

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Botulotoxin: nebezpečný jed nebo užitečný lék?

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc.
Autor: Magdalena Hamerníková

České Budějovice

2007

ABSTRACT

Botulotoxin: dangerous poison or useful remedy?

Regarding present awareness of biological agents and the possibilities for terrorist groups several possible sources, which are most likely to be abused in biological weapons and subsequent spread of these diseases (sources) in population have been addressed, botulotoxin is one of them.

Poisoning with botulotoxin (botulism) is a possible variant of bio-terrorist attack, which is considered real at present..

Botulotoxin is used in cosmetics, particularly for smoothening wrinkles, and is also applied in medicine.

The aim of my thesis was to gather summarized information on botulotoxin and the possibilities of its abuse as poison for terrorist attack, to enlighten its availability, the way of use by terrorist, a scenario of such an attack, the clinical progress of poisoning, possible mortalities and preventive measures minimizing them, the issues of using botulotoxin as medicine in present health care and evaluation the possible consequent risks, and evaluation of awareness of botulotoxin and bio-terrorism in general among general public and professionals.

H1: Professionals consider botulotoxin one of the poisons most likely to be used as an instrument of bio-terrorism and has been high attention paid to its study.

H2: General public more perceive botulotoxin as cosmetic preparation for smoothening wrinkles in a face and it has only a few informations of its terrorist abuse.

Verification of the first hypothesis was performed at theoretical level by studying professional literature its critical assessment and consultation with experts. All available publications on botulotoxin and its relation to bio-terrorism of the last ten years were collected, and the reasons why botulotoxin is considered to be a suitable instrument of bio-terrorism as well as a suitable instrument in medicine and cosmetics.

Verification of the second hypothesis was performed by investigation in the form of a questionnaire research. A questionnaire enabling to find out awareness of botulotoxin and bio-terrorism in general among the public was compiled. The research

was conducted among the general public and among professionals, represented by members of the Integrated Rescue System in České Budějovice. The questionnaire consists of 18 questions. The samples of both the groups include 100 respondents, stratified selection of whom was performed upon consultation with an expert. Questionnaire evaluation was performed in 2 spheres. The first sphere deals with identification data and the second with general awareness. The aim of this work was to find out what the awareness of botulotoxin and bio-terrorism in general the general public and professionals was like.

Finally I analysed the research results and the formulated hypotheses. The research results have confirmed my hypotheses. They show that the examined general public sample and the sample of professionals could not have been chosen from an identical outside group, the difference between them is statistically significant. Professionals are statistically significantly better aware of botulotoxin features than the general public.

This thesis represent an information source for those interested in these issues, particularly for the Integrated Rescue System units.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Botulotoxin, nebezpečný jed nebo užitečný lék?“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Českých Budějovicích, 16. 5. 2007

.....

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat panu prof. RNDr. Jiřímu Patočkovi, DrSc. za příkladné vedení mé bakalářské práce. Dále děkuji za poskytnutí cenných rad a informací panu doc. RNDr. Přemyslovi Záškodnému, CSc.

OBSAH:

ÚVOD.....	5
1. SOUČASNÝ STAV.....	6
1.1 Historie zneužití biologických agens.....	6
1.2 Události po 11. září 2001.....	16
1.3 Bioterrorismus.....	16
1.3.1 Cíle terorismu.....	16
1.3.2 Biologický útok a botulotoxin.....	17
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....	19
2.1 Cíle práce.....	19
2.2 Hypotézy.....	19
3. METODIKA.....	20
3.1 Teoretická část.....	20
3.2 Praktická část.....	20
3.2.1 Elementární statistické zpracování	20
3.2.2 Neparametrické testování.....	22
3.2.3 Parametrické testování.....	24
4. VÝSLEDKY.....	26
4.1 Clostridium botulinum.....	26
4.1.1 Původce botulotoxinu.....	26
4.1.2 Epidemiologie.....	27
4.1.3 Patogeneze a klinický obraz.....	28
4.1.4 Klinické příznaky intoxikace.....	30
4.1.5 Diagnóza a diferenciální diagnostika.....	30
4.1.5.1 Laboratorní diagnostika.....	31
4.1.5.2 Morfologie	32
4.1.5.3 Fyziologické vlastnosti.....	32
4.1.6 Terapie.....	32
4.1.6.1 Hospitalizace.....	33

4.1.6.2 Protiepidemická opatření.....	34
4.1.7 Profylaxe a prevence.....	35
4.1.8 Detekce.....	35
4.1.9 Botulotoxin jako lék v současné medicíně a kosmetice.....	36
4.1.9.1 Současná medicína.....	36
4.1.9.2 Botulotoxinové injekce.....	37
4.2 Poučenost o botulotoxinu.....	37
4.3 Provedení praktického výzkumu.....	38
4.3.1 Předvýzkum.....	38
4.3.2 Výsledky dotazníkového šetření.....	38
5. DISKUSE.....	48
5.1 Shrnutí podkladů pro diskusi.....	48
5.2 Diskuse splnění cílů a hypotéz práce.....	50
6. ZÁVĚR.....	51
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	52
8. KLÍČOVÁ SLOVA.....	55
9. PŘÍLOHY	

ÚVOD

V současné době se všeobecně diskutuje problematika prevence, ochrany a represe pro tzv. „nové hrozby terorismu“, mezi které se mimo jiné počítají i biologické útoky. Mezi biologické prostředky, které počítáme mezi zbraně hromadného ničení patří bakterie, viry, patogenní houby a toxiny.

Toxiny, díky vědeckému pokroku posledních let, se dají snadno vyrobit i ve větším množství a jsou obavy, že by mohly být zneužity jako nástroj bioterorismu. Ve srovnání s ostatními zbraněmi jsou biologické zbraně unikátní co do rozmanitosti. Řada různých původců může být použita jako biologická zbraň a každý může mít naprosto odlišný efekt, tyto rozdíly jsou dány rozličnou výbavou jednotlivých původců.

Jedním z nejzávažnějších biologických agens je také *Clostridium botulinum* (botulotoxin). Botulotoxin jako biologickou zbraň předurčuje řada charakteristik včetně snadné produkce ve větších kvantech, možnosti dlouhodobějšího skladování, extrémní toxicita, vysoká letalita a nutnost nákladné a dlouhodobé péče o postižené.

Hlavním cílem mé práce je objasnit význam botulotoxinu jako jednoho z prostředků bioterorismu a zjistit stupeň informovanosti obyvatelstva o botulotoxinu jako jedu, možného nástroje bioteroristického útoku.

Toto téma jsem si vybrala, abych si rozšířila znalosti o *Cl. botulinum*, jako nebezpečného jedu, ale také jako přípravku medicíny současné doby. Doufám, že práce bude přínosem nejen pro mne, ale i pro další zájemce.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1 Historie zneužití biologických agens

Vývoj a testování botulotoxinu jako biozbraně začalo již zhruba před 60 léty. Již v 30. letech minulého století, po obsazení Mandžuska, experimentovali japonští biologičtí odborníci, soustředění v jednotce 731 (Water purification unit), s botulotoxinem a *C. botulinum* na zajatcích. V průběhu 2. světové války, v rámci biozbrojního programu armády Spojených států amerických, byla testována výroba botulotoxinu ve velkých kvantitách. Vzhledem k obavám, že německá armáda rovněž disponuje velkými kvanty botulotoxinu bylo vyrobeno více než 1 milion dávek botulinového antitoxinu pro spojenecké síly, které se vylodily v Normandii.

