1.6 \times 10^5$  spora, na med u istoj pčelinjoj zajednici u okviru prihrane pčelinje zajednice, pri čemu nije došlo do ukupnog povećanja broja spora (83).

Od 2001-2003. godine, autori sa Odeljenja za hranu, higijenu i zaštitu životne sredine, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Helsinkiju vršili su ispitivanja 1168 uzoraka koji su poticali sa pčelinjaka i iz okruženja pčelinjaka, a vezani su sa proizvodnjom meda (138). U okviru navedenih aktivnosti, metodom PCR-a, ispitivani su uzorci zemlje, polenovih zrna, šećernog sirupa, pčela, meda, pčelinjeg voska, pčelinjeg saća i perge na prisustvo spora *C. botulinum*. Navedena ispitivanja su

obavljena na uzorcima koji su poticali sa oko 100 pčelinjaka koji su opservirani od strane 37 pčelara. Ukupan broj pozitivnih uzoraka, na prisustvo spora *C. botulinum* bio je 216 pri čemu su navedene spore pronađene u svim kategorijama ispitivanih uzoraka. Od svih ispitanih uzoraka najviša prevalencija na prisustvo spora *C. botulinum*, utvrđena je u uzorcima zemlje. Od uzoraka koji su poticali iz košnice (pčele, med, pčelinji vosak, pčelinje saće i perga) u najvećem broju uzoraka pčelinjeg saća, pčelinjeg voska i perge utvrđeno je prisustvo spora. *C. botulinum* grupe B je bio najdominantniji u ispitanim uzorcima, tako da je on odgovoran za kontaminaciju meda u Finskoj. Najveći broj spora bio je prisutan u uzorcima voska. I u ispitivanjima prisustva spora *C. botulinum* u proizvodima od meda, na područjima Danske, Norveške i Švedske utvrđeno je veće prisustvo spora u uzorcima meda sa saćem nego u uzorcima vrcanog meda (136). Visoka prevalencija i prisustvo velikog broja spora *C. botulinum* u vosku ukazuju na to da vosak igra važnu ulogu u kontaminaciji meda. U kontaminaciji voska sporama *C. botulinum* najverovatnije najviše učestvuju pčele s obzirom da je najviše spora bilo prisutno u uzorcima zemlje/prasine. Zemljišta bez rastinja, površine obrasle mahovinom, šljunkovita i močvarna zemljišta mogu sadržavati spore *C. botulinum* češće od terena obraslih vegetacijom (136). Ukoliko na pčelinjaku nema pojilica za pčele, one mogu u potrazi za vodom sletati na alternativne izvore napajanja i kontaminirati se između ostalog i sporama klostridija. Ovo govori o činjenici da postavljanje pčelinjaka na prostorima sa vegetacijom i prisustvo napajalica na pčelinjaku predstavljaju elemente dobre proizvođačke prakse koji utiču na smanjenje kontaminacije meda sporama *C. botulinum*. S obzirom da je u vosku visoka prevalencija prisustva spora klostridija, njegovom redovnom zamenom i adekvatnim postupcima toplotne obrade nastaje uništavanje spora proteolitičkih sojeva *C. botulinum* grupe I što predstavlja jedan od elemenata dobre proizvođačke/pčelarske prakse (GMP) (94). Higijenski aspekti u okviru vađenja, ekstrakcije i pakovanja meda mogu igrati važnu ulogu u okviru konatminacije meda sporama klostridija (138). Potrebno je obezbediti adekvatan prostor, osvetljnje i higijenski režim rada u objektu za ekstrakciju. Kontaminaciju preko prasine treba smanjiti korišćenjem odgovarajuće i posebne odeće za rad van objekata, i u objektu za ekstrakcije i češćim zamenama voštano-satnih osnova koje su termički obrađene tako da bi se uniuštile spore *C. botulinum* grupe I.

Od ukupno 2607 analiziranih uzoraka meda iz različitih krajeva sveta, u periodu od 1978-2012. godine, utvrđeno je da je 5,4% uzoraka meda bilo kontaminirano sporama *C. botulinum* (Tabela 4) (91, 113, 114, 137, 150, 157). Broj spora koji je utvrđen u kontaminiranim uzorcima meda kretao se između 1-10/kg. U uzorcima meda koji su bili povezani sa pojavom infantilnog botulizma broj spora je bio viši, i to uglavnom oko  $10^3$ /kg (Tabela 4) (75, 114, 119, 127).

Međutim, po podacima pojedinih autora, broja spora u uzorcima meda vezan sa slučajevima infantilnog botulizma varirao je od 5 do 80 spora u gramu meda (119).

Prema dosadašnjim rezultatima nekoliko studija prosečna prevalencija spora *C. botulinum* u uzorcima meda iznosila je oko 4%, a u nekim ispitivanjima je bila čak i preko 20% (Tabela 4) (34, 50, 91, 113, 114, 119, 134, 136, 150, 175). Prisustvo spora *C. botulinum* u uzorcima meda detektovano je svim metodama koje su primenjivane, najčešće je detektovan tip B, ali je bio prisutan i tip C u Japanu, odnosno tip D u medu poreklom iz Brazila. U jednom uzorku nekada je detektovano i više tipova *C. botulinum*. Neravnomerna raspodela spora u uzorcima meda otežava postupak kvantifikacije tako da se, s obzirom na teško dobijanje homogenog uzorka, preporučuje analiza nekoliko uzoraka, odnosno subjedinica datog (jednog/istog) uzorka (119).



Tabela 4. Prevalencija i broj spora *C. botulinum* u uzorcima meda, period od 1978. do 2012. godine

Zemlja porekla uzoraka	Metoda obrade uzoraka	Broj poz.uzoraka/ukupan broj uzoraka/(%)	Tip i broj detektovanih <i>C.botulinum</i>	Tip i broj izolovanih <i>C. botulinum</i>	Veza sa inf. botulizmom	Broj spora/kg	Referenca i godina
USA	Dijliza	18/241 (7)	A(11), B(7)	NI <sup>c</sup>	Ne	80-280	(175) 1978.
USA	<sup>a</sup> DC	0/81	ND <sup>b</sup>	NI	Ne	NR <sup>d</sup>	(119) 1979.
USA	DC	9/9 (100)	A(2), B(7)	A(2), B(7)	Da	5-80x10 <sup>3</sup>	(119) 1979.
Nemačka	<sup>a</sup> DI	0/210	ND	NI	Ne	NR	(73) 1980.
Nemačka	Dijaliza	0/92	ND	NI	Ne	NR	(62) 1980.
USA	DC&DI	10/80 (13)	A(NR <sup>g</sup> ), B(NR)	NI	Ne	7*	(83) 1981.
USA	Dijaliza	2/100 (2)	A (2)	NI	Ne	0.8*	(91) 1982.
Italija	DC	0/107	ND	NI	Ne	NR	(11) 1983.
Norveška	DI&Dijaliza	0/134	ND	NI	Ne	NR	(77) 1986.
GB	DC& <sup>a</sup> MF	0/122	ND	NI	Ne	NR	(17) 1987.
Kanada	MF	0/43	ND	NI	Ne	< 1	(75) 1988.
Kanada	DC&MF	0/106	ND	NI	Ne	< 1	(75) 1988.
Kanada	DC&MF	1/1 (100)	A (1)	NI	Da	8x10 <sup>3</sup>	(75) 1988.
Japan	DC	23/270 <sup>e</sup> (9)	A(11), B(2), C(10), F(1)	A(11), B(1), C(3), F(1)	Ne	5*	(133) 1990.
Tajvan	Dijaliza	2/152 (1)	B(2)	-	Ne	-	(50) 1991.

Nastavak, Tabela 4.

Japan	DC	1/36 (3)	F(1)	F(1)	Ne	36-60x10 <sup>3</sup>	(134) 1991.
Italija	DC	2/39 (7)	B(2)	B(2)	Ne	3*	(39) 1993.
Argentina	DC	1/42(2)	A(1)	NI	Ne	1*	(34) 1994.
Francuska	Dijaliza	0/116	ND	NI	Ne	NR	(45) 1994.
Argentina	DC	2/44 (5)	Af(1), F(1)	Af(1), F(1)	Ne	< 1000	(127) 1999.
Argentina	DC	1/1 (100)	A(1)	A(1)	Da	15x10 <sup>3</sup>	(127) 1999.
Brazil	DI	6/85 (7)	A(2), B(1), D(3)	A(2), B(1), D(1)	Ne	7*	(159) 1999.
Nemačka	DI	1/52 (2)	A(1)	A(1)	Ne	0.8*	(113) 2000.
Brazil	DI	3/100 (3)	NSf (3)	NI	Ne	NR	(150) 2003.
Danska	MF	29/112 (26)	A(3), B(23), E(3)	A(1), B(20)	Ne	NR	(136) 2005.
Norveška	MF	21/122 (10)	B(7), E(4), F(1)	B(3)	Ne	NR	(136) 2005.
Švedska	MF	1/61 (2)	E(1)	NI	Ne	NR	(136) 2005.
Turska	DI, DC, MF	6/48 (12)	NS	ND	Ne	NR	(99) 2006.
Portugalija	DI	1/1 (100)	B (1)	B (1)	Da	NR	(157) 2012.

Legenda:

<sup>a</sup>metod pripreme uzoraka: DI-direktna inokulacija meda na hranljivu podlogu; DC-razređenje i centrifugovanje uzoraka; MF-membranska filtracija

<sup>b</sup>ND, nije detektovano

<sup>c</sup>NI, nije izolovano

<sup>d</sup>NR, nije rađeno

<sup>e</sup>jedan uzorak sadrži spore dva tipa *C. botulinum*

<sup>f</sup>nije navedeno

<sup>g</sup>nije objavljeno

\*broj spora određen MPN metodom u jednom razređenju

### 3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Na osnovu dostupnih podataka iz strane i domaće literature kao i dobijenih rezultata sopstvenih preliminarnih ispitivanja, cilj je da se pored standardnih mikrobioloških metoda primene i savremene molekularne metode u utvrđivanju prisustva uzročnika *C. botulinum*.

Imajući u vidu značaj i prirodu uzročnika botulizma neophodna je primena savremenih molekularnih metoda u utvrđivanju uzročnika *C. botulinum*.

Da bi bio ostvaren postavljeni cilj definisani su sledeći zadaci:

1. Uzorkovati različite vrste meda (bagremov, šumski, livadski, lipov, suncokretov) i medonosnih pčela poreklom iz različitih regiona (opština) Republike Srbije;
2. Ispitati prisustvo spora *C. botulinum* u uzorcima meda koji su namerno kontaminirani referentnim sojem (*C. botulinum* NCTC 7272) primenom metoda PCR, ISO metodom (SRPS ISO 15213:2011), kao i primenom klasičnih metoda mikrobiologije;
3. Ispitati prisustvo spora *C. botulinum* u uzorcima različitih sortnih vrsta meda i uzorcima medonosnih pčela primenom metode PCR, ISO metodom (SRPS ISO 15213:2011), kao i primenom klasičnih metoda mikrobiologije odnosno utvrditi najverovatniji mogući broj, MPN (most probable number) spora;
4. Primenom metode PCR izvršiti određivanje tipa *C. botulinum* na osnovu karakteristika detektovanog genoma u uzorcima meda i medonosnih pčela.

## **4. MATERIJAL I METODE RADA**

### **4.1. MATERIJAL**

#### **4.1.1. REFERENTAN SOJ I SPECIFIČNI GENSKI FRAGMENTI**

##### ***CLOSTRIDIUM BOTULINUM***

Za kontaminaciju kontrolnih, sigurno negativnih uzoraka meda u cilju verifikacije metode za utvrđivanje prisustva spora *C. botulinum*, u uzorcima meda i medonosnih pčela, primenom PCR metode, korišćen je referentan, proteolitički soj *C. botulinum*, NCTC 7272. Navedeni soj, tačno definisanih genotipsko-fenotipskih i biohemijskih karakteristika poreklom je iz Nacionalne kolekcije, Agencije za zaštitu zdravlja Ujedinjenog Kraljevstva (NCTC), London.

Kao pozitivna kontrola, za izvođenje metode PCR-a korišćeni su genski fragmenti *C. botulinum*: *bontA*, *bontB*, *bontE* i *bontF*. Navedeni genski fragmenti su dobijeni ljubaznošću Profesora doktora Miia-e Lindström sa Odeljenja za higijenu hrane i zaštitu životne sredine, Fakulteta veterinarske medicine u Helsinkiju, Finska.

#### **4.1.2. UZORCI MEDA I MEDONOSNIH PČELA**

Za navedena ispitivanja korišćeni su uzorci meda i medonosnih pčela sa područja Republike Srbije koji su dostavljani u Laboratoriju VSI "Kraljevo", u Kraljevu. Na rutinsku analizu uzorci meda i medonosnih pčela prikupljani su iz određenog broja košnica lokalizovanih na nekoliko različitih geografskih lokaliteta u Republici Srbiji. Navedenim ispitivanjima obuhvaćeno je 59 uzoraka meda i 61 uzorak medonosnih pčela.

Uzorci meda poreklom su iz košnica sa teritorije 20 opština. U odnosu na prirodu nektara, laboratorijski su ispitane četiri grupe monofloernih i jedna grupa polifloernih uzoraka meda. Ukupan broj laboratorijski ispitanih uzoraka meda kao i broj

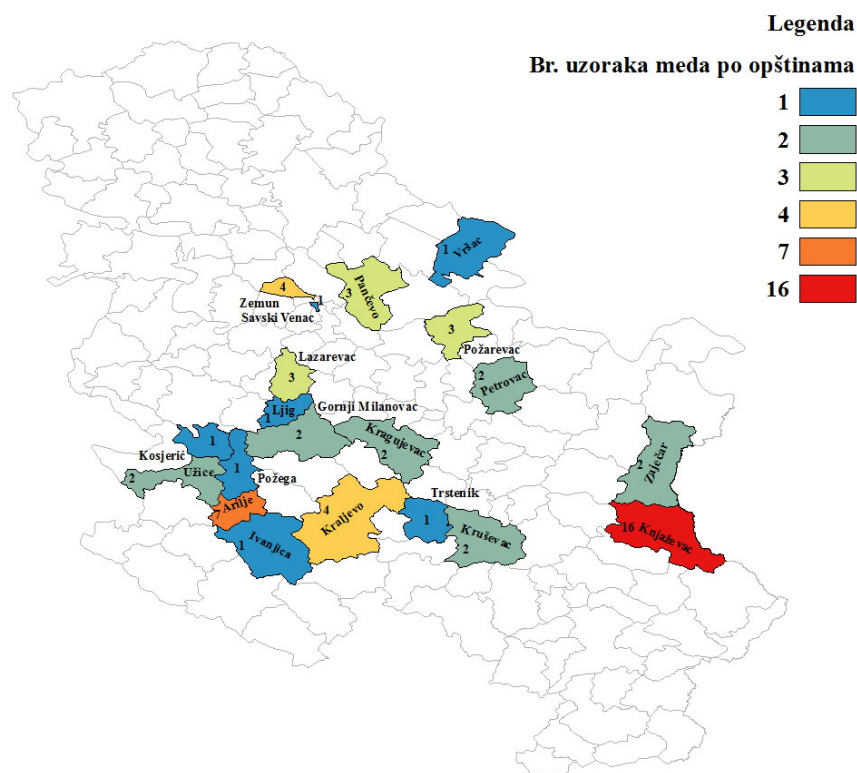
uzoraka meda u odnosu na vrstu nektara prikazani su tabelarno (Tabele 5, 6) i kartografski (Slika 4).

