

Magdalena Kizerwetter-Świda¹, Marian Binek^{1*}

¹ Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

Wpłynęło w listopadzie 2009 r.

1. Wstęp. 2. Właściwości *Clostridium botulinum*. 2.1. Medyczne zastosowanie toksyny botulinowej. 2.2. *Clostridium botulinum* jako broń biologiczna. 3. Patogeneza i formy choroby. 3.1. Botulizm pokarmowy. 3.2. Botulizm noworodków. 3.3. Botulizm przyranny. 3.4. Przypadki o nieustalonym źródle. 3.5. Botulizm u zwierząt. 4. Diagnostowanie i leczenie. 5. Badania laboratoryjne. 5.1. Zastosowanie metod biologii molekularnej. 6. Występowanie bakterii w naturze, źródła zatrucia. 7. Podsumowanie

***Clostridium botulinum* toxicosis – still a serious problem**

Abstract: *Clostridium botulinum* is an anaerobic, rod-shaped sporeforming bacterium. The neurotoxins produced by *C. botulinum* are among the most potent toxins known to man. Botulism is a public health emergency. Four distinct forms of botulism may occur, depending on the mode of acquisition of the toxin. The most common form of human botulism is a foodborne disease, with intoxication due to the ingestion of preformed neurotoxin in foods, which is generally related to improperly processed home-made products. Interestingly, there is an increasing number of botulism cases correlated with commercially processed foods. Non-proteolytic strains of *C. botulinum* (group II) are considered hazardous in modern food processing. The most dangerous methods are: mild pasteurization, anaerobic packing and chilled storage. In the United States, the most common form is infant botulism, an infection due to *C. botulinum* spores germination, which produces neurotoxin in the infant's gastrointestinal tract. Recently, wound botulism among injecting drug users has also become a problem.

Prompt diagnosis and early treatment of botulism are essential to minimize the otherwise great risk of death. The initial diagnosis may be difficult in individual cases. Epidemiologic investigation is critical to prevent further cases if hazardous food is still available for consumption. Toxin production is usually detected by a mouse bioassay, which usually takes several days. Recently, alternative rapid methods have been developed for diagnosis of botulism. PCR is a sensitive and specific method for the detection of neurotoxin genes, which allow for the detection of dual-toxin producing strains.

The presented review focuses on the characterization of *Clostridium botulinum*, its occurrence and pathogenicity. Recent changes in epidemiology of human botulism are also discussed.

1. Introduction. 2. Properties of *Clostridium botulinum*. 2.1. Medical application of botulinum toxin. 2.2. *Clostridium botulinum* as biological weapon. 3. Pathogenesis and forms of disease. 3.1. Foodborne botulism. 3.2. Infant botulism. 3.3. Wound botulism. 3.4. Cases of undetermined origin. 4. Diagnosis and treatment. 5. Laboratory examination. 5.1. Application of molecular biology methods. 6. Occurrence of *Clostridium botulinum*, sources of intoxication. 7. Summary

Słowa kluczowe: botulizm, bezpieczeństwo żywności, *Clostridium botulinum*

Key words: botulism, *Clostridium botulinum*, food safety

1. Wstęp

Botulizm należy do chorób, do których dochodzi w następstwie spożycia żywności zanieczyszczonej mikroorganizmami produkującymi egzotoksyny. Jest chorobą znaną od dawna, nazwę nadano jej w 1820 roku od łacińskiej nazwy kiełbasy „*botulus*”, związanej historycznie z przyczyną choroby. Sam mikroorganizm, *Clostridium botulinum* został wyizolowany w 1896 roku przez van Ermengema w Belgii. Należy do Gram-dodatnich beztlenowych laseczek szeroko rozpowszechnionych w naturze, przede wszystkim w glebie i osadach dennych zbiorników wodnych [6, 23]. W trakcie wzrostu bakterie wytwarzają biał-

kowe, ciepłowrażliwe toksyny (jad kiełbasiany), różniące się serologicznie, co stało się podstawą do podziału produkujących je szczepów na typy, oznaczone literami A, B, C, D, E, F oraz G. Typy A, B, E oraz w sporadycznych przypadkach typ F powodują botulizm u człowieka, natomiast typy C i D na ogół są odpowiedzialne za botulizm u zwierząt. Szczepy *C. botulinum* typu G oraz niechorobotwórcze gatunki *C. subterminale* oraz *C. hastiforme* zaliczamy obecnie do gatunku *C. argentinense* [38]. Częstość występowania choroby u ludzi jest niewielka, jednakże śmiertelność w wyniku zachorowania jest bardzo wysoka, jeżeli nie podejmie się natychmiastowego i właściwego leczenia [6, 23, 31].

* Autor korespondencyjny: Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel.: (+48) 22 593 60 28; e-mail: marian_binek@sggw.pl

2. Właściwości *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum są Gram-dodatnimi bakteriami beztlenowymi, wytwarzającymi przetrwalniki. Cechą fenotypową rozstrzygającą o przynależności do gatunku jest zdolność do wytwarzania neurotoksyny botulinowej (BoNT). W preparatach z hodowli *C. botulinum* ma postać wysmukłych laseczek, z których część wykazuje subterminalne, rzadziej terminalne ułożenie spor. Przypomina to obraz pędu czosnku lub małej łyżeczki. Na podłożu stałym z krwią bakterie tworzą kolonie nieznacznie wypukłe, o nierównym brzegu, niekiedy płaskie i szorstkie, zazwyczaj otoczone strefą hemolizy. Zależnie od urzęsienia komórek i intensywności przetrwalnikowania mogą tworzyć na powierzchni pożywki nalot lub struktury przypominające płatki azbestu [7, 21]. Należą do klostridiów sacharolitycznych i proteolitycznych. Fermentują glukozę, niektóre szczepy (typu B, E i F) laktozę, maltozę (40–50% szczepów typu C i D rozkłada maltozę i mannozę). Szczepy typu B, E i F słabo rozkładają fruktozę. Wszystkie typy *C. botulinum* hydrolizują żelatynę i wytwarzają lipazę, na ogół trawią kazeinę oraz za wyjątkiem części szczepów typu C i D, nie wytwarzają lecytynazy i nie produkują indolu [30].

Według taksonomii Bergey'a z 2009 roku rodzaj *Clostridium* należy do typu XIII *Firmicutes*, klasy II *Clostridia*, rzędu I *Clostridiales*, rodziny I *Clostridiaceae* [24]. Współcześnie gatunek *C. botulinum* dzielony jest na do 4 grup (od I do IV) różniących się cechami fenotypowymi i genotypowymi. Do grupy I zaliczane są proteolityczne szczepy typu A, B oraz F. Grupa II skupia nie proteolityczne szczepy typu B, E oraz F. Natomiast do grupy III należą szczepy typu C oraz D. Botulizm u ludzi wywołują na ogół szczepy z grupy I oraz II, natomiast botulizm u zwierząt powodują szczepy z grupy III. Grupa IV obejmuje niechorobotwórcze szczepy serotypu G. Na podstawie wyników badań właściwości fenotypowych oraz genotypowych zmieniono nazwę szczepów zaliczanych do grupy IV oraz innych niechorobotwórczych gatunków

Clostridium na *C. argentinense* [38]. W sporadycznych przypadkach zachorowania u noworodków i osób dorosłych mogą być wywoływane przez gatunki klostridiów inne niż *C. botulinum*, zdolne do wytwarzania toksyny botulinowej, takie jak neurotoksyczne szczepy *C. butyricum* oraz *C. baratii* [6, 23]. Wybrane dane charakteryzujące *C. botulinum* zaliczone do grupy I i II przedstawiono w tabeli I. Klostridia zaliczane do grup I oraz II charakteryzują się różną opornością spor na działanie wysokiej temperatury. Szczepy proteolityczne zaliczane do grupy drugiej są bardziej wrażliwe na działanie wysokiej temperatury i niektóre z nich nie przeżywają ogrzewania w 80°C [6, 9, 22, 30].

Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej przyczyniły się do lepszego poznania biologii *C. botulinum*. Stwierdzono, że u jednego szczepu mogą występować geny odpowiedzialne za wytwarzanie dwóch toksyn [6, 9, 33]. Zwykle jedna z nich jest produkowana w większych ilościach, natomiast geny kodujące wytwarzanie drugiej toksyny nie ulegają ekspresji lub jest to ekspresja na niskim poziomie. Szczepy takie mogą dawać niespecyficzne wyniki w próbie biologicznej, a ich precyzyjna identyfikacja jest kłopotliwa. Niejednoznaczna odpowiedź, co do przynależności szczepu do serotypu może utrudniać podjęcie decyzji, odnośnie podjęcia leczenia. Wydaje się, że wiele szczepów *C. botulinum* zakwalifikowanych na podstawie wyników testu ochronnego na myszach do typu A lub B może zawierać w swoim materiale genetycznym geny odpowiedzialne za wytwarzanie innych typów toksyn [4, 14–18, 23].

Wytwarzanie dwóch toksyn opisano już w latach 70-tych, szczepy te zaliczono do typu Af, ponieważ w głównej mierze produkowały one toksynę typu A, w mniejszej ilości toksynę typu F [21]. Początkowo izolowano je z próbek gleby w Argentynie, w późniejszych latach potwierdzono ich udział w wywoływaniu zatrucia jadem kiełbasianym u ludzi [6, 14]. Inna grupa izolatów produkujących głównie toksynę A została zaliczona do typu Ab, natomiast u szczepów określanych jako A(B) gen odpowiedzialny za wytwarzanie

Tabela I

Wybrane właściwości *C. botulinum* grupy I i II

Właściwości		Grupa I	Grupa II
Typ neurotoksyny		A, B, F	B, E, F
Botulizm u ludzi		+	+
Temperatura wzrostu °C	minimalna	10	3,3
	optymalna	35–40	18–25
D100 °C spor (min)*		25	< 0,1
D121 °C spor (min)		0,1–0,2	< 0,001
Występowanie		Powszechne, typ A częściej w zachodniej części USA, typ B powszechnie we wschodniej części USA, Europie i Azji	Powszechne, typ E osady morskie na całym świecie

* – D (dziesięciokrotna redukcja) – czas potrzebny do zabicia 90% bakterii w danej temperaturze

toksyny typu B nie ulega ekspresji. Analiza nieaktywnego genu toksyny B wykazała pewne różnice w jego sekwencji w porównaniu do genu ulegającego ekspresji. Różnice te dotyczą m. in. delecji 6 nukleotydów, którą można wykrywać przy pomocy techniki PCR [17]. Stwierdzono również występowanie szczepów produkujących głównie toksynę typu B i w mniejszych ilościach toksyny A oraz F, które zakwalifikowano do typów Ba oraz Bf [4, 6].

Opisano także przypadki wytwarzania toksyny botulinowej przez *C. butyricum* oraz *C. baratii*. Przypadki botulizmu wywołane przez szczepy *C. butyricum* wytwarzające toksynę botulinową typu E opisano w Indiach, Chinach i we Włoszech. Objawy botulizmu pokarmowego mogą być wywołane przez toksynę typu E produkowaną przez *C. butyricum*. Natomiast botulizm noworodków może być związany z kolonizacją przewodu pokarmowego przez *C. baratii* wytwarzające toksynę typu F [6, 31].

2.1. Medyczne zastosowanie toksyny botulinowej

Działanie toksyny botulinowej jest wysoce specyficzne wobec obwodowych zakończeń nerwowych i w pełni odwracalne. Wstrzyknięte miejscowo małe dawki neurotoksyn nie rozprzestrzeniają się poza miejsce podania. Jest to pierwsza biologiczna toksyna dopuszczona do stosowania w leczeniu przez FDA (Food and Drug Administration, Agencja ds. Żywności i Leków). Ma ona zastosowanie w terapii zaburzeń neurologicznych, np.: dystonii krtaniowej, dystonii karku oraz kończyn, kurczu powiek, kurczach dłoni, nadmiernej potliwości, nadmiernemu ślinieniu się, migrenowych bólach głowy oraz w leczeniu zęza [12, 39].

Toksyny botulinowe mają również zastosowanie kosmetyczne. Na rynku dostępne są preparaty zawierające toksynę A oraz B. Częściej stosowana jest toksyna typu A, ponieważ jej działanie utrzymuje się dwa razy dłużej niż toksyny B [12, 39].

2.2. *Clostridium botulinum* jako broń biologiczna

CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorób) zalicza *C. botulinum* do drobnoustrojów z grupy A, czyli najbardziej niebezpiecznych, które można zastosować jako broń biologiczna. Najbardziej skuteczną drogą ataku w przypadku tych bakterii jest droga aerozolowa, możliwe jest też zastosowanie celowo skażonej żywności. Badania nad zastosowaniem *C. botulinum* jako broni biologicznej prowadzono w okresie II Wojny Światowej w Japonii, Związku Radzieckim i USA [27]. Po wojnie w Zatoce Perskiej w 1991 roku in-

spektorzy ONZ w Iraku stwierdzili obecność toksyny botulinowej w pociskach raketowych o zasięgu 600 km oraz w bombach. Podobne badania prawdopodobnie nadal trwają w Iranie, Iraku, Korei Północnej oraz Syrii. Do tej pory nie notowano użycia *C. botulinum* jako broni biologicznej podczas wojen. Pod koniec XX wieku japońska sekta Najwyższa Prawda kilkakrotnie podejmowała próby rozpylenia toksyny w centrum Tokio. Próby nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, przyczyną czego mogły być kłopoty z otrzymaniem aerozolu toksyny [27, 37].

3. Patogeneza i formy choroby

Toksyna botulinowa jest jedną z najsilniejszych znanych toksyn bakteryjnych, do wywołania choroby u ludzi wystarczy zaledwie kilka nanogramów toksyny, która absorbowana jest do krwioobiegu skąd trafia do nerwów obwodowych. Oddziałuje na zwoje ruchowe rdzenia przedłużonego oraz synapsy nerwów obwodowych i płytki nerwowo-mięśniowe mięśni szkieletowych poprzez hamowanie uwalniania acetylocholino w zakończeniach nerwów ruchowych, co prowadzi do porażenia wiotkiego. Porażenie nerwu przeponowego prowadzi zwykle do śmierci. Związana toksyna nie jest usuwana po podaniu antytoksyny. Stopniowo, po około trzech miesiącach dochodzi do wytworzenia się nowych zakończeń nerwowo-mięśniowych w obrębie płytki ruchowej i do powrotu funkcji przekazywania impulsów nerwowo-mięśniowych. Toksyny botulinowe uszkadzają również komórki innych narządów i naczyń krwionośnych [6, 34].