V roce 1925 byl podepsán Ženevský protokol o zákazu válečného použití dusivých, otravných a jiných plynů a bakteriologických způsobů boje. Přesto si některé státy, včetně Spojených států a tehdejšího Sovětského svazu, formálně vyhradily právo použít takové zbraně ve smyslu odvety, pokud tyto zbraně budou použity protivníkem. To ve své podstatě znamená možnost a právo biologické zbraně skladovat.

R. 1932-1945 Japonci vytvořili bojový biologický program známý jako Jednotka 731 (Unit 731). Byly využívány experimenty na lidech. Odhadem zemřelo na 3 000 vězňů. Tato jednotka byla založena japonskou císařskou armádou v severozápadní Číně v Ping Fan, v okupované Manchurii. Jednotka byla rozmístěna na ploše 6 km² a zaměstnávala v té době udivující počet (3 000) japonských lékařů, techniků a vojáků. Jednotka měla 8 oddělení pracujících na biologických zbraních od těch, která se zabývala výzkumem a kultivací patogenů, přes oddělení odpovědná za testování na zvířatech a lidech v laboratořích a v poli, až po oddělení, která vyvíjela speciální bomby či plnicí pera nebo vycházkové hole sloužící rovněž jako kontejnery pro biologické zbraně. Na svém vrcholu jednotka produkovala 300 kg čistých bakterií moru každý měsíc. V případě potřeby by mohla vyrobit 600 kg původců antraxu, 900 kg původců tyfu nebo 1 000 kg choleroých vibrií (původců cholery). Morová továrna byla schopna kultivovat a poté „sklidit“ 45 kg morových blech ve velice krátkém čase. Jednotce velel

generál Ishi, přesvědčený o možném ničivém potenciálu biologických zbraní. Skutečnost, že biologické zbraně byly zakázány v roce 1925 Ženevským protokolem, ho utvrzovala v přesvědčení o jejich možném devastujícím dopadu. Byl vzdělán medicínsky se specializací v mikrobiologii a imunologii. V mírové době byl stresován nemožností provádět pokusy na lidech. Po násilném obsazení města Hárbin v roce 1932 byla vybrána vesnice Beiyinhe, kde existovalo místní vězení s lidmi různého původu – Číňany, Rusy, Mongolci, Korejci, ale i Evropany. Tak začal hororový scénář, který nemá ve světových dějinách prakticky obdoby. Byly prováděny různé experimenty s biologickými původci (mor, tyfus, paratyfus A a B, neštovice, tularémie, infekční žloutenka, plynatá sněť, tetanus, cholera, úplavice, vozohřivka, spála, klíšťová encefalitida, krvácivé horečky, černý kašel, záškrť, pohlavní choroby, tuberkulóza, salmonelóza a mnoho dalších). Například se prováděly pokusy s plynatou snětí, při nichž byli vězni vystaveni působení bomb obsahujících bakterie plynaté sněti. Aby nezahynuli díky explozi, byli jejich hlavy a trupy chráněny speciálními kovovými štíty. Poté byl týden sledován celkový efekt do té doby, než všichni postižení zemřeli. Vězni byli nuceni jíst čokoládu infikovanou antraxem, sušenky s morem nebo pít mléko infikované cholerou. Vězenkyně byly cíleně nakaženy různými pohlavními chorobami, například syfilis. V řadě případů pak byly prováděny pitvy ještě za živa bez použití anestetik. První biologický útok byl proveden v roce 1939. Ishii vyslal speciální jednotku, která nesla 22,5 kg bakterií způsobujících salmonelózu a tyfus, a poté je vypustila do řeky. Po odebrání vzorků z řeky se skupina vrátila zpět. Efektivita této operace nebyla nikdy vyhodnocena.

R. 1933 Biologický program v Sovětském svazu byl dán pod kontrolu OGPU, předchůdce KGB. Současně byla vytvořena malá laboratoř v Suzdalu. V témže roce otevřela armáda Vědecko-výzkumný institut mikrobiologie ve vesnici Perkuškovo u Moskvy jako hlavní základnu. Další laboratoře vznikly při Vojenské akademii v Leningradě.

R. 1940 Japonci zaútočili na město Changchun cholerou. Ishii přesvědčil místní orgány, že je třeba očkovat populaci proti epidemii cholery a poté provedl očkování

roztokem plným choleroých mikroorganismů. Epidemie se brzy rozšířila v celé oblasti. Je odhadováno, že zemřelo 10 000 civilistů a 1 700 japonských vojáků.

R. 1942 Britové testovali antrax na ovčích na skotském ostrově Gruinard, který má pouhých 550 akrů a je vzdálen 3 míle od severozápadního pobřeží. Byly použity první západní bomby s antraxem (25librový prototyp). Po dobu 2. světové války panovaly ve Velké Británii obavy z možnosti využití střel V-1 k dopravě bakteriologických zbraní na Londýn, proto byl vlastní vývoj poměrně intenzivní. Neobydlený ostrov byl po dlouhou dobu kontaminován nadlimitními dávkami. Díky tomu se podařilo prokázat, že spory z použitých antraxových bomb byly živé ještě o 40 let později. Proto v roce 1986 byla provedena na celém ostrově dekontaminace za použití několika tisíců litrů formaldehydu.

V roce 1942 Spojené státy zahájily výzkum biologických zbraní.

R.1942 Sovětský svaz přesunul svá tajná zařízení a laboratoře do Kirova, aby znemožnil jejich obsazení Němci. V roce 1942 se objevila rozsáhlá epidemie tularémie, která postihla německá vojska. I když použití biologických zbraní není zcela věrohodně potvrzeno, experimenty Sovětů s tímto původcem tularémie v této době jsou dobře známé.

R. 1943 Spojené státy začínají vyvíjet antraxové zbraně. Rovněž britské a kanadské laboratoře se účastní na tomto vývoji, kdy antrax nese kódové označení „N“. Do roku 1944 jsou připraveny tisíce antraxových bomb pro použití spojenci, avšak rozvědky neměla žádné důkazy o tom, že nacistické Německo rozvíjí své výzkumné kapacity k biologickým zbraním. Direktiva samotného Hitlera zakazovala útočný výzkum biologických prostředků. Až později v průběhu války někteří jeho podřízení, konkrétně říšský maršál Herman Göring, podporovali výzkum v malém tajném zařízení u Poznaně v Polsku, kde byl právě antrax zvažován jako potenciální biologická zbraň jak proti lidem, tak i zvířatům. Válka skončila dříve, než toto úsilí přineslo jakékoliv výsledky.

V roce 1945 epidemie antraxu zabíjí v Iránu 1 000 000 ovčí.

R. 1946 začíná se rozvíjet rozsáhlý ofenzivní sovětský biologický program. V čele je nechvalně známý Lavrentij Berija. Sověti získali jak německé technologie a zařízení,

tak japonské informace od spolupracovníků generála Ishii. Vzniká dlouhodobý program, který má výraznou odlišnost proti americkému. Sověti vyvíjejí zejména takové zbraně, proti kterým neexistuje ochrana. Jsou pro protivníka tedy podstatně nebezpečnější, ale mohou potenciálně ohrozit i vlastní vojska. V USA byla naopak zřejmá snaha myslet na zadní vrátka, mít současně k dispozici očkovací látku nebo léky.