Tabela 5. Broj ispitanih uzoraka meda i njihovo poreklo

Redni broj	Poreklo (Opština)	Broj uzoraka meda
1.	Arilje	7
2.	Gornji Milanovac	2
3.	Ivanjica	1
4.	Knjaževac	16
5.	Kosjerić	1
6.	Kragujevac	2
7.	Kraljevo	4
8.	Kruševac	2
9.	Lazarevac	3
10.	Ljig	1
11.	Pančevo	3
12.	Petrovac na Mlavi	2
13.	Požarevac	3
14.	Požega	1
15.	Savski Venac (Beograd)	1
16.	Trstenik	1
17.	Užice	2
18.	Vršac	1
19.	Zaječar	2
20.	Zemun (Beograd)	4
		Σ 59

Tabela 6. Vrste ispitanog meda

Redni broj	Vrsta meda	Broj ispitanih uzoraka meda
1.	Bagrem	24
2.	Lipa	2
3.	Livada (poliflorni)	20
4.	Šumski	8
5.	Suncokret	5
		Σ 59



Slika 4. Kartografski prikaz oblasti iz kojih je izvršeno uzorkovanje meda

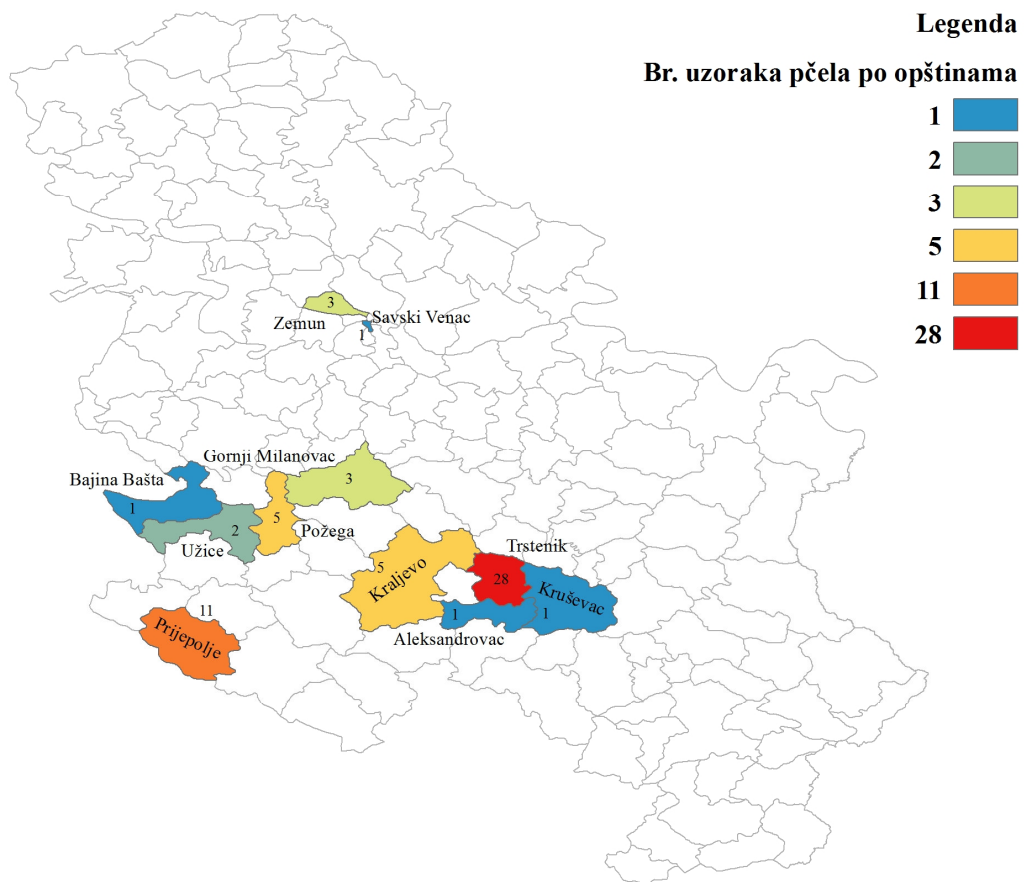
Svi uzorci meda dostavljani u Laboratoriju VSI "Kraljevo", u Kraljevu, do obrade su čuvani na temperaturi od 4 °C.

Uzorci medonosnih pčela poreklom su iz košnica sa područja 11 opština. Broj i poreklo laboratorijski obrađenih uzoraka medonosnih pčela, po opštinama, prikazani su tabelarno (Tabela 7) i kartografski (Slika 5).

Tabela 7. Broj i poreklo ispitanih uzoraka medonosnih pčela

Redni Broj	Opština	Broj lab. obrađenih uzoraka medonosnih pčela
1.	Aleksandrovac	1
2.	Bajina Bašta	1
3.	Gornji Milanovac	3
4.	Kraljevo	5
5.	Kruševac	1
6.	Požega	5
7.	Prijepolje	11
8.	Savski Venac (Beograd)	1
9.	Trstenik	28
10.	Užice	2
11.	Zemun (Beograd)	3
		Σ 61





Slika 5. Kartografski prikaz porekla uzoraka medonosnih pčela

Uzorci leševa medonosnih pčela do obrade su čuvani na - 20 °C.

Sa pet pčelinjaka uzorkovano je devet uzoraka meda i medonosnih pčela pri čemu su sa jednog pčelinjaka u različitim vremenskim intervalima, tri puta uzorkovani med i medonosne plčele. Ostali uzorci su uzorkovani pojedinačno sa različitim lokacija i iz različitih pčelinjih društava.

#### 4.1.3. RASTVORI, REAGENSI, PUFERI, HRANLJIVE PODLOGE I DIJAGNOSTIKUMI KORIŠĆENI U ISPITIVANJIMA

U toku laboratorijskog ispitivanja prisustva spora *C. botulinum* u uzorciima meda i medonosnih pčela, a u cilju dobijanja pouzdanih, objektivnih i validnih rezultata ispitivanja, korišćen je veliki broj rastvora, pufera, hranljivih podloga, reagenasa i dijagnostikuma.

U toku pripreme uzoraka meda i medonosnih pčela za laboratorijskih ispitivanja utvrđivanja prisustva spora *C. botulinum*, aktiviranja odnosno potvrde čistoće i vijabilnosti referentnog soja *C. botulinum* NCTC 7272 kao i namerne kontaminacije uzoraka meda, metodama klasične mikrobiološke dijagnostike, između ostalog korišćeno je i pripremano sledeće:

- Dejonizovana voda

Demineralizacija vode iz gradskog vodovoda je rađena u VSI Kraljevo na jonoizmenjivačkom demineralizatoru "mr Branislav Djonin" Vršac, Srbija.

- Peptonski slani rastvor

- Enzimski hidrolizat kazeina 1g (RM014), HiMedia, Indija

- NaCl 8.5 g, proizvođač Zorka Pharma, Šabac, Srbija

- Dejonizovana voda do 1000 ml

Navedena rastvor je po rastvaranju čvrstih supstanci autoklaviran na 121 °C, u trajanju od 15 minuta. Finalni pH je podešen na 7.0±2 pri temperaturi od 25 °C.

- Hranljivi bujon

- Hranljivi bujon 13 g (M002), HiMedia, Indija

- Dejonizovana voda do 1000 ml

Navedena podloga je po rastvaranju autoklavirana na 121 °C, u trajanju od 15 minuta. pH je podešen na 7.4±2 pri temperaturi od 25 °C.

- Triptoza-Pepton-Glukoza-Kvasac bujon (TPGY)

- Enzimski hidrolizat kazeina 50g (RM014), HiMedia, Indija

- Pepton bakteriološki 5 g (RM001), HiMedia, Indija
- Ekstrakt kvasca 20 g (RM027), HiMedia, Indija
- Dekstroza 4 g, (RM016) , HiMedia, Indija
- Natrijum tioglikolat 1g, AppliChem, Nemačka
- Dejonizovana voda do 1000 ml

Navedena podloga je posle rastvaranja podeljena u epruvete 16 x 150 mm po 9.6 ml. Epruvete su autoklavirane na 121 °C, u vremenu od 15 minuta. Finalni pH je podešen na 7.0±2 na 25 °C pri temperaturi od 25 °C.

- Žumancetni agar, anaerobni (EYA)
  - Enzimski hidrolizat kazeina 5g (RM014), HiMedia, Indija
  - Pepton bakteriološki 20 g (RM001), HiMedia, Indija
  - Ekstrakt kvasca 5 g (RM027), HiMedia, Indija
  - NaCl 8 g, Zorka Pharma, Šabac, Srbija
  - Agar 20 g (RM026), HiMedia, Indija
  - Emulzija zumanceta 80 ml (FD045), HiMedia, Indija
  - Dejonizovana voda do 1000 ml

Navedena podloga je posle rastvaranja, a bez emulzije zumanceta, autoklavirana na 121 °C, u vremenu od 15 minuta. Po hlađenju na 45-50 °C, a pre razlivanja u Petrijeve posude, u pripremljenu podlogu je dodato 80 ml emulzije zumanceta. Finalni pH je podešen na 7.0±2 pri temperaturi od 25 °C.

- Zeissler-ov krvni agar
  - Hranljivi agar 28 g (M001), HiMedia, Indija
  - Dekstroza 20 g, (RM016), HiMedia, Indija
  - Dejonizovana voda do 1000 ml

Navedena podloga je posle rastvaranja, a bez dekstroze, autoklavirana na 121 °C, u vremenu od 15 minuta. Po hlađenju na 45-50 °C, a pre razlivanja u Petrijeve posude u pripremljenu podlogu je dodata je dekstroza i 10 ml defibrinisane krvi ovna na 90 ml podloge. Finalni pH je podešen na 7.0±2 pri temperaturi od 25 °C.

- Krvni agar
  - Hranljivi agar 28 g (M001), HiMedia, Indija
  - Dekstroza 20 g, (RM016), HiMedia, Indija
  - Dejonizovana voda do 1000 ml

Navedena podloga je posle rastvaranja, a bez dekstroze, autoklavirana na 121 °C, u vremenu od 15 minuta. Po hlađenju na 45-50 °C, a pre razlivanja u Petrijeve posude u pripremljenu podlogu je dodata dekstroza i 5% defibrinisane krvi ovna na 95 ml podloge. Finalni pH je podešen na 7.0±2 pri temperaturi od 25 °C.

- Podloga za određivanje broja sulfitoredujućih bakterija koje rastu pod anaerobnim uslovima, metoda SRPS EN ISO 15213:2011 (Gvožđe-sulfit agar)
  - Perfringens agar baza 21 g (M837I), HiMedia, Indija
  - Dejonizovana voda do 500 ml

Navedena podloga je posle rastvaranja autoklavirana na 121 °C, u trajanju od 15 minuta. pH je podešen na 7.6±2 pri temperaturi od 25 °C.

- Sredstvo za homogenizaciju uzoraka meda
  - Twin 80, Merck, Nemačka

- Kedrovo ulje
  - Kedrovo ulje, Centrohem, Stara Pazova, Srbija

- Reagensi za bojenje po Gramu
  - Gencijana violet (pripremljen rastvor), NRK Inženjering, Beograd, Srbija
  - Lugolov Rastvor
    - J<sub>2</sub>, Centrohem, Stara Pazova, Srbija
    - K<sub>2</sub>J, Zorka Pharma, Šabac, Srbija

U tarioniku je pomešano 3 g J<sub>2</sub> i 6 g K<sub>2</sub>J, usitnjeno tučkom, supstanca isprana dejonizovanom vodom u litarsku bocu u koju je dodato do 1000 ml dejonizovane vode.

- Etanol 95%, Zorka Pharma, Šabac, Srbija
- Karbol fuksin
  - Fuksin bazni, NRK Inženjering, Beograd, Srbija

- Fenol (karbolana kiselina), Centrohem, Stara Pazova, Srbija
- Etanol 95%, Zorka Pharma, Šabac, Srbija

Napravljen je rastvor A, mešanjem 8 g fuksina baznog i 92 ml 95% etanola.

Rastvor B je dobijen mešanjem 5 g karbolne kiseline i 95 ml dejonizovane vode. Radni rastvor karbol fuksina je dobijen mešanjem 10 ml rastvora A, 1 ml rastvora B i 89 ml dejonizovane vode.

Po nanošenju bakterijske kulture na mikroskopsku pločicu, preparat je fiksiran na plameniku. Na fiksirani preparat je naneta gencijana violet i ostavljena da deluje 2-3 minuta. Po isteku 2-3 minuta boja je odlivena sa preparata a preparat preliven lugolovim rastvorom koji je ostavljen da deluje 1-2 minuta. Odbojavanje preparata se obavljalo 95% etil alkoholom, sve dok boja nije isprana. Po ispiranu boje alkoholom, preparat je ispran vodovodnom vodom. Posle ispiranju vodovodnom vodom na preparat je nanešen karbol fuksin, ostavljen da deluje od 30 sekundi do 1. minuta, boja odlivena a preparat ispran vodovodnom vodom. Po sušenju na preparat je nanošena kap kedrovog ulja i preparat mikroskopiran. Mikroskopija je rađena na binokularnom mikroskopu, proizvođača Optica, Italija na uvećanju 1000 x, pod imerzijom.

- Glicerol
  - Glicerol 85%, Zorka Pharma, Šabac, Srbija
- Strip za anaerobnu biohemijsku identifikaciju mikroorganizama
  - BBL Crystal™ Identification Systems, Anaerobe ID Kit, BD, USA
  - Api 20 A, bioMerieux, Francuska

Merenje pH vrednosti svih rastvora, pufera i podloga korišćenih u laboratorijskim ispitivanjima uzoraka, vršeno je pH-metrom Coning, Schalar 425, USA.

Čuvanje rastvora, pufera, hranljivih podloga, reagenasa i dijagnostikuma koji zahtevaju temperaturu frižidera obavljano je u rasladnim uređajima proizvođača Gorenje, Slovenija i Fiocetti Frigoriferi scientifici, Italija.

Sterilizacija neophodnog materijala, opreme, rastvora, pufera i podloga vršena je u autoklavu Collussi L 40 E, Italija i autoklavu 300x500, Sutjeska, Beograd, Srbija.

Čuvanje rastvora, hranljivih podloga, reagenasa i dijagnostikuma koji zahtevaju temperature dubokog zamrzavanja (temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) obavljeno je u uređajima proizvođača Gorenje, Slovenija i Fiocetti Frigoriferi scientifici, Italija.

Referentna zaliha (referentan štok) *C. botulinum* NCTC 7272 čuvana je na ultra niskim temperaturama ( $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u zamrzivaču Il shin, Holandija u medijumu jednakog odnosa (aa) hranljivog bujona i glicerola.

Za inkubiranje su upotrebljavani termostati UT 350 i UT 380, proizvođača Stjeska, Beograd, Srbija kao i gasna komora (termostat) za inkubiranje, ISCO 9000, Italija. U inkubiranju je korišćeno i vodeno kupatilo BTU D, ISCO, Italija.

U pripremi uzoraka za reakciju multipleks PCR i PCR-a između ostalog upotrebljeno je i sledeće:

- Dejonizovana voda, PCR čistoće
  - Nuclease-Free Water, Ambion, USA
- TE pufer (Tris-HCl 10 mM [pH 7.5], EDTA 1 mM [pH 8.0])
  - Trizma hydrochloride (0.01 M Tris-HCl) 1.58 g/l, (Molecular Biology grade), Sigma, USA
  - Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (0.001 M EDTA) 0.372 g/l, (Molecular Biology grade), Sigma, USA
  - Dejonizovana voda PCR čistoće do 1000 ml (Nuclease-Free Water, Ambion, USA)

Pufer je posle rastvaranja dodatih supstanci autoklaviran na  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 15 minuta. Izvršeno je podešavanje pH na  $8.0\pm 2$  pri temperaturi od  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Mastermiks
  - Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific – Fermentas, Litvanija

- Sekvence genoma DNK *C. botulinum* (prajmeri), Invitrogen Custom Primers, USA
  - CMBLA1
  - CMBLA1
  - CMBLB1
  - CMBLB2
  - CMBLE1
  - CMBLE2
  - CMBLF1
  - CMBLF2
  
- Agarozni gel
  - E-Gel 2% agarose (GP) with Ethidium Bromide, G501802, Israel
  
- Genski DNK marker, molekularni standard (Ladder)
  - GeneRuler 100 bp, Fermentas, Litvanija

## **4.2. METODE RADA**

### **4.2.1. PRIPREMA UZORAKA MEDA ZA UTVRĐIVANJE PRISUSTVA SPORA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM***

Priprema uzoraka meda za dokazivanje prisustva *C. botulinum*, primenom klasičnih mikrobioloških metoda i metodom PCR-a vršena je kombinacijom metoda centrifugovanja i membranske filtracije (109, 135, 136). Svi uzorci su pripremani u duplikatu.

