PRZEGL EPIDEMIOL 2007; 61: 513 - 518

Dariusz Bielec, Romana Modrzewska

ZATRUCIE JADEM KIEŁBASIANYM DAWNIEJ I DZIŚ – ASPEKTY ETIOLOGICZNE, EPIDEMIOLOGICZNE I PATOGENETYCZNE

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych AM im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie
Kierownik: Romana Modrzewska

W pracy przedstawiono wyniki najważniejszych badań z zakresu etiologii, epidemiologii i patogenezy zatrucia jadem kiełbasianym.

Słowa kluczowe: zatrucie jadem kiełbasianym, etiologia, epidemiologia, patogeneza
Key words: botulism, etiology, epidemiology, pathogenesis

WSTĘP

W końcu XVIII wieku liczne epidemie zatrucia jadem kiełbasianym (botulizmu), które wystąpiły na terenie Würtenbergii zainspirowały kilku przedstawicieli ówczesnego świata nauki i medycyny do rozpoczęcia badań dotyczących tej tajemniczej choroby. *Justinus Kerner*, lekarz i poeta romantyczny, opublikował w 1820 roku monografię poświęconą zatruciu jadem kiełbasianym, w której zawarł dokładny opis 76 zachorowań. W następnych latach przeprowadził szereg doświadczeń na sobie i zwierzętach z użyciem ekstraktu z zatrutych kiełbas. Stwierdził, że jad kiełbasiany, nazywany przez niego również jadem tłuszczowym lub kwasem tłuszczowym, powstaje w warunkach beztlenowych, jest substancją biologiczną, wykazuje silne działanie w małych dawkach i powoduje przerwanie transmisji w obwodowym i autonomicznym układzie nerwowym. *Kerner* zalecał w celu zapobiegania zatruciu długotrwałe gotowanie kiełbas i przechowywanie ich w suchych, tlenowych warunkach. Wnioski te zawarł w drugiej monografii wydanej w 1822 roku. Dalszy postęp w badaniach został dokonany przez mikrobiologa *Emile Pierre Marie Van Ermengem*, który wykrył drobnoustrój będący przyczyną epidemii zatrucia jadem kiełbasianym w 1895 roku w Ellezelles. Nazwał go *Bacillus botulinus*, a wyniki badań opublikował w 1897 roku. W następnych latach nazwę tą zmieniono na *Clostridium botulinum* (1).

CZYNNIKI ETIOLOGICZNE ZATRUCIA JADEM KIEŁBASIANYM

Laseczka jadu kiełbasianego, *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*), jest beztlenowcem zdolnym do wytwarzania zarodników i neurotoksyny botulinowej (BoNT). Różnice

antygenowe wykryte między izolatami *C. botulinum* oraz między produkowanymi przez nie neurotoksynami stały się podstawą do wyodrębnienia 7 serotypów *C. botulinum* oznaczonych literami od A do G. W obrębie *C. botulinum* typu C wyróżniono następnie dwa serotypy: Cα wytwarzający neurotoksynę botulinową typu C1 (BoNT/C1) i Cβ odpowiedzialny za syntezę toksyny C2, która nie posiada własności neurotoksyny. Zachorowania ludzi spowodowane są najczęściej neurotoksyną botulinową typu A (BoNT/A), B (BoNT/B), E (BoNT/E), rzadziej F (BoNT/F). Wśród zwierząt botulizm wywołany jest toksyną typu C (BoNT/C) lub D (BoNT/D) (2). Związek neurotoksyny botulinowej typu G (BoNT/G) z patologią człowieka nie został do końca wyjaśniony, należy jednak wspomnieć, że *Sonnabend* i wsp. opublikowali w 1981 roku opis pięciu zachorowań ludzi zakończonych zgonem spowodowanych przez *C. botulinum* typu G (2,3). Ostatnio prowadzone badania filogenetyczne w obrębie rodzaju *Clostridium* doprowadziły do zakwalifikowania laseczek jadu kiełbasianego typu G do nowego gatunku *Clostridium argentinense* (2).