R. 1947 Sovětský svaz tajně buduje závod pro masovou produkci biologických zbraní ve Sverdlovsku.

V 50. a 60. letech americký biologický útočný program pokračuje po 2. světové válce v laboratořích Fort Detrick v Marylandu. V této době je program bohatě financován, dostává více prostředků, než jsou vědci vůbec schopni utratit. Ačkoliv ještě v 30. letech byly Spojené státy poslední ze světových mocností s ohledem na zájem o biologické zbraně, v 50. letech americká armáda vytvořila infrastrukturu biologických prostředků, o které generál Ishii a jeho vědci v jednotce 731 mohli jenom snít. I američtí vědci sami se zdráhali uvěřit tomu, co všechno bylo dokázáno. Na počátku 2. světové války byla Británie prokazatelně napřed ve výzkumech v experimentálním zařízení v Porton Down v oblasti Wiltshire. Ve srovnání s projektem Manhattan, který měl vyvinout atomovou bombu, byl americký biologický program s rozpočtem 3,5 milionů amerických dolarů poměrně malý, avšak na konci 2. světové války dosahoval rozpočet již 60 milionů amerických dolarů. Nikdy předtím nebylo věnováno tolik peněz, vybavení a vědeckého úsilí za účelem výroby biologických zbraní. Klíčovým faktorem byl výběr aktuálních biologických původců. Požadován byl mikroorganismus s vysokou virulencí, minimální dávkou vyvolávající smrt, dlouhodobým efektem, spolehlivým růstem organismu během masové produkce, životaschopností během dlouhodobého uskladnění, jednoduchou možností transportu, schopností přežít ve zbraňových systémech schopností „paralyzovat“ rozsáhlé oblasti. Roli hrál rovněž požadavek, aby byla vyvinuta taková zbraň, která protivníka pouze dočasně zneschopní, ale nezabije ho, nebo aby byl nalezen alespoň původce, který by byl vysoce infekční pro člověka, ale dále se nešířil. Svatým grálem biologického útočného výzkumu je výroba suchého bakteriálního nebo virového původce. To je kritická část všech programů. Po zvážení několika vhodných míst byl zvolen Camp

Detrick na úpatí hor Catoctin Mountains v západním Marylandu, 80 km severozápadně od Washingtonu. V dubnu 1943 se stal Camp Detrick (v roce 1956 přejmenován na Fort Detrick) mozkovým centrem amerického programu. Byla zde prováděna inicializace a koordinace veškerého laboratorního výzkumu, výroba malých množství B-agens, testování, koordinace kontaktů s vědeckými kruhy a průmyslem. V době největšího rozmachu v roce 1945 zde bylo 1 770 důstojníků a nižšího personálu pracujících v laboratořích s maximálním nebezpečím. Byly vyvíjeny 500librové prototypy bomb, které obsahovaly mnoho malých bombiček a které byly shazovány z letadla. Tyto byly schopny zničit lidský život v okruhu 1 čtvereční míle. Společně s Brity byly připravovány strategie, jak shodit stovky tisíc 4librových antraxových bombiček na 6 německých měst (Berlín, Hamburk, Stuttgart, Frankfurt, Cáchy a Wilhemshafen). Tento plán však nebyl realizován vzhledem k možnému katastrofickému scénáři pro civilisty žijící v okolí. Po ukončení války v roce 1945 se výzkum v Camp Detricku orientoval na původce, kteří se jevíli slibně již během války, zvláště antrax, botulotoxin, brucelózu, tularemii a papouščí nemoc. V roce 1951, v dobách studené války, bylo však využíváno podstatně širší spektrum původců a byly vyvíjeny snahy, jak tyto původce více zefektivnit. V Pine Bluff ve středním Arkansasu byla již v roce 1942 otevřena velká továrna na chemické zbraně. V rozsáhlém areálu na více než 5 500 hektarech později vzniklo i nové zařízení pod kódovým názvem X-201, které mělo vyrábět a skladovat biologické látky. Tato továrna byla plně funkční v roce 1954 a jejích 858 zaměstnanců začalo produkovat původce brucelózy a tularémie. Později v roce 1955 byla produkce rozšířena o antrax a botulotoxin. V roce 1963 byla továrna zmodernizována tak, aby byla schopna produkovat i virové agens a původce Q-horečky. Paralelně v Camp Detricku probíhal program rozmnožování infikovaných komárů určených k šíření malárie a horečky Dengue, blech přenášejících mor, cholera, antrax a dyzenterii a klíšťat nakažených tularemii. Ve dnech 20. až 26.9.1950 dvě minolovky rozprášily miliony organismů *Serratia marcescens* u pobřeží San Franciska. Ačkoliv se v té době věřilo, že tento mikroorganismus je neškodný, o 3 dny později se objevilo několik pacientů s onemocněním vyvolaným tímto původcem, jeden muž zemřel. Podle nepotvrzených zdrojů mohly však počty obětí dosahovat stovek až tisíců. V roce 1957

byla zahájena další série testů za účelem zamoření rozsáhlých oblastí biologickými původci rozprášenými z letadel či pohybujících se automobilů. Zjistilo se, že pokud jsou částice dostatečně malé a směr větru odpovídá potřebám, mohou snadno pokrýt tisíce km². V roce 1958 byla vyvinuta první raketa schopná nést hlavici s biologickým obsahem – 762 mm Honest John, s dosahem 25 km. Kritickým posunem ve vývoji byla schopnost zamrazit suchým způsobem velké množství tekutých původců. V letech 1963-1969 probíhaly pokusy na Johnstonově atolu v jižním Pacifiku, které jsou doposud zahaleny tajemstvím. Testovány byly tularémie a Q-horečka. Aerosol byl šířen z letadel a účinek byl hodnocen na testovaných zvířatech.

R. 1953 je v USA zahájen obranný medicínský program, který pokračuje doposud pod názvem USAMRIID a stejný název nese i vlastní institut pro výzkum infekčních nemocí.

Až r.1954 vědci detailně popisují, jak bakterie antraxu vyvolává onemocnění – produkuje toxin.

R. 1954 v Aralském moři byla otevřena testovací základna na ostrově Vozrožděnie. Jednotlivé mikroorganismy byly testovány na stovkách šimpanzů. Po každém pokusu se vědci snažili zasaženou část ostrova dezinfikovat, ale bez znatelného úspěchu.

V roce 1969 Spojené státy a Velká Británie oficiálně ukončily svůj biologický zbraňový program. Obranný biologický program pokračuje.

R. 1970 byla vakcína proti antraxu schválena americkou FDA (Úřad pro kontrolu léčiv a potravin).

R. 1972 v součinnosti Spojených států, Velké Británie a Sovětského svazu byla dokončena Konvence o biologických zbraních, ke které se připojilo kolem 140 států. Tato konvence zakazuje vývoj, produkci, skladování nebo jiným způsobem udržování biologických původců nebo toxinů v množstvích a druzích, které nemají ospravedlnění z hlediska profylaktických, ochranných či jiných mírových důvodů. Také zakazuje zbraně, vybavení nebo prostředky, které jsou schopny dopravovat tyto původce či toxiny.

R. 1972 rybářská loď s několika Kazachy na palubě zabloudila v Aralském moři a dostala se příliš blízko k ostrovu Vozrožděnie. Když byli později náhodně objeveni, všichni byli mrtví. Příčinou jejich smrti byl mor.