Sterilnom kašičicom odmereno je po 25 g meda u dve 0.5 litarske sterilne kese, (Nasco Whiril-pak, USA). U svaki odmereni uzorak meda dodato je po 225 ml 1% Tween 80 u sterilnoj dejonizovanoj vodi. Kесе sa sadržajem su inkubirane u vodenom kupatilu na temperaturi od 70 °C, u trajanju od 30 minuta. Po hlađenju, sadržaj je

centrifugovan 30 minuta na 8000 rpm, (centrifuga MPW 351R, Poljska) odliven je supernatant, a u precipitat dodato po 9 ml TPGY bujona i dobro promućkno. U sterilan špric je uvučen prethodno pripremljen i promućkan sadržaj. Na špric je postavljen sterilan filter, promera pora 0.45  $\mu\text{m}$ , prečnika 25 mm (mdc Syringe Filters SY25PN-S, India) i profiltrovan kompletan sadržaj. Po završenoj filtraciji filter je ubačen u širu sterilnu posudu koja je iza toga nalivena sa 9 ml TPGY bujona.

Posude sa TPGY bujonom i filtrima inkubirane su na temperaturi od  $37\pm 1$  °C (*C. botulinum* grupa I) i  $30\pm 1$  °C (*C. botulinum* grupa II), anaerobno u narednih pet dana. Po završenoj inkubaciji uzeto je po 1 ml iz svake posude, prebačeno u epruvete sa po 9 ml TPGY bujona i epruvete inkubirane preko noći, 14-16 h, pod istim uslovima.

Iz navedenog sadržaja je rađena izolacija *C. botulinum* na Zeissler-ovom krvnom i žumancetnom agaru odnosno prečišćavanje i ekstrakcija nukleinske kiseline za PCR.

#### **4.2.2. PRIPREMA UZORAKA MEDONOSNIH PČELA ZA UTVRĐIVANJE PRISUSTVA SPORA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM***

Pre obrade, uzorci leševa medonosnih pčela držani su preko noći u anaerobnim uslovima kako bi se uklonio višak kiseonika. U tom cilju korišćeni su anaerobni lonci (BBL GasPak Anaerobic Jars, USA) sa gas-pak kesicama (Anaerocult A, Merck, Nemačka). Priprema uzoraka medonosnih pčela obuhvatila je pripremu predrasređenja svakog uzorka u duplikatu (1 g uzorka medonosnih pčela + 9 ml peptonskog slanog rastvora). Svi uzorci pripremani su u duplikatu radi paralelnog praćenja *C. botulinum*, grupa I i II. Po izvršenoj homogenizaciji sterilnim staklenim štapićem, sadržaj je inkubiran u vodenom kupatilu na temperaturi 70 °C u trajanju od 30 minuta da bi bili eliminisani vegetativni oblici bakterija. Po inkubiranju sadržaj je profiltrovan kroz sterilnu gazu u sterilne epruvete i centrifugovan 30 minuta na 8000 rpm. Odliven je supernatant, a u precipitat dodato je 9 ml TPGY bujona, promućkano i inkubirano na temperaturi  $37\pm 1$  °C i  $30\pm 1$  °C, anaerobno u narednih pet dana. Nakon završene inkubacije, iz svake epruvete uzeto je po 1 ml sadržaja i prebačen ponovo u epruvete sa po 9 ml TPGY bujona, a epruvete inkubirane 14-16 h pod istim uslovima.



Kao i kod uzoraka meda i u ovom slučaju ovako pripremljen materijal, od uzoraka medonosnih pčela, korišćen je za metode klasične mikrobiološke izolacije odnosno obradu uzoraka za ispitivanje primenom metode PCR-a, a u cilju utvrđivanja prisustva spora *C. botulinum*.

#### **4.2.3. AKTIVIRANJE REFERENTNOG SOJA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* NCTC 7272**

Aktiviranje referentnog soja *C. botulinum* NCTC 7272 izvršeno je u laminarnoj komori, nivoa biosigurnosti A2 (HeraSafe KS 12, Nemačka). Po otvaranju, u ampulu sa liofilizovanim sadržajem (*C. botulinum*, NCTC 7272) dodato je 0.5 ml hranljivog bujona. Po rastvaranju i homogenizaciji liofilizata izvršeno je zasejavanje sadržaja na jedan tečni i jedan čvrsti hranljivi medijum. Zasejane su tri epruvete sa po 9 ml hranljivog bujona i tri ploče Zeissler-ovog krvnog agara. Sva zasejavanja su rađena platinastom omčicom, promera 10 µl. U cilju obezbeđenja anaerobnih uslova korišćeni su anaerobni lonci (BBL GasPak Anaerobic Jars, USA) sa gas-pak kesicama (Anaerocult A, Merck, Nemačka). Navedeni, hranljivi medijumi su inkubirani anaerobno u vremenu od 72 h. Po završenoj inkubaciji, iz tečnih hranljivih podloga rađeno je presejavanje, metodom iscrpljenja na Zeissler-ov krvni agar. U oba slučaja, posle inkubacije od 72 h u anaerobnim uslovima i dobijanju čistih kultura i pojedinačnih kolonija sa Zeissler-ovog krvnog agara, rađena je kulturelna, mikroskopska, biohemijska i molekularna identifikacija i determinacija referentnog soja.

#### **4.2.4. KONTAMINACIJA UZORKA MEDA REFERENTNIM SOJEM *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* NCTC 7272**

Za namernu kontaminaciju je izabran uzorak bagremovog meda pri čemu je pre laboratorijske obrade izvršena sterilizacija u autoklavu na temperaturi od 121 °C u vremenu od 3 minuta, a u cilju izbegavanja mogućnosti dobijanja lažno negativnih rezultata (123). Pre početka ispitivanja izvršena je provera odsustva ciljnog

mikroorganizma u uzorku meda, analizom 6 subjedinica iz istog uzorka (pakovanje od 1. kg), metodom Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja sulfitoredujućih bakterija koje rastu pod anaerobnim uslovima (SRPS EN ISO 15213:2011) i metodom PCR-a.

U kontaminaciji uzoraka meda korišćen je međunarodni standard ISO/TR 13843:2000(E), Kvalitet vode - Smernice za validaciju mikrobioloških metoda (ISO/TR 13843:2000-06 (E) Water quality - Guidance on validation of microbiological methods) (198).

Za pripremanje namerno kontaminiranih uzorka meda izabran je referentni soj *C. botulinum* NCTC 7272, zasejan u TPGY bujon i inkubiran anaerobno 48 časova na temperaturi od 37 °C. Iz bujonske kulture zasejane su, metodom ispljenja, ploče Zeissler-ovog krvnog agara i inkubirane 48 časova na temperaturi od 37 °C, takođe anaerobno. Po inkubaciji, sa ploče je uzeta po jedna kolonija i suspendovana u TPGY bujon koji je inkubiran pod anaerobnim uslovima na temperaturi od 37 °C u narednih 24 časa.

Iz inkubiranog TPGY bujona uzet je 1ml (približno  $10^9$  CFU/ml) i prenet u 9 ml fiziološkog rastvora. Izvršena je homogenizacija na električnoj vibracionoj mešalici (Tehtnica, Slovenija) i na taj način dobijeno razređenje  $10^{-1}$ . Na isti način napravljena je serija razređenja do  $10^{-9}$ . Istovremeno po 1 ml svakog razređenja preneto je u četiri niza sterilnih epruveta. U sve epruvete naliven je otopljeni i na 44-47 °C ohlađeni gvožđe-sulfit agar tako da je visina stubića u epruveti iznosila 130 mm. Sadržaj epruveta promešan je balgim okretanjem epruveta među dlanovima ruku a zatim ostavljen da se očvrstne u hladnom vodom kupatilu. Po hlađenju u epruvete je dodato još po oko 2 ml sulfitnog agara, a ta naknadno dodata količina je imala funkciju čepa i kada se agar očvrstnuo zasejane epruvete su inkubirane 24 i 48 sati na  $37 \pm 1$  °C. Epruvete sa karakterističnim crnim kolonijama, u dubini podloge, smatrane su za kolonije klostridija. Od crnih kolonija napravljen je preparat i obojen po Gramu, a istovremeno ista kolonija zasejana na krvni agar i inkubirana aerobno na temperaturi od  $37 \pm 1$  °C, 48h (provera da li eventualno ima bakterija koje proizvode  $H_2S$  a nisu sulfitoredujuće klostridije). Prisustvo Gram pozitivnih štapića uglavnom bez spora uz istovremen izostanak rasta na krvnom agaru inkubiranom aerobno smatrao se dokazom prisustva *C.*

*botulinum*, koji je potom potvrđen i molekularno, metodom PCR-a. Izbrojane su kolonije u epruvetama, u onom razređenju gde su kolonije bile jasno vidljive (Tabela 8).

Tabela 8. Ukupan broj *C. Botulinum* u različitim razređenjima

Razređenje	CFU/ml
1ml razređenja $10^{-5}$	> 150
1ml razređenja $10^{-6}$	53.75
1ml razređenja $10^{-7}$	7.75
1ml razređenja $10^{-8}$	1.75

Uzorci meda mase 25 g namerno su kontaminirani različitim razređenjima *C. botulinum* tako da su dobijena četiri različita kontaminirajuća nivoa, kontrolnih, sigurno pozitivnih uzoraka meda, što je prikazano u tabeli 9.

Tabela 9. Razređenja i novoi kontaminacije

Nivo kontaminacije	Dodato razređenje u ml
Kontaminacija sa 0.1-1 CFU/g	razređenja $10^{-6}$ u 25 g meda
Kontaminacija sa 1-5 CFU/g	razređenja $10^{-6}$ u 25 g meda
Kontaminacija sa 5-10 CFU/g	razređenja $10^{-6}$ u 25 g meda
Kontaminacija sa 100 CFU/g	razređenja $10^{-6}$ u 25 g meda

Na opisan način dobijeni su sledeći kontrolni uzorci meda odnosno uzrci meda koji su služili kao sigurno pozitivni i sigurno negativni uzorci.

- 0 - nekontaminirani uzorci/negativna kontrola
- I - vrlo nizak nivo kontaminacije 0.1-1 CFU/g;
- II - nizak nivo kontaminacije 1-5 CFU/g;
- III - intermedijaran nivo kontaminacije 5-10 CFU/g;
- IV - visok nivo kontaminacije 10-50 CFU/g.

U otkrivanju prisustva *C. botulinum* u nekontaminiranim i namerno kontaminiranim, kontrolnim uzorcima meda, primenjena je horizontalna metoda za

određivanje broja sulfitoredujućih bakterija koje rastu pod anaerobnim uslovima - SRPS ISO 15213:2011.

Pre kontaminacije, a u cilju homogenizacije, odmereni uzorci meda (25 g meda i 225 ml 1% Tween 80 u sterilnom peptonskom slanom rastvoru, razređenje  $10^{-1}$ ) su zagrejani u vodenom kupatilu na temperaturi od 45 °C, u trajanju od 30 minuta radi homogenizacije. Ovako pripremljen sadržaj je pre obrade, dodatno homogenizovan na horizontalnoj mešalici/šejkeru (LT2, Češka) u vremenu od 5 minuta. Po završenoj homogenizaciji i namernoj kontaminaciji, pipetom sa nastavkom, prenet je 1 ml sadržaja u epruvetu sa sa 9 ml peptonskog slanog rastvora i epruveta homogenizovana na električnoj vibracionoj mešalici i na taj način dobijeno razređenje  $10^{-2}$ . Na isti način napravljena je serija razređenja do  $10^{-3}$ . Po 1 ml razređenja  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$  preneto je u po jednu sterilnu epruvetu. U sve epruvete naliven je otopljeni i na 44-47 °C ohlađeni gvožđe-sulfit agar tako da je visina stubića u epruveti iznosila 130 mm. Sadržaj epruveta promešan je balgim okretanjem epruveta među dlanovima ruku a zatim ostavljen da se očvrstne u hladnom vodom kupatilu. Po hlađenju u epruvete je dodato još po oko 2 ml sulfitnog agara, a ta naknadno dodata količina je imala funkciju čepa i kada se agar očvrstnuo zasejane epruvete su inkubirane 24 i 48 sati na  $37 \pm 1$  °C. Epruvete sa karakterističnim crnim kolonijama, u dubini podloge, smatrane su za kolonije klostridija. Od crnih kolonija napravljen je preparat i obojen po Gramu, a istovremeno ista kolonija zasejana na krvni agar i inkubirana aerobno na temperaturi od  $37 \pm 1$  °C, 48h (provera da li eventualno ima bakterija koje proizvode  $H_2S$  a nisu sulfitoredujuće klostridije). Prisustvo Gram pozitivnih štapića uglavnom bez spora uz istovremen izostanak rasta na krvnom agaru inkubiranom aerobno smatrao se dokazom prisustva *C. botulinum*, koji je potom potvrđen i molekularno, metodom PCR-a.

Kontaminirani uzorci meda laboratorijski su obrađeni i metodom PCR-a. U pripremi kontaminiranih uzoraka meda za metodu PCR-a korišćena je kombinacija metoda centrifugovanja i membranske filtracije.

#### **4.2.5. POTVRĐIVANJE REFERENTNOG SOJA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* NCTC 7272**

Posle aktiviranja i primarne mikrobiološke obrade referentnog soja *C. botulinum* NCTC 7272 odnosno po dobijanju čistih kultura i pojedinačnih kolonija sa Zeissler krvnog agara, rađena je kulturelna, mikroskopska, biohemijska i molekularna identifikacija i determinacija referentnog soja. Navedene kolonije su bile okruglaste, blago ispupčene, neprozirne, nepravilnih ivica, neravne površine, veličine od 0.5 do 5 mm, sivo-beličaste boje, neprozirne, slabo hemolitičke. Bojenjem napravljenog mikroskopskog preparata, od svežih kultura, metodom po Gram-u, zapaženo je prisustvo uniformnih Gram pozitivnih štapićastih formacija, dužine oko 4-5  $\mu\text{m}$ . Izvršena je i biohemijska potvrda dobijenog izolata na Api 20 A sistemu (105). Referentni soj *C. botulinum*, NCTC 7272 je u više navrata potvrđen i primenom metode PCR-a pri čemu su uvek dobijeni genski fragmenati od 782 bazna para (bp).

#### **4.2.6. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* U UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA PRIMENOM KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH METODA**

Iz pripremljenih uzoraka meda i medonosnih pčela vršeno je zasejavanje na Zeissler-ov krvni i žumancetni agar. Ploče su u vremenu od 48 časova inkubirane anaerobno na temperaturi od  $37\pm 1$  °C. Nakon inkubacije, izrasle kolonije su ispitivane kulturelno i mikroskopski, a identifikacija izolovanih klostridija vršena je na BBL i Api 20 A sistemima (71, 135, 136).