Wyizolowane zostały szczepy *C. botulinum* produkujące dwa typy neurotoksyny. *Barash* i wsp. opisali szczep 93-197, który w temperaturze 30°C produkował głównie BoNT/F, w temperaturze 37°C – BoNT/B, a w temperaturze 35°C oba typy neurotoksyny. Ponieważ ilość powstającej BoNT/B była czterokrotnie większa niż BoNT/F, szczep został zaklasyfikowany do podtypu Bf (4). *Franciosa* i wsp. opisali laseczki jadu kiełbasianego podtypu Ab. Autorzy za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) wykazali także obecność niepodlegających ekspresji genów BoNT/B w licznych szczepach *C. botulinum* typu A (5). W ostatnich dziesięcioleciach wykryto również laseczki jadu kiełbasianego podtypu Af i Ba (6).

Istnienie neurotoksyny botulinowej o mozaikowej budowie zostało potwierdzone u kilku szczepów *C. botulinum*. Laseczki jadu kiełbasianego typu C 6813 wytwarzają BoNT, która zbudowana jest z łańcucha lekkiego o własnościach antygenowych i składzie aminokwasowym podobnych do łańcucha lekkiego BoNT/C1 oraz łańcucha ciężkiego, antygenowo i pod względem składu aminokwasowego zbliżonego do łańcucha ciężkiego BoNT/D (6,7).

W 1980 roku został zidentyfikowany drugi czynnik etiologiczny botulizmu, neurotoksykogenny szczep *Clostridium barati* (*C. barati*), który wyhodowano wraz z potwierdzeniem obecności neurotoksyny typu F ze stolca niemowlęcia (8). Zachorowania spowodowane szczepami *C. barati* produkującymi neurotoksynę typu F występują rzadko. *Barash* i wsp. wykryli w 2005 roku piąty potwierdzony przypadek botulizmu niemowląt wywołany tą bakterią (9). *McCroskey* i wsp. opisali zachorowanie 54-letniego mężczyzny, sugerując możliwość kolonizacji jelita przez neurotoksykogenny szczep *C. barati* (10). Większość zachorowań spowodowanych przez neurotoksykogenne szczepy *C. barati* wystąpiła u noworodków lub niemowląt, u których doszło do kolonizacji jelita grubego.

Łańcuch lekki neurotoksyny typu F *C. barati* wykazuje 64,2% zgodności sekwencji aminokwasów z łańcuchem lekkim BoNT/F i 55,2% z łańcuchem lekkim BoNT/E. Homologia w zakresie łańcucha ciężkiego wynosi odpowiednio 73,6% z BoNT/F i 68,8% z BoNT/E. Neurotoksyna typu F *C. barati* jest neutralizowana zarówno przez przeciwciała anty-BoNT/F, jak i anty-BoNT/E (10,11).

W 1986 roku *Mc Croskey* i wsp. opisali kolejny czynnik etiologiczny botulizmu – neurotoksykogenny szczep *Clostridium butyricum* (*C. butyricum*) wytwarzający neurotoksynę typu E (12). Nieliczne wykryte do tej pory zachorowania wystąpiły na terenie Eurazji: we Włoszech, Chinach i prawdopodobnie Indiach (12-16). Przypadki stwierdzone we Włoszech

dotyczyły trojga niemowląt, 9-letniego chłopca i 19-letniej kobiety. Charakterystyczną ich cechą było częste występowanie dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, w tym silnych bólów brzucha, które łącznie z narastającym wodobrzuszem spowodowały laparotomię u 3 chorych, w tym u dwóch rozpoznano zapalenie uchyłka Meckela. U jednego z noworodków objawom botulizmu towarzyszyła intensywna biegunka spowodowana współistnieniem zapalenia jelita grubego wywołanym przez *Clostridium difficile* (13-15).

Porównanie sekwencji aminokwasów łańcucha lekkiego neurotoksyny typu E *Clostridium butyricum* z sekwencją łańcucha lekkiego BoNT/E wykazało 96,0% homologię, która dla łańcucha ciężkiego wyniosła 98,1% (11). Neurotoksyna typu E *Clostridium butyricum* jest podatna na neutralizację przez przeciwciała anty-BoNT/E (12).

WYBRANE ZAGADNIENIA EPIDEMIOLOGICZNE ZATRUCIA JADEM KIEŁBASIANYM

Epidemie zatrucia jadem kiełbasianym opisane w XVIII wieku wywołane były spożyciem kiełbasy lub szynki. Wykrycie jadu kiełbasianego w konserwowej fasoli w czasie epidemii w Darmstadt w 1904 roku udowodniło, że botulizm może być spowodowany spożyciem konserw warzywnych. Oprócz produktów mięsnych i jarzynowych źródłem BoNT mogą być także ryby (1,2).

