

MIKROFLORA MIODU JAKO ŹRÓDŁO SPOR *C. BOTULINUM* I PRZYCZYNA ROZWOJU BOTULIZMU NIEMOWLĄT – ROZWAŻANIA NA TEMAT ZASADNOŚCI OCZYSZCZANIA MIODU W KONTEKŚCIE OBOWIĄZUJĄCEGO PRAWA

Karolina Rudnicka^{1*}, Paulina Kwiatkowska¹, Adrian Gajewski¹, Magdalena Chmiela¹

¹Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Fizykochemiczne i przeciwdrobnoustrojowe właściwości miodu. 3. Mikroflora miodu. 4. Środowiskowe rezerwuary *C. botulinum*. 5. Proces wytwarzania miodu i drogi transmisji spor *C. botulinum*. 6. Metody oczyszczania miodu i ich wpływ na czystość mikrobiologiczną. 7. Miód jako czynnik ryzyka rozwoju botulizmu niemowląt. 8. Aspekty prawne. 9. Wytyczne dotyczące oznakowania miodu. 10. Zalecenia w sprawie ograniczenia zapadalności na botulizm niemowląt. 11. Podsumowanie

Honey as a reservoir of *C. botulinum* and a risk factor for infant botulism

Abstract: Honey is a natural, sweet substance produced by honey bees *Apis mellifera*. In spite of its antimicrobial properties, honey may contain certain microbes, most of which are harmless to humans. However, the presence of *Clostridium botulinum* in honey is considered a risk factor for infant botulism development. Infant botulism is a toxicoinfection occurring in infants under the age of one year, after *C. botulinum* spores consumption. This disease is extremely rare, however, in recent years there has been an increase in the number of infant botulism cases. According to CDC (*Centres for Disease Control and Prevention*) infant botulism constitutes 76% of all botulism cases and more than half occurs as a consequence of honey consumption. *C. botulinum* is easily transmitted from soil to blossom, pollen, surface of honey bees and then to honey. The Polish legal system states that any integral components cannot be excluded from honey during processing. However, it is impossible to eliminate the spores from honey without deactivating its enzymes or removing pollen. The EU together with CDC recommend that infants under one year of age should not be fed with honey. They obligate the companies to provide the consumer with the information about the risk of honey consumption by infants. In Poland, infant botulism is not registered, is underestimated and may be misdiagnosed as a sudden infant death syndrome. The producers of honey are not obligated to label honey with the proper information about the microbiological risk of its consumption by infants.

1. Introduction. 2. Physico-chemical and antimicrobial properties of honey. 3. Microbiology of honey. 4. Environmental reservoirs of *C. botulinum*. 5. Production of honey and its contamination routes with *C. botulinum*. 6. Methods of purification and their impact on microbiological safety of honey. 7. Honey as a risk factor for the infant botulism development. 8. Legal notes. 9. Labeling of honey. 10. Recommendations on the safety of honey consumption by infants. 11. Summary

Słowa kluczowe: botulizm niemowląt, *Clostridium botulinum*, mikroflora miodu, miód

Key words: infant botulism, *Clostridium botulinum*, microorganisms in honey, honey

1. Wstęp

Zgodnie z definicją Komisji Europejskiej, przyjętą w drodze rozporządzenia przez ustawodawcę krajowego, miód jest „naturalnie słodką substancją produkowaną przez pszczoły *Apis mellifera* z nektaru roślin lub wydzielin żywych części roślin lub z wydzielin owadów wysysających żywe części roślin, zbieranych przez pszczoły i przerabianych przez łączenie specyficznych substancji z pszczół, składanych, odwodnionych, gromadzonych i pozostawianych w plastrach miodu do dojrzewania” [21, 24–25]. Każdy z powyższych oraz dalsze etapy obróbki miodu są narażone na kontakt z mikroorganizmami obecnymi w środowisku [28, 42, 58]. Ponadto, drobnoustroje wchodzące w skład mikroflory układu pokarmowego pszczół mogą przedostawać się do miodu, zarówno podczas zbierania nektaru czy pyłku jak i dostarczania ich do ula. Właściwości

przeciwbakteryjne miodu, sprawiają, że część drobnoustrojów jest eliminowana już na etapie odwadniania i dojrzewania miodu, natomiast wzrost innych jest wyłącznie zahamowany [42].

Bakterie zdolne do tworzenia przetrwalników są szczególnie odporne na odwodnienie, wysokie stężenie cukrów i właściwości przeciwbakteryjne miodu [2]. Drobnoustroje zaliczane do rodzaju *Clostridium* i *Bacillus* są odpowiednio, beztlenowymi i tlenowymi pałeczkami (d. laseczkami) przetrwalnikującymi szeroko rozpowszechnionymi w środowisku naturalnym. Spory bakteryjne, wraz z ziemią mogą przedostawać się na powierzchnię roślin oraz pszczół i w ten sposób trafiają do ula, a następnie do miodu [50, 58]. W składzie mikroflory miodu dominują drobnoustroje środowiskowe, nieszkodliwe dla człowieka [28, 42]. Z uwagi na właściwości miodu, drobnoustroje w nim zawarte nie namnażają się, a stopień kontaminacji mikrobiolo-

* Autor korespondencyjny: Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel: (42) 635 45 41; e-mail: rudnicka@biol.uni.lodz.pl

gicznej w przeliczeniu na gram produktu, jest zazwyczaj niewielki [48]. Potencjalnie chorobotwórczym gatunkiem wykrywanym w miodzie jest pałeczka woskowa *Bacillus cereus* będąca przyczyną zatruc i zakażeń pokarmowych. Jednak w miodzie germinacja i wytwarzanie toksyn są całkowicie zahamowane, a dawka *B. cereus* niezbędna do wywołania objawów wynosi co najmniej kilka do kilkunastu tysięcy spor i znacznie przekracza ilości wykrywane w miodzie [60]. Obok relatywnie niegroźnej pałeczki woskowej, w skład mikroflory miodu wchodzi przetrwalniki *Clostridium*.

Pałeczka (d. laseczka) jadu kiełbasianego, *Clostridium botulinum*, jest przetrwalnikującą, Gram-dodatnią bakterią beztlenową, szeroko rozpowszechnioną w środowisku naturalnym [46]. Bakterie te są źródłem toksyny botulinowej (BoNT) odpowiedzialnej za objawy zatrucia występujące u ludzi i zwierząt. Na podstawie różnic we właściwościach antygenowych BoNT wyodrębniono siedem serotypów *C. botulinum* (A-G). Natomiast zróżnicowanie w zakresie cech biochemicznych i optymalnych warunków wzrostu pozwoliły na wyodrębnienie czterech grup fenotypowych (Tab. I). Szczepy zaliczane do grupy I i II są najczęstszą przyczyną chorób ludzi, natomiast szczepy należące do grupy III, wywołują choroby zwierząt. Ponadto *C. butyricum* i *C. baratii*, produkujące odpowiednio BoNT typu E i F, również mogą być przyczyną botulizmu. Ponadto istnieją tzw. szczepy mozaikowe produkujące dwa typy toksyn jednocześnie. Zidentyfikowano dotychczas następujące fenotypy mozaikowe: AB, Ab, Af, Ba, Bf. Duże litery w nazwie oznaczają toksynę dominującą, a małe tę produkowaną na niskim

poziomie (49–50). W zależności od drogi jaką toksyna lub spory bakteryjne trafiają do organizmu, serotypu toksyny, a nawet wieku pacjenta, choroba wywoływana przez *C. botulinum* może przyjmować różną postać. Amerykańskie Centrum ds. Zwalczania i Zapobiegania Chorób – CDC (*Centres for Disease Control and Prevention*), wyróżnia cztery typy botulizmu: botulizm pokarmowy (*foodborn botulism*), botulizm przyranny (*wound botulism*), botulizm niemowląt (*infant botulism*) oraz tzw. inne, niezwykle rzadko występujące typy botulizmu, nie mieszczące się we wcześniej wymienionych definicjach (Tab. II). Definicje przypadków chorób zakaźnych przygotowane przez Zakład Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia na potrzeby nadzoru epidemiologicznego definiują powyższe jednostki chorobowe w oparciu o objawy [14–15, 55].