Svi uzorci meda su ispitani na prisustvo sulfitoredukujućih klostridija i standardnom metodom SRPS ISO 15213:2011 (Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja sulfitoredukujućih bakterija koje rastu pod anaerobnim uslovima).

#### 4.2.7. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA *CLOSTRIDIJUM BOTULINUM* U UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA, METODOM PCR

U cilju detekcije DNK *C. botulinum* primenjena je metoda detekcije *C. botulinum* metodom multipleks PCR-a u hrani i fecesu, opisana od strane Miia-e Lindström i saradnika, 2006. godine (109, 135, 136).

Nakon obrade uzoraka meda i medonosnih pčela, a posle primarnog i sekundarnog obogaćenja uzeto je po 1 ml TPGY (uzorka) za prečišćavanje i ekstrakciju nukleinske kiseline (DNK), a u cilju izvođenja PCR-a. Po 1 ml je prebačeno u Eppendorf epruvete i centrifugovano 3 minuta na 18000 rpm. Odliven je supernatant a u Eppendorf epruvete dodato po 1 ml TE pufera i inkubirano na 37±1 °C, 1 h, a zatim centrifugovano 3 minuta na 18000 rpm. Odliven je supernatant, a u talog je dodato 1 ml sterilne dejonizovane vode PCR čistoće, inkubirano 5 minuta na temperaturi od 95 °C (oslobađanje DNK), a zatim je ekstrahovana DNK čuvana na temperaturu od -20 °C do početka rada PCR-a. Po odmrzavanju, po 1 µl navedenog ćelijskog ekstrakta je korišćeno kao ispitivani uzorak DNK u reakciji PCR-a.

Korišćeni prajmeri u reakciji PCR-a i očekivane veličine njihovih fragmenata prikazani su u tabeli 10 (108).

Tabela 10. Prajmeri korišćeni u reakciji PCR-a

Deo genoma	Smer reakcije	Sekvenca prajmera (5'–3')	Veličina PCR produkta (bp)
<i>BontA</i>	→	AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT	782
	←	CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG A	
<i>BontB</i>	→	CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA	205
	←	CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG	
<i>BontE</i>	→	CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA	389
	←	GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA	
<i>BontF</i>	→	CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA	543
	←	TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT	

Reakciona smeša je pripremana istovremeno za sve uzorke u reakciji multipleks PCR-a. Sastav reakcione smeše, po ispitivanom uzorku, bio je sledeći: 25 µl mastermiksa, 8 x 0.26 µl prajmera (koncentracija 50 µM), 22 µl H<sub>2</sub>O i 1 µl ekstrahovane DNK iz ispitivanog uzorka. U multipleks PCR-u korišćeni su genomi DNK *bontA*, *bontB*, *bontE* i *bontF* za detekciju *C. botulinum* tipova A, B, E i F u 50 µl zapreminskoj reakciji gde je dodato po 1 µl ćelijskog ekstrakta. (108). U finalnoj reakcionoj smeši, od 50 µl nalazilo se 1.25 U polimeraze, po 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub> i 0.26 mM svakog od prajmera.

U svim uzorcima gde je utvrđeno prisustvo genoma odgovarajuće veličine za *C. botulinum* tipova A, B, E i F rađen je PCR sa prajmerima samo za dobijeni tip *C. botulinum*.

PCR ciklus je započet inicijalnom denaturacijom, u termalnom sajkleru na temperaturi 95 °C, u vremenskom periodu od 4 minuta. PCR se odvijao u 40 ciklusa. Denaturacija se odvijala na temperaturi od 95 °C u vremenskom periodu od 30 s, vezivanja prajmera (annealing) na temperaturi od 60 °C u trajanju od 30 s, kopiranja DNK lanaca (elongacija) na temperaturi od 72 °C i vremenu od 90 s i na kraju finalne elongacije, vreme trajanja 5 minuta na temperaturi od 72 °C. Korišćen je PCR termalni sajkler 2720, Applied Biosystems, USA.

Razdvajanje fragmenata DNK molekula, dobijenih PCR proizvoda, izvođeno je metodom horizontalne elektroforeze u 2% agarozu-gelu, na uređaju E-Gel iBase Power System, Israel, struji 48 V, 0.8 A, 50/60 Hz i preporučenom vremenu od 26 minuta. U pločama gela se nalazio ethidium bromid u koncentraciji od 0.2 µg/ml. Po 20 µl ispitujućih uzoraka (PCR proizvoda) direktno je nanošeno u bazenčiće E-Gel-a bez mešanja sa loading bufferom (loading buffer se nalazio u mastermiksi).

Očitavanje rezultata obavljeno je prosvetljavanjem 2% agarozu-gela u komori za fotografisanje gela (Gel Doc XR System with Image Lab, Bio-Rad, USA), uz primenu UV zraka.

#### **4.2.8. UTVRĐIVANJE NAJVEROVATNIJEG MOGUĆEG BROJA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* U POZITIVNIM UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA (MPN METODA)**

Za određivanje broja spora *C. botulinum* u uzorcima meda i medonosnih pčela, korišćena je metoda utvrđivanja najverovatnijeg mogućeg broja (MPN). Svaki uzorak meda i medonosnih pčela tri puta je pripremljen i obrađen na prisustvo spora *C. botulinum*, metodom PCR-a. MPN metoda je primenjen za procenu broja spora u uzorcima koji su pokazali pozitivnu reakciju na prisustvo genskih fragmenata *C. botulinum* u bilo kom od ova tri ponavljanja (80).

Kada se očekuju niske koncentracije mikroorganizama, ili se očekuju samo umerene razlike, u MPN metodologiji se koristi inokulacioni sistem jednostrukih serija, jednakih test količina. Imajući u vidu rezultate više studija, a i rezultate naših dosadašnjih ispitivanja da se metodama klasične mikrobiološke dijagnostike dosta retko utvrđuje prisustvo sulfitoredukujućih bakterija (*C. botulinum*) u medu, kod proračuna broja spora je korišćen sistem jednostrukih serija, jednakih test količina. Procena broja spora izračunata je tako što su svi pozitivni uzorci obrađeni u jednostrukom razblaženju (140). Pozitivni uzorci meda su obrađeni u 20 replikata, a uzorci medonosnih pčela u 10 replikata. U ovom slučaju broj spora je proračunat i usaglašen korišćenjem MPN tabela (43).

## **5. REZULTATI RADA**

### **5.1. REZULTATI ISPITIVANJA UZORKA MEDA KONTAMINIRANOG REFERENTNIM SOJEM *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* NCTC 7272**

Nakon aktiviranja referentnog soja urađena je njegova biohemijska identifikacija na Api 20 A sistemu u cilju provere čistoće i vijabilnosti soja. Takođe, vijabilnost soja je proveravana i metodom PCR-a. Metodom PCR-a svaki put je potvrđen, proteolitički referentni soj *C. botulinum* NCTC 7272, tip A, dobijanjem DNK fragmenta od 782 bp.



Primenom metode SRPS ISO 15213:2011 utvrđeno je da se *C. botulinum* u namerno kontaminiranim uzorcima meda ne može otkriti primenom klasičnih mikrobioloških metoda jer one nisu dovoljno osetljive. Rezultati ovog dela ispitivanja prikazani su tabelarno u tabeli 11.

Tabela 11. Broj pozitivnih i negativnih uzoraka po inokulacionom nivou

Nivo kontaminacije	Broj uzoraka	Pozitivno	Negativno
0 - Negativna kontrola/nekontaminirani uzorci	20	0	20
I - Vrlo nizak nivo (0.1-1 CFU/g)	20	0	20
II - Nizak nivo (1-5 CFU/g)	20	0	20
III - Intermedijarni nivo (5-10 CFU/g)	20	3	17
IV - Visok nivo (10-50 CFU/g)	20	7	13

Od ukupno 80 uzoraka meda kontaminiranih *C. botulinum*, sa četiri inokulaciona nivoa, u 10 uzoraka od kojih u tri sa intermedijarnim nivoom i sedam sa visokim nivoom kontaminacije utvrđeno je prisustvo *C. botulinum*, metodom SRPS ISO 15213:2011.

Primenom metode PCR-a, u svim namerno kontaminiranim uzorcima meda, svih nivoa kontaminacije, utvrđeno je prisustvo spora *C. botulinum*.

## **5.2. REZULTATI ISPITIVANJA PRISUSTVA SPORA *CLOSTRIDIJUM BOTULINUM* U UZORCIMA MEDA**

Od ispitanih 59 uzoraka meda, u 5 uzorka je ustanovljeno je prisustvo spora *C. botulinum*, metodom PCR-a.

Primenom klasičnih metoda mikrobiologije, na Zeissler krvnom i EYA agaru, u navedenim uzorcima meda nije ustanovljeno prisustvo spora *C. botulinum*.

Svi navedeni uzorci meda su ispitani na prisustvo sulfitoredujućih klostridija i metodom SRPS ISO 15213:2011. Ni u jednom od ispitanih uzoraka meda, navedenom kvalitativno-kuantitativnom metodom, nije utvrđeno prisustvo spora klostridija.

Rezultati ispitivanja uzoraka meda u kojima je utvrđeno prisustvo i određeni tipovi *C. Botulinum*, primenom metode PCR, prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Broj i tip *C. botulinum* detektovani iz uzoraka meda, primenom metode PCR

Broj i oznaka uzorka	Vrsta meda	Tip <i>C. botulinum</i>
4 – 3888	Bagrem	A, E
7 – 4630	Bagrem	B
20 – 6344	Šumski	E
23 – 5034/5	Bagrem	A, B, E
29 – 5480/4	Livada (poliflorni)	A, E

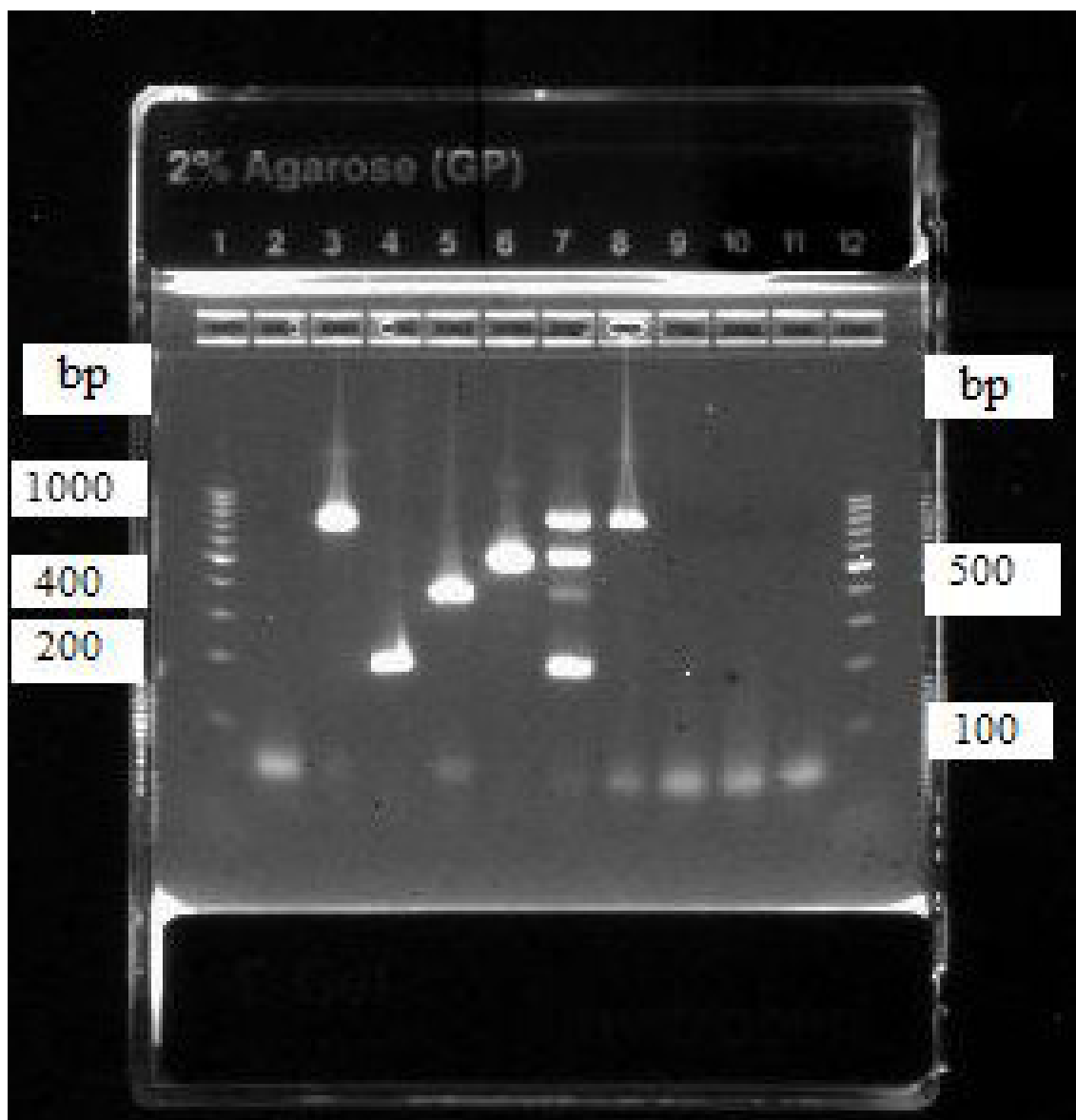
Primenom metode PCR-a *C. botulinum* je detektovan u pet uzoraka meda, na području pet opština. U jednom uzorku meda detektovane su spore tri tipa *C. botulinum*, u dva uzorka spore dva tipa i u dva uzorka detektovane su spore po jednog tipa *C. botulinum*.

