

Clostridium botulinum

– charakterystyka i znaczenie epidemiologiczne

TOMASZ GREUDA, KRZYSZTOF KWIATEK

Zakład Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Grenda T., Kwiatek K.

Clostridium botulinum – characteristic features and epidemiological significance

Summary

Bacteria of the species *Clostridium botulinum* are spore-forming, gram-positive, anaerobic rods which are able to produce the most potent toxins in nature. Botulinum toxins are the etiologic factor of botulism in humans and animals. A lethal dose of botulinum toxin for a mouse is about 0.3 ng/kg, whilst a lethal dose for a human ranges from 0.2 µg/kg to 2 µg/kg. Historically, the differentiation of *Clostridium botulinum* strains is based on their ability to produce one of the seven botulinum toxins marked with letters from A to G. Nowadays, the classification based on the ability to produce botulinum toxins is not the only taxonomic criterion. *C. botulinum* strains are also divided into four groups which have different metabolic and culture features. Although, botulism is a rare disease, the outbreaks of botulism are difficult to control and cause economic losses in livestock. The species most susceptible to botulism are cattle and birds. The aim of this article is the characteristic of *Clostridium botulinum*, botulinum toxins, their action and botulism as a disease in some species of animals.

Keywords: *Clostridium botulinum*, botulism in animals, botulinum toxin

Podział taksonomiczny

Gatunek *Clostridium botulinum* stanowią beztlenowe, Gram-dodatnie laseczki przetrwalnikujące. Według systematyki Bergeya, każdy mikroorganizm, który posiada zdolność do wytwarzania jednej z siedmiu toksyn botulinowych, oznaczanych kolejno literami od A do G, uznawany jest za *Clostridium botulinum* (4). Klasyfikacja opierająca się o właściwości serologiczne nie jest jedynym kryterium podziału taksonomicznego. Współcześnie mikroorganizmy zdolne do wytwarzania toksyn botulinowych, jak i szczepy nie wykazujące właściwości toksynotwórczych, lecz posiadające podobne cechy metaboliczne i hodowlane klasyfikowane są do jednej z czterech grup. Do grupy pierwszej zaliczane są proteolityczne szczepy *Clostridium botulinum* zdolne do wytwarzania toksyn typów A, B i F, a także nie produkujące toksyny szczepy *Clostridium sporogenes*. Do grupy drugiej zaliczane są nieproteolityczne szczepy *Clostridium botulinum* zdolne do wytwarzania toksyn typów A, B, E. Grupa trzecia obejmuje proteolityczne i nieproteolityczne szczepy *Clostridium botulinum* zdolne do wytwarzania toksyn typów C i D, a także *Clostridium novyi* typu A. Do grupy czwartej klasyfikowane są szczepy *Clostridium botulinum* wytwarzające toksynę typu G (ze względu na znaczną odmienność genetyczną i fenotypową od szczepów *C. botulinum*, zaklasyfikowanych do trzech pozostałych grup, w literaturze określane niekiedy jako

odrębny gatunek *Clostridium argentinense*), a także nietoksynotwórcze szczepy *C. subterminale* i *C. hastiforme* (7, 20). Do wytwarzania toksyn botulinowych są zdolne także nie zaliczane do gatunku *C. botulinum* nieproteolityczne szczepy: *C. butyricum* – zdolne do produkcji toksyny typu E oraz *C. barati* – zdolne do produkcji toksyny typu F (7).