V období květen 1971 až únor 1973 Spojené státy ničí zásoby biologických zbraní.

R. 1973 Sovětský svaz začíná rozvíjet biologický zbraňový program Biopreparát. V rámci tohoto programu byly vyvíjeny biologické zbraně na bázi uměle modifikovaných mikroorganismů vyskytujících se v přírodě. Byly vyvinuty kmeny, které jsou odolné proti celé škále současně používaných antibiotik, ale i proti očkovacím látkám. K nejnebezpečnějším výzkumům patřily pokusy vytvořit tzv. chimérické původce, tedy mikroorganismy naklonované z několika různých původců s využitím jejich nejnebezpečnějších vlastností. Tak byly připravovány například viry, které kombinovaly některé vlastnosti virů neštovic a Eboly. V rámci programu probíhaly rovněž práce na získání viru z mrtvých těl obětí pandemie chřipky z let 1918-1919, která se zachovala. Jedním z klíčových zařízení, která se v tehdejší Sovětské svazu specializovala na vývoj geneticky modifikovaných virových agens a chimérických původců, kteří byli kombinací několika smrtících mikroorganismů, byl Vektor, i v USA nejvýše respektovaná laboratoř. Toto zařízení se orientovalo na vývoj a masovou produkci virových zbraní, včetně neštovic, horečky Marburg a Ebola. Z bezpečnostních důvodů bylo zřízeno v malém sibiřském městečku nazývaném Kolcovo, které se nachází v oblasti Novosibirska. Dalšími zařízeními byly Sergijev Posad (dříve Zagorsk), Kirov, Jekatěrinburg a Striži, které podléhaly přímo ministerstvu obrany.

V Březnu 1975 Konvence o biologických a toxických zbraních nabývá účinnosti.

R. 1978 bulharští agenti zavraždili Georgi Markova, bulharského novináře a spisovatele v Londýnské emigraci pomocí toxinu ricinu.

Během let 1978-1980 je dokončena eradikace (vymýcení) neštovic. Světová zdravotnická organizace oficiálně vyhlásila eradikaci v roce 1980. Pouze 2 laboratoře na světě by měly mít původce neštovic, a to Centrum pro kontrolu nemocí v Atlantě (USA) a právě Vektor v Kolcovu, kam byl převezen z Ivanovského institutu v Moskvě. Existují

však oprávněné obavy, že zařízení zabývající se biologickými zbraněmi mohou mít určité zásoby tohoto viru.

R. 1978-1980 v Zimbabwe se vyskytla přírodní epidemie antraxu, která postihla 6 000-10 000 osob a způsobila 100 úmrtí.

V dubnu až květnu 1979, ve Sverdlovsku došlo k nehodě, kdy antrax zahubil nejméně 68 osob. Podle nepotvrzených zdrojů však počty obětí mohly dosahovat stovek i tisíců. Speciální jenské zařízení ve Sverdlovsku (v anglosaských zemích známé pod krycím názvem Compound 19) bylo zřízeno k výrobě biologických zbraní, zejména na bázi antraxu. Ve skladech ho byly uloženy stovky tun. V důsledku nedbalosti personálu byl odstraněn filtr z filtroventilačního zařízení a nebyl nahrazen novým. Nová směna zahájila technologický proces a infekční materiál se dostal do zevního ovzduší. Odhadované množství uniklého antraxu se pohybovalo v řádu kilogramů. Pouze díky směru větru, který foukal směrem od města, neměla tato nehoda za následek desítky až stovky tisíc mrtvých. Uniklý původce antraxu patřil k běžným kmenům používaným do zbraňových systémů a byl citlivý na antibiotika. Ještě mnoho let po tragédii se sovětská propaganda snažila přesvědčit okolní svět, že šlo o alimentární epidemii způsobenou konzumací nevhodných potravin. Až v roce 1992 Boris Jelcin připustil, že tato epidemie byla výsledkem vojenských aktivit a ve své podstatě znamená porušení mezinárodních dohod.

R. 1980-1988 v iránsko-irácké válce používá Irák chemické zbraně a pracuje na vývoji biologických zbraní.

V r. 1984 Sovětský svaz vytváří tzv. supermor.

V letech 1985-1989 Ken Alibek (Kanatjan Alibekov) vytváří Alibekův antrax, válečně využitelný kmen.

R. 1988 Nikolaj Ustanov, 44letý výzkumník, se v laboratořích Vektor poranil při práci s virem Marburg, a vlastním životem tak zaplatil vývoj varianty U viru Marburg, jedné z nejúčinnějších biologických zbraní.

V roce 1989 Vladimir Pasečnik uprchl do Velké Británie a odkryl sovětský biologický program.

R. 1990-1991, v rámci války v Perském zálivu Irák připravuje biologické zbraně pro možné použití. K dispozici jsou rakety, bomby a tanky k aerosolovému použití s botulotoxinem, antraxem a aflatoxinem. Celkem bylo vyprodukováno 19 000 litrů koncentrovaného botulotoxinu, 8 500 litrů koncentrovaného antraxu a 2 200 litrů aflatoxinu.

Dne 11. dubna 1990 Spojené státy žádají, aby Sovětský svaz ukončil svůj ofenzivní biologický program. Gorbačov později „oficiálně“ program zrušil.

V letech 1990-1995 sekta Óm širikjó se snaží nastolit nový světový pořádek likvidací starého světa zbraněmi hromadného ničení. Sekta podnikla podle údajů svých členů nejméně 9 biologických útoků. Nejprve získali mikroorganismus *Clostridium botulinum* a snažili se ho namnožit ve svých laboratořích, aby získali jeden z nejedovatějších toxinů. V dubnu 1990 poslali konvoj 3 nákladních automobilů ulicemi středu Tokia, poté k americkým základnám v Jokohamě a v Jokosuce a nakonec k letišti. Všechny tyto lokality byly sprejovány tímto mikroorganismem. Tento útok však není spolehlivě prokázán. Rovněž je velice těžké nalézt v přírodě smrtící kmen původce botulismu. Následovně sekta vyzkoušela nového původce – antrax, který měla získat z místní univerzity a poté masivně produkovat ve vlastních 8patrových laboratořích ve východním Tokiu. V roce 1993 vypustili příslušníci sekty ze střechy těchto laboratoří mrak na obytnou část města. Opět nikdo nezemřel, ale ani neonemocněl. Vše bylo opakováno v červenci téhož roku. Obyvatelé v sousedství laboratoří si stěžovali na zvláštní zápach, ale nikdo neonemocněl. Také v červenci se sekta pokusila rozšířit antrax formou aerosolu za použití nákladního auta v centrálním Tokiu u vládních budov, opět bezvýsledně. Hlavní důvody, proč byli neúspěšní, se zdají být zřejmé. Použili vakcinační kmen antraxu, který není nebezpečný, a zároveň forma aerosolu nebyla optimální. Sekta se vrátila k botulotoxinu, ale opět bez úspěchu. Proto se definitivně obrací k chemickým zbraním.

V lednu 1991 američtí a britští experti přijíždějí na inspekci zařízení v rámci programu Biopreparát.

R. 1991 Ken Alibek opouští program Biopreparát a emigruje do USA. Alibek tvrdí, že ruský vojenský biologický program existuje i v roce 1991, tedy rok poté, co ho Michail Gorbačov nechal zastavit.