Rezultati ispitivanja uzoraka meda, u kojima je utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum*, po vrstama meda i opštinama, prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Oznaka uzorka, vrsta meda i opština detekcije spora *C. botulinum*, u uzorku meda

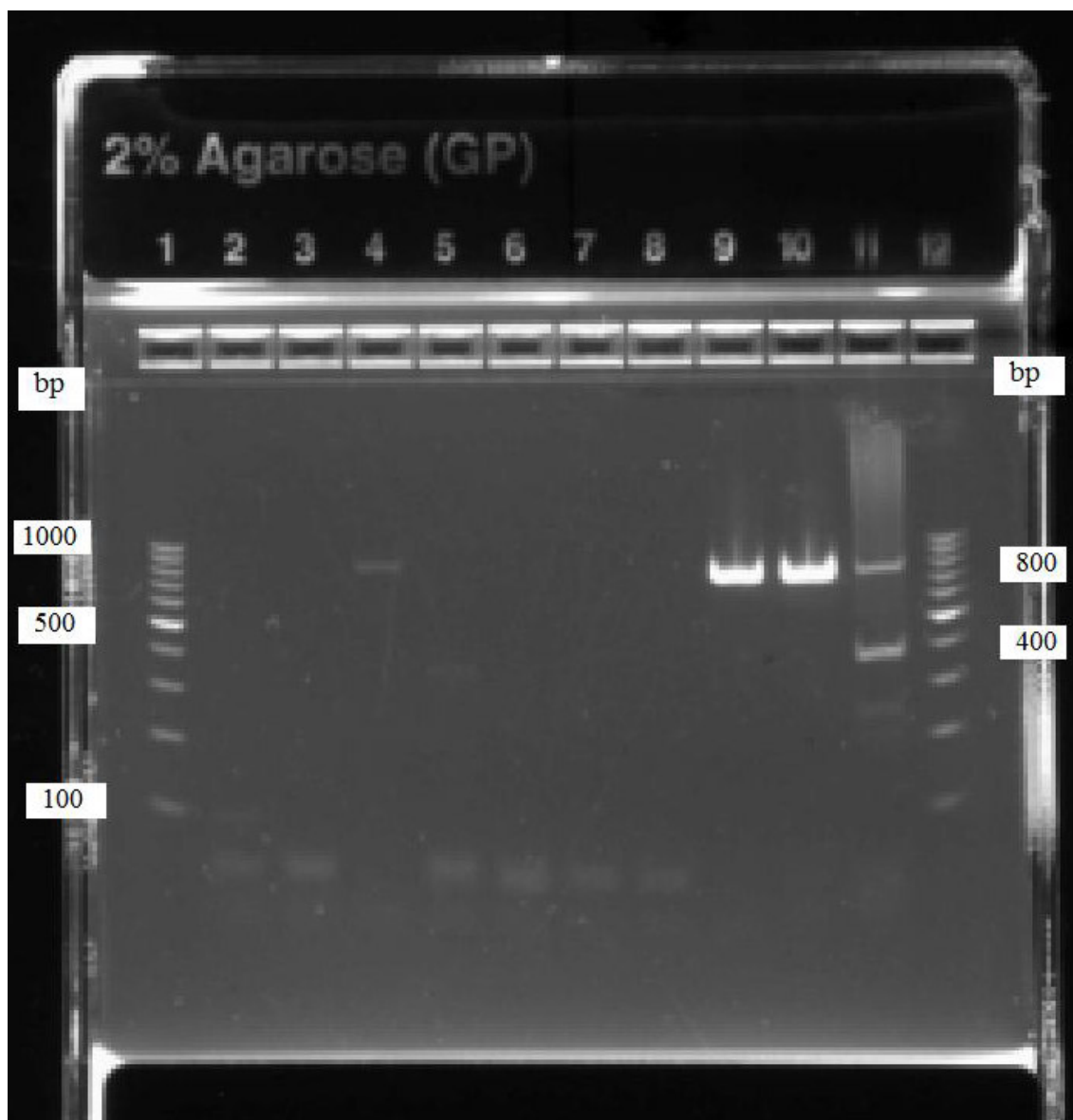
Broj i oznaka uzorka	Vrsta meda	Opština
4 – 3888	Bagrem	Lazarevac
7 – 4630	Bagrem	Kruševac
20 – 6344	Šumski	Savski Venac (Beograd)
23 – 5034/5	Bagrem	Arilje
29 – 5480/4	Livada (poliflorni)	Kraljevo

Sa pčelinjaka, opština Savski Venac i Kraljevo, u kojima je utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum*, za laboratorijsku analizu uzorkovani su i leševi medonosnih pčela. U leševima medonosnih pčela, navedenom metodologijom, nije utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum*. Deo potvrdnih ispitivanja utvrđivanja prisustva spora *C. botulinum*, u uzorcima meda, primenom metode PCR i multipleks PCR-a, prikazan je na slici 6.

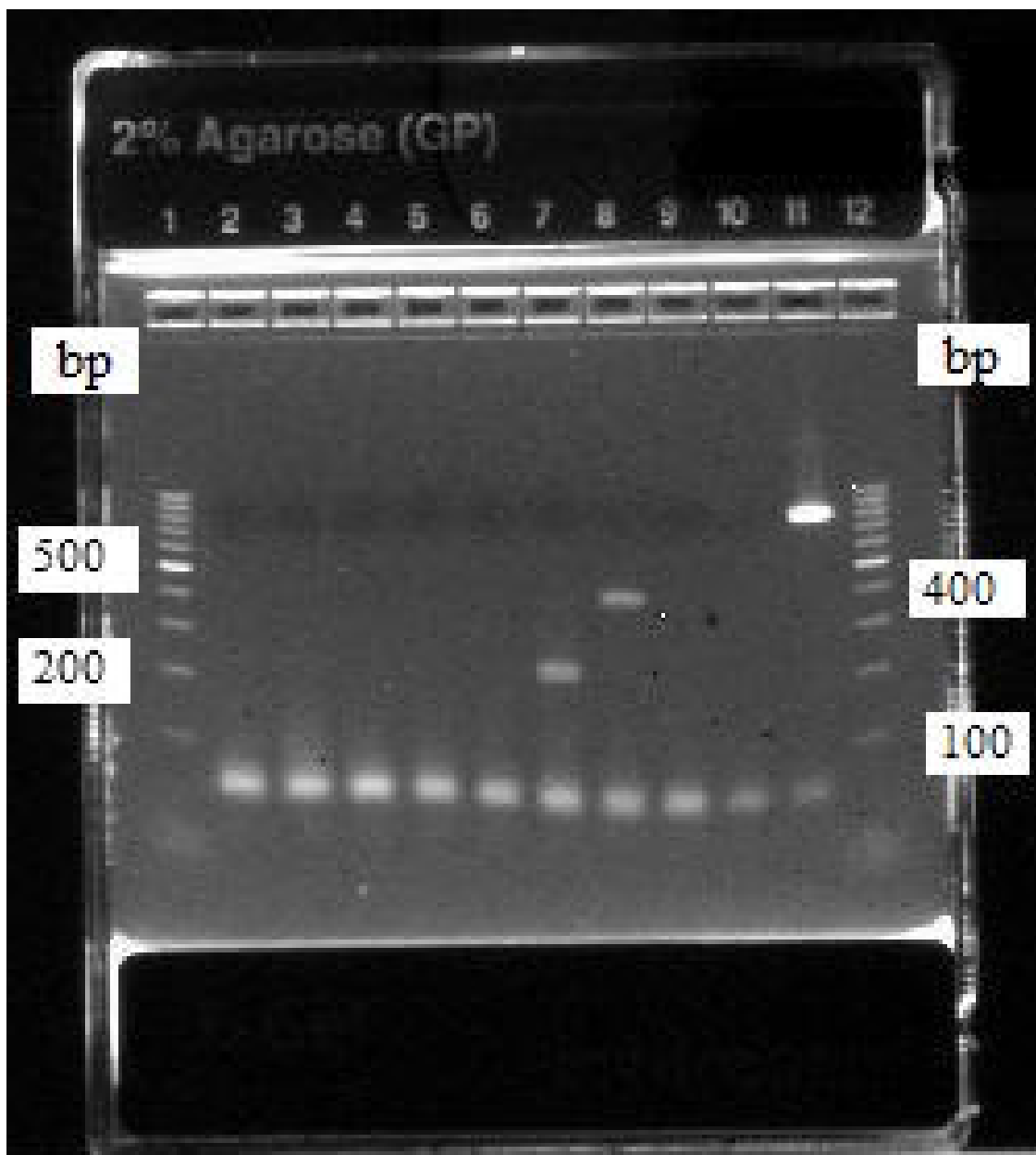


Slika 6. PCR i multipleks PCR detekcija sigurno pozitivnih uzoraka *C. botulinum* tipa A, B, E i F (kontrola ekstrakcije i PCR-a): kolone 1 i 12, DNK markeri, Ladder 10x100 bp; 2 NC - negativna kontrola; 3 PC - pozitivna kontrola *C. botulinum* tip A, fragment DNK veličine 782 bp; 4 PC - pozitivna kontrola *C. botulinum* tip B, fragment DNK veličine 205 bp; 5 PC - pozitivna kontrola *C. botulinum* tip E fragment DNK veličine 389 bp; 6 PC - Pozitivna kontrola *C. botulinum* tip F fragment DNK veličine 543 bp; 7 PC - pozitivna kontrola *C. botulinum* tip A, F, E, B, fragmenti DNK veličine 782, 543, 389 i 205 bp; 8 PC - pozitivna kontrola, referentni soj *C. botulinum* tip A NCTC 7272, fragment DNK veličine 782 bp; 9, 10 i 11 ispitujući uzorci meda koji su reagovali negativno na prisustvo spora *C. botulinum* (odsustvo PCR proizvoda)

Deo rezultata ispitivanja prisustva spora *C. botulinum* u uzorcima meda prikazan je na slikama 7 i 8.



Slika 7. Mutipleks PCR detekcija *C. botulinum* u uzorcima meda: kolone 1 i 12 DNK markeri, Ladder 10x100 bp; 2, 3 NC - negativna kontrola; 4 namerno kontaminiran uzorak ispitujućeg meda sa 0.5 CFU/g, referentnim sojem *C. botulinum* tip A, NCTC 7272, fragment DNK veličine 782 bp; 5-8 negativni ispitujući uzorci meda, odsustvo PCR proizvoda; 9 PC - pozitivna kontrola, *C. botulinum* tip A, fragment DNK veličine 782 bp; 10 PC - pozitivna kontrola, referentni soj *C. botulinum* tip A, NCTC 7272, fragment DNK veličine 782 bp; 11 pozitivan ispitujući uzorak meda, prisustvo PCR proizvoda *C. botulinum* tip A, E, fragmenti DNK veličine 782 i 389 bp



Slika 8. Mutipleks PCR detekcija *C. botulinum* u uzorcima meda: kolone 1 i 12 DNK markeri, Ladder 10x100 bp; 2-6, 9 negativni ispitujući uzorci meda, odsustvo PCR proizvoda; 7 pozitivni uzorak ispitujućeg meda, prisustvo PCR proizvoda *C. botulinum* tip B, fragment DNK veličine 205 bp; 8 pozitivni uzorak ispitujućeg meda, prisustvo PCR proizvoda *C. botulinum* tip E, fragment DNK veličine 389 bp; 10 NC - negativna kontrola; 11 PC - pozitivna kontrola, referentni soj *C. botulinum* tip A, NCTC 7272, fragment DNK veličine 782 bp

### 5.3. REZULTATI KVANTITATIVNOG UTVRĐIVANJA UKUPNOG BROJA SPORA *CLOSTRIDIJUM BOTULINUM* U UZORCIMA MEDA, METODOM MPN

U svim uzorcima meda u kojima je kvalitativno, metodom PCR-a, utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum* izvršeno je kvantitativno ispitivanje ukupnog broja spora i tipa *C. botulinum*, metodom MPN.

Rezultati kvantitativnog ispitivanja uzoraka meda, u kojima je utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum*, prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Broj utvrđenih spora i tip *C. botulinum*, u PCR pozitivnim uzorcima meda, utvrđen metodom MPN

Broj i oznaka uzorka	Broj spora i tip <i>C. botulinum</i> u okviru 20 ponovljenih ispitivanja	MPN broj/kg
4 – 3888	5 (2A, 3E)	116
7 – 4630	6 (6B)	144
20 – 6344	8 (8E)	204
23 – 5034/5	3 (1A, 1B, 1E)	64
29 – 5480/4	1 (A, E)	20

### 5.4. REZULTATI ISPITIVANJA MEDONOSNIH PČELA NA PRISUSTVO SPORA *CLOSTRIDIJUM BOTULINUM*

Od ispitanih 61. uzorka medonosnih pčela, u jednom uzorku, oznake 4880 i jedn put u okviru 10 ponavljenih ispitivanja, vezano za utvrđivanje MPN broja, utvrđeno je prisustvo spora *C. botulinum* tipa E, metodom PCR-a. Navedeni uzorak medonosnih pčela je sa pčelinjaka iz opštine Aleksandrovac. Sa istog pčelinjaka nije laboratorijski obrađen uzorak meda.

Kvalitativnim metodama izolacije na Zeissler krvnom i EYA agaru, po obogaćenju, u svim ispitanim uzorcima medonosnih pčela nije ustanovljeno prisustvo spora *C. botulinum*.

Broj spora u navedenom uzorku, određen metodom MPN-a, iznosio je 110/kg.

## 6. DISKUSIJA

Zbog bioloških i biohemijskih karakteristika, stepena i načina disperzije, prirode matriksa u kom se nalazi, utvrđivanje uzročnika botulizma, u uzorcima meda oduvek je predstavljalo problem (122). Na to ukazuju i rezultati naših ispitivanja.

Razlozi nemogućnosti detektovanja spora *C. botulinum* u uzorcima meda, metodama klasične mikrobiološke dijagnostike leže u činjenici da je med po svojoj prirodi, sastavu i fizičko-hemijskim svojstvima inhibitorni matriks kako za održavanje vegetativnih oblika i spora bakterija, tako i za laboratorijsku obradu uzoraka (135, 170). Veliki viskozitet meda, usled visokog sadržaja šećera i malog sadržaja vode, dovodi do neravnomernog raspoređivanja spora *C. botulinum* što značajno otežava pripremu, obradu i korišćenje uzoraka meda, kako u primeni klasičnih tako i molekularnih metoda laboratorijske dijagnostike (38, 122, 135, 136, 138). Sve to u laboratorijskim ispitivanjima može dovesti do lažno negativnih rezultata kako u primeni klasičnih tako i molekularnih metoda ispitivanja što je potvrđeno i u radovima drugih autora (122, 135, 136, 138). PCR se pokazao kao značajno osetljivija metoda za detekciju spora *C. botulinum*, u uzorcima meda ali se i primenom ove metode mogu dobiti lažno negativni rezultati. Neravnomerna distribucija spora *C. botulinum*, u uzorcima meda, otežava i kvantitativno ispitivanje tako da i u ovom ispitivanju možemo očekivati pojavu lažno negativnih rezultata (122).

Ni u jednom od ispitanih uzoraka meda i medonosnih pčela, primenom klasičnih mikrobioloških metoda nije utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum* (SRPS ISO 15213:2011 i izolacija na Zeissler krvnom odnosno EYA agaru).

U namerno kontaminiranim uzorcima meda, koji su služili kao pozitivne kontrole, kvalitativno-kvantitativnom metodom SRPS ISO 15213:2011, utvrđeno je prisustvo *C. botulinum* u tri uzorka sa intermedijarnim i sedam uzoraka sa visokim nivoom kontaminacije (Tabela 11). U svim ostalim kontaminiranim uzorcima meda dobijeni su lažno negativni rezultati. Ovi rezultati ukazuju na to da klasične metode mikrobiologije nisu adekvatne za izolaciju *C. botulinum* iz uzoraka meda i medonosnih pčela jer nisu dovoljno osetljive i mogu da daju lažno negativne rezultate, posebno u uzorcima niskog stepena kontaminacije.

U svim namerno kontaminiranim uzorcima meda, uključujući i uzorak vrlo niskog nivoa kontaminacije, primenom metode PCR-a, uz prethodno predobogaćenje (priprema uzoraka meda kombinacijom centrifugovanja i membranske filtracije), utvrđeno je prisustvo spora *C. botulinum*. Naši rezultati se podudaraju sa rezultatima Mari Nevas i saradnika koji su 2002. godine ustanovili da je PCR dovoljno osetljiva metoda da detektuje čak mali broj spora (0.1 spora/g) u medu (135).

Viši nivo osetljivosti, metoda PCR je pokazala i kod analize 59 uzoraka meda sa šireg područja Republike Srbije. U pet uzoraka meda utvrđeno je prisustvo spora *C. botulinum*. Navedenom metodom prisustvo spora *C. botulinum* je utvrđeno i u jednom uzorku medonosnih pčela. Navedeni rezultati se podudaraju sa rezultatima drugih autora koji su vršili ispitivanje prisustva spora u uzorcima meda i medonosnih pčela (114, 135, 136, 138).

Sa pet pčelinjaka, na laboratorijska ispitivanja je dostavljeno devet uzoraka meda i medonosnih pčela. U dva uzorka meda utvrđeno je prisustvo spora *C. botulinum*, dok u preostalim uzorcima meda i medonosnih pčela, nije utvrđeno prisustvo spora navedenog uzročnika. Imajući u vidu navedene rezultate kao i činjenicu da je u većem broju uzoraka meda (pet od pedesetdevet) utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum* nego u uzorcima medonosnih pčela (jednom od šezdesetjednog ispitanog uzorka), kontaminacija uzoraka meda je najverovatnije i najčešće nastajala sekundarno. Na tu mogućnost ukazuju brojni, mogući putevi kontaminacije, koji su sastavni deo pčelarske tehnologije i prakse na koje ljudski faktor može uticati, a gde između ostalog spadaju: mesto i položaj pčelinjaka; mesto, vrsta i uslovi pčelinje paše; način i vrsta ishrane i napajanja pčelinjih zajednica; način i uslovi pripreme voštano-satnih osnova; način, mesto i uslovi ekstrakcije meda. To je potvrđeno i rezultatima ispitivanja Mari Nevas i saradnika 2006. godine (138).