Cechy hodowlane *Clostridium botulinum*

Gatunek *Clostridium botulinum* stanowią urzęsione peritrichalnie laseczki przetrwalnikujące (zazwyczaj subterminalnie) z tendencją do wybrzuszania komórki bakteryjnej. Przeważnie osiągają rozmiary ok. 2-10 µm × 0,8-1,16 µm. Komórki występują pojedynczo, parami bądź tworzą krótkie łańcuszki. Po okresie ok. 48 h inkubacji tworzą okrągłe kolonie o nieregularnych brzegach, o rozmiarach od 2-3 mm. Na agarze z krwią tworzą kolonie otoczone wąską strefą zupełnej hemolizy. Na agarze z emulsją żółtka jaja kurzego kolonie *C. botulinum* pokrywa lśniąca warstwa świadcząca o właściwościach lipolitycznych, tzw. warstwa perłowa. W przypadku niektórych szczepów grupy trzeciej obserwuje się wokół kolonii strefy zmętnienia, co świadczy o zdolności wytwarzania lecytynazy. Optymalne pH dla rozwoju wszystkich szczepów *C. botulinum* zawiera się w granicach 7,0-7,2, jednak niektóre szczepy wykazują zdolność wzrostu już przy pH = 4,5. Aktywność wodna (a_w) dla

podtrzymania wzrostu i produkcji toksyny wynosi powyżej 0,93 (2, 14, 18, 19, 23).

Optymalne temperatury rozwoju szczepów *C. botulinum* przyjmują różne zakresy w zależności od przynależności do grupy metabolicznej: dla grupy pierwszej od 35°C do 40°C, dla grupy drugiej ok. 30°C, dla grupy trzeciej ok. 40°C, dla grupy czwartej ok. 37°C. Wzrost *C. botulinum* hamuje temperatura ok. 4°C (7). *Clostridium botulinum* charakteryzuje się łatwością sporulacji, ponadto formy przetrwalne mogą wchodzić w etap kiełkowania przy warunkach niesprzyjających dla wzrostu form wegetatywnych. W warunkach laboratoryjnych przetrwalnikowanie jest stymulowane przez L-alaninę, L-laktat i aniony węglanowe (1). Spory inaktywują: ogrzewanie w temperaturze 121°C przez 20 min., mocne kwasy, formaldehyd, chlor, silne zasady oraz tlenki etylenu i propylenu. Są one odporne na oddziaływanie ultrafioletu i alkoholi (18, 23).

Różne wymagania temperaturowe dla optymalnego wzrostu, jak i zróżnicowanie pod względem metabolizmu jest powodem braku selektywnych pożywek mikrobiologicznych do izolacji wszystkich mikroorganizmów określanymi jako *Clostridium botulinum*. Szczepy należące do grup pierwszej i czwartej są proteolityczne, natomiast szczepy należące do pozostałych grup nie posiadają zdolności proteolitycznych (wyjątek stanowią niektóre szczepy grupy trzeciej). Szczepy poszczególnych grup różnią się także pod względem zdolności fermentacji cukrów. Izolację wszystkich szczepów należących do gatunku *C. botulinum* utrudnia bliskie pokrewieństwo ze szczepami nie posiadającymi zdolności do produkcji toksyny botulinowej, lecz o podobnych cechach fenotypowych i wymaganiach metabolicznych (7, 17).

Budowa toksyn botulinowych

Toksyny botulinowe (BoNT) uznawane są za najsilniejsze z substancji toksycznych naturalnie występujących w środowisku. Letalna dawka toksyny dla człowieka wynosi od 0,2 µg/kg do 2,0 µg/kg. Dawka letalna dla myszy laboratoryjnej wynosi ok. 0,3 ng/kg (15).