Poszczególne toksyny botulinowe różnią się budową antygenową, jednak wykazują identyczne działanie. Są one syntetyzowane jako pojedynczy łańcuch nieaktywnego białka o masie cząsteczkowej około 150 kDa, które podlega potranslacyjnej proteolizie do aktywnej formy dwułańcuchowej (50 i 100 kDa), połączonej mostkiem dwusiarczkowym. Toksyny składają się z trzech funkcjonalnych domen, odpowiedzialnych za wiązanie z receptorem, translatację oraz aktywność katalityczną. Toksyny botulinowe gromadzone są w cytozolu komórek bakteryjnych, a po lizie komórek są uwalniane w formie kompleksów określanych jako protoksyny. W skład tych kompleksów wchodzi nietoksyczne białko, tzw. białko NAPs (neurotoxin-associated proteins), których liczba jest różna u poszczególnych typów toksyn botulinowych. Znane są trzy formy protoksyn *C. botulinum*: LL-toksyna (extra large toxin, 900 kDa), L-toksyna (large toxin, 500 kDa) oraz M-toksyna (medium toxin 300 kDa). W cząsteczkach neurotoksyn botulinowych wyróżnia się trzy funkcjonalnie różne domeny: N-końcową domenę o aktywności endopeptydazy zależnej od cynku

(łańcuch lekki L), domenę warunkującą transport toksyny przez błonę (H_N) oraz domenę odpowiedzialną za wiązanie toksyny do receptora [34, 36].

Toksyna botulinowa rozprzestrzenia się w ustroju i wiąże z receptorami błony presynaptycznej α -motoneuronów. Łańcuch lekki ma aktywność specyficznej proteazy, która rozpoznaje i tnie jedynie trzy białka odpowiedzialne za fuzję pęcherzyka synaptycznego zawierającego neuromediator, z błoną neuronu. W ten sposób dochodzi do uszkodzenia białek pęcherzyków presynaptycznych zawierających acetylocholinę. Uniemożliwia to wiązanie pęcherzyka presynaptycznego z błoną presynaptyczną i blokowane jest uwalnianie acetylocholino do przestrzeni synaptycznej. Dochodzi do zmniejszenia potencjału na płycie ruchowej nerwowo-mięśniowej i w efekcie do porażenia wiotkiego mięśni [34, 36].

Współcześnie znane są cztery formy choroby: botulizm pokarmowy, botulizm noworodków, botulizm przyranny oraz tzw. przypadki o nieustalonym źródle. Forma choroby jest związana ze sposobem przedostania się do organizmu żywności zawierającej toksynę botulinową lub spor *C. botulinum*. Botulizm najczęściej przebiega jako intoksykacja, ponieważ same komórki bakteryjne są mało inwazyjne. Rzadziej występuje jako toksykoinfekcja, choć w ostatnich latach notuje się coraz więcej takich przypadków przebiegających w formie botulizmu noworodków lub botulizmu przyrannego.

3.1. Botulizm pokarmowy

Botulizm pokarmowy (intoksykacja pokarmowa) powstaje w następstwie spożycia żywności zawierającej toksynę wyprodukowaną przez *C. botulinum*. Żywność zanieczyszczona sporami *C. botulinum* poddana nieodpowiedniej obróbce w warunkach domowych staje się źródłem choroby. Objawy zatrucia pojawiają się zwykle po 12–36 godzinach, chociaż mogą wystąpić już po 4 godzinach lub nawet po 8 dniach. Dochodzi do ostrej obustronnej neuropatii nerwu czaszkowego, czego konsekwencją jest suchość w ustach oraz utrudnione połykanie, niewyraźna mowa, opadanie powiek, porażenie mięśni oka. Wczesne objawy choroby manifestują się osłabieniem i zawrotami głowy, pojawieniem się podwójnego widzenia, trudnościami w mówieniu i połykaniu. Pacjent nie gorączkuje i zachowuje przytomność, chociaż może popadać w letarg i mieć trudności w komunikowaniu się. Nie dochodzi do zmian czucia. W łagodnej formie choroby nie rozwijają się inne objawy i pacjent może nawet nie zgłosić się do lekarza. Postęp choroby manifestuje się zstępującą symetrycznie słabością mięśni, co prowadzi do utraty kontroli nad utrzymaniem głowy, hypotonii, ogólnego osłabienia, wzdęcia brzucha,

trudnościami w oddychaniu a nawet jego zaprzestania. W trakcie postępu choroby odruchy ścięgnowe ulegają osłabieniu i może dochodzić do zaporcia [23].

W przypadku nie podjęcia leczenia dochodzi do porażenia mięśni oddechowych, a śmierć następuje w wyniku niedrożności oddechowej lub zaprzestania funkcji oddechowej. Objawy chorobowe są zróżnicowane w zależności od dawki toksyny. Pacjenci z ciężkimi i ostrymi objawami zatrucia wymagają długiej opieki lekarskiej. Wspomaganie oddychania jest konieczne przez 2 do 8 tygodni, w ciężkich przypadkach nawet przez 7 miesięcy. Poprawa stanu pacjenta wymaga wytworzenia się nowych połączeń nerwowo-mięśniowych [6, 23, 33].

3.2. Botulizm noworodków

Botulizm noworodków opisany po raz pierwszy w 1976 roku, dotyczy dzieci poniżej 12 miesiąca życia. Do choroby dochodzi w następstwie spożycia wraz z żywnością spor *C. botulinum*, które podlegają następnie germinacji. Ten typ botulizmu jest zwykle związany ze spożyciem miodu lub mleka w proszku dla niemowląt zanieczyszczonych sporami. Bakterie kolonizują jelita, namnażają się oraz wytwarzają toksynę. Co ciekawe, notowano przypadki, kiedy pozostali dorośli członkowie rodzin, którzy spożywali ten sam miód nie chorowali. Źródłem spor *C. botulinum* dla niemowląt może być także syrop kukurydziany lub kurz z odkurzacza [6].

Przebieg choroby może być łagodny, odchodzi do zaporcia i porażenia nerwów czaszkowych, a następnie nerwów obwodowych. Trudności w przyjmowaniu pokarmu powodują niedożywienie i osłabienie oraz popadanie w letarg. Charakterystyczne jest zbieranie się wydzieliny w jamie ustnej oraz amiotonia. W ciężkim przebiegu choroby występuje porażenie mięśni oddechowych, prowadzące do śmierci. Botulizm noworodków jest obecnie najczęściej notowany w Stanach Zjednoczonych [6, 33].

3.3. Botulizm przyranny

Botulizm przyranny zdarza się najrzadziej, chociaż w Wielkiej Brytanii w ostatnich latach jest to najczęstsza forma choroby. Do choroby dochodzi po przedostaniu się do rany spor *C. botulinum*, często razem z innymi bakteriami oraz produkcji toksyny, która przenika do krwiobiegu i wraz z krwią do innych części organizmu. Często są to powypadkowe rany głębokie. Objawy neurologiczne są takie same jak w przypadku botulizmu pokarmowego, nie występują jedynie symptomy ze strony przewodu pokarmowego. Ostatnio coraz powszechniej notowany jest botulizm przyranny u osób stosujących narkotyki [6, 33].

3.4. Przypadki o niestalonym źródle

W niektórych przypadkach botulizmu, mimo dokładnego badania i wywiadu nie udaje się zidentyfikować źródła bakterii lub toksyn w żywności. Przypadki takie są określane przez CDC jako przypadki o „niestalonym źródle” (undetermined origin). Występują one u osób dorosłych i dzieci powyżej 12 miesiąca życia, są odpowiednikami botulizmu niemowląt. Zwykle zdarza się to u pacjentów, u których wykonywano operacje przewodu pokarmowego lub leczonych antybiotykami. Wspomniane zabiegi prawdopodobnie mogą wpływać na zakłócenie naturalnej równowagi w mikroflorze jelitowej, co doprowadza do kolonizowania *C. botulinum* [5, 26].