Prevalencija *C. botulinum*, u uzorcima meda na ispitivanom području je 8.47 % (od 59 ispitanih uzoraka u 5 uzoraka je utvrđeno prisustvo spora *C. botulinum*). Prema dostupnim rezultatima dosadašnjih studija prevalencija *C. botulinum* u medu se kretala od 1 do 26% (Tabela 4).

Prevalencija *C. botulinum* u uzorcima medonosnih pčela, na ispitivanom području, je 1.64 % (od 61. ispitanog uzorka u 1. uzorku je utvrđeno prisustvo spora *C.*



*botulinum*). Prema dostupnim rezultatima dosadašnjih studija prevalencija *C. botulinum* u medonosnim pčelama se kretala od 7 do 16% (138).

U ispitanim uzorcima meda utvrđeno je prisustvo spora *C. botulinum* tipova A, B i E. U istom uzorku su detektovane spore *C. botulinum* tipova A, B i E, odnosno spore *C. botulinum* tipova A i E (Tabele 12 i 14). U nekoliko ispitivanja, metodom multipleks PCR, istovremeno je dokazano prisustvo dva tipa u subjedinici istog uzorka (spore *C. botulinum* tipa A i E), dok je u više ponavljanja dokazano prisustvo jednog tipa (Tabele 12 i 14). Broj spora *C. botulinum* u navedenim ispitivanjima, koji je izračunat primenom metode MPN broja, kretao se od 20-204/kg meda (Tabela 14).

Određivanjem broja spora, primenom MPN metode dokazana je i neravnomerna raspoređenost prisutnih spora u uzorcima meda (Tabela 14). To je 1979. godine, u svojim ispitivanjima, potvrdio i Midura sa saradnicima (122). Imajući ovo u vidu, kod uzoraka meda sa niskim i neravnomernim nivoom kontaminacije sporama *C. botulinum* postoji mogućnost da za ispitivanje bude uzet deo uzorka koji ne sadrži spore. Zbog toga je kada je med u pitanju, u ispitivanje neophodno uključiti veći broj subjedinica istog uzorka u odnosu na vrstu i prirodu drugih uzoraka.

Prosečna količina spora u svim ispitanim uzorcima meda iznosila je 9,3/kg meda, a prosečna količina spora u svim ispitanim uzorcima medonosnih pčela iznosila je 1.8/kg.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Detekcija spora *Clostridium botulinum* direktno iz neobrađenih uzoraka meda i medonosnih pčela nije moguća. Priprema uzoraka meda i medonosnih pčela za dokazivanje spora *Clostridium botulinum* uključuje postupak predobogaćenja, dilucije, centrifugovanja i membranske filtracije. Ovako dobijen sadržaj koristi se za izolaciju *Clostridium botulinum* na Zeissler i žumancetnom agaru, odnosno za prečišćavanje i ekstrakciju nukleinske kiseline za lančanu reakciju polimeraze (PCR).

2. Za verifikaciju ekstrakcije, kao pozitivna kontrola u ispitivanjima korišćen je standardni soj *Clostridium botulinum* NCTC 7272. Takođe, kao pozitivne kontrole za

metodu PCR korišćeni su odgovarajući DNK fragmenti specifični za vrstu *Clostridium botulinum* (*bontA*, *bontB*, *bontE*, *bontF*).

3. U cilju detekcije spora *Clostridium botulinum* u uzorcima meda i medonosnih pčela, primenom metode PCR, za svaki ispitujući uzorak morala su biti izvođena višestruka ponovljena ispitivanja zbog neravnomerne raspoređenosti spora u uzorcima i mogućnosti dobijanja lažno negativnih rezultata.

4. Za određivanje broja spora *Clostridium botulinum* u uzorcima meda i medonosnih pčela korišćena je metoda najverovatnijeg mogućeg broja (MPN). Proračun broja spora rađen je primenom sistema jednostrukih serija, jednakih test količina sa definisanim brojem ponavljanja.

5. U uzorcima meda kontaminiranog referentnim sojem *Clostridium botulinum* NCTC 7272, PCR metodom može da se dokaže jedna spora/g meda. SRPS ISO metodom 15213:2011 može da se dokaže 5 do 10 spora/g meda. Klasične metode mikrobiologije kao i metoda SRPS ISO 15213:2011 nisu podesne za detekciju spora *Clostridium botulinum* u uzorcima meda jer ove metode zbog niske osetljivosti daju lažno negativne rezultate.

6. Prisustvo spora *Clostridium botulinum*, PCR metodom, utvrđeno je u 8,47% ispitivanih uzoraka meda i 1,64% uzoraka medonosnih pčela. Najverovatniji mogući broj spora u uzorcima meda bio je od 20/kg do 204, a u uzorcima medonosnih pčela 110/kg. U istim uzorcima meda, odnosno medonosnih pčela SRPS ISO metodom 15213:2011 nije dokazano prisustvo spora *Clostridium botulinum*. Pozitivni uzorci meda na prisustvo spora *Clostridium botulinum* poticali su iz opština Lazarevac, Arilje, Kruševac (bagremov med), opštine Savski Venac (šumski med) i Kraljevo (livadski med), a uzorak medonosnih pčela, pozitivan na prisustvo spora *Clostridium botulinum*, poticao je iz opštine Aleksandrovac.

7. U ispitivanim uzorcima meda, u dva uzorka (bagremov i livadski med) dokazano je istovremeno prisustvo spora *Clostridium botulinum* tipa A i E, a u jednom uzorku

bagremovog meda spora *Clostridium botulinum* tipa B. U jednom uzorku šumskog meda dokazane su spore *Clostridium botulinum* tipa E, a u jednom od uzoraka bagremovog meda dokazano je istovremeno prisustvo spora *Clostridium botulinum* tipa A, B i E. Spore *Clostridium botulinum* tipa E dokazane su u jednom uzorku medonosnih pčela. U uzorcima meda i medonosnih pčela nije dokazano prisustvo spora *Clostridium botulinum* tipa F.

## 8. SPISAK LITERATURE

1. Abavare L., Abavare C. (2012): Wound Botulism Resulting from Heroin Abuse: Can You Recognize It? *J. of Emergency Nursing*. 38: 301-303.
2. Akbulut D., Grant K.A., McLauchlin J. (2004): Development and Application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism. *Foodborne Pathog. Dis.* 1: 247-257, 505-511.
3. Alnaqdy A., Al-Jabri A., Al Mahrooqi Z., Nzeako B., Nsanze H. (2005): Inhibition effect of honey on the adherence of *Salmonella* to intestinal epithelial cells in vitro. *Int. J. Food. Microbiol.* 103: 347-351.
4. Arnon S.S., Damus K., and Chin J. (1981): Infant botulism: Epidemiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidemiol. Rev.* 3: 45-66.
5. Arnon S.S., Damus K., Thompson B., Midura T.F., Chin J. (1982): Protective role of human milk against sudden infant death from infant botulism. *J. of Pediatr.* 100: 568-573.
6. Arnon S.S., Midura T.F., Damus K., Thompson B., Wood R.M., Chin J. (1979): Honey and other Environmental risk factors for infant botulism. *J. of Pediatr.* 94: 331-336.
7. Arnon S.S., Midura T.F., Damus K., Wood R.M., Chin J. (1978): Intestinal infection and toxin production by *Clostridium botulinum* as one cause of sudden infant death syndrome. *Lancet* 1: 1273-1277.
8. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T.,

- O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D., Tonat K. (2001): Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *J. Am. Med. Assoc.* 285: 1059-1070.
9. Artin I, Bjorkman P., Cronqvist J, Radstrom P., Holst E. (2007): First Case of Type E Wound Botulism Diagnosed Using Real-Time PCR, *J. of Clin. Microbiol.* 45: 3589-3594.
  10. Aureli P., Fencia L., and Franciosa G. (1999): Classic and emergent forms of botulism: The current status in Italy. *Euro. Surveill.* 4: 7-9.
  11. Aureli P., Ferrini A.M., Negri S. (1983): Ricerca delle spore di *Cl. botulinum* nel miele. *La Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 12: 457-460.
  12. Aureli P., Franciosa G., Fencia L. (2002): Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *Ped. Inf. Dis. J.* 21: 866– 868.
  13. Badawy O.F.H., Shafii S.S.A., Tharwat E.E., Kamal A.M. (2004): Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness gainst *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection: *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23 (3), 1011-1022.
  14. Bakheit A.M., Ward C.D., McLellan D.L. (1997): Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: Report of two cases. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 62: 198.
  15. Barrett DH. (1991): *EndeMicrobiol.* food-borne botulism: clinical experience, 1973–1986 at Alaska Native Medical Center. *Alaska Med.* 33: 101–108.
  16. Beller M., Middaugh J.P. (1990): Repeated type E botulism in an Alaskan eskimo. *N. Eng. J. Med.* 322:855.
  17. Berry P.R., Gilbert R.J., Oliver R.W.A., Gibson A.A.M. (1987): Some preliminary studies on low incidence of infant botulism in the United Kingdom. *J. Clin. Pathol.* 40: 121.
  18. Beseler-Soto B., Sanchez-Palomares M., Santos-Serrano L., Landa Rivera L., Sanantonio-Valdearcos F., Paricio-Talayero J.M. (2003): Iatrogenic botulism: a complication to be taken into account in the treatment of child spasticity. *Rev. Neurol.* 37: 444–446.

19. Bianco M.I., Luquez C., de Jong L.I.T., Fernandez R.A. (2008): Presence of *Clostridium botulinum* spores in *Matricaria chamomilla* (chamomile) and its relationship with infant botulism. *Int. J. of Food Microbiol.* 121: 357–360.
20. Bohnel H., Schwageric B., Gessler F. (2001): Visceral botulism – a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J. Vet. Med. A.* 48: 373-383.
21. Brett M. (1999): Botulism in the United Kingdom. *Euro Surveill.* 4: 9-11.
22. Brett M., Hallas G., Mpamugo O. (2004): Wound botulism in the UK and Ireland. *J. Med. Microbiol.* 53: 555-561.
23. Brett M.M., Hood J., Brazier J.S., Duerden B.I., Hahne S.J. (2005): Soft tissue infections caused by spore-forming bacteria in injecting drug users in the United Kingdom. *Epidemiol. Infect.* 133: 575-582.
24. Brin M. F., Hallett M., Jankovic J. (2002): *Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
25. Broda D. M., Boerema J. A., Bell R. G. (1998): A PCR survey of psychrotrophic *Clostridium botulinum*-like isolates for the presence of BoNT genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 219-223.
26. Bushara K.O., Park D.M. (1994): Botulinum toxin and sweating. *J Neurol. Neurosurg Psychiatr.* 57: 1437–1438.
27. Cai S., Singh B.R., Sharma S. (2007): Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit. Rev. Microbiol.* 33: 109–125.
28. Campbell K. D., Collins M. D., East A. K. (1993): Gene probes for identification of the botulinum neurotoxin gene and specific identification of neurotoxin types B, E, and F. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2255-2262.
29. Cato E.P., George W.L., Finegold S.M. (1986): *Genus Clostridium.* In *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2.* Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe M.E. *et al.* (eds). Williams & Wilkins, Baltimore 1141-1200.
30. Cawthorne A., Celentano L.P., D’Ancona F., Bella A., Massari M., Anniballi F., Fenicia L., Aureli P., Salmaso S. (2005): Botulism and preserved green olives. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 781–782.
31. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2010): Investigational Heptavalent Botulinum Antitoxin (HBAT) to Replace Licensed Botulinum

- Antitoxin AB and Investigational Botulinum Antitoxin E. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59: 299.
32. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (1998): Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
  33. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2004): Surveillance for botulism. Summary of 2002 data. Centers for Disease Control and Prevention, Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, Atlanta, USA
  34. Centorbi O.P., Alcaraz L.E., Centorbi H.J. (1994): Análisis bacteriológico e investigación de esporas de *Clostridium botulinum* en mieles. *Revista Argentina de Microbiología* 26: 96-100.
  35. Cherington, M.D. (1998): Clinical spectrum of botulism. *Muscle. Nerve.* 21: 701-710.
  36. Coban A., Matur Z., Hanagasi H.A., Parman Y. (2010): Iatrogenic botulism after botulinum toxin type a injections. *Clin. Neuropharmacol.* 33:158-160.
  37. Codex Alimentarius (2001): Revised Codex standard for honey. *Codex Stan 12-1982: Rev.(1987), Rev. 2. (2001)* 7
  38. Council Directive 2001/110/EC (2002): *Official Journal of the European Communities.* L10: 51–52.
  39. Criseo G., Bolignano M.S., De Leo F. (1993). Isolation of *Clostridium botulinum* type B from Sicilian honey samples. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 22: 75–181.
  40. DasGupta B.R., Sugiyama H. (1972): A common subunit structure in *Clostridium botulinum* type A, B, and E toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 108-112.
  41. Davis J.B., Mattman L.H., Wiley M. (1951): *Clostridium botulinum* in a fatal wound infection. *J. Am. Med. Assoc.* 146: 646-648.
  42. Davis L.E., King M.K. (2008): Wound botulism from heroin skin popping. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 8: 462-468.
  43. de Man J.C., MPN tables (corrected), (1983): *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 17: 301-305

44. de Paiva A., Meunier F.A., Molgo J., Aoki K.R., Dolly J.O. (1999): Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: Biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 3200-3205.
45. Delmas C., Vidon D.J.-M., Sebald, M. (1994): Survey of honey for *Clostridium botulinum* spores in eastern France. *Food Microbiol.* 11: 515-518.
46. Dezfulian M, Bartlett J.G. (1985): Kinetics of growth and toxigenicity of *Clostridium botulinum* in experimental wound botulism. *Infect. Immun.* 49: 452-454.
47. Dezfulian M. (1993): A simple procedure for identification of *Clostridium botulinum* colonies. *World J. Microbiol. Biotech.* 9: 125-127.
48. Doellgast G. J., Triscott M. X., Beard G. A., Bottoms J. D., Cheng T., Roh B. H., Roman M. G., Hall P. A., Brown J. E. (1993): Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2402-2409.
49. Dowell V.R.Jr., McCroskey L.M., Hatheway C.L., Lombard G.L., Hughes C.L., Merson M.H. (1977): Coproexamination for botulinal toxin and *Clostridium botulinum*: a new procedure for laboratory diagnosis of botulism. *JAMA* 238: 1829-1832.
50. Du S.J., Cheng C.M., Lai H.Y., Chen L.H. (1991): Combined methods of dialysis, cooked meat medium enrichment and laboratory animal toxicity for screening *Clostridium botulinum* spores in honey and infant foods. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 24: 240-247.
51. Edmonson R.B., Giltner L.T., Thom C. (1920): The possible pathogenicity of *Bacillus botulinus*. *Arch. Intern. Med.* 26: 357-366.
52. Eija Hyytiä-Trees (1999): Prevalence, molecular epidemiology and growth of *Clostridium botulinum* type E in fish and fishery products, *AcadeMicrobiol. dissertation*, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
53. Ekong T. (2000): Immunological detection of botulinum neurotoxins. *Anaerobe* 6: 125-127.