Większość szczepów toksynotwórczych zdolna jest do produkcji jednego rodzaju toksyny, jednak znane są także szczepy zdolne do produkcji dwóch rodzajów toksyn: Ab, Ba, Af, Bf (duża litera oznacza toksynę produkowaną w przeważającej ilości) (6). Pośród toksyn wytwarzanych przez szczepy C i D zaobserwowano zróżnicowanie antygenowe wskazujące na istnienie w obrębie tych szczepów kilku odmiennych serologicznie podtypów. Wytwarzanie toksyn przez szczepy grupy trzeciej jest uzależnione od rodzaju zakażających je bakteriofagów, które warunkują ich toksyczność. Szczepy nietoksyczne mogą przechodzić pod wpływem bakteriofagów w toksyczne o różnym charakterze antygenowym wytwarzanych przez nie toksyn. W obrębie toksotypu C istnieją dwa podtypy: C_α i C_β. Szczepy C_α zdolne są do produkcji toksyny C₁ oraz niewielkich ilości toksyny C₂ – nieposiadającej właściwości neurotoksyny oraz niewielkich ilości toksyny typu D. Szczepy typu C_β zdolne są do produkcji toksyny C₂, a także śladowych ilości C₁. Szczepy typu D, oprócz toksyny typu D, są zdolne do produkcji małych ilości toksyn typów C₁ i C₂ (8).

Toksyny botulinowe są gromadzone w cytozolu komórek bakteryjnych. Ich uwalnianie następuje w fazie logarytmicznego wzrostu *C. botulinum*, a wzrasta intensywnie w czasie autolizy komórek (16). Toksyny botulinowe zbudowane są z kilku komponentów, tworzą kompleks protoksyny złożony z formy aktywnej (BoNT) w połączeniu z hemaglutyniną (HA) i nietoksyczną niehemaglutyniną (NTHN). Rozróżnia się trzy formy protoksyn o różnej masie molekularnej: formę M – zbudowaną z BoNT i NTHN (o stałej sedymentacji 12S i masie molekularnej ok. 300 kDa), formę L (o stałej sedymentacji 16 S i masie molekularnej ok. 500 kDa) – zbudowaną z BoNT, NTHN i dwóch HA, formę LL (o stałej sedymentacji 19S i masie molekularnej ok. 900 kDa) – stanowiącą dimer złożony z dwóch protoksyn L. Szczepy *C. botulinum* toksotypu A są zdolne do produkcji wszystkich form protoksyn, *C. botulinum* toksotypów B, C, D wytwarzają protoksyny M i L, podczas gdy szczepy toksotypów E i F – jedynie formę M (11).

Aktywne formy toksyn botulinowych (BoNT) stanowią dwułańcuchowe molekuly połączone między sobą wiązaniami disiarczkowymi. Uwolnienie tych molekul z kompleksu protoksyny zachodzi w wyniku działania własnych proteaz wytwarzanych przez szczepy proteolityczne *C. botulinum* bądź przez proteazy produkowane przez organizm gospodarza. Molekuly te składają się z łańcucha lekkiego (L_c) o masie ok. 50 kDa oraz z łańcucha ciężkiego (H_c) o masie ok. 100 kDa. W obrębie BoNT znajdują się trzy różne funkcjonalnie domeny: 1) cynkowo-zależna metaloproteaza – łańcuch lekki (L_c), 2) domena umożliwiająca transport toksyny przez błonę presynaptyczną (H_N), 3) domena wiążąca toksynę na powierzchni receptora błony presynaptycznej, składa się ona z dwóch poddomen (H_c – H_N oraz H_c – C) (11, 12).

Działanie toksyn botulinowych

Toksyny bądź przetrwalniki *C. botulinum* dostają się do organizmu wraz z żywnością, paszą, w rzadszych przypadkach poprzez miejsca zranień. Laseczki *C. botulinum* są mało inwazyjne. Najczęściej do zatrucia toksyną botulinową dochodzi w wyniku intoksykacji, w rzadszych przypadkach w wyniku toksykoinfekcji. Toksyny po wchłonięciu w jelitach bądź w miejscach zranień wraz z płynami ustrojowymi przedostają się do błon presynaptycznych zakończeń cholinergicznym neuronów. Wiążą się z błonami presynaptycznymi w α-motoneuronach (10).