R. 1992 Boris Jelcin oficiálně ruší ruský útočný zbraňový program.

V roce 1992 ruské strážní jednotky se stáhly z Uzbekistánu a Kazachstánu. Zůstal tak zcela nechráněn ostrov Vozrožděnie. Tento malý ostrůvek uprostřed Aralského moře se nachází pouhých 600 mil od Afghánistánu a byl dlouhá léta místem testování sovětských biologických zbraní. Předpokládá se, že po ukončení pokusů před více než 10 lety zde byly pohřbeny kontejnery s takovým množstvím biologických zbraní, že by byly schopny vyhubit populaci celého světa několikrát. Toto místo je teoretickým potenciálním zdrojem pro teroristy hledající biologické zbraně, ale i tikající biologickou bombou budoucnosti. V rámci mezinárodního programu Spojené státy uvažují o dekontaminaci tohoto ostrova.

R. 1993 NATO vytváří pracovní skupiny ochrany proti biologickým zbraním.

V roce 1995 sekta Óm šinrikjó vypouští sarin v tokijském metru po řadě neúspěšných pokusů s biologickými původci.

R. 1995 Spojené státy obviňují Rusko z pokračování v jeho biologickém programu a napomáhání Íránu vytvořit program biologické války.

R. 1995 Irák připouští, že vyprodukoval 8 500 litrů koncentrovaného antraxu v rámci svého bojového biologického programu.

V roce 1996 inspektoři Speciální komise Spojených národů pro Irák (UNSCOM) ničí irácké biologické zbraně.

R. 1997 sovětsí vědci publikují detaily o geneticky změněném antraxu v renomovaném časopise Vaccine.

V březnu 1998 Spojené státy nařizují povinné očkování proti antraxu u svých vojenských jednotek. Kanada přijímá stejné opatření u svých vybraných zahraničních jednotek.

R. 1999 bylo Rusko kritizováno kvůli značným zásobám viru neštovic a existenci 4 vojenských laboratoří, které stále existují, aniž je umožněna jakákoliv inspekce či návštěva zemí okolního světa. **(Prymula, 2002)**

1.2 Události po 11. září 2001

V roce 2001, týden po teroristickém útoku na Pentagon a Světové obchodní centrum 11. září 2001 je doručen dopis obsahující spory antraxu do americké televizní stanice NBC. Zaslání tohoto dopisu je prvním z řady incidentů v zemi a spouštěčem celosvětové vlny spíše psychologického terorismu než reálného biologického nebezpečí. Do 21. října 2001 umírá na antrax pouze 1 osoba. **(Prymula, 2002)**

Ukazuje se, že zatímco získání biologických a chemických látek není nepřekonatelným problémem, přeměnit je v účinnou zbraň hromadného ničení prozatím zůstává mimo možnosti nestátních aktérů. Podobně je vyloučené, aby byl nestátní aktér schopen vyrobit jadernou zbraň. Zbývá krajně nepravděpodobná možnost získání zbraní od některého z tzv. banditských států, nebo pouze primitivní a omezeně účinná kombinace radiačního materiálu a konvenční trhavy (tzv. špinavá bomba). Jako nejúspěšnější užití zbraní hromadného ničení nestátním aktérem se proto doposud jeví kampaň dopisů rozesílaných v USA, které obsahují antrax. Tato akce byla inspirována zvýšenou pozorností věnovanou terorismu po 11. září a mají ji nejspíše na svědomí teroristé (či osamělý terorista) domácí, americké provenience, z řad extrémních protifederálních skupin. **(Šedivý, 2002)**

1.3 Bioterrorismus

Bioterrorismus není nic jiného než určitá forma užití biologických zbraní. **(Daneš, 2003)**

1.3.1 Cíle terorismu

Cílem mezinárodního terorismu je nejčastěji internacionalizace a publicita politických problémů. Pro mezinárodní terorismus jsou typické snahy nacionalisticky a nábožensko-fundamentalisticky zaměřených skupin o navázání vzájemných kontaktů se

stejně orientovanými silami v zahraničí a snahami o vytvoření internacionály terorismu. **(Juran, 2007)**

Ke konkrétním projevům patří pumové útoky na živé i neživé cíle, braní a zadržování rukojmí, únosy letadel, používání dopisových bomb, vraždy, vydírání a vyhrožování násilím. Živnou půdou bývá obvykle politická, náboženská, rasová nebo sociální diskriminace a také ideologické zneužití části obyvatelstva k boji o moc a vliv ve státě nebo v regionu. Typologie, která vychází z různých přístupů, rozděluje terorismus mj. na vnitřní a mezinárodní, nacionalistický, náboženský, nábožensko-etnický, krajně pravicový, levicový a kriminální. Za nejméně čitelný je považován tzv. terorismus psychotický, kdy duševně vyšinutému jedinci stačí, že jeho čin vyvolává pozornost a hrůzu, zpětně poskytující pocity zvráceného potěšení a uspokojení. **(BIS, 2007)**

Bohužel dochází často k násilí na objekty v zastoupení – na nevinných obětech, které většinou nemají žádný podíl na přípravě a provádění politiky. **(Lukášek, 1999)**

Rozhodně civilní panika a neschopnost institucionálních operací jsou pravděpodobně významnými cíly některého z bioteroristických útoků. **(Donaghy, 2006)**

1.3.2 Biologický útok a Botulotoxin

Biologické zbraně jsou druhem zbraní, které patří mezi zbraně hromadného ničení. Využívají škodlivých účinků biologických látek na lidský nebo jiný živý organismus. Skládají se z biologických látek a prostředků jejich dopravy na cíl. **(SÚJB, 2007)**

Botulotoxin je nejúčinnější známý jed. K usmrcení člověka stačí pouhých 0,1 µg – to znamená, že 1 g může zabít teoreticky až 10 000 lidí. Srovnajme tato čísla s americkými údaji, podle nichž měl Irák v roce 1991 v zásobě 19 000 litrů koncentrovaného botulotoxinu, z toho polovinu již připravenou do zbraní hromadného ničení. **(Navrátil, 2006)**

Botulotoxin se připravuje kultivací *Clostridia botulinum* na syntetických či polysyntetických půdách. Purifikací lze získat tento toxin ve formě bělavých jehličkovitých krystalů, představujících vysoce čistý produkt. Příprava velkých kvantit

botulotoxinu je sice nákladná, ale není obtížná. Proto patří tento toxin spolu se spory antraxu a původci moru a neštovic mezi agens, které by mohly být s větší pravděpodobností použity jako biozbraně. Teroristé mají více možností jak botulotoxin použít. Tou nejnebezpečnější by bylo použití neurotoxinu, chráněného látkami koloidálního charakteru, ve formě aerosolu s úmyslem vyvolat hromadnou intoxikaci obyvatelstva. O účinku a persistenci botulotoxinového aerosolu v místě jeho úmyslného rozptýlu rozhodují místní atmosférické podmínky a velikost aerosolových partikulí. Příliš malé partikule aerosolu vedou k značnému rozptýlu a snížení koncentrace pod účinnou mez. Zvýšená teplota a vlhkost ovzduší, UV záření a sluneční svit rychle degradují rozptýlený toxin. V závislosti na počasí dochází k jeho degradaci rychlostí přibližně od 1 do 4 % za minutu. K úplné inaktivaci botulotoxinu dochází obvykle do dvou dnů po jeho rozptýlu v ovzduší. Technicky obtížnější by bylo rozšířit dostatečné množství toxinu potravinou či vodou tak, aby došlo k závažné intoxikaci velkého počtu osob srovnatelné s použitím aerosolu. **(Ježek, 2002)**

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce je na základě zveřejněných dostupných informací poukázat na problematiku botulismu a botulinového toxinu, jako nástroje teroristů při možném teroristickém útoku, a současně zjistit míru informovanosti laické a odborné veřejnosti v této problematice.