54. Ekong T. A. N., Feavers I. M., Sesardic D. (1997): Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for *Clostridium botulinum* type A toxin endopeptidase activity *in vitro*. *Microbiol.* 143: 3337-3347.
55. Ekong T., Austin J. W., Smith J. P., Dufresne I., Brett, M. (1999): Evaluation of the use of the endopeptidase assay for the detection of BoNT E in trout fillets inoculated with *Clostridium botulinum* type E. Proceedings of the 1999 Meeting of Interagency Botulism Research Coordinating Committee, Orlando, FL, USA, 36.
56. Erbguth F.J., Naumann M. (1999): Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the “sausage poison”. *Neurology* 53: 1850-1853.
57. Fach P., Gilbert, M., Griffais, R., Popoff, M. R. (1996): Investigation of animal botulism outbreaks by PCR and standard methods. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13: 279-285.
58. Fach P., Perelle S., Dilasser F., Grout J., Dargaignaratz C., Botella L., Gourreau J-M., Carlin F., Popoff M.R., Broussolle V. (2002): Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and Environmental samples from a coastal area in Northern France. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5870-5876.
59. Famularo A.C. (2009): Infantile Botulism: Clinical Manifestations, Treatment, and the Role of the Nurse Practitioner. *The Journal for Nurse Practitioners - JNP* 5: 335-343
60. Ferreira J. L., Maslanka S., Johnson E., Goodnough M. (2003): Detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. *J. AOAC Int.* 86: 314-331.
61. Ferreira M.C., Salles A.G., Gimenez R., Soares M.F.D. (2004): Complications with the use of botulinum toxin type A in facial rejuvenation: report of 8 cases. *Aesth. Plast. Surg.* 28: 441-444.
62. Flemming R., Stojanowic V. (1980): Untersuchungen von Bienhonig auf *Clostridium botulinum*-Sporen. *Arch. Lebensmittelhyg* 31: 179-180.
63. Foran P.G., Mohammed N., Lisk G.O., Nagwaney S., Lawrence G.W., Johnson E. (2003): Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B,



- C1: E, and F compared with the long lasting type A. The J. of Biol. Chemistry 278:1363-1371.
64. Franciosa G., Ferreira J. L., Hatheway C. L. (1994): Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpected type B toxin genes in type toxigenic organisms. J. Clin. Microbiol. 32: 1911-1917.
  65. Fujii N., Kimura K., Yokosawa N., Tsuzuki K., Oguma K. (1992): A zinc-protease specific domain in botulinum and tetanus neurotoxins. Toxicon. 30: 1486-1488.
  66. Galazka A., Przybylska A. (1999): Surveillance of foodborne botulism in Poland: 1960-1998. Euro Surveill. 4: 69-72.
  67. Gill D.M. 1982. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiol. Rev. 46: 86-94.
  68. Glasby C., Hatheway C.L. (1985): Isolation and enumeration of *Clostridium botulinum* by direct inoculation of infant fecal specimens on egg yolk agar and *Clostridium botulinum* isolation media. J. Clin. Microbiol. 21: 264-266.
  69. Goldfrank L.R., Geyer H.L. (2010): Botulinum Antitoxin. In: Goldfrank's Toxicologic Emergencies (Ninth Edition) by Nelson L.S., Lewin N.A., Howland M.A., Hoffman R.S., Goldfrank L.R., Flomenbaum N.E.. New York: McGraw-Hill; 695-697.
  70. Guglielmo-Viret V., Attree O., Blanco-Gros V., Thullier P. (2005): Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. J. Immunol. Methods 301: 164-172.
  71. H. M. Solomon, T. Lilly (2001): *Clostridium botulinum*. Bacteriological Analytical Manual, FDA, USA: Chapter 17.
  72. Hallis B., James B. A. F., Shone C. C. (1996): Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. J. Clin. Microbiol. 34: 1934- 1938.
  73. Hartgen H. (1980): Untersuchungen von Honigproben auf Botulinustoxin. Arch. Lebensmittelhyg 31: 177-178.
  74. Hartigan P. J. (1985): Botulism in horses. Irish Vet. J. 39: 194-197.

75. Hasegawa K., Watanabe T., Suzuki T., Yamano A., Oikawa T., Sato Y., Kouguchi H., Yoneyama T., Niwa K., Ikeda T., Ohyama T. (2007): A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* serotype D toxin complex with three extended arms. *J. Biol. Chem.* 282: 24777-24783.
76. Hauschild A.H.W., Hilsheimer R., Weiss K.F., Burke R.B. (1988): *Clostridium botulinum* in honey, syrups and dry infant cereals. *J. Food Protect.* 51: 892-894.
77. Hetland A. (1986): *Clostridium botulinum* sporer I norskprodusert honning? *Norsk Veterinærtidsskrift* 98: 725-727.
78. Hielm S., Bjorkroth J., Hyytia E., Korkeala H. (1998): Genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 703-708.
79. Hielm S., Bjorkroth J., Hyytia E., Korkeala H. (1998): Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4161-4167.
80. Hielm S., Hyytia E., Ridell J., Korkeala H. (1996): Detection of *Clostridium botulinum* in fish and Environmental samples using polymerase chain reaction. *Int. J. of food Microbiol.* 31: 357-365.
81. Holzer V.E. (1962): Botulismus durch inhalation. *Med. Klin.* 57: 1735-1738.
82. Horowitz B.Z. (2005): Botulinum toxin. *Crit. Care Clin.* 21: 825-839.
83. Huhtanen C.N., Knox D., Shimanuki H. (1981): Incidence and origin of *Clostridium botulinum* spores in honey. *J. Food Protect.* 44: 812-814.
84. Hyytia E., Bjorkroth J., Hielm S., Horbeala H. (1999): Characterisation of *Clostridium botulinum* groups I and II by randomly amplified DNA analysis and repetitive element sequence-based PCR. *Intern. J. Food Microbiol.* 48: 179-189.
85. Ingrid Artin (2008): Real-time PCR for diagnosis of botulism and quantification of neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum*. Academic thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
86. Jankovic J., Schwartz K., Donovan DT. (1990): Botulinum toxin treatment of cranial-cervical dystonia, spasmodic dysphonia, other focal dystonias and hemifacial spasm. *J. Neurol. Neurosurg. and Psychiatr.* 53: 633-639.

87. Johnson E. A. (1999): Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 551-575.
88. Johnson R.O., Clay S.A., Arnon S.S. (1979): Diagnosis and management of infant botulism. *Am. J. Dis. Child.* 133: 586-593.
89. Jubb T. F., Ellis T. M. (1993): Diagnosis of botulism in cattle using ELISA to detect antibody to botulinum toxins. *Aust. Vet. J.* 70: 226-227.
90. Kakinuma H., Maruyama H., Yamakawa K., Nakamura S., Takahashi H. (1997): Application of nested polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of infant botulism type B. *Acta Paediatr. Jpn.* 39: 346-348.
91. Kautter D.A., Lilly T.Jr., Solomon H.M., Lynt R.K. (1982): *Clostridium botulinum* spores in infant foods: a survey. *J. Food Protect.* 45: 1028-1029.
92. Kautter D.A., Solomon H.M. (1977): Collaborative study of a method for the detection of *Clostridium botulinum* and its toxin in foods. *J. Assoc. of Anal. Chem* 60: 541-545.
93. Kerner J. (1820): Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden todlichen Vergiftungen
94. Kim J., Foegeding P.M. (1993): Principles of control. In *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. Hauschild A.H.W., Dodds K. (eds). New York, NY, USA: Marcel Dekker 121-176.
95. Kobayash H., Fujisawa K., Saito Y., Kamijo M., Oshima S., Kubo M., Eto Y., Monma C., Kitamura M. (2003): A botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of *Clostridium botulinum* type Ab. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 73-74.
96. Konig H., Gassman H.B., Jenzer G. (1975): Ocular involvement in benign botulism B. *Am. J. Ophthalmol.* 80: 430-432.
97. Kourilvo V., Steinitz M. (2002): Magnetic-bead enzyme-linked immunosorbent assay verifies adsorption of ligand and epitope accessibility. *Anal. Biochem.* 311: 166-170.
98. Kruger M., Große-Herrenthey A., Schrodli W., Gerlach A., Rodloff A. (2012): Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany e Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust, *Anaerobe* 18: 221-223.

99. Kuplulu O., Goncuoglu M., Ozdemir H., Koluman A. (2006). Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control* 17: 222–224.
100. Kuusi M., Hasseltvedt V., Aavitsland P. (1999): Botulism in Norway. *Euro Surveill.* 4: 11-12.
101. Legieiza J., Reiss J., Michalic M. (1994): Chemiluminescence immunosorbent assay (CLISA) and a possibility of the specific detection of soluble antigens of *Clostridium botulinum* type A. *Archivum. Immunol. Ther. Experim.* 42: 129-133.
102. Leitenberg M. (2000): The experience of the Japanese Aum Shinrikyo group and biological agents. In *Hype or Reality: the “New Terrorism” and Mass Casualty Attacks* Roberts B, ed, 159-172. CBACI, Alexandria.
103. Lilly T., Harmon S.M., Kautter D.A., Solomon H.M., Lynt R.K. (1971): An improved medium for detection of *Clostridium botulinum* type E. *J. Milk Food Technol.* 34: 492-497.
104. Lindstrom M, Vuorela M, Hinderink K, Korkeala H, Dahlsten E, Raahenmaa M, Kuusi M. (2006): Botulism associated with vacuum-packed smoked whitefish in Finland, *Euro Surveill.* 11: E060720.3.
105. Lindstrom M., Jankola H., Hielm S., Hyytia, E. Korkeala H. (1999): Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24: 267-274.
106. Lindstrom M., Keto R., Markkula A., Nevas M., Hielm S., Korkeala, H. (2001). Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in food and fecal material. *Appl. and Environ. Microbiol.* 67: 5694–5699.
107. Lindstrom M., Kiviniemi K., Korkeala H., (2006): Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing, *Int. J. Food Microbiol.* 108: 92-104.
108. Lindstrom M., Korkeala H. (2006): Laboratory Diagnostics of Botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* 298–314: American Society for Microbiology
109. Lindstrom M., Nevas M., Korkeala H. (2006). Detection of *Clostridium botulinum* by Multiplex PCR in Foods and Feces, *Methods in Biotechnology; Food-Borne Pathogens, Methods and Protocols* 21: 37-45.

110. Lindstrom, M. (2003): Diagnostics of *Clostridium botulinum* and thermal control of non-proteolytic *Clostridium botulinum* in refrigerated processed foods. Ph.D. Thesis, Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland
111. Long S.S. (2001): Infant botulism. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20: 707–709.
112. Lusby P.E., Coombes A.L., Wilkinson J.M. (2005): Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch. Med. Res.* 36: 464-467.
113. Made D., Trumper K, Stark R. (2000): Nachweis von *Clostridium botulinum* in Honig durch Polymerase-Kettenreaktion. *Arch. Lebensmittelhyg* 51: 57-80.
114. Mari Nevas (2006): *Clostridium botulinum* in honey production with respect to infant botulism. Academic dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
115. Marler L. M., Siders J. A., Wolters L. C., Pettigrew Y., Skitt B. L., Allen S. (1991): Evaluation of the new RapID ANA II system for the identification of clinical anaerobic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 29: 874-878.
116. McCroskey L.M., Hatheway C.L. (1988): Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1052-1054.
117. Merson M.H., Hughes J.M., Dowell V.R., Taylor A., Barker W.H., Gangarosa E.J. (1974): Current trends in botulism in the United States. *JAMA* 229: 1305–1308.
118. Middlebrook J.L., Franz D.R. (1997): Botulinum toxins. In: Sidell F.R., Takafuji E.T., Franz D.R, editors. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Washington, DC: Office of the Surgeon General, Department of the Army 643–654.
119. Midura T.F. (1979): Laboratory aspects of infant botulism in California. *Rev. Infect. Dis.* 1: 652-655.
120. Midura T.F. (1996): Update: Infant botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 119-125.
121. Midura T.F., Arnon S.S. (1976): Infant botulism: Identification of *Clostridium botulinum* and its toxin in faeces. *Lancet* 2: 934-936.
122. Midura T.F., Snowden, S., Wood R.M., Arnon S.S. (1979): Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. *J. Clin. Microbiol.* 9: 282-283.

123. Miia Lindstrom (2003): Diagnostics of *Clostridium botulinum* and thermal control of nonproteolytic *C. botulinum* in refrigerated processed foods. Academic dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
124. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja sulfitoredujućih bakterija koje rastu pod anaerobnim uslovima - SRPS ISO 15213:2011.
125. Miyazaki S., Iwasaki M., Sakaguchi G. (1977): *Clostridium botulinum* type D toxin: purification, molecular structure, and some immunological properties. *Infect. Immun.* 17: 395–401.
126. Molan P.C., Allen, K.L. (1996): The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1206-1209.
127. Monetto A.M., Francavilla A., Rondini A., Manca L., Siravegna M., Fernandez R. (1999): A study of botulinum spores in honey. *Anaerobe* 5: 185-186.
128. Moriishi K., Koura M., Fujii N., Fujinaga Y., Inoue K., Syuto B., Oguma K. (1996): Molecular cloning of the gene encoding the mosaic neurotoxin, composed of parts of botulinum neurotoxin types C1 and D, and PCR detection of this gene from *Clostridium botulinum* type C organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 662-667.
129. Mundo M.A., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W. (2004): Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 1-8.
130. Myllykoski J., Lindstrom M., Bekema E., Polonen I., Korkeala H. (2011): Fur animal botulism hazard due to feed, *Research in veterinary science*, 90: 412-418.
131. Myllykoski J., Nevas M., Lindstrom M., Korkeala H. (2006): The detection and prevalence of *Clostridium botulinum* in pig intestinal samples. *Int. J. of Food Microbiol.* 110: 172–177.
132. Nakano H., Kizaki H., Sakaguchi G. (1994): Multiplication of *Clostridium botulinum* in dead honey-bees and bee pupae, a likely source of heavy contamination of honey. *Int. J. of Food Microbiol.* 23: 247– 252.