Toksyny botulinowe mają charakter specyficznych proteaz, oddziałujących na różne białka, które tworzą kompleks błony presynaptycznej (SNARE) – odpowiedzialny za fuzję pęcherzyka synaptycznego wypełnionego neuromediatorem (acetylocholiną) z błoną neuronu. BoNT produkowane przez serotypy A i E degradują białko SNAP-25, BoNT produkowane przez szczepy serotypów B, D, F i G degradują białko VAMP (synaptobrewinę), a BoNT produkowane przez serotyp C degraduje białko HPC1 (syntaksynę) i SNAP 25. Degradacja jednego z białek kompleksu SNARE prowadzi do zahamowania mechanizmu uwalniania acetylocholino oraz wystąpienia objawów porażenia wiotkich (11, 12).

Osobliwy charakter oddziaływania posiada toksyna typu C₂ produkowana przez szczepy toksotypu C. Nie

ma ona charakteru neurotoksyny, lecz wykazuje aktywność cytotoxyczną (8, 14).

Botulizm u zwierząt

Botulizm u zwierząt jest rzadko spotykanym schorzeniem, pomimo tego choroba jest rozpowszechniona na całym świecie. Wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia schorzenia przypisywane jest rejonom ubogim w fosfor i białko, czego przykładem są regularne zachorowania na botulizm w Afryce Południowej u bydła i u owiec w Australii (14).

Botulizm często przyjmuje charakter epidemii trudnych do opanowania. Chore zwierzęta mogą wydalać przetrwalniki i tym samym stwarzać możliwość rozsiewania *C. botulinum*, pośredniego przenoszenia schorzenia na zdrowe zwierzęta poprzez kontaminację źródeł poboru wody, pokarmu. Najczęściej do objawów schorzenia dochodzi wskutek intoksykacji spowodowanej spożyciem przez zwierzę zanieczyszczonej toksyną paszy. Rzadziej do objawów dochodzi wskutek toksykoinfekcji jelitowej, spowodowanej rozwojem przetrwalników *C. botulinum* w świetle jelita grubego i produkcji toksyny *in situ* (3). Do objawów botulizmu może także dojść wskutek rozwoju przetrwalników *C. botulinum* w miejscach zranień i podobnie jak w przypadku toksykoinfekcji jelitowej – produkcji toksyny *in situ* (13, 14).

Czynnikiem etiologicznym botulizmu u zwierząt są najczęściej toksyny produkowane przez *C. botulinum* toksotypów C i D. Rzadziej do objawów schorzenia dochodzi wskutek oddziaływania toksyn produkowanych przez toksotypy A, B i E (5, 14). Obszary występowania poszczególnych toksotypów wydają się determinować czynniki środowiskowe. Częstotliwość ich występowania jest różna w zależności od regionu geograficznego. *Clostridium botulinum* toksotypu B jest najczęściej identyfikowane w Europie i we wschodnich regionach USA, toksotyp C jest najczęściej wykrywany w zachodniej części USA, podczas gdy toksotyp D jest najczęściej wykrywany w Afryce Południowej i Australii. Obserwowana jest także sezonowość schorzenia. Częstotliwość wybuchów botulizmu znacznie wzrasta w lecie, co jest związane z dogodnymi warunkami temperaturowymi dla rozwoju większości szczepów *Clostridium botulinum*. Botulizm występujący w okresie zimy przeważnie powodowany jest intoksykacją. Gatunkami najczęściej zapadającymi na botulizm są bydło i ptaki (5, 9, 14, 22).