V této práci se budu blíže zabývat bakterií *Clostridium botulinum* tak, aby si mohl každý čtenář vytvořit teoretický obraz toho, jak je tato bakterie důležitá v životě každého člověka.

Pro někoho může být botulotoxin příjemnou pomůckou v oblasti kosmetiky (zde je zájemce dostatečně poučen vybraným odborníkem), ale bohužel pro některé nebezpečným nástrojem zla, vzhledem k neustálému vývoji a zdokonalování biologických zbraní.

Nejpravděpodobnějším způsobem intoxikace je aerosol, nelze však vyloučit ani pokus o intoxikaci prostřednictvím kontaminované pitné vody nebo potravin. Jako každé použití toxinu i tento biologický toxin láká teroristy k použití především proto, že k vyvolání onemocnění a následné smrti stačí opravdu jen malá dávka. Léčba je sice možná, ale aktuálně by se našlo v jednom místě jen malé množství antitoxinu.

2.2 Hypotézy

H1: Odbornou veřejností je botulotoxin považován za jeden z nejpravděpodobnějších jedů, který by mohl být zneužit jako nástroj bioterorismu a jeho studiu je věnována velká pozornost.

H2: Laickou veřejností je botulotoxin vnímán spíše jako kosmetický prostředek k odstraňování vrásek v obličeji a o jeho teroristickém zneužití má jen málo informací.

3. METODIKA

3.1 Teoretická část

Práce je založena na teoretickém zpracování informací získaných z dostupné literatury, časopisů a internetu o *Clostridium botulinum*, o botulotoxinu jako nástroje možného bioterorismu, ale také jako vhodného nástroje v kosmetice. Na internetu jsem se pokusila nalézt informace a rady pro dostatečné poučení obyvatelstva o botulotoxinu jako jedu.

Pro zjištění informovanosti laické a odborné veřejnosti o botulotoxinu a bioterorismu jsem zvolila dotazníkový průzkum.

K vyhodnocení dotazníků jsem použila bodové hodnocení; body 1, $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$ a 0.

Pro interpretaci výsledků jsem vybrala metody: Elementární statistické zpracování, Neparametrické testování, Parametrické testování.

3.2 Praktická část

3.2.1. Elementární statistické zpracování

Výsledky měření je potřebné uspořádat, graficky vyjádřit a parametrizovat vhodnými empirickými parametry. Výsledkem elementárního statistického zpracování je empirický obraz zkoumaného výběrového statistického souboru VSS. Elementárním statistickým zpracováním je rovněž završena ta skupina hlavních statistických metod, kterou lze nazvat empirickou statistikou.

Dílní úkoly „uspořádání“, „grafického vyjádření“ a „parametrizace“ lze vystihnout třemi základními výsledky elementárního statistického zpracování – „tabulkou“, „empirickými rozděleními (v podobě polygonu)“ a „empirickými parametry“.

Tabulka představuje formu uspořádání výsledků měření, obsahuje pět sloupců. První čtyři sloupce jsou potřebné pro zpřehlednění výsledků měření a pro znázornění

empirických rozdělení. Zbývající pátý sloupec má pomocný význam a slouží k snadnému a rychlému výpočtu empirického parametru.

Sloupce obsahují:

1. sloupec označený x_i - prvky škály,
2. sloupec označený n_i - absolutní četnosti prvků škály,
3. sloupec označený n_i / n - relativní četnosti prvků škály,
4. sloupec označený $\Sigma (n_i / n)$ - kumulativní četnosti.
5. sloupec obsahuje součiny $x_i \cdot n_i$,

Tabulka je uzavřena součty údajů v jednotlivých sloupcích. V prvních čtyřech sloupcích mají tyto součty význam kontrolní, v pátém sloupci je součet potřebný pro výpočet empirického parametru.

Empirická rozdělení četností lze členit na dva základní druhy. První druh přiřazuje prvkům škály x_i odpovídající absolutní četnosti n_i nebo relativní četnosti n_i / n . Druhý druh přiřazuje prvkům škály x_i odpovídající kumulativní četnosti $\Sigma (n_i / n)$.

Zde je vhodné použít kvantitativní metrickou škálu, která umožňuje stanovit vzdálenost mezi dvěma sousedními jednotkami – z tohoto pohledu je nezbytné definovat jednotku škály (zde bodová hodnocení dotazníků). Prvky škály jsou jednotlivé body škály vyjádřené číselnými velikostmi. Kvantitativní metrická škála vyjadřuje hodnoty statistického znaku bez možnosti interpretovat počátek škály – volba počátku škály je proto libovolná.

Grafické vyjádření empirického rozdělení statistického souboru je spojeno s používáním souřadnicového systému v rovině. V tomto souřadnicovém systému jsou vždy na vodorovnou osu nanášeny prvky škály x_i , na svislou osu odpovídající četnost. Grafické vyjádření těchto funkčních závislostí je dáno množinou bodů, jejichž první souřadnicí je vždy prvek škály x_i , druhou souřadnicí je odpovídající absolutní četnost n_i . Spojením sousedních bodů této množiny úsečkami lze obdržet lomenou čáru, která je nazývána „polygon absolutních četností“.

Význam grafického vyjádření empirického rozdělení je značný. Grafické vyjádření umožňuje okamžité zkoumání, kterému teoretickému rozdělení se přibližuje empirické rozdělení, získané jako výsledek empirické statistiky.

Empirické parametry stručně a jednoduše vystihují povahu výběrového statistického souboru, patří sem obecný moment 1. řádu a centrální moment 2. řádu.

Pomocí obecného momentu 1. řádu lze výstižně charakterizovat parametr polohy (aritmetický průměr), pomocí centrálního momentu 2. řádu lze charakterizovat parametr proměnlivosti (empirický rozptyl).

Obecné vztahy pro obecné a centrální parametry:

Obecný moment r-tého řádu : $O_r(x) = \frac{1}{n} \sum n_i \cdot (x_i)^r$

Obecný moment 1. řádu: $O_1(x) = \bar{x}$ (aritmetický průměr)

Centrální moment r-tého řádu: $C_r(x) = \frac{1}{n} \sum n_i \cdot (x_i - \bar{x})^r$

Centrální moment 2. řádu: $C_2(x) = S_x^2$ (empirický rozptyl)

Směrodatná odchylka : $S_x = \sqrt{C_2(x)}$

(Záškodný, 2004)

3.2.2 *Neparametrické testování*

Pro potřeby neparametrického testování je užitečné rozdělit rozpětí prků metrické škály u zkoumaného statistického souboru na určitý počet intervalů. Do každého z vytvořených intervalů pak budou zahrnuty odpovídající prvky metrické škály.

Základem testování neparametrických hypotéz je používání aparátu nulových hypotéz H_0 a alternativních hypotéz H_a .

V případě neparametrických hypotéz nulová hypotéza předpokládá, že empirické rozdělení lze nahradit zamýšleným teoretickým rozdělením. Alternativní hypotéza pak předpokládá, že tato domněnka není správná. Podstatou testování neparametrických hypotéz je pak srovnávání teoretických a empirických absolutních četností.