3.5. Botulizm u zwierząt

Botulizm u zwierząt najczęściej wywołują szczepy *C. botulinum* typu C oraz D, rzadziej A, B oraz E. Na przebieg objawów klinicznych ma wpływ ilość przyjętej toksyny oraz gatunkowa wrażliwość zwierząt. Najbardziej wrażliwe są ssaki nieparzystokopytne, następnie ptaki (zwłaszcza kaczki i kury), duże i małe przeżuwacze. Psy i trzoda chlewna są raczej odporne. Znaczą odporność wykazują zwierzęta mięsożerne (głównie lisy) oraz wolno żyjące gryzonie. Natomiast wyjątkowo wrażliwe spośród zwierząt mięsożernych są norki. Zwierzęta laboratoryjne są wrażliwe na wszystkie typy neurotoksyn [22, 23].

Zatrucie jadem kiełbasiany u zwierząt może występować na całym świecie, choć jest spotykane rzadko. Predysponowane do występowania objawów klinicznych są szczególnie bydło i owce hodowane na terenach ubogich w fosfor oraz białko w Afryce i Australii. W przypadku zwierząt hodowlanych botulizm może przebiegać w formie epidemii. Chore osobniki wydają do środowiska przetrwalniki, które zanieczyszczają paszę i wodę. Objawy występują najczęściej po spożyciu paszy zawierającej toksyny lub wskutek toksykoinfekcji, gdy dochodzi do rozwoju przetrwalników i produkcji toksyn w jelitach lub w miejscu zranienia [22].

Spśród różnych gatunków zwierząt, stosunkowo często choroba jest obserwowana u bydła po spożyciu nieodpowiednio przygotowanej kiszonki lub sianokiszonki. Materiał roślinny może być zanieczyszczony sporami *C. botulinum*, zwłaszcza w przypadkach stosowania nawożenia odchodami kurzymi. Laseczki należące do typu D na ogół nie powodują botulizmu u kur, natomiast są w dużych ilościach wydalane z kałomoczem, dlatego nawożenie pól odchodami kurzymi jest czynnikiem sprzyjającym botulizmowi bydła. Spory mogą także pochodzić ze zwłok drobnych gryzoni, które przypadkowo dostają się do materiału na

kiszonkę. Przy nieodpowiednim przebiegu procesu zakiszenia paszy w wewnętrznych jej partiach dochodzi do wytworzenia się warunków beztlenowych sprzyjających rozwojowi *C. botulinum* oraz produkcji toksyn. Na zatrucie narażone są również zwierzęta hodowane na terenach niedoborowych w fosfor, bydło stara się wtedy uzupełnić niedobory przez spożywanie kości padłych zwierząt zawierających nagromadzone neurotoksyny [22, 23].

Botulizm u ptaków jest wywołany głównie przez *C. botulinum* typu C, rzadziej A, B lub E. Najczęściej występuje on na terenach podmokłych, sezonowo zalanych. Chorują w głównej mierze wolnożyjące ptaki wodne, zaś z ptaków udomowionych kaczki, bażanty oraz kury. Wiosną na terenach podmokłych dochodzi do gnicia materiału roślinnego, powstają warunki beztlenowe, korzystne do rozwoju *C. botulinum*. Do rozprzestrzeniania się choroby przyczyniają się również larwy owadów, którymi odżywiają się ptaki. Larwy owadów są niewrażliwe na działanie toksyny typu C, natomiast mogą gromadzić w swoich organizmach zarówno toksynę, jak i spory.

Konie są bardzo wrażliwe na działanie jadu kiełbasianego. Zatrucie występuje u nich z reguły po spożyciu zanieczyszczonej toksyną paszy. Szczególna forma toksykoinfekcji występuje u źrebiąt, u których w przewodzie pokarmowym nie wykształciła się naturalna ochronna mikroflora. Mleko kłaczy zawierające wysoki poziom hormonów kortykosteroidowych jest czynnikiem predysponującym do wystąpienia u takich źrebiąt botulizmu.

Do niedawna poważnym problemem były epidemie botulizmu w hodowlach nerek. Obecnie dzięki stosowaniu programów szczepień ochronnych masowe zatrucia toksyną botulinową u tej grupy zwierząt zostały znacznie ograniczone. Przykładem może być masowe zatrucie jadem kiełbasianym u nerek i lisów w Finlandii, w wyniku którego 52 000 zwierząt padło lub zostało poddanych eutanazji [32]. Botulizm u nerek, lisów, niekiedy również trzody chlewnej i psów jest związany z karmieniem zwierząt padliną, drobiowymi odpadkami z rzeźni oraz odpadkami z ryb, które mogą zawierać spory lub toksyny *C. botulinum* [22].

Objawy kliniczne zatrucia jadem kiełbasianym są podobne u wszystkich gatunków zwierząt, występują zwykle po 3 do 17 dniach inkubacji. U bydła można obserwować ostry, podostry lub przewlekły przebieg zatrucia, w zależności od ilości wchłoniętej toksyny. Przy ostrym przebiegu zwierzęta padają w ciągu kilku do kilkunastu godzin, w przebiegu przewlekłym, śmierć może nastąpić nawet po 17 dniach. Początkowo stwierdza się brak apatyty, zaburzenia koordynacji, bezład i porażenia wiotkie. Porażenia w pierwszej kolejności dotyczą mięśni kończyn tylnych i ogona, następnie obejmują kończyny przednie oraz żuchwę

i język. Prowadzi to do charakterystycznej pozycji leżącej z głową skreconą w bok. U ptaków porażenia początkowo obejmują kończyny i skrzydła, następnie mięśnie szyi. Można u nich obserwować opadanie głowy i skręt szyi. Przy zatruciu toksyną typu C u kurcząt brojlerów nie występują porażenia wiotkie, obserwuje się natomiast zapalenie jelit i biegunkę [22, 23].

4. Diagnozowanie i leczenie

Rozpoznanie botulizmu u pacjenta opiera się na podstawie charakterystycznych objawów klinicznych i nie jest łatwe, ponieważ obraz choroby może być zróżnicowany w zależności od jej stadium i dawki toksyny [31]. Szczególnie kłopotliwe jest rozpoznanie pojedynczych przypadków o łagodnym przebiegu. Okres inkubacji choroby wynosi średnio 12–36 godzin. W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić syndrom Guillain-Barré, *miastenia gravis*, udar, zatrucie spowodowane takimi czynnikami tłumiącymi, jak alkohol metylowy, węglan baru, chlorek metylenu, organiczne związki fosforu, zatrucie grzybami, atropiną, czy CO, a także zapalenie substancji szarej rdzenia, zakażenia w obrębie centralnego układu nerwowego, guz mózgu czy choroby psychiczne. W wywiadzie istotna jest informacja o spożywaniu domowych przetworów. Botulizm w odróżnieniu od innych chorób przebiegających z objawami porażenia wiotkiego wyróżnia się tym, że wyraźne objawy pojawiają się w miejscach unerwianych przez nerwy czaszkowe i są symetryczne. Nie zanikają symptomy czuciowe. W celu odróżnienia od innych chorób przydatne jest badanie w tomografii komputerowej, elektromiografia i badanie płynu mózgowo-rdzeniowego. W tym ostatnim przypadku poszukuje się czynników zakaźnych lub oznacza białko, którego ilość wzrasta np. w chorobie Guillain-Barre a pozostaje w normie przy zatruciu jadem kiełbasianym. Botulizm noworodków jest diagnozowany na podstawie wykrywania toksyny i bakterii w kale. Botulizm noworodków należy różnicować z sepsą, szczególnie meningokokową, encefalopatią oraz wrodzona miopatią [6, 31].

Podstawowym założeniem w leczeniu botulizmu jest inaktywacja toksyny. Efekt ten uzyskuje się poprzez dożylnie podanie antytoksyny, która neutralizuje wolną jeszcze toksynę niezwiązaną z zakończeniami nerwowymi. Decyzja, co do podania antytoksyny powinna być powzięta na podstawie oceny stanu klinicznego pacjenta, historii choroby i nie powinna być odkładana do czasu uzyskania wyników badań laboratoryjnych, ponieważ terapia jest najbardziej skuteczna we wczesnym stadium choroby. Podanie antytoksyny wiąże się z określonym ryzykiem, ponieważ niektórzy pacjenci wykazują nadwrażliwość na obco-

gatunkową surowicę. Antybiotykoterapia nie ma zastosowania do leczenia botulizmu pokarmowego, co więcej podanie leku może przyczynić się do uwalniania toksyny w jelitach. Pacjenci wymagają leczenia wspomagającego, czasami przez wiele miesięcy, w tym odżywiania przy pomocy sondy lub parenteralnego, oddychania przy pomocy respiratora, jak również leczenia wtórnych zakażeń [31, 34].

Objawy występujące przy zatruciu jadem kiełbasianym u ludzi uważane są za wysoce charakterystyczne. Jednak w przypadkach osób starszych ze współistniejącymi innymi schorzeniami rozpoznanie kliniczne może być trudne, ponieważ objawy zatrucia mogą być u nich słabo wyrażone. Chwałuk i Chwałuk [8] opisują dwa przypadki botulizmu o nietypowym przebiegu klinicznym u pacjentów w podeszłym wieku. Autorzy zwracają uwagę, że prawidłowe rozpoznania postawiono z opóźnieniem, mimo zastosowania antytoksyny jeden z pacjentów zmarł.

5. Badania laboratoryjne

Rozpoznanie botulizmu opiera się na obserwacji klinicznej chorego. Badanie laboratoryjne może potwierdzić słuszność diagnozy, ale jej nie wykluczyć. Wykrycie toksyny potwierdza kliniczne rozpoznanie choroby. Toksyny botulinowej poszukuje się we krwi chorego, kale, treści żołądkowej i jelitowej a także żywności, którą chory spożywał. Podejmuje się również próby izolacji *C. botulinum* z kału raz treści żołądka i jelit. Bakterii powinno się również poszukiwać w podejrzonej o spowodowanie zatrucia żywności, tym niemniej ze względu na powszechne występowanie spor *Clostridium* w środowisku ich obecność może nie mieć związku z chorobą [6, 29]. Izolacja i identyfikacja bakterii zajmuje kilka tygodni. Właściwości biochemiczne *C. botulinum* nie zawsze pozwalają na pewną identyfikację gatunku. Badania Lindström i wsp. [28] oraz Brett [7] wykazały, że szczepy *C. botulinum* mogą być nieprawidłowo zidentyfikowane przy pomocy testów API 20A, Rapid ID 32A oraz Rapid ANAII. Dotyczy to szczególnie szczepów proteolitycznych z grupy I, które mogą wykazywać cechy podobne do *C. sporogenes* [7].

Ograniczeniem dla badań laboratoryjnych jest w niektórych przypadkach niemożność pobrania odpowiednich próbek materiałów klinicznych – koncentracja toksyny może być poniżej progu jej wykrywalności lub także ulec degradacji podczas transportowania próbek. Szacuje się, że w około 30–40% zatruc, koncentracja toksyny w pobranych próbkach jest poniżej progu wykrywalności. Ważny jest również przedział czasu, w którym można ją wykryć w materiałach klinicznych pobranych od chorego i tak np. u >50% cho-

rych stwierdza się jej obecność w surowicy i kale w ciągu 1 dnia od zatrucia i tylko u <25% chorych po 3 dniach. *C. botulinum* stwierdza się u >70% chorych w przeciągu 2 dni i tylko u 40% po 10 dniach. Materiał od chorego do badania na obecność toksyny należy pobrać przed podaniem antytoksyny [6].

Klasyczne metody wykrywania toksyny botulinowej przy pomocy próby biologicznej wykonywane są na wrażliwych zwierzętach laboratoryjnych, najczęściej na myszach, świnkach morskich lub innych drobnych ssakach. Wymagają one jednak długiego czasu obserwacji zwierząt (do 4 dni), co utrudnia szybkie podjęcie ukierunkowanego leczenia. Test ochronny na myszach może dawać niespecyficzne wyniki w przypadku botulizmu wywołanego przez szczepy *C. botulinum* wytwarzającego dwa typy neurotoksyn. Objawy zatrucia jadem kiełbasianym mogą być związane z obecnością w badanym materiale toksyn typu E lub F. W takich przypadkach należy brać pod uwagę możliwość wytwarzania neurotoksyn przez *C. butyricum* oraz *C. baratii*, a ostateczne rozpoznanie czynnika etiologicznego powinno być poparte metodami hodowlanymi. Badanie w próbie biologicznej próbek kału lub gleby może wywołać niespecyficzne upadki zwierząt. Ponadto toksyny typu C i D dają w teście ochronnym reakcje krzyżowe. Metody biologiczne służą jako testy referencyjne oraz umożliwiają określanie aktywności biologicznej badanych toksyn lub antytoksyn [23, 31].

Szybka diagnostyka w przypadku zatrucia jadem kiełbasianym ma decydujące znaczenie dla natychmiastowego podania choremu typowo swoistej surowicy antytoksycznej. W ostatnim czasie coraz częściej do laboratoryjnego potwierdzania botulizmu stosuje się metody biologii molekularnej takie jak PCR, multiplex PCR, czy PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) [10, 13, 15, 23]. Skrócenie czasu diagnozy do kilku godzin umożliwia także odczyn immunoenzymatyczny (ELISA), odczyn hemaglutynacji pośredniej (HAp) lub odczyn immunofluorescencyjno-adsorpcyjny (IFOA). Charakteryzują się one wysoką czułością i swoistością, prostotą wykonania i interpretacji wyników, czas oczekiwania na wynik wynosi kilka godzin. Najczęściej stosowane są testy ELISA, których czułość w porównaniu do próby biologicznej jest 10 do 100 razy mniejsza [6, 28].

5.1. Zastosowanie metod biologii molekularnej

Próba biologiczna na zwierzętach laboratoryjnych pozostaje referencyjną metodą wykrywania toksyn botulinowych. Konwencjonalne metody wykrywania i identyfikacji *C. botulinum* coraz częściej są zastępowane przez metody biologii molekularnej oparte na analizie DNA. Najczęściej stosowana jest reakcja łań-

cuchowej polimerazy lub hybrydyzacja DNA. Niewątpliwą zaletą tych metod jest czułość i specyficzność oraz możliwość szybkiego uzyskania wyników, w porównaniu z próbą biologiczną lub metodami hodowlanymi [16, 31].

W diagnostyce botulizmu przy pomocy technik biologii molekularnej wykrywane są specyficzne fragmenty genów odpowiedzialne za wytwarzanie neurotoksyn. Natomiast nie bada się aktywności neurotoksyn w badanych próbkach, co w niektórych przypadkach może stanowić wadę stosowania tych metod. Metody biologii molekularnej są bardzo skuteczne w badaniu przesiewowym kolonii bakteryjnych lub próbek podanych przednamnażaniu na podłożach płynnych. W większości metod opartych na reakcji PCR wykrywa się obecność fragmentu jednego z siedmiu genów kodujących neurotoksyny. Opracowano także metodę multiplex PCR pozwalającą na wykrywanie w jednej reakcji aż czterech toksyn: A, B, E oraz F, co skraca czas oczekiwania na wynik oraz obniża koszty odczynników [16, 31].

Liczba komórek lub spor *C. botulinum* w badanych próbkach może być bardzo niska, co może nawet uniemożliwić uzyskanie pozytywnego wyniku amplifikacji DNA. Dla podwyższenia czułości reakcji PCR stosowany jest często etap przednamnażania umożliwiający germinację spor i zwiększenie liczby komórek *C. botulinum* w badanej próbce. Ustalając temperaturę przednamnażania należy pamiętać, że optymalna temperatura inkubacji dla szczepów *C. botulinum* z grupy I wynosi od 35 do 37°C, natomiast dla grupy II od 26 do 30°C. Możliwe jest zastosowanie w procesie przednamnażania dwóch różnych temperatur. Czas przednamnażania powinien być optymalizowany dla poszczególnych rodzajów próbek oraz stosowanego podłoża. Zbyt krótki czas przednamnażania może powodować nadmierne namnożenie innych bakterii zanieczyszczających próbkę. Z kolei zbyt długa inkubacja może powodować lizę komórek *C. botulinum* lub sporulację. Optymalne wydaje się zastosowanie reakcji PCR w ciągu kilku kolejnych dni przednamnażania [30].

Czułość wykrywania *C. botulinum* w reakcji PCR oraz hybrydyzacji DNA w próbkach takich jak kał, krew i próbki żywności może być znacznie obniżona. Niektóre substancje obecne w tego rodzaju próbkach, takie jak: sole kwasów żółciowych, immunoglobuliny, krew oraz białko i tłuszcz obecne w żywności, mogą hamować przebieg reakcji amplifikacji DNA lub znacząco zmniejszać jej czułość. Większa czułość jest osiągana przy stosowaniu jako matrycy DNA wyizolowanego z wyhodowanych kolonii bakteryjnych. Także technika nested-PCR cechuje się większą czułością oraz umożliwia ona skrócenie lub całkowitą eliminację etapu przednamnażania, często stosowanego w konwencjonalnej reakcji PCR [30].

6. Występowanie bakterii w naturze, źródła zatrucia

Jak już wspomniano *C. botulinum* i jego forma przetrwalna są rozpowszechnione w naturze. Występują w ziemi uprawnej i leśnej, w osadach i mułach strumieni wodnych, rzek, jezior, w przybrzeżnych wodach mórz i oceanów. Są obecne w przewodzie pokarmowym krabów, mięczaków, ryb oraz ssaków. Praktycznie każda żywność może być zanieczyszczona laseczkami *C. botulinum* i jeżeli nie zostanie poddana zabiegom, w trakcie których spory tych bakterii giną, wówczas w trakcie jej przechowywania, w sprzyjających warunkach temperaturowych (patrz tabela I, klostridia z II-giej grupy zdolne są do namnażania się w temperaturze lodówki) i pH powyżej 4,6 może dochodzić do germinacji spor, namnażania się bakterii i produkcji toksyny. Jeżeli taka żywność przed spożyciem nie zostanie poddana obróbce cieplnej inaktywującej jad kiełbasiany (minimum: ogrzewanie w temperaturze 80°C przez 10 minut, a najlepiej gotowanie przez 20 minut), wówczas dochodzi do botulizmu. Toksyna botulinowa była wykrywana w wielu różnych produktach żywnościowych, jak np.: puszkowanej kukurydzy, papryce, zielonej fasoli, różnego typu zupach, miodzie, pieczarkach, dojrzałych oliwkach, szpinaku, rybach, mięsie i przetworach drobiowych, konserwach mięsnych, szynce, kiełbasie, faszerowanych jajach, homarach, wędzonych i solonych rybach [1, 6, 30].

Występowanie botulizmu w poszczególnych krajach na świecie jest zróżnicowane, ale ogólnie niskie w porównaniu do innych intoksykacji i toksykoinfekcji pokarmowych. Na częstość zatruc mają wpływ regionalne przyzwyczajenia żywieniowe, dostępność żywności, co powoduje, że nie jest ona przetwarzana i przechowywana w warunkach domowych, przemysłowe przetwarzanie żywności i nadzór nad jej pozyskiwaniem, przetwarzaniem i dystrybucją [1]. Wspólny rynek krajów EU powoduje, że następuje wolny przepływ żywności pomiędzy krajami członkowskimi. Żywność importowana do krajów EU musi odpowiadać wymaganiom jakościowym i prawnym ustanowionym przez kraje Wspólnoty Europejskiej. To powoduje, że do zatruc produktami przetworzonymi w sposób przemysłowy dochodzi stosunkowo rzadko, częściej natomiast produktami przetwarzanymi i przechowywanymi w warunkach domowych. W Europie źródłem zatruc jadem kiełbasianym są głównie przetwory domowe zawierające mięso, natomiast w Stanach Zjednoczonych przetwory domowe przygotowane z produktów pochodzenia roślinnego zanieczyszczonych przetrwalnikami *C. botulinum*. Przetwory domowej produkcji przygotowywane w niewłaściwy sposób znacznie częściej są źródłem *C. botulinum*, niż żywność produkowana na masową skalę. W technologii produkcji konserw jednym z krytycznych punktów jest

inaktywacja spor *C. botulinum* przez ogrzewanie w wysokiej temperaturze. W warunkach domowych nie zawsze jest osiągnięta odpowiednia temperatura lub ogrzewanie jest zbyt krótkie. W takich przypadkach laseczki jadu kiełbasianego mogą być obecne w przetworach i wytworzyć toksynę. Aby zmniejszyć prawdopodobieństwo zatrucia należy przetwory domowe ogrzewać bezpośrednio przed spożyciem [1, 6, 30].

W ostatnich latach notowane są również przypadki botulizmu związanego ze spożyciem żywności produkowanej przemysłowo (Tab. II). Jak już wspomniano wcześniej, szczepy *C. botulinum* zaliczane do grupy I i II różnią się właściwościami fizjologicznymi (Tab. I). Przypadki botulizmu odnotowane w wyniku spożycia żywności produkowanej przemysłowo spowodowane są nieproteolitycznymi szczepami zaliczanymi do II grupy, zdolnymi do namnażania się w temperaturze około 3°C. Wzrost liczby przypadków zatruc jadem kiełbasianym po spożyciu żywności produkowanej przemysłowo jest spowodowany pewnymi zmianami w metodach produkcji żywności [35]. Przez konsumentów pożądanym jest, aby produkty żywnościowe były przetworzone oraz poddane działaniu środków konserwujących w jak najmniejszym stopniu. Z tego powodu często procesy technologiczne ograniczają się jedynie do schłodzenia produktu i pakowania w atmosferze dwutlenku węgla. Chłodziarki na etapie dystrybucji żywności oraz w domach konsumentów często zapewniają jedynie temperaturę 10°C, w której spory *C. botulinum* z grupy II mogą ulegać germinacji. Ponadto pakowanie produktów spożywczych w atmosferze dwutlenku węgla sprzyja przeżywaniu laseczek jadu kiełbasianego. Innym czynnikiem umożliwiającym przeżywanie *C. botulinum* procesu przetwarzania żywności jest ogrzewanie produktów w niższych zakresach temperatur, które nie działają bójkowo na spory tych bakterii. Stosowanie niskich temperatur wynika z preferencji konsumentów do minimalizowania zmiany cech organoleptycznych, co dzieje się w wyniku oddziaływania wysokiej temperatury. Nie ma ustalonych wytycznych dotyczących czasu i temperatur ogrzewania produktów żywnościowych o niskim stopniu przetworzenia, które zapewniłyby zniszczenie spor *C. botulinum*. Ciepłooporność spor zależy bowiem od składu poszczególnych produktów. Z tego powodu opracowanie uniwersalnych norm jest nie możliwe. Zalecaną metodą zapobiegającą namnażaniu się *C. botulinum* w żywności produkowanej przemysłowo jest zapewnienie podczas produkcji i dystrybucji temperatury poniżej 3°C [1, 30, 35].

W Polsce przypadki zatrucia jadem kiełbasianym u ludzi odnotowywane są od 1952 roku. Częstość występowania botulizmu w latach 60-tych i 70-tych była wysoka. Podobnie bardzo wysoka częstość występowania botulizmu miała miejsce w okresie przeobrażeń

Tabela II

Przypadki botulizmu związanego ze spożyciem żywności produkowanej przemysłowo, wywołane przez szczepy *C. botulinum* z grupy II

Rok	Kraj	Liczba przypadków (liczba zgonów)	Rodzaj żywności (Typ <i>C. botulinum</i>)	Piśmiennictwo
1980–2002	Gruzja	85	Ryba wędzona (E)	[31]
1990	USA	3	Jesiotr (NB)	[31]
1991	Egipt	91	Solony kielb, niewytrzewiony (E)	[40]
1992	USA	3	Solona ryba, niewytrzewiana (E)	[31]
1996	Włochy	8 (1)	Ser mescarpone (A)	[3]
1997	Hiszpania	3	Szparagi w puszcze (B)	
1997	Niemcy	2	Ryba wędzona (E)	[26]
1997–2003	Norwegia	9	Fermentowana ryba („rakfish”, E)	[31]
1998	Japonia	6	Solone oliwki (B)	[31]
1999	Maroko	78 (20)	Mortadela (B)	[31]
1999	Rosja	72	Ryba (NB)	[31]
2002	RPA	2 (2)	Sardynki z puszki (A)	[19]
2003	Francja	4	Koszerne kielbaski wołowe i drobiowe (B)	[31]
2004	Rosja	10 (1)	Ryba wędzona (NB)	[31]
2004	Rosja	4 (1)	Ryba suszona (NB)	[31]
2004	Ukraina	6	Ryba suszona (NB)	[31]
2009	Francja	3	Ryba wędzona (E)	[25]

(NB) – nie badano

społecznych i braku żywności w latach 80-tych. Dla przykładu w 1964 roku odnotowano 201 przypadków botulizmu (współczynnik zapadalności 0,6 na 100 000 osób), a w roku 1982 odnotowano 738 zachorowań (współczynnik zapadalności 2 na 100 000 osób). W latach 1988–1998 odnotowano około 2000 przypadków zachorowań na botulizm, i była to znacznie większa liczba w porównaniu do innych krajów europejskich, jak np.: Włochy (412 przypadków), Niemcy (177 przypadków), Hiszpania (92 przypadki). Od 1991 roku obserwuje się tendencję spadkową występowania botulizmu w Polsce, która utrzymuje się do czasów obecnych, w 2004 roku odnotowano 53 przypadki choroby a w 2005 roku 46 przypadków (współczynnik zapadalności 0,12 na 100 000 osób), co prawdopodobnie wynika z lepszego zaopatrzenia rynku w żywność i podniesienia standardów życia [6, 23, 34].

Dobra sytuacja epidemiologiczna nie powinna jednak usypiać czujności w kontrolowaniu tej choroby, ponieważ zmieniające się zwyczaje żywieniowe polegające na spożywaniu pokarmów minimalnie przetworzonych a więc potencjalnie zanieczyszczonych sporam *C. botulinum*, mogą doprowadzać do pojawienia się większej liczby zatruc.

Nowym zjawiskiem w epidemiologii botulizmu jest wzrost przypadków botulizmu przyrannego u osób stosujących narkotyki [11]. Najwięcej przypadków jest związanych z domięśniowymi lub podskórnymi wstrzyknięciami heroiny. Możliwe jest również wystąpienie objawów botulizmu po wdychaniu heroiny.

Osoby przyjmujące narkotyki drogą wziewną mają często uszkodzoną bonę śluzową nosa lub zatok przynosowych, przez którą bakterie mogą łatwo wnikać do organizmu. Do zanieczyszczenia heroiny przez *C. botulinum* może dochodzić na każdym etapie produkcji. Heroina jest słabo rozpuszczalna w wodzie, dlatego przed wstrzyknięciem rozpuszcza się ją w słabym roztworze kwasu cytrynowego i ogrzewa. Ogrzewanie stymuluje wytwarzanie spor, jednocześnie zabija większość innych bakterii zanieczyszczających heroinę, mogących „konkurować” z *C. botulinum* w wywołaniu infekcji. Wielokrotnie powtarzane iniekcje domięśniowe powodują uszkodzenie i bliznowacenia tkanki mięśniowej oraz miejscowe zmniejszenie przepływu krwi. W takiej sytuacji dochodzi do tworzenia ropni, w których panują warunki beztlenowe, sprzyjające rozwojowi *C. botulinum* [2, 5, 11, 20].

Najwięcej przypadków botulizmu u osób wstrzykujących sobie narkotyki stwierdza się w Stanach Zjednoczonych, w 2000 roku było to 90% przypadków odnotowanych w całym świecie. Podobne zjawisko występuje także w Europie: w takich krajach jak Anglia, Irlandia, Szwajcaria oraz Norwegia, w których stwierdza się coraz większą liczbę przypadków botulizmu przyrannego u osób stosujących narkotyki. W Stanach Zjednoczonych notuje się rocznie około 110 przypadków botulizmu przyrannego, co stanowi około 30–40% wszystkich zatruc jadem kielbasianym. W Anglii i Irlandii w latach 2000–2001 rozpoznano 10 przypadków botulizmu przyrannego, w roku 2002

– 23 przypadki, w 2003 – 15 przypadków oraz w roku 2004 – 40 przypadków. W Niemczech w roku 2006 potwierdzono laboratoryjnie botulizm przyranny u 4 pacjentów [2, 5, 20].

7. Podsumowanie

Zauważalne zmiany w epidemiologii botulizmu u ludzi pozwalają przypuszczać, że w najbliższych latach można spodziewać się wzrostu liczby przypadków zatruc jadem kiełbasianym po spożyciu żywności produkowanej przemysłowo oraz w grupie ludzi stosujących narkotyki. Nie można wykluczyć także zatruc wywołanych przetworami domowymi. Szczególnie łatwy obecnie przepływ towarów i ludzi, może przyczynić się do wystąpienia zatruc nietypowym dla danego terenu produktem żywnościowym lub typem *C. botulinum*. Szczególną uwagę należy zwrócić na bezpieczeństwo konsumentów żywności niskoprzetworzonej, która może być źródłem szczepów *C. botulinum* należących do grupy II.

Kliniczne przypadki botulizmu występują stosunkowo rzadko, co może dodatkowo utrudniać prawidłowe rozpoznanie i opóźniać decyzję co do podjęcia leczenia. Niektóre kraje, jak np.: Francja nie produkują już antytoksyny botulinowej, ze względu na wysokie koszty produkcji. Biorąc pod uwagę zagrożenie dla życia ludzi, ostatnio słyszy się propozycje utworzenia działającego na wzór CDC w Stanach Zjednoczonych, w całej Europie ośrodka do spraw rozpoznawania i leczenia botulizmu.

Piśmiennictwo

1. Abgueguen P., Delbos V., Chennebault J.M., Fanello S., Brenet O., Alquier P., Granry J.C., Pichard E.: Nine cases of foodborne botulism type B in France and literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 749–752 (2003)
2. Akbulut D., L. de Souza-Thomas i wsp.: Wound botulism in injectors of drugs: upsurge in cases in England during 2004. *Euro. Surveill.* **10**, 172–174 (2005) (praca jest dziełem 11 autorów)
3. Aureli P., Franciosa G., Pourshaban M.: Foodborne botulism in Italy. *Lancet*, **348**, 1594 (1996)
4. Barash J.R., Arnon S.S.: Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1713–1715 (2004)
5. Barry J., Ward M., Cotter S., Macdiarmada J., Hannan M., Sweeney B., Grant K.A., McKeown P.: Botulism in injecting drug users, Dublin, Ireland, November–December 2008. *Euro. Surveill.* **14**, 1–3 (2009)
6. Botulism in the United States, 1899–1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases Division of Bacterial and Mycotic Diseases (1998)
7. Brett M.M.: Evaluation of the use of the bioMerieux Rapid ID32 for the identification of *Clostridium botulinum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 81–84 (1998)
8. Chwałuk P., Chwałuk A.: Trudności diagnostyczne w zatruciu jadem kiełbasianym – opis przypadków i przegląd piśmiennictwa. *Przegl. Lek.* **64**, 348–351 (2007)
9. Collins M.D., East A.K.: Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 5–17 (1998)
10. Dahlenborg M., Borch E., Rådström P.: Development of combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4781–4788 (2001)
11. Davis L.E., King M.K.: Wound botulism from heroin skin popping. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **8**, 462–468 (2008)
12. Fabbri A., Travaglione S., Falzano L., Fiorentini C.: Bacterial protein toxins: current and potential clinical use. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1116–1125 (2008)
13. Fach P., Gibert M., Griffais R., Popoff M.R.: Investigation of animal botulism outbreaks by PCR and standards methods. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 279–285 (1996)
14. Fernández R.A., Ciccarelli A.S., Arenas G.N., Giménez D.F.: First outbreak of botulism caused by *Clostridium botulinum* subtype Af. *Rev. Argent. Microbiol.* **18**, 29–31 (1986)
15. Franciosa F., Ferreira J.L., Hatheway C.L.: Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. *J. Clin. Microb.* **32**, 1911–1917 (1994)
16. Franciosa F., Florodi F., Maugliani A., Aureli P.: Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7192–7199 (2004)
17. Franciosa F., Hatheway C.L., Aureli P.: The detection of a deletion in the type B neurotoxin gene of *Clostridium botulinum* A(B) strains by two-step PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 442–446 (1998)
18. Franciosa G., Fenicia L., Pourshaban M., Aureli P. Recovery of a strain of *Clostridium botulinum* producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1148–1150 (1997)
19. Frean J., Arntzen L., van der Heever J., Perovic P.: Fatal type A botulism in South Africa, 2002. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**, 290–295 (2004)
20. Galldiks N., W.F. Haupt i wsp.: Rapid geographical clustering of wound botulism in Germany after subcutaneous and intramuscular injection of heroin. *Neurocrit. Care.* **6**, 30–34 (2007) (praca jest dziełem 14 autorów)
21. Giménez D.F., Ciccarelli A.S.: New strains of *Clostridium botulinum* subtype Af. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A.* **240**, 215–220 (1978)
22. Grenda T., Kwiatek K.: *Clostridium botulinum* – charakterystyka i znaczenie epidemiologiczne. *Med. Wet.* **65**, 743–746 (2009)
23. Hatheway C.L.: Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 66–98 (1990)
24. http://www.bergeys.org/outlines/bergeys_vol_3_outline_linked.pdf (12.04.2010)
25. King LA, de Valk H i wsp.: Botulism and hot-smoked whitefish: a family cluster of type E botulism in France, September 2009. *Euro Surveill.* **14**, pii: 19394 (2009) (praca jest dziełem 19 autorów). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N45/art19394.pdf> (12.04.2010)

26. Korkeala H., Stengel G., Hyytiä E., Vogelsang B., Bohl A., Wihlman H., Pakkala P., Hielm S.: Type E botulism associated with vacuum-packaged hot-smoked whitefish. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 1–5 (1998)
27. Kortepeter M.G., Cieslak T.J., Eitzen E.M.: Bioterrorism. *J. Environ. Health.* **63**, 21–24 (2001)
28. Lindström M., Jankola H.M., Hielm S., Hyytiä E.K., Korkeala H.J.: Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Imm. Med. Microb.* **24**, 267–274 (1999)
29. Lindström M., Keto R., Markkula A., Nevas M., Hielm S., Korkeala H.: Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in food and fecal material. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5694–5699 (2001)
30. Lindström M., Kiviniemi K., Korkeala H.: Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 92–104 (2006)
31. Lindström M., Korkeala H.: Laboratory diagnostics of botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 298–314 (2006)
32. Lindström M., Nevas M., Kurki J., Sauna-aho R., Latvala-Kiesilä A., Pölonen I., Korkeala H.: Type C botulism due to toxic feed affecting 52,000 farmed foxes and minks in Finland. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4718–4725 (2004)
33. Nevas M., Lindström M., Hielm S., Björkroth K.J., Peck M.W., Korkeala H.: Diversity of proteolytic *Clostridium botulinum* strains, determined by a pulsed-field gel electrophoresis approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1311–1317 (2005)
34. Parasion S., Bartoszcze M., Grylko R.: Struktura i mechanizm działania neurotoksyn bakterii rodzaju *Clostridium*. *Przegl. Epidemiol.* **61**, 519–527 (2007)
35. Peck M.W.: *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J. Appl. Microbiol.* **101**, 556–570 (2006)
36. Schiavo G., Montecucco C.: The structure and mode of botulinum and tetanus toxins (w) The Clostridia. Molecular Biology and pathogenesis, red. J. Rood, B.A. McClane, J.G. Songer, R.W. Titball, San Diego, California: Academic Press, 1997, s. 295–322.
37. Shukla H.D., Sharma S.K.: *Clostridium botulinum*: a bug with beauty and weapon. *Crit. Rev. Microbiol.* **31**, 11–18 (2005)
38. Suen J.C., Hatheway C.L., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.: *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin group G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 375–381 (1988)
39. Truong D.D., Stenner A., Reichel S.: Current clinical applications of botulinum toxin. *Curr. Pharm. Res.* **15**, 3671–3680 (2009)
40. Weber J.T., Hibbs R.G. Jr, Darwish A., Mishu B., Corwin A.L., Rakha M., Hatheway C.L., el Sharkawy S., el-Rahim S.A., al-Hamd M.F., et al. A massive outbreak of type E botulism associated with traditional salted fish in Cairo. *J. Infect. Dis.* **167**, 451–454 (1993)