Najczęściej występującą formą botulizmu jest postać pokarmowa (klasyczna), której objawy wywołane są spożyciem pokarmu zawierającego toksynę botulinową. BoNT wchłaniana w jelitach, wiąże się z komórkami nerwowymi powodując w niedługim czasie (średnio po upływie 18–36 godz.) objawy symetrycznego i zstępującego paraliżu obwodowego. Pierwszymi symptomami są nudności, wymioty i zaparcia. W kolejnym etapie rozwija się porażenie nerwów czaszkowych, opadanie powiek i zaburzenia widzenia. Diagnostyka botulizmu klasycznego opiera się głównie na objawach i jest potwierdzana w badaniu laboratoryjnym stolca, surowicy, wymiocin lub resztek jedzenia, w kierunku toksyny botulinowej. Dla skutecznej immunoterapii, niezbędne jest określenie typu toksyny botulinowej, ponieważ podstawą leczenia jest podanie, obok końskiej

Tabela I
Charakterystyka grup I–IV *Clostridium botulinum* [50]

Cecha	Grupa			
	I	II	III	IV
Serotyp BoNT*	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Optymalna temperatura wzrostu	35–40°C	18–25°C	40°C	37°C
Właściwości proteolityczne	+	–	–/+	+
Produkcja lipazy	+	+	+	–

* toksyna botulinowa

Tabela II
Rodzaje botulizmu wg Definicji CDC [14–15]

Typ botulizmu	Patogeneza, drogi zakażenia/zatrucia
Pokarmowy	spożycie pokarmu zawierającego neurotoksynę BoNT*
Przyranny	zanieczyszczenie rany sporami; rozwój <i>C. botulinum</i> ; wydzielanie BoNT w miejscu zranienia
Niemowlęcy	spożycie pokarmu zawierającego spory <i>C. botulinum</i> , dotyczy niemowląt poniżej 12 miesiąca życia; tymczasowa kolonizacja przewodu pokarmowego; uwalnianie BoNT do światła jelita; toksykoinfekcja
Dorosłych	patogeneza i objawy jak w botulizmie niemowląt; dotyczy dorosłych i dzieci powyżej 12 miesiąca życia
Inny	iatrogeny, inhalacyjny, toksykoinfekcja dorosłych o etiologii <i>C. botulinum</i>

* toksyna botulinowa

surowicy przeciwbotulinowej, ludzkiej swoistej immunoglobuliny przeciwbotulinowej. Botulizm jest chorobą występującą sporadycznie [14, 17, 46]. Według danych CDC w Stanach Zjednoczonych od 1973 r. notuje się średnio 24 przypadki botulizmu pokarmowego, 3 przypadki botulizmu przyrannego oraz aż 71 przypadków botulizmu niemowlęcego [13–14].

Botulizm niemowlęcy, to choroba o charakterze tokykoinfekcji, występująca u dzieci poniżej 1 roku życia, po spożyciu miodu zanieczyszczonego przetrwalnikami pałeczki jadu kielbasianego [11, 16, 29, 51]. Liczba spor, która zagraża życiu niemowlęcia, jest nieszkodliwa dla osób dorosłych, posiadających w pełni wykształconą mikroflorę jelit, która chroni przed kolonizacją *C. botulinum* [63]. Aby zrozumieć, w jaki sposób przetrwalniki trafiają do miodu i w nim przeżywają, należy prześledzić proces jego wytwarzania i obróbki, rozpatrzyć potencjalne drogi jego kontaminacji oraz poznać zakres właściwości przeciwbakteryjnych miodu i jego mikroflorę.

2. Fizykochemiczne i przeciwdrobnoustrojowe właściwości miodu

Do głównych składników miodu należą woda i węglowodany. Cukry stanowią 95–99% suchej masy miodu, a w ich składzie dominują łatwo przyswajalne monosacharydy t.j.: fruktoza (38,2%), glukoza (31,3%) oraz disacharydy (maltoza, sacharoza i izomaltoza) [58, 31]. Pszczoły dostarczają nektar kwiatowy do komórek plastra, gdzie jest on poddawany koncentracji (odwadnianie) i dojrzewaniu [42]. W tym czasie miód traci od 25 do 70% pierwotnej zawartości wody. Kwasy organiczne stanowią jedynie 0,57% miodu, jednak mają znaczący wpływ na właściwości organoleptyczne. Składniki mineralne to zaledwie 0,17% miodu, przy czym potas jest wśród nich pierwiastkiem dominującym. Ponadto w miodzie wykrywa się śladowe ilości wapnia, miedzi, żelaza, magnezu i fosforu, a także witamin: C, B, B2, B6 oraz enzymów i fitozwiązków odpowiadających za właściwości antybakteryjne [8, 58, 36]. Spektrum przeciwdrobnoustrojowe miodów europejskich jest szerokie i obejmuje zarówno bakterie Gram-ujemne, Gram-dodatnie jak i grzyby (Tab. III).

Za właściwości przeciwbakteryjne miodu odpowiada kilka czynników, m.in.: wysoka zawartość cukrów, niskie pH, obecność nadtlenu wodoru i fitozwiązków [8, 31, 58]. Wysoka gęstość miodu jest wynikiem niskiego współczynnika aktywności wody (a_w) czyli wartości cząstkowego ciśnienia pary wodnej zawartej w produkcie spożywczym do standardowego ciśnienia cząstkowego wody destylowanej w danej temperaturze. Średnia wartość a_w dla miodu waha się od 0,56 do 0,62, podczas gdy wzrost większości bakterii jest całkowicie zahamowany przy a_w wynoszącej 0,94–0,99. Do kiełkowania

Tabela III
Spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej miodów europejskich

Bakterie	Grzyby
<i>Acinetobacter</i> sp. [57]	<i>Aspergillus niger</i> [10]
<i>Aeromonas hydrophila</i> [57]	<i>Candida</i> sp. [36]
<i>Clostridium jejuni</i> [57]	<i>Penicillium chrysogenum</i> [10]
<i>Escherichia coli</i> [58]	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> [31]
<i>Helicobacter pylori</i> [49]	<i>Zygosaccharomyces melis</i> [31]
<i>Plesiomonas shigelloides</i> [58]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [31]
<i>Pseudomonas</i> sp. [57]	<i>Zygosaccharomyces baillii</i> [31]
<i>Salmonella</i> Typhi [58]	
<i>Shigella boydi</i> [57]	
<i>Staphylococcus aureus</i> [57]	
<i>Vibrio cholerae</i> [58]	
<i>Yersinia enterocolitica</i> [57]	