Etiologię botulizmu u bydła najczęściej determinuje toksotyp C. Rzadziej do objawów schorzenia dochodzi wskutek oddziaływania toksyn produkowanych przez toksotypy D, B i A. W przypadku toksotypu B – w powodowaniu botulizmu u bydła mają znaczenie jedynie szczepy proteolityczne. Przyczyną schorzenia może być spożycie przez zwierzę niewłaściwie sporządzonej kiszonki bądź sianokiszonki, gdzie w wewnętrznych warstwach powstają warunki beztlenowe sprzyjające rozwojowi *C. botulinum*. Dodatkowo rozkładająca się padlina drobnych zwierząt wewnątrz składowanego materiału może stanowić źródło rozsiewania przetrwalników *C. botulinum* typu C i D. Schorzenie na tle toksyny wytwarzanej przez *C. botulinum* typu B odnotowywane jest często po spożyciu przez zwierzęta składowanego ziarna –

jęczmienia, owsa, gdzie w wewnętrznych warstwach przy odpowiedniej wilgoci i warunkach beztlenowych może dojść do rozwoju przetrwalników i produkcji toksyny. Nawożenie pól uprawnych odchodami kurzymi może spowodować przenoszenie przetrwalników *C. botulinum* toksotypu D na rośliny, które następnie wykorzystywane są do produkcji pasz. Toksyna typu D nie powoduje poważnie botulizmu u ptaków, lecz przetrwalniki *C. botulinum* serotypu D mogą być przenoszone wraz z ptasimi odchodami. Nawożenie pól pomiotem kurzym może więc stanowić czynnik przyczyniający się do występowania botulizmu u bydła. Botulizm u bydła odnotowywany jest często w rejonach niedoboru fosforu. Przyczyną może być naturalne uzupełnianie niedoboru fosforu poprzez spożywanie przez bydło szkieletów zwierząt, w których pozostaje nagromadzona toksyna (2, 14).

Botulizm u bydła w zależności od ilości wchłoniętej toksyny przyjmuje przebieg ostry, podostry lub przewlekły. Okres inkubacji choroby jest rozciągnięty w czasie i trwa zazwyczaj od 2 do 6 dni, ale śmierć może nastąpić nawet po ok. 17 dniach. W przebiegu ostrym śmierć może nastąpić w przeciągu kilku do kilkunastu godzin. W przebiegu podostrym choroba trwa przez okres do ok. 7 dni i dłuższy w przypadku przebiegu przewlekłego. W początkowej fazie schorzenia obserwowany jest bezład ruchowy, zataczanie się zwierzęcia. Następnie występują liczne porażenia wiotkie. Zwykle na początku porażenia obejmują mięśnie kończyn tylnych, ogon, a następnie rozciągają się na kończyny przednie, głowę (głównie żuchwę i język) i szyję. W końcowej fazie choroby zwierzę układa się charakterystycznie z głową skręconą w bok. Schorzenie przebiega bezgorączkowo. Obserwowana jest utrata mleka oraz zaparcia. Śmierć następuje zazwyczaj w wyniku porażenia przepony i innych mięśni oddechowych (5, 14).

Botulizm u ptaków wywołuje głównie serotyp C, rzadziej A, B i E. Do schorzenia dochodzi najczęściej na obszarach bagnistych, okolicach jezior, szczególnie tam, gdzie sezonowo mają miejsce powodzie. Zachorowania występują najczęściej wśród dzikiego ptactwa wodnego, ptaków migrujących. Wśród ptaków udomowionych botulizm często występuje u kaczek, kur, bażantów. Zasięg geograficzny schorzenia jest bardzo szeroki. Botulizm u ptaków odnotowywany jest na wszystkich kontynentach. Wzrost liczby przypadków zachorowań następuje w porze letniej, przy odpowiednich warunkach temperaturowych dla rozwoju *C. botulinum*. Schorzenia na tle toksyny typu E występują najczęściej wiosną. Dogodne warunki dla rozwoju zarazka występują w następstwie powodzi w szlamach, podczas procesów gnilnych roślin (22).