Mezi nejpoužívanější statistická kritéria patří Studentovo rozdělení (t-test) a Pearsonovo χ^2 rozdělení (χ^2 – test) pro ověřování neparametrické hypotézy.

Po výběru statistického kritéria je zapotřebí přistoupit k určení experimentální hodnoty tohoto kritéria (χ^2_{exp}) a kritické teoretické hodnoty (χ^2_{teor}). Prostřednictvím kritické teoretické hodnoty bude zapsán tzv. kritický obor W příslušného statistického kritéria.

Bude-li experimentální hodnota vybraného kritéria prvkem kritického oboru W, je nezbytné přijmout alternativní hypotézu H_a – tzn. empirické rozdělení nelze nahradit zamýšleným rozdělením teoretickým. V opačném případě, kdy experimentální hodnota nebude prvkem kritického oboru W, lze přijmout nulovou hypotézu H_0 – tzn. empirické rozdělení lze nahradit zamýšleným rozdělením teoretickým.

Nezbytným prvkem testování neparametrických i parametrických hypotéz je stanovení hladiny významnosti α . Tato hladina významnosti udává pravděpodobnost chybného zamítnutí testované hypotézy. Nejčastějšími hladinami významnosti jsou hodnoty $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$. Např. hladina významnosti 0,05 umožňuje např. při příznivém testu normality (tj. je přijata hypotéza H_0 o možnosti nahradit empirické rozdělení normálním a zamítnuta hypotéza H_a) učinit závěr, že bude-li 100krát vybrán výběrový statistický soubor VSS ze základního statistického souboru ZSS, v 95 případech se ukáže, že empirické rozdělení lze nahradit rozdělením normálním.

Potřebné vztahy pro χ^2_{exp} , pravděpodobnosti p_i a normované hodnoty u_i jsou uvedeny s použitím operátoru \wedge pro konjunkci dílčích výroků v následujícím tvaru:

$$\chi^2_{\text{exp}} = \sum \frac{(n_i - np_i)^2}{np_i} \wedge p_i = \Phi(u_i) - \Phi(u_{i-1}) \wedge u_i = \frac{x_i - \mu}{\sigma}$$

Řecké písmeno Φ označuje Laplaceovu funkci závisící na normované náhodné veličině u_i (u_i je normovaná hodnota odrážející horní mez x_i příslušného intervalu intervalového rozdělení četností). Pravděpodobnosti p_i jsou rozdílem příslušných hodnot Laplaceovy funkce, součiny $n \cdot p_i$ pak vyjadřují teoretické absolutní četnosti, hodnoty n_i označují empirické absolutní četnosti. **(Záškodný, 2004)**

3.2.3 Parametrické testování

Testování parametrických hypotéz opět vychází z aparátu nulové hypotézy H_0 a alternativní hypotézy H_a . Tento aparát je doplněn obvyklým aparátem kritického oboru W .

Parametrické testování lze rozčlenit na jednovýběrové testování hypotézy o střední hodnotě nebo o rozptylu (pak jsou používány jednovýběrové testy u-test a t-test pro střední hodnotu a jednovýběrový χ^2 – test pro rozptyl) a na dvojbvýběrové testování hypotézy o rovnosti středních hodnot nebo rozptylů (pak jsou používány dvojbvýběrové testy u-test a t-test pro rovnost středních hodnot a dvojbvýběrový F-test pro rovnost rozptylů).

V případě dvojbvýběrového testování, které v této práci použiji lze hypotézu H_0 a H_a formulovat ve tvaru:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 \text{ nebo } H_0: \sigma_1 = \sigma_2, \quad H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \text{ nebo } H_a: \sigma_1 \neq \sigma_2.$$

Dvojbvýběrový t-test:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{(n_1 - 1)Sx^2 + (n_2 - 1)Sy^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$$W = (-\infty, -t_{n_1+n_2-2}(\alpha/2)) \cup (t_{n_1+n_2-2}(\alpha/2), \infty)$$

Dvojbvýběrové parametrické testování vychází ze srovnávání empirického parametru μ_1 nebo empirického parametru σ_1 (těmito symboly jsou označeny výsledky elementárního statistického zpracování výběrového statistického souboru VSS_1 , jejichž prostřednictvím byly odhadnuty příslušné teoretické parametry μ_1, σ_1 odpovídajícího normálního rozdělení s nějakými vnějšími teoretickými údaji μ_2, σ_2 , jejichž původ lze obvykle nalézt ve výsledcích zkoumání jiného výběrového statistického souboru VSS_2).

Dvojbvýběrové parametrické testování pak z pohledu matematické statistiky odpovídá na otázku, zda oba výběrové statistické soubory VSS_1 a VSS_2 zkoumaly

obdobnou otázku a zda tyto soubory mohly spolupracovat. Při potvrzení hypotézy H_0 lze na výběrové soubory VSS_1 a VSS_2 pohlížet jako na výběrové soubory vybrané z téhož základního souboru ZSS . Při přijetí hypotézy H_a je nutno z pohledu matematické statistiky vyslovit pochybnosti o kompatibilitě souborů VSS_1 a VSS_2 .

Postup při parametrickém testování je obdobný jako při testování neparametrickém. Nejdříve je potřebné naformulovat nulovou a alternativní hypotézu a zvolit hladinu významnosti α . Pak je potřebné vybrat vhodné statistické kritérium (u-test, t-test, χ^2 – test, F-test), nalézt jeho kritickou hodnotu a zapsat odpovídající kritický obor W . Posléze je zapotřebí přikročit k výpočtu empirické hodnoty statistického kritéria a zjistit, zda je či není prvkem kritického oboru W . Je-li empirická hodnota prvkem kritického oboru W , je zapotřebí přijmout alternativní hypotézu H_a , v opačném případě pak přijmout nulovou hypotézu H_0 . **(Záškodný, 2004)**

4. VÝSLEDKY

4.1 *Clostridium botulinum*

4.1.1 *Původce botulotoxinu*

Původcem botulotoxinu je sporulující, grampozitivní anaerobní mikroorganismus *Clostridium botulinum*. Vegetativní formy *C. botulinum* jsou málo odolné, jsou inaktivovány teplotou 80 °C do 15 minut. Spory některých kmenů naopak vydrží několikahodinový var a jsou rezistentní na ozáření. Botulotoxin se vytváří za anaerobních podmínek (v konzervách, ve střevě, v ráně), při 37 °C už za 18 hodin. Lze jej získat v krystalické formě. Botulotoxin je tepelně labilní, je inaktivován varem v několika sekundách, teplotou 80 °C po 6 minutách. Trávicí fermenty botulotoxin neporušují. Botulotoxin se vyskytuje v 7 odlišných antigenních typech: A, B, C, D, E, F a G, které neprojevují kříženou neutralizaci. Typ C se vyskytuje ve dvou variantách: C α a C β . Jednotlivé typy toxinu slouží jako vhodný epidemiologický markr. (Ježek, 2002) Nejčastěji je lidský botulismus způsoben typy A, B a E. (Hrdina, 1991) Botulotoxin A a B se liší pouze membránovými receptory a cílovým cytoplasmatickým proteinem. Dlouhý řetězec toxinové molekuly má terminal C, který realizuje membránové spojení a translokaci toxinu do buňky. (Barták, 2007) Celkem vzácně se uplatňuje typ F. Typy C a D postihují husy, kachny, skot, ovce a koně, typ E ryby. Toxin typu G byl izolován z bakterií v r. 1969 a dosud není znám makroorganismus, jež by postihoval. Mimo *C. botulinum* produkují botulotoxin i kmeny *Clostridium baratii* a *Clostridium butyricum*. Letální dávka botulotoxinu pro člověka (70 kg) není přesně známa, ale odhaduje se na 0,1 mikrogramu při intravenózní aplikaci, na 0,7 mikrogramu inhalační cestou a 70 mikrogramů při podání per os. Tato fatální dávka je extrémně malá a člověka může usmrtit pouhé ochutnání kontaminované stravy. (Ježek, 2002)