zarodników grzybów z rodzaju *Candida* może dochodzić w miodach o aktywności wody przekraczającej 0,7 stąd drobnoustroje te stanowią częstą przyczynę psucia miodu [8, 67]. Średnie pH miodu wynosi od 3,2 do 4,5. Jednak wiele gatunków chorobotwórczych drobnoustrojów (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Streptococcus pyogenes*) znosi kwaśne pH i nie jest ono czynnikiem ograniczającym ich rozwój [26–27]. Obecność nadtlenu wodoru w miodzie jest wynikiem aktywności enzymatycznej oksydazy glukozowej pochodzącej ze ślinianek pszczelich. Nektar kwiatowy w głównej mierze składa się z wielocukrów. Po jego dostarczeniu do ula, robotnice przeżywają nektar i przy użyciu oksydazy glukozowej katalizują reakcję rozkładu glukozy do kwasu glukuronowego z wydzielaniem nadtlenu wodoru [58, 36]. Aktywność nadtlenu wodoru wzrasta wraz z rozcieńczeniem miodu a jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest skierowana głównie przeciw grzybom [58]. Wykazano, że nasilenie aktywności przeciwbakteryjnej miodu jest w dużej mierze zależne od gatunku rośliny, z której pochodzi nektar [28]. To fitozwiązki zawarte w miodzie determinują dodatkowe właściwości przeciwbakteryjne, niezależne od nadtlenu wodoru. Są to substancje pochodzenia roślinnego o udokumentowanych właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwdrobnoustrojowych i antyproliferacyjnych. Miód jest źródłem szerokiej gamy fitozwiązków tj. polifenole, flawonoidy, terpeny czy kwasy fenolowe. Ich zawartość w miodzie w głównej mierze zależy od klimatu i szerokości geograficznej (klimatu). Obecność i aktywność fitozwiązków wykazano dla większości naturalnych rodzajów miodów europejskich. Miodem o szczególnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym jest tzw. miód manuka [2]. Substancją aktywną odpowiedzialną za właściwości przeciwdrobnoustrojowe tego miodu jest metyloglioksal, związek pochodzący z dihydrooksyacetonu zawar-

tego w nektarze roślin z gatunku *Leptospermum* sp. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe miodu manuka wykazano względem bakterii takich jak *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aureginosa*, *Enterococcus faecalis* i wielu innych, nawet wielolekoopornych patogenów człowieka. Stąd miody te znalazły zastosowanie w leczeniu trudno gojących się ran [69]. W przeciwieństwie do nadtlenku wodoru enzymy pochodzenia tkankowego nie obniżają aktywności przeciwdrobnoustrojowej zależnej od fitozwiązków, a promieniowanie gamma stosowane podczas sterylizacji miodu do celów medycznych nie obniża ich skuteczności [36].

Sugeruje się, że lecznicze właściwości miodu nie ograniczają się wyłącznie do aktywności przeciwbakteryjnej. Badania *in vitro*, z użyciem ludzkich leukocytów krwi obwodowej, hodowanych w obecności różnych stężeń miodu, dowiodły, iż wykazuje on silne właściwości immunomodulujące, szczególnie w zakresie pobudzania leukocytów do proliferacji i fagocytozy oraz wydzielania interleukiny (IL)-1, IL-6 i czynnika martwicy guzów TNF- α (*tumor necrosis factor*), a także właściwości antyproliferacyjne, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów [1].

3. Mikroflora miodu

Pomimo udokumentowanych właściwości antibakteryjnych, miód nie jest produktem wolnym od mikroorganizmów [4, 42, 44, 48, 50, 57–60]. Udowodniono, że repertuar drobnoustrojów zawartych w miodzie jest ściśle związany ze składem mikroflory układu pokarmowego pszczół, bliskością pól uprawnych i gospodarstw rolnych oraz z warunkami higienicznymi w jakich przeprowadzana jest wstępna obróbka miodu [50]. Badania genetyczne nad mikroflorą układu pokarmowego pszczół miodnych wykazały obecność kilkunastu rodzajów drobnoustrojów m.in. *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Saccharibacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Paralactobacillus*. Wykazano również, że większy stopień zróżnicowania gatunkowego mikroflory, chroni pszczoły przed inwazją bakterii patogennych [42]. Działanie przeciwbakteryjne sprawia, że większość drobnoustrojów trafiających do miodu ginie. Przeżywają tylko te gatunki, które są szczególnie odporne na niesprzyjające warunki środowiska. Stąd w mikroflorze miodu dominują tlenowe i beztlenowe bakterie przetrwalnikujące oraz grzyby [31, 42, 67] (Tab. IV). Ogólna liczba drobnoustrojów przypadająca na 1 g miodu waha się od zera do kilku tysięcy [48]. Właściwości przeciwbakteryjne sprawiają, że drobnoustroje nie namnażają się w miodzie, stąd duży stopień zanieczyszczeń mikrobiologicznych świadczy o świeżej kontaminacji [31]. Obecność pleśni z rodzajów *Rhizopus* sp., *Curvularia*

Tabela IV
Drobnoustroje izolowane z różnych gatunków miodów

Bakterie	Grzyby
<i>Bacillus cereus</i> [2, 67]	<i>Aspergillus candidus</i> [59]
<i>Bacillus</i> sp [8, 42]	<i>Aspergillus flavus</i> [59]
<i>Clostridium botulinum</i> [2, 44, 50, 61, 66]	<i>Aspergillus fumigates</i> [59]
<i>Gluconobacter</i> sp. [59]	<i>Aspergillus niger</i> [59]
<i>Lactobacillus</i> sp. [2, 42]	<i>Candida</i> sp. [67]
<i>Micrococcus</i> sp. [60]	<i>Curvularia</i> sp. [67]
<i>Zymomonas</i> sp. [60]	<i>Fusarium</i> sp. [59]
	<i>Geotrichum</i> sp. [59]
	<i>Libertella</i> sp. [67]
	<i>Mucor</i> sp. [67]
	<i>Pappularia</i> sp. [67]
	<i>Penicillium</i> sp. [2, 67]
	<i>Rhizopus</i> sp. [2, 67]
	<i>Saccharomyces</i> sp. [2, 67]
	<i>Trichoderma</i> sp. [2, 67]
	<i>Torulopsis</i> sp. [2, 67]

sp. i *Aspergillus* sp. wskazuje na brak zachowania odpowiednich warunków higienicznych podczas zbierania i obróbki miodu [67]. Ruiz-Argueso i wsp. w próbkach dojrzewającego miodu wykryli obecność bakterii z rodzaju: *Gluconobacter*, *Lactobacillus* i *Zymomonas* oraz grzybów z gatunku *Saccharomyces melis*, *Torulopsis magnoliae*, *T. apicola* oraz *T. stellata* [60].

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej produktów spożywczych, przedstawia kryteria jakościowe dotyczące miodu, jednak nie obejmują one wytycznych dotyczących czystości mikrobiologicznej [19, 21]. Wymagania w zakresie jakości miodu są również ujęte w Dzienniku Ustaw Wspólnoty Europejskiej, w którym poruszane są wyłącznie normy fizykochemiczne, z pominięciem kryteriów czystości mikrobiologicznej [18].

Jak podaje Komitet Naukowy ds. Oznaczeń Weterynaryjnych o Znaczeniu dla Zdrowia Publicznego (*Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health*) (*przyp. tłum.*) powołany przez Komisję Europejską, pałeczki *C. botulinum* i inne szczepy *Clostridium* produkujące toksynę botulinową są jedyne potencjalnie chorobotwórczymi drobnoustrojami wykrywanymi w miodzie [27, 32, 34–35, 37]. Badania z użyciem techniki PCR przeprowadzone na 190 próbkach miodu, wykazały obecność spor *C. botulinum* w 20 (11%) przebadanych próbkach [51]. Natomiast badania przesiewowe dwóch tysięcy próbek miodu pochodzących z różnych krajów świata wykazały obecność spor *C. botulinum* w 5% miodów [27, 61]. Średnia prevalencja przetrwalników w miodzie, oszacowana na

podstawie kilkunastu badań, waha się od 4% do 20% [53]. Przy czym obecność przetrwalników pałeczki jadu kiełbasianego wykazano dotychczas w miodach pochodzących z Argentyny, Australii, Kuby, Finlandii, Francji, Włoch, Hiszpanii i Węgier, a ich liczba wahała się od 18 do 60 spor/kg miodu [44, 66].

4. Środowiskowe rezerwuary *C. botulinum*

Udokumentowanymi, naturalnymi rezerwuarami spor *C. botulinum* są gleba, piasek, słono- i słodkowodne osady denne a nawet kurz domowy [27, 39, 46, 50]. *C. botulinum* wyizolowano z 20% próbek gleby, pobranych na terenie Finlandii oraz z ponad połowy próbek piasku pochodzących z wybrzeży Alaski i 41% próbek ziemi zebranych na terenie Danii [2, 4]. Wraz z ziemią przetrwalniki przedostają się nie tylko na powierzchnię warzyw bulwiastych, ryb i mięs, ale trafiają również na powierzchnię kwiatów, owadów, pyłku oraz do nektaru (Tab. V).

5. Proces wytwarzania miodu i drogi transmisji spor *C. botulinum*

Miód powstaje z nektaru roślin kwiatowych, zbieranego i przetwarzanego przez pszczoły miodne. Proces wytwarzania miodu rozpoczyna się od momentu zbierania nektaru oraz pyłku, przy czym tylko nektar

stanowi materiał wyjściowy do produkcji miodu [9]. Jest on pobierany z kwiatu i przenoszony do ula w przewodzie pokarmowym pszczoły. W ulu, nektar jest przekazywany robotnicom, które poddają go obróbce enzymatycznej. Następnie jest gromadzony w woskowych komórkach plastrów i poddawany dehydratacji, tracąc przy tym ok. 60% wody. Kiedy duże ilości nektaru trafiają do ula, robotnice przyspieszają proces parowania poprzez intensywne ruchy skrzydeł: z jednej strony usprawniające wentylację ula, z drugiej zaś zwiększające prawdopodobieństwo przeniesienia drobnoustrojów ze skrzydeł do miodu [58]. Po kilku dniach, proces dojrzewania jest zakończony, a pszczoły zamykają światło komórki wypełnionej miodem warstwą wosku i propolisu. Pszczelarz odzyskuje miód poprzez wirowanie ram z plastrami wosku w specjalnych wirówkach (ekstraktorach). Każdy z etapów tworzenia miodu jest narażony na zanieczyszczenie przetrwalnikami (Rys. 1).

Źródła zakażenia miodu, można podzielić na pierwotne i wtórne. Do tych pierwszych zalicza się ziemię, pyłek, nektar oraz mikroflorę pszczoł. Do wtórnych źródeł kontaminacji miodu należy cukier stosowany jako karma dla pszczoł (substytut miodu) oraz cały ciąg technologiczny obróbki miodu, od momentu wyjęcia ram z plastrami do konfekcjonowania miodu [50, 66].

Nevas i wsp. zbadali drogi transmisji spor *C. botulinum* z ziemi do miodu, pszczoł, i pyłku. Analiza ta wykazała, że najwięcej przetrwalników zawierał wosk (30%) oraz miód (24%), przy czym w miodzie poddanym wstępnej obróbce (wirowaniu) wykrywano kil-

Tabela V
Rezerwuary i źródła spor *C. botulinum*

Rezerwuuar		Serotyp	Odsetek zakażonych próbek	Kraj	Literatura
Gleba	piasek rzeczny	E	6%	Alaska	[2]
	piasek nadmorski	A, E	31,5%	Polska	[33]
	osady oceaniczne	E	48%	Alaska	[2]
	ziemia	A, B, E, F	34%	Finlandia	[50]
	kurz domowy	B	n.b.	Finlandia	[52]
	woda oceaniczna	E	57%	Alaska	[2]
Rośliny	szparagi	n.b.	n.b.	Włochy	[70]
	ziemniaki	n.b.	n.b.	USA	[64]
	marchew	B	8,6%	Francja	[62]
	pyłek kwiatowy	B	4%	Finlandia	[70]
Mięso i ryby	surowa wieprzowina	A, B, C	0–14%	Wielka Brytania	[26]
	wędliny	A	2%	Kanada	[26]
	łosoś	E	5%	Alaska	[2]
	bieługa	E	2%	Alaska	[2]
	mrożona flądra	E	10%	Ocean Atlantycki	[26]
	karp solony	E	63%	Morze Kaspjskie	[26]
	ryby i owoce morza	C, D	8%	Japonia	[26]

n.b. – nie badano



Rys. 1. Przymuszczalne drogi kontaminacji miodu sporami *C. botulinum*. Objasnienia w tekście

kanaście razy mniej przetrwalników (3%), niż w miodzie nie przetworzonym [51]. Drobnoustroje z układu pokarmowego pszczół mogą trafiać do nektaru jeszcze przed jego dostarczeniem do ula lub podczas jego wstępnej obróbki przeprowadzanej przez robotnice [50]. Wykazano, że prevalencja *C. botulinum* w pyłku jest dwukrotnie niższa, niż w przetworzonym przez robotnice propolisie, co wskazuje na udział pszczół w transmisji spor [51]. Nakano i wsp., udowodnili, że przetrwalniki *C. botulinum* znajdujące się w pyłku lub szczątkach martwych pszczół, w warunkach beztlenowych mogą podlegać germinacji do form wegetatywnych [47]. Jednak z uwagi na szybkie usuwanie martwych owadów z ula, ten czynnik ryzyka transmisji jest uznawany przez niektórych autorów za marginalny [42]. Z drugiej strony, uwzględniając fakt częstego występowania kanibalizmu w społecznościach pszczelich, przetrwalniki mogą równie dobrze trafiać do układu pokarmowego robotnic i rozprzestrzeniać się po całej kolonii [51]. Badania mikrobiologiczne cukru stosowanego, jako pożywienie dla pszczół, wykazały obecność spor *C. botulinum* w 5% próbek [28, 47]. Nevas i wsp., wykazali również wpływ warunków sanitarnych panujących podczas ekstrakcji miodu oraz bliskości pól uprawnych i gospodarstw rolnych na stopień jego zanieczyszczenia sporami *C. botulinum* [51].

6. Metody oczyszczania oraz ich wpływ na czystość mikrobiologiczną miodu

Wstępna obróbka i odzyskiwanie miodu z naturalnej lub sztucznej węzy (ramki) polega na zastosowaniu jednego z procesów: wirowania, prasowania lub ocie-

kania grawitacyjnego. Oczyszczanie i dalsza obróbka miodu może sprowadzać się do: filtracji, dekantacji, pasteryzacji (opcjonalnie), dojrzewania, konfekcjonowania i przechowywania [26].

Żaden z powyższych etapów nie eliminuje bakterii przetrwalnikujących tj. *Clostridium* i *Bacillus*. Zastosowanie metody wirowania, umożliwia usunięcie części spor mniej jednak w ten sposób pozbawia się go cennego składnika, jakim jest pyłek. Co ważne w świetle prawa pyłek stanowi integralną i nieodłączną część miodu. Jego usunięcie uniemożliwia zastosowanie terminu „miód” przez jego producenta [38]. Po wirowaniu przeprowadza się dekantację polegającą na kilkudniowej inkubacji miodu w temperaturze 25°C. Bąbelki powietrza, wosk i inne nieczystości (z wyłączeniem pyłku i przetrwalników) osadzają się na dnie lub gromadzą na powierzchni zbiornika, skąd mogą być usunięte. Kolejne etapy są przeprowadzane niezwykle rzadko i polegają na oczyszczaniu miodu na drodze przesączania lub filtrowania. Metoda przesączania polega na podgrzaniu miodu do temp. 30–35°C i filtrowaniu przez filtr o średnicy por 150 µm. Proces ten prowadzi do usunięcia propolisu i fragmentów owadów, ale nie pozbawia go przetrwalników bakteryjnych ani pyłku. Filtracja miodu jest również poprzedzona jego podgrzaniem do 60°C. Miód jest następnie przepuszczany przez filtry ceramiczne o średnicy porów mniejszych niż 50 µm. W ten sposób jest on pozbawiony większości zanieczyszczeń włącznie z pyłkiem, ale za wyjątkiem spor bakteryjnych. Wraz z usuwaniem większych cząstek istnieje możliwość eliminacji części spor, jednak w celu całkowitego pozbawienia miodu przetrwalników *C. botulinum*, w procesie filtracji należałoby zastosować filtry o średnicy 0,5 µm, co doprowadziłoby do usunięcia jego integralnych

składników np. pyłku. Większość miodów dostępnych w Europie nie jest poddawana filtracji [38, 54].

Kolejny etap, tzw. dojrzewanie miodu, trwa dwa tygodnie i zachodzi w temperaturze 15°C [60]. Ostatecznie miód jest zlewany do odpowiednich zbiorników i w szczególnych przypadkach poddawany pasteryzacji [2]. Wysoka temperatura może prowadzić do karmelizacji i degradacji substancji aktywnych, a z drugiej strony obniża liczbę grzybów, zapobiegając fermentacji i opóźniając procesy krystalizacji. Komisja Europejska zaleca stosowanie temperatury 77°C, w czasie 2 minut, a następnie szybkie schładzanie do temperatury 54°C lub 30 minutowe ogrzewanie miodu, w temp. 60–71°C [2, 27]. Pamiętając, że inaktywacja przetrwalników *C. botulinum* jest możliwa po 6 godzinach gotowania w temp. 100°C lub 3 min. w 121°C (*botulinum cook*), zastosowanie zaleceń Komisji Europejskiej nie wpływa na obniżenie liczby spor tych bakterii w miodzie [61].

7. Miód, jako czynnik ryzyka rozwoju botulizmu niemowlęcego

Botulizm niemowlęcy, inaczej nazywany toksykoinfekcją niemowląt lub jelitową toksemią niemowlęcą można rozpatrywać, jako kolonizację jelita przez spory *C. botulinum* (zakażenie) z równoczesną produkcją toksyny botulinowej (toksemia) [3, 11, 15, 35]. Przetrwalniki *C. botulinum* lub znacznie rzadziej *C. butyricum* lub *C. baratii*, wraz z pokarmem trafiają do żołądka i jelit, gdzie przekształcają się w komórki wegetatywne, produkujące neurotoksynę botulinową [7, 32, 34, 41]. BoNT jest wchłaniana i transportowana za pośrednictwem układu krwionośnego do połączeń nerwowo-mięśniowych, z którymi trwale się wiąże blokując uwalnianie acetylocholinozylu z zakończeń nerwów ruchowych [35, 39]. Okres inkubacji od spożycia skażonego pokarmu do pierwszych objawów, wynosi średnio od dwóch do czterech tygodni. Objawy typowe dla botulizmu niemowląt to kilkudniowe zaparcia (min. trzy dni bez wypróżniania) poprzedzające pojawienie się takich symptomów jak brak apetytu, senność, osłabienie odruchu ssania [43, 46]. Botulizm niemowlęcy występuje najczęściej u dzieci od 3 do 20 tygodnia życia (średnio w 13 tyg.) [63]. Niemowlęta, z uwagi na brak w pełni wykształconej mikroflory naturalnej jelit oraz niedojrzałe komórki układu immunologicznego, są szczególnie podatne na zasiedlenie jelit przez przypadkowo połączony spory *C. botulinum* [12, 43, 68].

Pierwszy potwierdzony laboratoryjnie przypadek botulizmu niemowlęcego odnotowano w Stanach Zjednoczonych, w 1976 roku, po spożyciu miodu zakażonego sporami *C. botulinum* [16]. Serotypami odpowiedzialnymi za większość toksykoinfekcji występujących u niemowląt są toksyny A, B i E oraz typy mozaikowe

Ba i Bf [5, 34, 37, 41]. Botulizm niemowlęcy występuje niezwykle rzadko, lecz w skali globalnej jest najczęściej występującą postacią botulizmu. W 2010 r., w Stanach Zjednoczonych stanowił 76% wszystkich rejestrowanych przez CDC przypadków chorób o etiologii *C. botulinum* [13–14]. W latach 1976–2007, w skali globalnej odnotowano ponad 3000 przypadków botulizmu niemowlęcego, z czego 2419 zarejestrowano w Stanach Zjednoczonych [13]. Występowanie botulizmu niemowlęcego nie ogranicza się do Stanów Zjednoczonych i zostało odnotowane na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Afryki. Wysoką zapadalność notuje się również w Argentynie, Australii, we Włoszech oraz Kanadzie i Japonii. W latach 1978–2007, z czternastu krajów Europy spłynęły 73 zgłoszenia botulizmu niemowlęcego [6, 40, 56]. Miód jest jedynym potwierdzonym i możliwym do uniknięcia rezerwuarem spor *C. botulinum* i przyczyną ponad połowy przypadków botulizmu niemowlęcego [4, 26–27, 33–35, 50–51, 53, 61].

8. Aspekty prawne

Ustawodawca europejski w Rozporządzeniu Rady Wspólnoty Europejskiej o jednolitej wspólnej organizacji rynku wprowadził obowiązującą także w Polsce definicję miodu przywołaną w niniejszym opracowaniu [25]. Z kolei kryteria dotyczące jakości miodu nie uwzględniające norm dotyczących zanieczyszczeń mikrobiologicznych ustalono mocą Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu [21]. Z dniem 1 stycznia 2003 roku przestała obowiązywać Polska Norma dla miodu PN-88/A-77626. Ponieważ jednocześnie nie unieważniono jej wytycznych, norma jest dalej uznawana jednakże na zasadzie dobrovolności. Aktem wiążącym pozostaje wyżej wymienione Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi zgodnie z którym miód wprowadzany na rynek Polski musi spełniać stosowne kryteria w zakresie właściwości organoleptycznych i jakościowych. Do tych pierwszych należą: barwa, konsystencja, smak i zapach, zaś jakość handlową wyznacza m.in. kryterium naturalnych składników, w szczególności aktywnych enzymów, tj. miód spełnia wspomniane wymagania, jeżeli jego naturalne enzymy nie zostały częściowo lub całkowicie zniszczone, np. przez ogrzewanie. Ponadto miód nie może być pozbawiony żadnego integralnego składnika (pyłku, propolisu, etc.), chyba że jest to niezbędne w celu usunięcia substancji obcych, np. w drodze filtracji, przy czym ustawodawca krajowy nie narzuca na producenta obowiązku informowania o wpływie procesu oczyszczania na skład miodu [21].

Szczegółowe wymagania, jakie powinny spełniać środki spożywcze specjalnego przeznaczenia żywienio-

wego, w tym w szczególności produkty spożywcze dla niemowląt, określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego [20]. Z załącznika nr 4 do tego Rozporządzenia wynika, iż w przypadku, gdy w składzie takich preparatów znajduje się miód, powinien on być poddany obróbce w celu usunięcia z niego przetrwalników *C. botulinum*. Jak wcześniej wspomniano obróbka miodu w takim celu polegać może na zastosowaniu wysokiej temperatury (121°C, 3 min.) lub filtracji z użyciem filtrów bakteriologicznych. Pierwszy proces istotnie wpływa na właściwości organoleptyczne (karmelizacja), a także prowadzi do całkowitej dezaktywacji enzymów naturalnie występujących w miodzie. Drugi zaś pozbawia go integralnych jego składników tj. pyłku i propolisu [26].

Z uwagi na przywołane powyżej kryteria ujęte w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi można zaryzykować postawienie tezy, że oczyszczanie miodu z zanieczyszczeń mikrobiologicznych (w tym spor *C. botulinum*) nie jest pożądane z komercyjnego punktu widzenia, ponieważ ostateczny produkt nie spełniałby definicji miodu. Produkty żywieniowe przeznaczone dla niemowląt mogą zawierać wyłącznie miód pozbawiony *C. botulinum*, jednak każdy ze sposobów umożliwiający zniszczenie lub usunięcie przetrwalników tej bakterii doprowadzi do drastycznego obniżenia jego właściwości odżywczych, immunomodulujących i przeciwbakteryjnych. W kontekście ryzyka rozwoju botulizmu niemowlęcego, szczególnie istotne wydaje się informowanie zarówno matek jak i lekarzy o czynnikach ryzyka rozwoju botulizmu niemowlęcego oraz wprowadzenie odpowiedniego oznakowania miodu informującego o zagrożeniu, jakim jest stosowanie miodu u niemowląt poniżej 1 roku życia.

9. Wytyczne dotyczące oznakowania miodu

Przepisy krajowe odnoszące się do oznakowania miodu ujęte są w ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia [22]. Zgodnie z art. 45 wyżej wymienionej ustawy, oznakowanie środka spożywczego obejmuje wszelkie informacje w postaci napisów i innych oznaczeń, w tym znaki towarowe, nazwy handlowe, elementy graficzne i symbole, dotyczące środka spożywczego, umieszczone na opakowaniu, etykiecie, obwolutcie, ulotce lub zawieszce. Odpowiedzialność za bezpieczeństwo produkowanej i wprowadzanej do obrotu żywności ponosi przedsiębiorca zgodnie z art. 17 tej ustawy. Kto nie przestrzega wymagań w zakresie znakowania środków spożywczych podlega karze pieniężnej. Zgodnie z Rozporządzeniem w sprawie znakowania środków spożywczych etykieta miodu powinna zawierać: pełną nazwę produktu, dane identyfikacyjne pszczelarza, warunki przechowywania, masę netto, datę rozlewu i numer partii produkcyjnej, miejsce pochodzenia oraz normę lub akt prawny, z którym zgodne są kryteria jakościowe miodu (Tab. VI) [23].

Etykieta nie może przypisywać działania lub właściwości, których miód nie posiada oraz nie może sugerować, że dany miód ma szczególne właściwości, jeżeli mają je podobne miody. Ponadto, nie może zawierać informacji, miód zapobiega chorobom lub je leczy, a nawet odwoływać się do takich właściwości oraz nie może zawierać takich określeń jak „zdrowy”, „bezpieczny” itp. [65].

W latach 1995–2001 Inspekcja Handlowa przeprowadziła kontrolę miodu znajdującego się w obrocie handlowym. Jej celem było zbadanie jakości miodu krajowego i importowanego pod względem zgodności

Tabela VI
Sugerowane elementy oznakowania miodu [23]

Oznakowanie	Komentarz
Nazwa produktu	pełna nazwa rodzaju i odmiany miodu może być zastąpiona wyrazem „miód” o ile nie dotyczy miodu przefiltrowanego, miodu sekcijnego, miodu z plastrami i miodu piekarniczego w przypadku których zamiast określenia „miód” należy użyć terminu „miód wyłącznie do dalszego przerobu”
Dane identyfikacyjne pszczelarza	z uwzględnieniem imienia i nazwiska właściciela oraz adresu pasieki
Termin przydatności	w przypadku miodu należącego do produktów trwałych oznacza termin „najlepiej spożyć przed...” czyli minimalną trwałość produktu lub czas. Data minimalnej trwałości dla miodu wynosi 36 miesiące
Warunki przechowywania	temp. 4–20 °C, chronić przed światłem
Masa netto	podawana w kg
Data rozlewu i numer partii produkcyjnej	data rozlewu może być jednocześnie numerem partii umieszczonym na etykiecie lub nakrętce
Pochodzenie	kraj pochodzenia albo w przypadku, gdy miód pochodzi z więcej niż jednego kraju odpowiednią informację o krajach pochodzenia
Dodatkowe informacje (opcjonalnie)	podanie nazwy gatunkowej rośliny z której pochodzi miód (gdy miód pochodzi w całości lub prawie w całości z tego źródła i ma właściwe dla tego pochodzenia właściwości)

z wymaganiami normy PN-88/A-77626 oraz sprawdzenie prawidłowości oznakowania opakowań jednostkowych. Kontrola wykazała, że w 2001 r. nastąpiło znaczne pogorszenie jakości miodu, bowiem 38% zbadanych próbek nie spełniało kryteriów normy. W 2001 r. brak istotnych dla konsumenta informacji wymaganych przez normę stwierdzono w 21% sprawdzonych miodów [65].

Zgodnie z art. 14 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Europejskiej z dnia 28 stycznia 2002 żywność znajdująca się w obrocie nie może być niebezpieczna dla zdrowia i życia człowieka [18]. Według założenia Komisji Europejskiej stwierdzającego, że miód należy do produktów zagrażających niemowlętom do pierwszego roku życia, zasadnym wydaje się, iż stosowana informacja powinna być zamieszczana na etykiecie miodu.

10. Zalecenia w sprawie ograniczenia zapadalności na botulizm niemowlęcy

Miód jest jedynym produktem spożywczym stanowiącym naturalny rezerwuuar spor *C. botulinum*, dlatego Agencje CDC i WHO, a za nimi American Academy of Pediatrics i National Honey Board, zalecają aby nie podawać miodu niemowlętom poniżej 12 miesiąca życia, u których może dojść do rozwoju botulizmu niemowlęcego [26–27, 35, 40, 53]. W krajach Unii Europejskiej obowiązuje opinia Komitetu Naukowego ds. Kryteriów Weterynaryjnych o Znaczeniu dla Zdrowia Publicznego na temat Miodu i Zagrożeń Mikrobiologicznych. Zgodnie z tym dokumentem dzieciom poniżej pierwszego roku życia nie powinno się podawać miodu. Ponadto Komisja Europejska obliuguje producentów miodu do zamieszczania informacji mówiącej o zagrożeniu, jakie niesie za sobą włączenie miodu do diety niemowlęcia [2, 56]. Aby decyzje Komisji Europejskiej były prawomocne w całej Unii Europejskiej, muszą być wydane w formie rozporządzenia, natomiast dokument dotyczący oznakowania miodu ma charakter doradczy i nie został wprowadzony do polskiego ustawodawstwa.

11. Podsumowanie

Miód wykazuje naturalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe względem bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich oraz grzybów [8, 31, 58]. Wysoka zawartość cukrów, obecność nadtlenu wodoru oraz zawartość wody poniżej 20% działa głównie grzybobójczo i w mniejszym stopniu bakteriobójczo. Fitozwiązki wywodzące się od roślin, z których pozyskiwany był nektar, odpowiadają za aktywność przeciwbakteryjną

miodu [28]. Pomimo działania przeciwdrobnoustrojowego, pewne gatunki mikroorganizmów mogą przetrwać w miodzie. Należą do nich głównie drobnoustroje przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* oraz liczne bakterie środowiskowe, pochodzące z gleby, powierzchni roślin oraz mikroflory układu pokarmowego pszczoł miodnych [50]. Pleśnie pojawiające się w miodzie, są przejawem niskich warunków sanitarnych podczas jego obróbki i są odpowiedzialne za jego psucie [67]. *Clostridium botulinum* jest jedynym potencjalnie szkodliwym dla człowieka drobnoustrojem izolowanym z miodu [53]. Miód zawierający spory *C. botulinum* jest szczególnie niebezpieczny dla niemowląt poniżej 1 r.ż, które nie dysponują w pełni wykształconą florą jelitową [35]. Nawet niewielkie ilości spor pałeczki jadu kiełbasianego mogą wywołać objawy botulizmu niemowlęcego, choroby zbliżonej pod względem przebiegu do syndromu nagłej śmierci niemowląt (SIDS) [30, 43, 45]. Ponad połowa przypadków botulizmu niemowlęcego jest efektem spożycia miodu zawierającego spory *C. botulinum* [61]. Z uwagi na brak właściwej diagnostyki oraz pośmiertne klasyfikowanie przyczyny śmierci niemowląt, jako SIDS rzeczywista liczba przypadków botulizmu niemowlęcego jest niedoszacowana. Znakowanie miodów produkowanych w Polsce nie jest obligatoryjne, a świadomość społeczeństwa i lekarzy pediatrów niewielka. Państwowy Zakład Higieny nie prowadzi rejestru przypadków botulizmu niemowlęcego, pomimo wprowadzenia tej jednostki na listę definicji chorób zakaźnych. Prawdopodobnie rejestru nie prowadzi się z uwagi na fakt, iż przypadki te nie są właściwie diagnozowane [17, 55]. Istnieje duże zagrożenie, że brak wiedzy na temat istnienia choroby, jaką jest botulizm niemowląt, prowadzi do błędnej diagnozy i klasyfikowania tych przypadków do tzw. syndromu nagłej śmierci niemowląt. Polska należy do krajów o najwyższej zapadalności na botulizm pokarmowy w Europie, a miód jest często stosowany, jako dodatek do domowych potraw dla dzieci stąd występowanie botulizmu niemowląt wydaje się wysoce prawdopodobne.

Aby miód spełniał kryteria, jakości handlowej, podczas procesu jego pozyskiwania, dojrzewania, konfekcjonowania lub oczyszczania, nie może być pozbawiany żadnego integralnego składnika [18, 22–23]. Z uwagi na fakt, iż obecnie stosowane procedury oczyszczania miodu, prowadzą do usunięcia nie tylko spor bakteryjnych, ale i enzymów, pyłku czy propolisu – eliminacja przetrwalników *C. botulinum* bez wpływu, na jakość miodu jest w praktyce niemożliwa. Ponadto normy europejskie i krajowe nie wyznaczają kryteriów mikrobiologicznych dla miodu. Inne kraje UE oraz Stany Zjednoczone nie narzucają obowiązku eliminacji spor *C. botulinum* z produktów żywnościowych przeznaczonych dla niemowląt, ale na producentów takiej

żywności oraz producentów miodu narzucają obowiązek informowania o zagrożeniu, jakim jest spożywanie miodu i produktów go zawierających przez dzieci poniżej 1 roku życia.

Piśmiennictwo

- Abuharfeil N., Al-Oran R., Abo-Shehada M.: The effect of bee honey on the proliferative activity of human B- and T-lymphocytes and the activity of phagocytes. *Food Agric. Immunol.* **11**, 169–77 (1999)
- Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food (ACMSF). Ad Hoc Group on Infant Botulism. Report on minimally processed infant weaning foods and the risk of infant botulism 2005, <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/infantbotulismreport.pdf> (28 czerwca 2012)
- Arnon S.S.: Botulism as an Intestinal Toxemia (w) Infections of the Gastrointestinal Tract, red. M.J. Blaser, P.D. Smith, J.I. Ravdin, H. B. Greenberg, R.L. Guerrant, Raven Press, New York, 1995, s. 257–271
- Arnon S.S., Midura T.F., Damus K., Thompson B., Wood R.M., Chin J.: Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *J. Pediatrics*, **94**, 331–336 (1979)
- Aureli P., Fenicia L., Pasolini B., Ginafranceschi M., McCroskey L.M., Hatheway C.L.: Two cases of type E infant botulism in Italy caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum*. *J. Infect. Dis.* **54**, 207–211 (1986)
- Aureli P., Franciosa G., Fenicia L.: Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *Pediatric Infect. Dis. J.* **21**, 866–868 (2002)
- Barash J.R., Tang T.W.H., Arnon S.S.: First case of infant botulism caused by *Clostridium baratii* cype F in California. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4280–4282 (2005)
- Bogdanov S.: Characterisation of antimicrobial substances in honey. *Lebensm. Wiss. Technol.* **17**, 74–76 (1984)
- Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P.: Honey for Nutrition and Health: A Review. *J. Amer. College of Nutrition*, **27**, 677–689 (2008)
- Brady N.F., Molan P.C., Harfoot C.G.: The sensitivity of dermatophytes to the antimicrobial activity of manuka honey and other honey. *Pharm Sci.* **2**, 1–3 (1997)
- Brook I.: Anaerobic infections in children. *Adv. Experiment. Med. Biology*, **697**, 1117–1152 (2011)
- Burr D.H., Sugiyama H.: Susceptibility to enteric botulinum colonization of antibiotic-treated adult mice. *Infect. Immunol.* **36**, 103–106 (1982)
- CDC. CDCUPHS (Centres for Disease Control and Prevention-Case Definition for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance). *M.M. Weekly Rep.* **46**, NN-10 1997, <http://ftp.cdc.gov/pub/publications/mmwr/rr/rr4610.pdf> (28 czerwca 2012)
- CDC. Botulism. (Centres for Disease Control and Development) Botulism: Epidemiological Overview for Clinicians. 2012, <http://www.bt.cdc.gov/agent/botulism/clinicians/epidemiology.asp> (28 czerwca 2012)
- CDC. Case Definitions, Botulism (*Clostridium botulinum*) 2011, http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/casedef/botulism_current.htm (28 czerwca 2012)
- Cox N., Hinkle R.: Infant Botulism. *Amer. Family Physician*, **65**, 1388–1392 (2002)
- Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B.: Zatrucie jadem kiełbasianym w Polsce w 2009 roku. *Przeg. Epidemiol.* **65**, 251–254 (2011)
- Dz. U WE L 31 z 01.02.2002 rozporządzenie (WE) NR 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=D-D:15:06:32002R0178:PL:PDF> (21 stycznia 2014)
- Dz.U. z 2001 r. Nr 5 poz. 44. Ustawa z dnia 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20010050044> (21 stycznia 2014)
- Dz. U. z 2010 r. Nr 136 poz. 914. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 29 czerwca 2010 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20101360914> (21 stycznia 2014)
- Dz. U. z 2003 r. Nr 181, poz. 1773. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu 2003, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU2003181773> (21 stycznia 2014)
- Dz. U. z 2006 Nr 171, poz. 1225. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20061711225> (21 stycznia 2014)
- Dz. U. z 2007 Nr 137, poz. 966. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20071370966> (21 stycznia 2014)
- Dz. Urz. UE z 16 listopada 2007 roku, nr L 299/1. Rozporządzenie Rady (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007 r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz przepisy szczegółowe dotyczące niektórych produktów rolnych („rozporządzenie o jednolitej wspólnej organizacji rynku”, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:299:0001:0149:PL:PDF> (21 stycznia 2014)
- Dz. Urz. UE z dn. 16 listopada 2007 roku, nr L 299/1 ust. 1, cz. VIII, zał. III Rozporządzenie Rady (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007 r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz przepisy szczegółowe dotyczące niektórych produktów rolnych („rozporządzenie o jednolitej wspólnej organizacji rynku”, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:299:0001:0149:PL:PDF> (21 stycznia 2014)
- ESR-Institute of Environmental Science & Research Limited. Risk Profile: *Clostridium botulinum* in Honey, <http://esr.cri.nz/> (28 czerwca 2012)
- European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Honey and Microbiological Hazards, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out53_en.pdf (28 czerwca 2012)
- Evans J.D., Schwarz R. S.: Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* **19**, 614–620 (2011)
- Fenicia L., Anniballi F.: Infant botulism. *Ann. Ist Super Sanità.* **45**, 134–146 (2009)
- Francisco A.M., Arnon S.S.: Clinical mimics of infant botulism. *Pediatrics*, **119**, 826–828 (2007)
- Gomes S., Dias L.G., Moreira L.L., Rodrigues P., Estevinho L.: Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 544–548 (2010)
- Hall J.D., McCroskey L.M., Pincomb B.J., Hatheway C.L.: Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces a type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 654–655 (1985)
- Hauschild A.H.W., Hilsheimer R., Weiss K.F., Burke R.B.: *Clostridium botulinum* in honey, syrups and dry infant cereals: a research note. *J. Food Protection*, **51**, 892–894 (1998)

34. Hoarau G., Pelloux I., Gayot A., Wroblewski I., Popoff M.-R., Mazuet C., Maurin M., Croizé J.: Two cases of type A infant botulism in Grenoble, France: no honey for infants. *Europ. J. Pediatrics*, **171**, 589–591 (2012)
35. Infant Botulism Treatment and Prevention Program. California Department of Health Services. 2012, <http://www.infantbotulism.org> (28 czerwca 2012)
36. Irish J., Blair S., Carter D.A.: The antimicrobial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS ONE*, **6**, e18229 (2011)
37. Johnson E.A., Tepp W.H., Bradshaw M., Gilbert R.J., Cook P.E., McIntosh E.D.G.: Characterization of *Clostridium botulinum* strains associated with an infant botulism case in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2602–2607 (2005)
38. Kędzia B.: Botulizm i miód, cz. I. *Pasieka*, 6. 2008, <http://www.pasieka24.pl/wszystkie-nr-pasieki/47-pasieka-72008/442-botulizm-i-miod-cz-i.html> (28 czerwca 2012)
39. Kizerwetter-Świda M., Binek M.: Zatrucie jadem kiełbasianym – problem wciąż aktualny. *Post. Mikrobiol.* **49**, 75–85 (2010)
40. Koepke R., Sobel J., Arnon S.S.: Global Occurrence of Infant Botulism, 1976–2006. *Pediatrics*, **122**, 73–82 (2008)
41. Lúquez C., Dykes J.K., Yu P.A., Raphael B.H., Maslanka S.E.: First report worldwide of an infant botulism case due to *Clostridium botulinum* type E. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 326–328 (2009)
42. Mattila H.R., Rios D., Walker-Sperling V.E.W., Roeselers G., Newton I.L.G.: Characterisation of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PloS ONE*, **7**, e32962 (2012)
43. Midura T.F.: Update: Infant Botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 119–125 (1996)
44. Midura T.F., Snowden S., Wood R.M., Arnon S.S.: Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. *J. Clin. Microbiol.* **9**, 282–283 (1979)
45. Mitchell W.G., Tseng-Ong L.: Catastrophic Presentation of infant botulism may obscure or delay diagnosis. *Pediatrics*, **116**, 436–438 (2005)
46. Moniuszko A., Czupryna P., Pancewicz S.A., Kondrusik M., Grygorczuk S., Zajkowska J.M.: Botulizm – nadal aktualny problem epidemiologiczny i kliniczny. *Pol. Merk. Lek.* **27**, 58–61 (2009)
47. Nakano H., Kizaki H., Sakaguchi G.: Multiplication of *Clostridium botulinum* in dead honey-bees and bee pupae, a likely source on heavy contamination of honey. *Intern. J. Food Microbiol.* **21**, 247–252 (1994)
48. National Honey Board Fact Sheet. Microorganisms in Honey. 2012, <http://honey.com> (28 czerwca 2012).
49. Ndip R.N., Malange Takang A.E., Echakachi C.M., Malongue A., Akoachere J-F T.K., Ndip L.M., Luma H.N.: *In-vitro* antimicrobial activity of selected honeys on clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Afr. Health Sci.* **7**, 228–232 (2007)
50. Nevas M., Lindstrom M., Horman A., Keto-Timonen R., Korkeala H.: Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environmen. Microbiol.* **8**, 1085–1094 (2006)
51. Nevas M., Hielm S., Lindström M., Koivulehto K., Horn H., Korkeala H.: High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 45–52 (2002)
52. Nevas M., Lindstrom M., Virtanen A., Hielm S., Kuusi M., Arnon S.S., Vuori E., Korkeala H.: Infant botulism acquired from household dust presenting as sudden infant death syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 511–513 (2005)
53. Nevas M.: *Clostridium botulinum* in honey production with respect to infant botulism. Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki. Helsinki, Finland 2006, <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/elint/vk/nevas/clostrid.pdf> (28 czerwca 2012)
54. Niedźwiecki A.: Pszczelarstwo ekologiczne w krajach UE (na przykładzie Niemiec). *Pasieka*, nr 1, 2003, http://www.pasieka.pszczoly.pl/index.php?artplik=2003_01_01p_ekologiczne.html&grkat=z_pasieka_w_swiat&s=vjufile (28 czerwca 2012)
55. NIZP-PZH. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny Definicje przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH. Wersja robocza(2) 2012, http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_Rob_2.pdf (28 czerwca 2012)
56. O'Brien S.: Case of infant botulism in the United Kingdom. *Eurosurveillance*, **5**, 2001, <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1703> (28 czerwca 2012)
57. Obaseiki-Ebor E.E., Afonja T.C.: *In vitro* evaluation of the anti-candidiasis activity of honey distillate (HY-1) compared with that of antimycotic agents. *J. Pharm. Pharmacol.* **36**, 283–284 (1984)
58. Olaitan P.B., Adeleke O.E., Ola I.O.: Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health Sci.* **7**, 159–165 (2007)
59. Popa M., Vica M., Axinte R., Glevitzki M., Varvara S.: Study concerning the honey qualities in Transylvania region. *Ann. Univ. Apulensis Ser. Oeconomica*, **11**, 1034–1040 (2009)
60. Ruiz-Argueso T., Rodriguez-Navarro A.: Microbiology of Ripening Honey. *Appl. Microbiol.* **30**, 893–896 (1975)
61. Sanford M.T., Atkinson E., Ellis, J.: Infant Botulism and Honey. Entomology and Nematology Department. ENY-128 2009, <http://edis.ifas.ufl.edu/aa142> (28 czerwca 2012)
62. Sevenier V., Delannoy S., Andre S., Fach P., Remize F.: Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 263–268 (2012)
63. Smith G.E., Hinde F., Westmoreland D., Berry P.R., Gilbert R.J.: Infantile botulism. *Arch. Dis. Child.* **64**, 871–872 (1989)
64. Solomon H.M., Rhodehamel E.J., Kautter D.A.: Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* on sliced raw potatoes in a modified atmosphere with and without sulfite. *J. Food Protocols*, **61**, 126–128 (1998)
65. Szczęsna T.: Problemy z jakością miodu na rynku krajowym. *Pasieka*, nr 3 2003, http://www.pasieka.pszczoly.pl/index.php?s=vjufile&grkat=produkty_pasieczne&artplik=2003_03_01jakosc_miodu.html (28 czerwca 2012)
66. Tanzi M.G., Gabay M.P.: Mini Review. Association between honey consumption and infant botulism. *Pharmacotherapy*, **22**, 1479–1483 (2002)
67. Tchoumboue J., Awah-Ndukum J., Fonteh F.A., Dongock N.D., Pinta J., Mvondo Z.A.: Physico-chemical and microbiological characteristics of honey from the sudano-guinean zone of West Cameroon. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 908–913 (2006)
68. Trethon A., Budai J., Herendi A., Szabo V., Geczy M.: Botulism in infancy. *Orvosi. Hetilap.* **136**, 1497–1499 (1995)
69. Willix D.J., Molan P.C., Harfoot C.J.: A comparison of the sensitivity of wound infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 388–394 (1992)
70. Zanon P., Pattis P., Pittsscheider W., Roscia G., De Giorgi G., Sacco G., Votter K., Stockner I., De Giorgi F., Wiedermann C.J.: Two cases of foodborne botulism with home-preserved asparagus. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, **41**, 156–159 (2006)