W 2005 roku *Böhnel* i wsp. opisali po raz pierwszy występowanie BoNT/B w świeżym mleku krowim. Zwierzę oprócz objawów botulizmu cierpiało na przewlekłe zapalenie jednego z płatów gruczołu sutkowego, a mleko pobrane z tej części wymienia zawierało bardzo wysokie stężenie BoNT/B wynoszące przynajmniej 10000 mysich LD_{50}/mL. Źródła neurotoksyny botulinowej typu B nie udało się ustalić, ponieważ w czasie autopsji nie pobrano tkanek wymienia do dalszych badań (17).

Spożywanie miodu jest jedynym udowodnionym czynnikiem ryzyka botulizmu niemowląt. Miód może być źródłem zarodników *C. botulinum*, które u dzieci do 1 roku życia potrafią kiełkować w jelicie i wytwarzać formy wegetatywne produkujące BoNT. Zachorowania na botulizm noworodków wiążą się ze spożyciem miodu o dużej zawartości zarodników *C. botulinum* , od 5 do 80 spor/g (18). Badania przeprowadzone w ostatnich latach przy użyciu PCR wykazały obecność spor *C. botulinum* w 20 (11%) próbkach miodu spośród 190 testowanych. Dodatnie wyniki uzyskano w produktach pochodzących z Argentyny, Australii, Kuby, Finlandii, Francji, Włoch, Hiszpanii i Węgier, a ilość wykrytych zarodników była niska i wynosiła od 18 do 60/kg. Miody zawierały spory *C. botulinum* typu A, *C. botulinum* typu B lub oba rodzaje równocześnie (19). Według szacunków Centers for Disease Control and Prevention (CDC) w 1978 roku w USA miód mógł być przyczyną około 1/3 zachorowań na botulizm niemowląt. CDC zaleca, żeby dzieci do końca 1 roku życia nie były karmione miodem ani produktami spożywczymi zawierającymi go w swoim składzie.

STRUKTURA I MECHANIZM DZIAŁANIA NEUROTOKSYNY BOTULINOWEJ

Neurotoksyny botulinowe A-G wytwarzane są w postaci nieaktywnego biologicznie, pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej około 150 kDa, który ulega rozszczepieniu przez endogenne, bakteryjne (w grupie I *C. botulinum*) lub egzo-

genne, tkankowe (w grupie II *C. botulinum*) proteazy. Powstały łańcuch ciężki o masie cząsteczkowej 100 kDa połączony jest wiązaniem dwusiarczkowym z łańcuchem lekkim o masie cząsteczkowej 50 kDa. W skład cząsteczki neurotoksyny botulinowej wchodzi również atom cynku, który związany jest przez konserwatywny region łańcucha lekkiego (Zn^{+2}-*binding motif*). Łańcuch ciężki tworzy dwie domeny: jedną odpowiedzialną za wiązanie z receptorem błony presynaptycznej (H_C, *binding domain*) i drugą zaangażowaną w przemieszczanie łańcucha lekkiego z wnętrza synaptosomu do cytoplazmy neuronu (H_N, *translocation domain*). Łańcuch lekki zawiera domenę katalityczną (L_C, *catalytic domain*) i po rozerwaniu wiązania dwusiarczkowego wykazuje aktywność wysoce swoistej, cynkowo-zależnej endopeptydazy (20).

Wszystkie typy toksyn botulinowych produkowane są przez *C. botulinum* w połączeniu z białkami, jakimi są hemaglutynina (HA) i nietoksyczna niehemaglutynina (NTNH), tworząc kompleks nazywany prototoksyną. Geny kodujące BoNT, HA i NTNH występują w formie klasteru. Wykryto trzy formy prototoksyny: M-toksynę nazywaną również 12S toksyną zbudowaną z BoNT i NTNH, L-toksynę (16S toksynę) złożoną z BoNT, NTNH i dwóch HA, LL-toksynę (19S toksynę) będącą dimerem złożonym z dwóch L-toksyn połączonych prawdopodobnie jedną z podjednostek hemaglutyniny. W skład hemaglutyniny wchodzą 4 podjednostki: HA1, HA2, HA3a i HA3b. *C. botulinum* typu A wytwarza wszystkie formy prototoksyny, typu B, C, D produkuje M-toksynę i L-toksynę, typu E - wyłącznie M-toksynę (21).