133. Nakano H., Okabe T., Hashimoto H., Sakaguchi G. (1990): Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origins. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 43: 183-195.
134. Nakano H., Sakaguchi G. (1991): An unusually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. FEMS Microbiol. Lett. 79: 171-178.
135. Nevas M., Hielm S., Lindstrom M., Koivulehto K., Horn H., Korkeala H. (2002): High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. Int. J. of Food Microbiol. 72: 45-52.
136. Nevas M., Lindstrom M., Hautamaki K., Puoskari S., Korkeala H. (2005): Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. Int. J. of Food. Microbiol. 105: 145-151.
137. Nevas M., Lindstrom M., Hielm S., Bjorkroth K.J., Peck M.W., Korkeala H. (2005): Diversity of Proteolytic *Clostridium botulinum* Strains, Determined by a Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Approach. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1311-1317.
138. Nevas M., Lindstrom M., Horman A., Keto-Timonen R., Korkeala H. (2006). Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. Environ. Microbiol. 8: 1085-1094.
139. Nevas M., Lindstrom M., Virtanen A., Hielm S., Kuusi M., Arnon S.S., Vuori E., Korkeala H. (2005). Infant botulism acquired from household dust presenting as sudden infant death syndrome. J. of Clinical. Microbiol. 43: 511-513.
140. Niemel S. (1983): Statistical evaluation of results from quantitative Microbiological examinations, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1: 2nd edition
141. Oguma K., Fujinaga Y., and Inoue K. (1995): Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. Microbiol. Immunol. 39: 161-168.
142. Ostergaard L., Fuglslang-Frederiksen A., Werdelin L., Sjo O., Winkel H. (1994): Quantitative EMG in botulinum toxin treatment of cervical dystonia. A

- double-blind, placebo-controlled study. *Electroencephalogr. clin. Neurophysiol.* 93, 434-439.
143. Patocka J., Splino M. (2002): Botulinum Toxin: From Poison to Medicinal Agent, Applide Science and Analysis, Inc. The ASA Newsletter, ASA 02-1: 88: 14-24.
  144. Peck W.M., Stringer S.C. (2004): The Safety of Pasteurised In-Pack Chilled Meat Products with Respect to the Foodborne Botulism Hazard. 50th International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, Finland
  145. Pellizzari R., Rossetto O., Schiavo G., Montecucco C. (1999): tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354: 259-268.
  146. Pickett J., Berg B., Chaplin E., Brunstetter-Schafer M-A. (1976): Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. *N. Engl. J. Med.* 295: 770-772.
  147. Potter M. D., Meng J., Kimsey P. (1993): An ELISA for detection of botulinal toxin types A, B, and E in inoculated food samples. *J. Food Protect.* 56: 856-861.
  148. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za med, druge pčelinje proizvode, preparate na bazi meda i drugih pčelinjih proizvoda, "Sl. list SCG", br. 45/2003
  149. Qiu P.Y., Ding H.B., Tang Y.K., Xu R.J. (1999): Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2760-2765.
  150. Rall V.L.M., Bombo A.J., Lopes T.F., Carvalho L.R., Silva M.G. (2003): Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? *Anaerobe* 9: 299-303.
  151. Rocke T. E., Smith S. R., Nashold S. W. (1998): Preliminary evaluation of a simple in vitro test for the diagnosis of type C botulism in wild birds. *J Wildlife Dis.* 34: 744-751.
  152. Rodloff A.C., Krüger M., (2012): Chronic *Clostridium botulinum* infections in farmers. *Anaerobe* 18: 226-228.
  153. Roman M. G., Humber J. Y., Hall P. A., Reddy N. R., Solomon H. M., Triscott M. X., Beard G. A., Bottoms J. D., Cheng T., Doellgast G. J. (1994): Amplified



- immunoassay ELISA-ELCA for measuring *Clostridium botulinum* type E neurotoxin in fish fillets. J. Food Protect. 57: 985-990.
154. Rooney J. R., Prikett M. E. (1967): Shaker foal syndrome. Mod. Vet. Pract. 48: 44-45
  155. Rowland L.P. (2002): Stroke, spasticity, and botulinum toxin. N. Engl. J Med. 347: 382-383.
  156. Sandler R. J., Rocke T. E., Yuill T. M. (1998): The inhibition of *Clostridium botulinum* type C by other bacteria in wetland sediments. J. Wildl. Dis. 34: 830-833.
  157. Saraiva M., Cunha I.C., Bonito C.C., Pena C., Toscano M.M., Lopes T-T., Sousa I., Calhau M.A., (2012): First case of infant botulism in Portugal. Food Control 26: 71–90.
  158. Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. (2000): Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol. Rev. 80: 717-766.
  159. Schocken-Iturrino R.P., Carneiro M.C., Kato E., Sorbara J., Rossi O.D., Gerbasi, L.E.R. (1999): Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 24: 379-382.
  160. Scott A.B. (1989): Botulinum toxin therapy of eye muscle disorders. Safety and effectiveness. American Academy of Ophthalmology. Ophthalmology Suppl: 37–41.
  161. Seals J.E., Snyder J.D., Edell T.A., Hatheway C.L., Johnson C.J., Swanson R.C., Hughes J.M. (1981): Restaurant-associated type A botulism: transmission by potato salad. Am. J. Epidemiol. 113: 436–444.
  162. Sevenier V., Delannoy D., Andre S., Fach P., Remize F. (2012): Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. Int. J. of Food. Microbiol. 115: 263-268.
  163. Shapiro R.L., Hatheway C., Becher J., Swerdlow D.L. (1997): Botulism surveillance and emergency response: a public health strategy for a global challenge. JAMA 278: 433–435.
  164. Shapiro R.L., Hatheway C., Swerdlow D.L. (1998): Botulism in the United States: A clinical and epidemiological review. Ann. Intern. Med. 129: 221-228.

165. Simpson L. (2004): Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 167-193.
166. Slater P.E., Addiss D.G., Cohen A., Leventhal A., Chassis G., Zehavi H., Bashari A., Costin C. (1989): Foodborne botulism: an international outbreak. *Int. J. Epidemiol.* 18: 693–696.
167. Smith L. D. S. Sugiyama H. (1988): Cultural and serological characteristics. In: Smith, L. D. S. and Sugiyama, H. (eds): *Botulism. The Organism, Its Toxins, the Disease.* Charles C. Thomas Springfield, USA, 23-37.
168. Smith L.A. (2006): Bacterial Protein Toxins as Biological Weapons. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, Vol 62* (Alouf J & Popoff M, eds), 1019-1030. Academic Press, London
169. Smith T.J., Roxas-Duncan V.I., Smith L.A. (2012): Botulinum Neurotoxins as Biothreat Agents. *J. Bioterr. Biodef.* S7: 003.
170. Snowdon J.A., Cliver D.O. (1996): Microorganisms in honey. *Int. J. of Food. Microbiol.* 31: 1– 26.
171. Sobel J. (2005): Botulism. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1167–1173.
172. Sobel J., Tucker N., Sulka A., McLaughlin J., Maslanka S. (2004): Food borne botulism in the United States, 1990–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1606–1611.
173. Sperber W. H. (1982): Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. *Food Technol.* 36: 89-94.
174. Starin W.A., Dack G.M. (1925): Pathogenicity of *Clostridium botulinum*. *J. Infect. Dis.* 36: 383-412.
175. Sugiyama H., Mills D.C., Kuo L-J.C. (1978): Number of *Clostridium botulinum* spores in honey. *J. Food Protect.* 41: 848-850.
176. Svetel M., Šternić N., Dragašević N., Jović J., Kostić V. (2003): Botulinski toksin u terapiji neuroloških bolesti, *Aktuelnosti iz neurologije psihijatrije i graničnih područja.* 2: 57-70.
177. Swenson J.M., Thornsberry C., McCroskey L.M., Hatheway C.L., Dowell V.R.Jr. (1980): Susceptibility of *Clostridium botulinum* to thirteen antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Ch.* 18: 13-19.
178. Swerczek T. W. (1980): Toxicoinfectious botulism in foals and adult horses. *JAVMA.* 176: 217-220.

179. Szabo E. A., Pemberton J. M., Desmarchelier P. M. (1993): Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3011-3020.
180. Szabo E. A., Pemberton J. M., Gibson A. M., Eyles M. J., Desmarchelier P. M. (1994): Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B, and E in food, soil and infant faeces. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 539-545.
181. Szabo E. A., Pemberton J. M., Gibson A. M., Thomas R. J., Pascoe R. R., Desmarchelier P. M. (1994): Application of PCR to a clinical and Environmental investigation of a case of equine botulism. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1986-1991.
182. Szilagyí M., Rivera V. R., Neal D., Merrill G. A., Poli M. A. (2000): Development of sensitive colorimetric capture elisas for *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes A and B. *Toxicon.* 38: 381-389.
183. Taormina P.J., Niemira B.A., and Beuchat L.R. (2001): Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food. Microbiol.* 69: 217-225.
184. Terranova W., Breman J.G., Locey R.P., Speck S. (1978): Botulism type B: epidemiologic aspects of an extensive outbreak. *Am. J. Epidemio.* 108: 150-156.
185. Therre H. (1999): Botulism in the European Union. *Euro Surveill.* 4: 2-7.
186. Thompson J.A., Filloux F.M., Van Orman C.B., Swoboda K., Peterson P., Firth S.D., Bale J.F. Jr. (2005): Infant botulism in the age of botulism immune globulin. *Neurology* 64: 2029–2032.
187. Ting P.T., Freiman A. (2004): The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to Botox. *Clin. Med. Review.* 4: 258-261.
188. Tompkin R.B. (1980): Botulism from meat and poultry products – a historical perspective. *Food Technology* 229-235.
189. Torrens J.K. (1998): *Clostridium botulinum* was named because of association with "sausage poisoning." *BMJ* 316: 151.
190. Tugnoli V., Eleopra R., Qyatrale R., Capone J.G., Sensi M., Gastaldo E. (2002): Botulism-like syndrome after botulinum toxin type A injections for focal hyperhidrosis. *Br. J. Dermatol.* 147: 808–809.

191. Tugnoli V., Marchese Ragona R., Eleopra R., Quatralo R., Capone J.G., Pastore A., Montecucco C., De Grandis D. (2002): The role of gustatory flushing in Frey's syndrome and its treatment with botulinum toxin type A. *Clin. Auton. Res.* 12: 174-178.
192. van Ermengem E.P. (1897): Uber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehung zum Botulismus. *Z Hyg Infektionskrankh* 26: 1-56. (Republished in English 1979: A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. *Rev. Infect. Dis.* 1: 701-719.
193. Varma J.K., Katsitadze G., Moiscrafishvili M., Zardiashvili T., Chokheli M., Tarkhashvili N., Jhorjholiani E., Chubinidze M., Kukhalashvili T., Khmaladze I., Chakvetadze N., Imnadze P., Hoekstra M, Sobel J. (2004): Signs and symptoms predictive of death in patients with foodborne botulism—Republik of Georgia, 1980-2002. *Clin. Infect. Dis.* 39: 357-362.
194. Vasilev D., I. Vuković (2008): Botulizam iz proizvoda od mesa – analiza opasnosti i mogućnosti sprečavanja. 1. Simpozijum – Bezbednost namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Beograd
195. Verastegui C., Lalli S., Meunier F.A., Schiavo G. (2002): Clostridial neurotoxins. *J. Toxicol.* 21: 203-227.
196. Vuković I. (2000): Botulizam u Jugoslaviji i mogućnost sprečavanja. *Tehnologija mesa* 41: 19-29.
197. Weber J.T., Goodpasture H.C., Alexander H., Werner S.B., Hatheway C.L., Tauxe R.V. (1993): Wound botulism in a patient with a tooth abscess: Case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 16: 635-639.
198. Water quality - Guidance on validation of microbiological methods (2000): ISO/TR 13843:2000-06 (E).
199. Werner A., Laccourreye O. (2011): Honey in otorhinolaryngology: When, why and how? *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 128: 133-137.
200. Werner S.B., Passaro D., McGee J., Schechter R., Vugia D.J. (2000): Wound botulism in California, 1951-1998: Recent epidemic in heroin injectors. *Clin. Infect. Dis.* 31: 1018-1024.
201. White J.W.Jr. (1978): Honey. *Adv. Food Res.* 24: 288-374.

202. Wictome M., Newton K. A., Jameson K., Dunnigan P., Clarke S., Gaze J., Tauk A., Foste K. A., Shone C. C. (1999): Development of in vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24: 319-323.
203. Wictome M., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K., Shone C. (1999): Development of an in vitro assay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3787-3792.
204. Williamson J. L., Roche T. E., Aiken J. M. (1999): In situ detection of the *Clostridium botulinum* type C1 toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3240-3243.
205. Willix D.J., Molan P.C., Harfoot C.G. (1992): A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 388-394.
206. Wu H.C., Huang Y.L., Lai S.C., Huang Y.Y., Shaio M.F. (2001): Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 321-325.
207. Yokosawa N., Tsuzuki K., Syuto B., Oguma K. (1986): Activation of *Clostridium botulinum* type E purified by two different procedures. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1981-1988.
208. Yoon S-Y., Chung G.T., Kang D-H., Ryu C., Yoo C-K., Seong W-K. (2005): Application of real time PCR for quantitative detection of *Clostridium botulinum* type A toxin gene in food. *Microbiol. Immunol.* 49: 505-511.
209. Zilinskas R.A. (1997): Iraq's biological weapons. The past as future? *JAMA* 278: 418-424.

## BIOGRAFIJA

Rođen 28.02.1965. godine u Čačku, Republika Srbija. Po završetku srednje medicinske škole, godine 1985/86. upisao studije veterinarske medicine na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu gde je diplomirao maja meseca 1992. godine sa srednjom ocenom 8,06.

U svojstvu veterinar volontera, od maja 1992. do maja 1993. godine obavlja pripravnički staž u Veterinarskoj stanici "Kraljevo". Od maja 1993. godine, radi u Veterinarskom specijalističkom institutu "Kraljevo". Godine 2005. raspoređen je u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta "Kraljevo", na poslovima šefa Odeljenja za laboratorijsku dijagnostiku.

Na Katedri za mikrobiologiju, Fakulteta veterinarske medicine, 1995/96. godine, upisao postdiplomske magistarske studije iz imunologije. Magistarski rad odbranio 2004. godine na istoj Katedri.

Od 8. do 21. maja 2002. godine, sa grupom ljudi iz zemlje i inostranstva pohađao Veterinarsko biološki kurs na Institutu za internacionalnu saradnju i biologiju životinja, pri ministarstvu poljoprivrede SAD-a, na Iowa State University, u Ames-u, Iowa, USA. U navedenom periodu obrađene su teme iz oblasti bazične imunologije, dijagnostike zaraznih bolesti, principa vakcinacije, obezbeđenja uspešnosti i zaštite vakcina i ocene testiranja, mogućnosti i bezbednosti dijagnostičkih kit testova.

Samostalno ili u saradnji sa drugim autorima objavio je preko sto stručnih i naučnih radova.

Od 2011. godine, kao istraživač, uključen je na projektu finansiranom od strane Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Vlade Republike Srbije pod ev. brojem TR 31088 i nazivom: "Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza", rukovodioca Prof. dr Sonje Radojičić.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани: Казимир Матовић

број индекса: /

Изјављујем

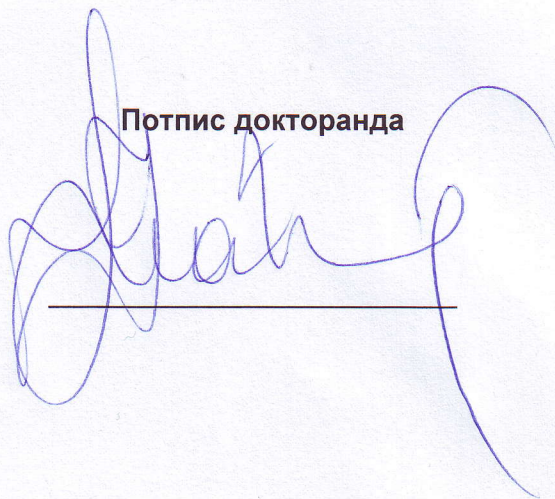
да је докторска дисертација под насловом:

**UTVRĐIVANJE PRISUSTVA CLOSTRIDIUM BOTULINUM U UZORCIMA  
MEDA I MEDONOSNIH PČELA**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 08.10.2013.

Потпис докторанда



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме: аутора Казимир Матовић

Број индекса: /

Студијски програм: Ветеринарска медицина, Микробиологија намирница

Наслов рада: UTVRĐIVANJE PRISUSTVA CLOSTRIDIUM BOTULINUM U  
UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA

Ментор: Проф. др Милан Балтић

Потписани: \_\_\_\_\_

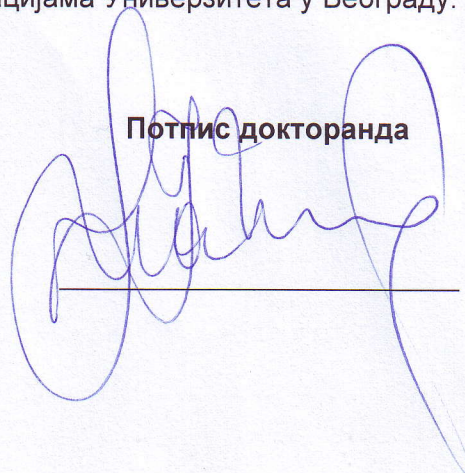
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 08.10.2013.

Потпис докторанда





Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### UTVRĐIVANJE PRISUSTVA CLOSTRIDIUM BOTULINUM U UZORCIMA MEDA I MEDONOSNIH PČELA

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 08.10.2013.

Потпис докторанда