Ważną rolę w etiologii botulizmu u ptaków odgrywają larwy owadów, a w szczególności chrząszczy i much, którymi odżywiają się ptaki. Wykazują one zazwyczaj zupełną niewrażliwość na jad typu C, mogą jednak gromadzić w swoich organizmach przetrwalniki bądź toksynę. Przy odpowiednich warunkach temperaturowych może nastąpić pośmiertnie w larwie namnożenie zarazka, a w konsekwencji produkcja toksyny. W fermach hodowlanych potencjalnym źródłem toksyny botulinowej i *C. botulinum* może być kał, a także padłe na botu-

lizm zwierzęta. Efekt letalny toksyny botulinowej uzależniony jest od wrażliwości gatunkowej oraz rodzaju toksyny. Największą wrażliwość na jad typu C wykazują bażanty i indyki (5).

Okres wylegania choroby w zależności od wrażliwości gatunkowej może trwać od kilku godzin do kilku dni (1-3 dni). Początkowym objawem botulizmu u ptaków jest zazwyczaj niezdolność do ruchu, zataczanie się. Następnie narastające niedowłady mięśni przechodzą w porażenia wiotkie, obejmujące głównie kończyny lub skrzydła. W dalszym przebiegu choroby porażenia przechodzą na mięśnie szyi. Chore ptaki przyjmują różne postawy, tj. mostkową czy też stojącą z opadnięciem głowy i skrętem szyi.

Osobliwe objawy były odnotowywane w niektórych przypadkach botulizmu na tle toksyny wytwarzanej przez *C. botulinum* typu C u kurcząt brojlerów. Objawy te nie miały charakteru porażenia wiotkich, ale obserwowano biegunkę i zapalenie jelit. Objawy takie są związane z cytotoksycznym działaniem toksyny typu C₂ (14).

Poza bydłem i ptactwem botulizm rzadko pojawia się u innych zwierząt. Ekstremalnie wrażliwe na toksynę botulinową są konie. Dawka subletalna toksyny dla myszy laboratoryjnej (dawka letalna to ok. 0,3 ng/kg) jest w stanie spowodować szybką śmierć u dorosłego konia (15). Schorzenia u koni są wywoływane przez toksyny produkowane przez *C. botulinum* toksotypów C, D, B i A. Botulizm u koni jest zazwyczaj konsekwencją spożycia przez zwierzęta paszy zanieczyszczonej toksyną botulinową, przeważnie ma charakter intoksykacji, rzadziej toksykoinfekcji, która była odnotowywana głównie u źrebiąt. Ta forma botulizmu u źrebiąt występuje w wyniku niedostatecznego wykształcenia naturalnej jelitowej mikroflory bakteryjnej. W literaturze istnieją doniesienia na temat dużej podatności na tę formę botulizmu młodych źrebiąt, przyjmujących mleko kłaczy zawierające w swym składzie duże ilości kortykosteroidów. Według danych literaturowych, w Ameryce Północnej botulizm u koni najczęściej wywołany jest przez toksynę produkowaną przez *C. botulinum* typu B (85% przypadków), rzadko przez toksotypy B i C. Botulizm na tle toksyn produkowanych przez *C. botulinum* typów A i B wiązany jest zazwyczaj z zanieczyszczeniem paszy – przeważnie siana przetrwalnikami *C. botulinum* bądź toksyną. Schorzenie występujące na tle toksyn produkowanych przez toksotyp C wiązane jest przeważnie z zanieczyszczeniem paszy padliną drobnych zwierząt zawierającą w sobie przetrwalniki lub toksynę (14, 21).

Dawniej problem stanowił botulizm w hodowlach norek, dzisiaj, dzięki systematycznym szczepieniom ochronnym występowanie choroby wśród tych zwierząt stało się rzadkością. Przyczyną schorzenia u norek, lisów fermowych, a także niekiedy u świń i psów jest skarmianie zwierząt padliną, odpadkami rzeźnianymi z drobiu i ryb, zawierającymi zarówno toksynę botulinową, jak i przetrwalniki *C. botulinum* (5).

Problem botulizmu u zwierząt oraz wpływu poszczególnych toksotypów *C. botulinum* na wywołanie tego schorzenia w Polsce nie jest w zasadzie podejmowany. Brak wdrożonych odpowiednich metod analitycznych uniemożliwia oszacowanie problemu występowania tego

mikroorganizmu w paszach i wpływu poszczególnych toksotypów na powodowanie botulizmu u zwierząt w Polsce. W związku z tym, w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB podjęto prace nad wdrożeniem nowych metod opartych na technikach PCR i Real-time PCR w celu identyfikacji i określenia toksotypów *Clostridium botulinum* w paszach i żywności. Podjęte prace umożliwią także szybkie postępowanie laboratoryjne w celu wspomaganie diagnostyki przypadków botulizmu u zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Alberto F., Broussolle V., Mason D. R., Carlin F., Peck M. W.: Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. *Letters Appl. Microbiol.* 2003, 36, 41-45.
2. Anon.: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Botulism in the United States 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers. Atlanta 1998.
3. Böhnelt H., Schwageric B., Gessler F.: Visceral botulism – a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J. Vet. Med.* 2001, 48, 373-383.
4. Cato E. P., George W. L., Finegold S. M.: Genus *Clostridium*, Prazmowski, 1880, [w:] Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Williams and Wilkins, Baltimore 1986, 1141-1200.
5. Cygan Z. M.: Choroby beztlenowcowe zwierząt. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Lublin 1991, 29-51.
6. Franciosa G., 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 unexpected type B toxin genes in type toxigenic organisms. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1911-1917.
7. Hatheway C. L.: Botulism: The present status of the disease. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 1995, 195, 55-75.
8. Jansen B. C.: The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. *J. Vet. Res.* 1971, 38, 93-98.
9. Kriek N. P. J., Odendaal M. W.: Botulism. *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford Press. Cape Town 1994, 1354-1371.
10. Montecucco C., Rossetto O., Schiavo G.: Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* 2004, 12, 442-446.
11. Montecucco C., Shiavo G.: Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 1995, 28, 423-472.
12. Parasian S., Bartoszcze M., Gryko R.: Struktura i mechanizm działania neurotoksyn bakterii rodzaju *Clostridium*. *Przegl. Epidemiol.* 2007, 61, 519-527.
13. Popoff M. R., Argente G.: Animal botulism, is it a menace for man? *Bull. Acad. Vét. France* 1996, 69, 373-382.
14. Saed E. M. A.: Studies on Isolation and Identification of *Clostridium botulinum* Investigating Field Samples Specially from Equine Grass Sickness Cases. Praca dokt., Faculty of Agriculture, Goettingen University 2004.
15. Sharma S. K., Whiting R. C.: Methods for *Clostridium botulinum* Toxin in Foods. *J. Food Prot.* 2005, 68, 1256-1263.
16. Simpson L. L.: The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol. Rev.* 1981, 33, 155-188.
17. Smith L.: Botulism. The Organism, Its Toxins, The Disease. American lecture series, Springfield 1977, 3-15.
18. Sobel J.: Botulism. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41, 1167-1173.
19. Sperber W. H.: Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. *Food Technol.* 1982, 36, 89-94.
20. Suen J. C., Hatheway C. L., Steigerwalt A. G., Brenner D. J.: *Clostridium argentinense* sp. Nov.: a genetically homogenous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. *Internat. J. System. Bacteriol.* 1988, 38, 375-381.
21. Swerczek T. W.: Toxicoinfectious botulism in foals and adult horses. *JAVMA* 1980, 176, 217-220.
22. Thomas N. J., Hunter B. D., Athinson C. T.: *Infectious Diseases of Wild Birds*. Blackwell Publishing, Oxford 2007, 377-416.
23. Vu T. L. A.: Incidence of *Clostridium botulinum* Spores in Honey and Infant Food Samples Collected from Vietnam and Germany. Praca dokt., Faculty of Agriculture, Goettingen University 2006.

Adres autora: prof. dr hab. Krzysztof Kwiatek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: kkwiatek@piwet.pulawy.pl