Białka połączone z BoNT w kompleks pełnią liczne funkcje. Postuluje się, że chronią neurotoksynę botulinową przed działaniem kwaśnego pH i enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym. W przypadku doustnego zatrucia neurotoksyną botulinową typu B stwierdzono, że L-toksyna ma około 1000 razy większą siłę działania niż M-toksyna, która z kolei jest 20-krotnie silniejsza od czystej BoNT/B. Wykazano również, że L-toksyna zawierająca w swoim składzie BoNT/C łączy się z mikrokosmkami jelita cienkiego poprzez reszty kwasu sialowego, a L-toksyna złożona z BoNT/A wiąże się z powierzchnią komórek jelita cienkiego za pośrednictwem reszt galaktozy, co może ułatwiać wnikanie neurotoksyn botulinowych do wnętrza komórek jelita (21). *Zhou* i wsp. wykazali, że hemaglutynina-33 (Hn-33) zawarta w kompleksie prototoksyny typu A wiąże się z synaptotagminą II, która jest domniemanym receptorem dla BoNT/A, BoNT/B i BoNT/E w układzie nerwowym. Obecność Hn-33 potwierdzono wewnątrz synaptosomów, co sugeruje jej prawdopodobny udział w łączeniu się BoNT z zakończeniami neuronów (22).

Docelowym miejscem działania toksyny botulinowej są zakończenia presynaptyczne w synapsach układu przywspółczulnego i połączenia nerwowo-mięśniowe, w których powoduje zahamowanie uwalniania acetylocholiny.

Łańcuch ciężki BoNT łączy się za pomocą domeny H_C z receptorem białkowym, jakim jest prawdopodobnie synaptotagmina II i gangliozydem zlokalizowanymi na błonie presynaptycznej neuronu. Zaadsorbowane cząsteczki BoNT ulegają następnie na drodze endocytozy przemieszczeniu do wnętrza struktur pęcherzykowych neuronu. Pod wpływem obniżenia pH wewnątrz synaptosomów dochodzi do utworzenia przez domenę H_N kanału w błonie synaptosomu, czemu towarzyszy redukcja wiązania dwusiarczkowego i przemieszczenie łańcucha lekkiego do cytoplazmy neuronu. Powoduje to ujawnienie enzymatycznej aktywności łańcucha lekkiego, który trawi białka biorące udział w neuroegzocytozie i hamuje przez to uwalnianie acetylocholiny do szczeliny synaptycznej. Stwierdzono, że łańcuchy lekkie

BoNT/A, BoNT/C1 i BoNT/E rozszczepiają SNAP-25 (synaptosome-associated membrane protein of 25 kDa), BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F, BoNT/G powodują rozpad synaptobrewiny, a BoNT/C1 trawi syntaksynę (20,23).

Łańcuchy lekkie BoNT są najbardziej selektywnymi proteazami, jakie zostały do tej pory poznane. Właściwość ta spowodowana jest łączeniem się z substratem zarówno w centrum katalitycznym, jak też w licznych miejscach wiązania substratu zlokalizowanych poza nim (23).

BoNT łączy się z zakończeniem presynaptycznym w sposób nieodwracalny, ale czas jej działania zależy od typu toksyny i jest najdłuższy dla BoNT/A. *Foran* i wsp. zmierzyli czas połowicznego hamowania uwalniania neurotransmitera w neuronach móżdżku szczura przez BoNT/A (powyżej 31 dni), BoNT/C1 (powyżej 25 dni), BoNT/B (około 10 dni), BoNT/F (około 2 dni) i BoNT/E (około 0,8 dnia). Autorzy wykazali także, że długi czas działania BoNT/A, BoNT/C1 i BoNT/B wynika z długotrwałego utrzymywania się aktywności tych endopeptydaz w zakończeniach neuronów (24).

D Bielec, R Modrzewska

BOTULISM IN THE PAST AND TODAY – ETIOLOGICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND PATHOGENIC ASPECTS

SUMMARY

In this paper we review the most recent approach to etiology, epidemiology and pathogenesis of botulism.