V roce 1896 belgický badatel van Ermengem odhalil tuto přísně anaerobní bakterii jako původce otravy 34 účastníků hostiny Hudebního pohřebního spolku ve vsi

Ellenzells po požití syrové šunky. Pro tři z nich končila tato oslava smrtí. **(Votava, 2003)**

4.1.2 Epidemiologie

Clostridium botulinum se vyskytuje jako půdní saprofyt. Jeho spory ulpívají na zelenině, ovoci, seně i slámě. Spory se vyskytují rovněž v bahně a sedimentu jezer, řek, moří, ale i nádrží a vodních rezervoárů. Vyskytují se i ve střevním traktu některých zvířat a ryb. Botulotoxin působí klinicky zjevná onemocnění u ptáků a zvířat a většinou inaparentní nákazy u ryb. U lidí, v přirozených podmínkách vyvolává sporadická i hromadná závažná a často fatální onemocnění především formou intoxikace botulotoxinem.

Tyto otravy vznikají nejčastěji po požití neprovařených či nedostatečně prohřátých potravin, obvykle šunky, klobás, v domácnostech připravovaných mastných pokrmů, paštik a pomazánek. Tradičně velmi nebezpečné mohou být i zeleninové konzervy (hrášek, mrkev, nakládané cibulky, česnek, papričky, kukuřice a houby). **(Ježek, 2002)** Zelenina, zvláště konzervovaná, je prakticky vždy kontaminovaná spory klostridií a zatímco při nízkém pH se toxin vůbec nevytvoří, tak nálevy jen lehce nakyslé toxin stabilizují. **(Ondrovčík, 2000)**

Novodobě epidemie vznikají v restauracích z brambor pečených ve folii či z kontaminovaného bramborového salátu ponechaného po přípravě v pokojové teplotě. Menší epidemie může způsobit i kontaminovaný jogurt, sýry a ryby.

Dosud nebyl popsán přenos botulotoxinu vodou. I když toxicita botulotoxinu vede k spekulacím, že by mohl být použit teroristy ke kontaminaci vody, jsou otravy prostřednictvím kontaminovaného vodovodního řádu dosti nepravděpodobné. **(Ježek, 2002)**. Kvůli jeho zředění a inaktivaci normálními procesy pro úpravu pitné vody je nepravděpodobné, že by kontaminace zdrojů pitné vody botulotoxinem byla účinná. **(Alastair, 2003)**. Botulotoxin je totiž rychle inaktivován standardně prováděnou úpravou pitné vody (chlorování, aerace). Navíc pomalé proudění a výměna obsahu velkokapacitních rezervoárů by vyžadovalo velké dávky inokula toxinu. Na rozdíl od

hygienicky ošetřené vody zůstává botulotoxin po několik dní stabilní v nechlorované vodě, případně v nápojích. Pokud by došlo k přenosu botulotoxinu potravinou či vodou, bylo by nutno odlišit teroristický útok od přirozených zdrojů kontaminace.

Mimo alimentární cestu může být vstupní branou pro botulotoxin i spojivková klenba a respirační trakt. Při aerosolizaci botulinového toxinu v pokusných laboratořích či při bioteroristickém útoku může dojít k inhalaci botulotoxinu a vzniku inhalačního botulismu. Tato forma přenosu je dosud studovaná na experimentálně nakažených zvířatech. Vzácně může postihnout i člověka. V Německu r. 1960 onemocněli inhalačním botulismem tři veterináři, kteří byli vystaveni reaerosolizovanému toxinu při manipulaci s králíky a morčaty, jejichž srst byla pokryta aerosolem botulotoxinu typu A. Vnímavost k otravě botulotoxinem je všeobecná: bez závislosti na věku, pohlaví a etnicitě skupiny. Botulismus a botulotoxin nejsou nakažlivé a i když lze toxin detekovat ve stolici postižených osob, nebyl dosud dokumentován případ sekundárního interhumánního přenosu. **(Ježek, 2002)**

4.1.3 Patogeneze a klinický obraz

U lidí v přirozených podmínkách se vyskytuje otrava botulotoxinem (botulismus) ve třech základních formách: alimentární, intestinální a kožní (raná). Při aerosolizaci botulinového toxinu může dojít k inhalaci toxinu a vzniku čtvrté formy intoxikace, tj. k inhalačnímu botulismu. Všechny tyto formy jsou výsledkem absorpce botulotoxinu do krevního oběhu ať již mukózní sliznicí (střevo, plic) nebo kožní ranou. Alimentární formu působí pouze otrava samotným botulotoxinem. Intestinální formu vyvolává infekce *C. botulinum* a následně otrava toxinem. Vzácně se objevuje i u kojenců (floppy child syndrom) **(Ježek, 2002)** vznikající po požití spor obsažených často v medu a po následné produkci toxinů ve střevě dětí. **(Göpfertová, 2002)**

Ke kožní, rané formě dochází při průniku *C. botulinum* zraněnou kůží, jeho pomnožením v anaerobním prostředí devitalizované tkáně s následnou otravou botulotoxinem. Botulotoxin však intaktní kůží neproniká. Jakmile dojde k absorpci botulotoxinu, roznese se toxin krevním oběhem do periferních neuromuskulárních

synapsí, kde dochází na terminální membráně motorického nervu k jeho ireverzibilní vazbě na proteiny a tím k blokování uvolňování neurotransmiteru acetylcholinu. Bez uvolněného acetylcholinu nejsou svalová vlákna schopná kontrakce.

Botulismus je akutní, bezhorečnaté onemocnění s descendentní chabou paralýzou. Klinické příznaky a symptomy jsou stejné bez ohledu na typ botulotoxinu. Rozsah a rychlost nástupu paralýz a celková tíže onemocnění závisí na množství botulotoxinu, jež se absorboval do krevního oběhu. I délka latentní doby závisí na množství absorbovaného toxinu. Při přenosu botulotoxinu potravinou se doba latence pohybuje v širokých hranicích od 2 hodin do 8 dnů po požití toxinu. Obvykle se však prvotní příznaky objevují od 12 do 72 hodin po požití kontaminované potravy. Čím je doba latence kratší, tím je onemocnění těžší. Latentní doba inhalačního botulismu zůstává dosud neznámá. Experimenty na malých souborech opic prokazují, že k prvotním klinickým příznakům dochází od 12 do 72 hodin po expozici toxickému aerosolu. U třech veterinárních pracovníků onemocnělých inhalačním botulismem v Německu v r. 1960 se objevily prvotní klinické příznaky 72 hodin po expozici neznámému množství reaerosolizovaného botulotoxinu typu A. **(Ježek, 2002)**

Toxicita botulotoxinů je neobyčejně vysoká, botulotoxin A je 15 000-100 000krát toxičtější než sarin. