

576.851.553:623.458.9:341.24

BOTULOTOXIN A ÚMLUVA O ZÁKAZU BIOLOGICKÝCH ZBRANÍ

Vladimír MĚRKA

Oddělení vědecké práce Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Po toxikologické charakteristice botulotoxinu A jako nejsilnějšího známého jedu pro člověka je podán přehled jeho prokázaného, domnělého nebo připravovaného nasazení jako biologické zbraně. Na příkladu botulotoxinu je ukázána obtížnost, jak odlišit jeho výzkum, výrobu a skladování pro čistě medicínské účely od možného zneužití k vedení biologické války či k biologickému terorismu. O toto usilují dlouhodobě probíhající jednání s cílem vytvoření dodatečného protokolu k úmluvě o zákazu biologických zbraní z roku 1972.

Klíčová slova: Botulotoxin; Biologická válka; Biologický terorismus; Úmluva o zákazu biologických zbraní.

Botulinum Toxin and Biological Weapons Convention

Summary

Botulinum toxin A (BTX) is the most toxic compound known to man. An overview of its proved, presumed or prepared deployment as a biowarfare agent is presented. In case of BTX it can be shown just how difficult it is to distinguish its research, production and storage for purely medical purposes from its abuse for waging biological warfare or for bioterrorism. An additional protocol to the Biological Weapons Convention of 1972 created during the long-term negotiations should make this possible.

Key words: Botulinum toxin; Biological warfare; Bioterrorism; Biological Weapons Convention.

Botulotoxin představuje skupinu 7 antigenně odlišných neurotoxinů, označovaných písmeny A-G, které jsou produkovány sporulujícím mikroorganismem *Clostridium botulinum*. Jde o grampozitivní, přísně anaerobní pohyblivou tyčinku, běžně se vyskytující v zažívacím traktu zvířat a v přírodě (zejména v půdě hnojené chlévskou mrvou). Spory *Clostridium botulinum* snesou i několikahodinový var, botulotoxin je termolabilní, 10minutový var jej rozloží. Botulotoxin je lidově nazýván klobásovým jedem. V nedostatečně sterilizovaných masových, zeleninových a ovocných konzervách může v anaerobním prostředí dojít k pomnožení *Clostridium botulinum* a k masivní produkci botulotoxinu. Po požití takové potraviny dochází k onemocnění nazývanému botulismus.

Nemoc je známa odedávna. Původce i jeho toxin izoloval Belgičan Van Ermengem v roce 1895 ze šunky a paralyzující účinek toxinu prokázal na koťatech (2, 5).

Vedle tohoto alimentárního botulismu (food-borne botulism) je znám kojenecký botulismus (infant botulism), což je intoxikace způsobená ab-

sorpcí botulotoxinu vytvořeného v zažívacím ústrojí po kolonizaci a pomnožení *Clostridium botulinum* ve střevě, a ranný botulismus (wound botulism), kdy dojde k tvorbě toxinu v infikované ráně. Prognóza kojeneckého a ranného botulismu je dobrá (2).

Botulotoxiny jsou proteiny s molekulovou hmotností kolem 150 kDa. Molekula se skládá z těžkého H (heavy) a lehkého L (light) řetězce spojených navzájem disulfidickým můstkem. Nositel toxického účinku je L-řetězec, zatímco H-řetězec zprostředkovává vazbu na specifické receptory v pre-synaptické membráně (podle sérotypu botulotoxinu). Po absorpci ze zažívacího traktu se dostává botulotoxin do krevního řečiště a odtud až k periferním cholinergním synapsím, na které se váže, a blokuje tak uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení. Tím dochází k vážnému narušení periferního cholinergního nervového přenosu, což se projeví po inkubační době, nejčastěji po 18 až 36 hodinách, typickými klinickými příznaky. Inkubační doba může však trvat pouze 2 hodiny, nebo naopak až 8 dnů v závislosti na velikosti infekční dávky. První je postiženo bulbární svalstvo, což se projevuje mydriá-

Tabulka 1

Otravy nervově paralytickými látkami x botulismus – diferenciální diagnóza

	NPL	Botulismus
Doba vzniku příznaků	v minutách	za 12–48 hodin
Nervové příznaky	křeče, zmatenost	postupná paralýza
Srdeční frekvence	zpomalená	normální
Dýchání	obtížné, konstriktory dýchacích cest	normální, pak progresivní paralýza
Gastrointestinální trakt	zvýšená peristaltika, nauzea, bolesti, průjem, tenezmy	snížená peristaltika, zácpa
Oční příznaky	míóza (zúžené zorničky)	mydriáza (dilatace zorničky), ptóza víček
Tvorba slin	hojné slinění	normální, obtížné polykání
Slzné žlázy	zvýšené slzení	?
Atropin	ano	ne
Smrt	v minutách	za 2–3 dny

zou, diplopií, nemožností akomodace a světloplachostí. Následují závratě (vyvolané hypotonií), suchost v ústech, svalová slabost až paralýza, poruchy polykání a řeči, nauzea, zvracení, bolesti břicha. Horečka zpravidla nebývá. Vědomí zůstává trvale zachováno. Paralýza dýchacího svalstva pak může být příčinou smrti (2, 3, 5, 9, 11).

Co se týká diagnózy, detekce toxinu v séru nebo žaludečním obsahu je možná (metodou ELISA), avšak dosti obtížná. Proto pokus na myši (s intra-peritoneálním podáním podezřelého materiálu – séra, žaludečního obsahu) zůstává nejdůležitějším testem.

Diferenciálně diagnosticky je třeba pomýšlet i na jiné neuromuskulární poruchy (např. myasthenia gravis, Guillainův-Barrého syndrom). Cerebrospinální mok je u botulismu normální a paralýzy jsou symetrické, což ho odlišuje od virových encefalomyelitid. Na druhé straně je třeba botulismus odlišit od otravy nervově paralytickými látkami (NPL). Zatímco u otrav NPL se sekrece z dýchacího ústrojí zvyšuje, u botulismu se snižuje (sliznice jsou suché). Ostatní znaky významné pro diferenciální diagnózu jsou shrnuty do tab. 1. Na rozdíl od otravy NPL, u níž je nadbytek acetylcholinu způsobený inhibicí acetylcholinesterázy, u botulismu je nedostatek přenašečů nervových impulsů v synapsích. Proto u botulismu není indikováno podávání atropinu (3).

V rámci první pomoci se pokusíme urychleně vyvolat zvracení a provést výplach žaludku. Toto opatření se týká především alimentárního botulismu a má naději na úspěch, je-li provedeno včas (5).

Náhlá zástava dechu je nejzávažnější komplikací intoxikovaných. Proto postižení musí být trvale monitorováni a včas je třeba zahájit umělou ventilaci s endotracheální intubací nebo tracheostomií. Tato nutná intenzivní péče o dýchání si může vy-

žádat i dobu několika týdnů. Dále je doporučováno podávání guanidin hydrochloridu (v denní dávce 15–50 mg/kg) nebo 3,4 diaminopyridinu, které podporují uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení. Někteří autoři ovšem jejich účinek zpochybňují (2, 9).

V terapii botulismu se největší význam přikládá botulinovému antitoxinu, což jsou hotové protilátky proti botulotoxinům na bázi koňského séra. Trivalentní koňský antitoxin amerického původu obsahuje 7500 IU typu A, 5500 IU typu B a 8500 IU typu E. Podává se intravenózně. Tento přípravek má všechny nevýhody koňského séra včetně rizika anafylaktického šoku a sérové nemoci. V současné době byl vyvinut heptavalentní koňský antitoxin proti všem sedmi typům botulotoxinu. Nebezpečí anafylaxe je u tohoto přípravku poněkud sníženo. Před podáním antitoxinů (antibotulinových sér) provádíme kožní test tak, že injikujeme 0,1 ml fyziologickým roztokem 10krát zředěného přípravku intradermálně do předloktí. Je-li test pozitivní, nesmí se antitoxin aplikovat. Nově vyvinuté monoklonální protilátky by měly odstranit nevýhody klasických antitoxinů.

Profylaxe botulismu je možná s použitím vakcín pentavalentního toxoidu (anatoxinu) typu A, B, C, D a E. Tato nová vakcína nebyla dosud zaregistrována ani v místě svého vzniku, tj. v USA, ani ve Francii (1). Je poměrně hodně reaktogenní, příprava je drahá a očkování prováděné v průběhu 3 měsíců podle vakcinačního schématu 0–2–12 týdnů ochrání asi 83 % očkovaných. Kontraindikací pro její použití je přecitlivělost na hliník, formaldehyd a thiomersal (1, 3).

Botulotoxin patří mezi nejobávanější potenciální biologické zbraně a v této souvislosti je nutno počí-

tat také s možným použitím ve formě aerosolu, při němž se noxa dostává do lidského organismu prostřednictvím dýchacího ústrojí. Co se týká jednotlivých sérotypů, největší hrozbu představuje typ A, vyznačující se nejvyšší toxicitou. Botulotoxin A je nejsilnějším známým bakteriálním jodem pro člověka. Jeho letální dávka (LD_{50}) se odhaduje na 1 ng/kg. Z připojené tabulky 2 s letálními dávkami pro myš podanými intraperitoneálně vyplývá, že botulotoxin A je 100 000krát toxičtější než sarin (1, 3, 12, 13).

Tabulka 2

Letální dávky (LD_{50}) vybraných bakteriálních toxinů a nervově paralytických látek pro laboratorní myši (intraperitoneálně)

Látka	LD_{50} $\mu\text{g/kg}$
Botulotoxin A	0,001
Shigatoxin	0,002
Tetanospasmin	0,002
Difterický toxin	0,10
C. perfringens toxiny	0,1–5,0
VX	15,0
Soman	64,0
Sarin	100,0

(podle Eitzena et al., 1998)

Aerosol botulotoxinu vyvolává podobný klinický obraz, jaký je pozorován u alimentárních intoxikací, avšak paralytické symptomy se dostavují o něco později (3).

Nebezpečnost botulotoxinu je dána také tím, že jeho příprava je poměrně snadná a nevyžaduje náročnější přístrojové vybavení. To umožňuje jeho použití i k teroristickým útokům.

Po zpřístupnění tajných archivů vyšlo najevo, že za druhé světové války Československo, okupované Hitlerem, a Velká Británie se uchýlily k nasazení biologické zbraně proti nacistickému pohlaváři R. Heydrichovi v Praze. Na základě požadavku britské tajné služby vojenské výzkumné středisko v Portonu (Chemical and Biological Defense Institute, Porton Down) připravilo speciálně upravené ruční protitankové granáty vzor 73 k zajištění akce Anthropoid. Horní třetina granátu byla vyplněna botulotoxinem. Dva výsadkáři, příslušníci zahraniční československé armády ve Velké Británii, Gabčík a Kubiš, použili tohoto granátu 27. května 1942. Heydrichova poranění hrudníku a sleziny způsobená úlomky granátu nemusela být a priori smrtelná.

Heydrich však 4. června 1942 náhle umírá s příznaky svědčícími o otravě botulotoxinem (6, 10). Vedle této verze existuje ještě jedno vysvětlení: Opěradlo sedadla, na němž Heydrich seděl, bylo proraženo střepinou granátu, která pronikla zezadu až do sleziny. Sedadlo mělo polstrování z koňských žíní, které byly střepinou strženy do rány. Koňské žíně primárně kontaminované jsou uváděny v Geisslerově obsáhlé monografii jako příčina „otravy krve“, na kterou 8 dnů po atentátu Heydrich zemřel (4). Obě verze lze ovšem převést na společného jmenovatele, když si uvědomíme, že koňské žíně mohly být kontaminovány různými bakteriemi, včetně *Clostridium botulinum*.

Polští partyzáni měli údajně za druhé světové války ve Varšavě botulotoxin také k dispozici. Tajná laboratoř byla odhalena a její pracovníci zlikvidováni roku 1942. Německá strana měla botulotoxin také ve svém arzenálu biologických zbraní, o čemž svědčí směrnice „Einsatzmöglichkeiten von B-Kampfmitteln zur Bekämpfung von Partisanen“, vypracované roku 1943 známým profesorem mikrobiologie Kliewem (4, 10).

V 80. letech byla policií v Paříži odhalena tajná laboratoř patřící francouzské frakci „rudých brigád“, která kultivovala mimo jiné *Clostridium botulinum* a připravovala botulotoxin (12).

V souvislosti s válkou v Perském zálivu (1990 až 1991) vyšlo najevo, že Irák, ač signatář úmluvy o zákazu biologických zbraní, prováděl výzkum pro ofenzivní vedení biologické války, a dokonce měl připravenou i munici (bomby, rakety a dělostřelecké granáty) s náplní botulotoxinu a antraxu (1, 3, 12).

Japonská náboženská sekta Óm šinrikjó před použitím sarinu v tokijském metru (březen 1995) zkoušela, naštěstí bez úspěchu, aerosol botulotoxinu v ulicích Matsumota a Tokia (1, 3, 12).

Hrozba použití botulotoxinu ve formě aerosolu, v munici, ale i ve formě teroristických akcí s úmyslnou kontaminací potravin či vody je zcela reálná (12, 13, 14).

Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění bakteriologických a toxinových zbraní byla podepsána v dubnu 1972 a vstoupila v platnost v březnu 1975. Do dnešního dne ji ratifikovalo 143 států. Alžírsko, Ázerbájdžán, Izrael, Kazachstán, Moldávie a Súdán úmluvu nepodepsaly a Egypt, Maroko a Sýrie úmluvu podepsaly, ale neratifikovaly. Mnohé signatářské státy úmluvu nedodržují (3, 8, 12). Kontrolní mechanismy jsou totiž nedokonalé. Po 22 letech vyjednávání je před dokončením dodatečný pro-

tokol, který by měl zpřísnit dodržování této úmluvy (8).

Návrh dodatečného protokolu obsahuje tyto hlavní prvky:

- a) **Deklarace:** Signatářské státy jsou povinny deklarovat dějiny svých ofenzivních biologických programů i současných aktivit v oblasti obrany proti biologickým zbraním. Vojenská i civilní zařízení, která jsou vhodná k vývoji a výrobě biologických zbraní, podléhají rovněž deklarační povinnosti. To se týká např. také laboratoří pro práci se zvláště nebezpečnými nákazami stupně BL-4 a zařízení pro výrobu očkovacích látek s fermentační kapacitou vyšší než 300 litrů.
- b) **Inspekční návštěvy:** Ze všech deklarovaných zařízení by mělo být každoročně 90 náhodně vybraných navštíveno inspektory mezinárodní inspekce. Tito inspektoři by kontrolovali, zda signatářské státy přesně plní své deklarační povinnosti. Při kontrolách musí však být respektována ochrana důvěrných informací.
- c) **Vyšetřování:** V případě, že signatářský stát má podezření, že jiný stát vyrábí, skladuje nebo již použil biologické zbraně, může požádat o kontrolu mezinárodní inspekci. V případě, že se podezření potvrdí, Rada bezpečnosti OSN vyvodí z toho důsledky.

Sídlem mezinárodní inspekce pro dodržování úmluvy o zákazu biologických zbraní by měla být nadále Ženeva.

Návrh dodatečného protokolu pojednává také o pomoci vyspělých států rozvojovým zemím v boji proti infekčním nemocím v rámci Světové zdravotnické organizace. Dobře fungující veřejné zdravotnictví je totiž základním předpokladem pro účinnou obranu proti biologickým zbraním (8).

Na příkladu botulotoxinu, nejprudšího známého jedu, lze však ukázat složitost a obtížnost úkolu, jak zabránit jeho zneužití k vedení biologické války nebo jeho použití k teroristickým útokům.

Výrobu botulotoxinu nelze z bezpečnostních důvodů jednoduše zakázat, neboť tento jed je zároveň i lékem. Botulotoxin se používá k léčbě některých křečových neuromuskulárních poruch, jako je blefarospasmus, strabismus, hemifaciální spasmus, torticollis, pes varus apod. Vedle těchto indikací se v poslední době botulotoxin A prosazuje v kosmetice k odstraňování hlubokých vrásek v obličeji. Botulotoxin totiž oslabuje svalový tonus a tím se povrch

kůže vyrovnává. Vrásky kolem očních víček, rtů a na čele mizejí. Pro léčebné účely se vyrábí krystalický lyofilizovaný botulotoxin A pod názvem Botox inj. nebo Dysport inj. Výrobcem je irská pobočka farmaceutické firmy Allergan ve městě Westport. Tyto farmaceutické přípravky se aplikují intramuskulárně, popř. subkutánně (7).

O terapeutickém využití botulotoxinu pojednává monografie autorů J. Jankovice a M. Halletta „Therapy with botulinum toxin“, vydaná v New Yorku v roce 1994.

Literatura

1. ATTRÉE, O. - QUESNEL-HELLMAN, A. - MICHEL, P.: Botulisme et menace biologique, quelles approches de protection médicale? Trav. Scient. S.S.A. 1999, vol. 20, p. 75-76.
2. BARTLETT, JG.: Botulism. In BENNETT, JC. - PLUM, F.: Cecil Textbook of Medicine. 20th ed. Philadelphia, Saunders, 1996, p. 1635-1636.
3. EITZEN, E., et al.: Medical management of biological casualties. 3rd ed., Fort Detrick Frederick, USAMRIID, 1998, 80 p.
4. GEISSLER, E.: Biologische Waffen, nicht in Hitlers Arsenalen. 2. vyd. Münster, LIT Verlag, 1999, 905 p.
5. HAVLÍK, J.: Příručka infekčních a parazitárních nemocí. 1. vyd. Praha, Avicenum, 1985, 536 s.
6. KLEIN, L. - MĚRKA, V.: Biological Terrorism. Rev. Int. Serv. Santé Armées, 2001, vol. 74, no. 1, p. 46-48.
7. LETESSIER, S.: Treatment of wrinkles with botulinum toxin. J. Dermatol. Treat., 1999, vol. 10, p. 31-36.
8. MATTER, M.: Das Biologiewaffenübereinkommen soll Zähne erhalten. Schweiz. Zeitschrift f. Militär- u. Katastrophenmed., 2001, Jg. 78, Nr. 2, S. 35-38.
9. MILOŠEVIČ, N.: Botulizam, prikaz jednog slučaja iz porodične epidemije. Vojnosanit. Pregled, 1997, vol. 54, no. 3, p. 273-276.
10. MOBLEY, JA.: Biological warfare in the twentieth century. Mil. Medicine, 1995, vol. 160, no. 11, p. 547-553.
11. PATOČKA, J.: Natural neurotoxins with targeting to cholinergic nervous system (cholinotoxins). Voj. zdrav. Listy, Suppl., 1998, vol. 67, no. 2, p. 22-31.
12. SOHNS, T.: Die Proliferation von Massenvernichtungswaffen. Notfallvorsorge, 2000, Jg. 2, S. 1-15.
13. STEFFEN, R. - GUTZWILLER, F.: Biologische Waffen und Bioterror, Hirngespinnst oder Bedrohung? Schweiz. Zeitschrift f. Militär- u. Katastrophenmed., 2000, Jg. 77, Nr. 1, S. 19-21.
14. STIENSTRA, S.: Amerika bereidt zich voor op de dreiging van bioterroristen. Nederlands Militair Geneeskundig Tijdschrift, 2000, vol. 53, no. 3, p. 83-86.

Korespondence: Doc. RNDr. Vladimír Měrka, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové

Do redakce došlo 25. 9. 2001