PIŚMIENNICTWO

1. Erbguth FJ. Historical Notes on Botulism, *Clostridium botulinum*, Botulinum Toxin, and the Idea of the Therapeutic Use of the Toxin. Mov Disord 2004; 19 (Suppl. 8): S2-S6
2. Caya JG, Agni R, Miller JE. *Clostridium botulinum* and the Clinical Laboratorian. Arch Pathol Lab Med 2004; 128: 653-62
3. Sonnabend O, Sonnabend W, Heinzle R, i in. Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G botulinal toxin in humans: report of five sudden unexpected deaths. J Infect Dis 1981; 143: 22-7
4. Barash JR, Arnon SS. Dual Toxin-Producing Strain of *Clostridium botulinum* Type Bf Isolated from a California Patient with Infant Botulism. J Clin Microbiol 2004; 42: 1713-15
5. Franciosa G, Ferreira JL, Hatheway CL. 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 Microbiol 1994; 32: 1911-17
6. Augustynowicz E. Molekularne podstawy patogennego działania neurotoksyn *Clostridium botulinum.* Post Microbiol 2000; 39: 325-40
7. Terajima J, Syuto B, Ochandra JO, i in. Purification and Characterization of Neurotoxin Produced by *Clostridium botulinum* Type C 6813. Infect Immun 1985; 48: 312-17
8. Hall JD, McCroskey LM, Pincomb BJ. Isolation of an Organism Resembling *Clostridium barati* Which Produces Type F Botulinal Toxin from an Infant with Botulism. J Clin Microbiol 1985; 21: 654-5

9. Barash JR, Tang TWH, Arnon SS. First Case of Infant Botulism Caused by *Clostridium barati* Type F in California. J Clin Microbiol 2005; 43: 4280-2
10. McCroskey LM, Hatheway CL, Woodruff BA. Type F Botulism Due to Neurotoxigenic *Clostridium barati* from an Unknown Source in an Adult. J Clin Microbiol 1991; 29: 2618-20
11. Thompson DE, Hutson RA, East AK, i in. Nucleotide sequence of the gene coding for *Clostridium barati* type F neurotoxin: Comparison with other clostridial neurotoxins. FEMS Microbiol Lett 1993; 108: 175-82
12. McCroskey LM, Hatheway CL, Fenicia L, i in. Characterization of an Organism That Produces Type E Botulinal Toxin But Which Resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an Infant with Type E Botulism. J Clin Microbiol 1986; 23: 201-220.
13. Aureli P, Fenicia L, Passolini B, i in. Two Cases of Type E Infant Botulism Caused by Neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. J Infect Dis 1986; 154: 207-11
14. Fenicia L, Franciosa G, Pourshaban M, i in. Intestinal Toxemia Botulism in Two Young People, Caused by *Clostridium butyricum* Type E. Clin Infect Dis 1999; 29: 1381-7
15. Fenicia L, Da Dalt L, Anniballi F, i in. A Case of Infant Botulism due to Neurotoxigenic *Clostridium butyricum* Type E Associated with *Clostridium difficile* Colitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 736-8
16. Schlechter R, Arnon SA. Commentary: Where Marco Polo Meets Meckel: Type E Botulism from *Clostridium butyricum*. Clin Infect Dis 1999; 29: 1388-93
17. Böhnel H, Neufeld B, Gessler F. Botulinum neurotoxin type B in milk a cow affected by visceral botulism. Vet J 2005; 169: 124-5
18. Tanzi MG, Gabay MP. Association Between Honey Consumption and Infant Botulism. Pharmacotherapy 2002; 22: 1479-83
19. Nevas M, Hielm S, Lindström M, i in. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol 2002; 72: 45-52
20. Montecucco C, Shiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. Q Rev Biophys 1995; 28: 423-72
21. Fujinaga Y. How bacterial toxins penetrate the intestinal epithelial barrier: strategies taken by cholera toxin and botulinum progenitor toxin. Tox Rev 2006; 25: 47-59
22. Zhou Y, Foss S, Lindo P, i in. Hemagglutinin-33 of type A botulinum neurotoxin complex binds with synaptotagmin II. FEBS J 2005; 272:2717-26
23. Breidenbach MA, Brunger AT. New insights into clostridial neurotoxin-SNARE interactions. Trends Mol Med 2005; 11: 377-81
24. Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, i in. Evaluation of the Therapeutic Usefulness of Boulinum Neurotoxin B, C1, E, and F Compared with the Long Lasting Type A. J Biol Chem 2003; 278: 1363-71

Otrzymano: 9.12.2006 r.

Adres autorów:
Dr n. med. Dariusz Bielec
Prof. zw. dr hab. n. med. Romana Modrzewska
Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych
ul. Biernackiego 9, 20-089 Lublin
tel. 081-7402700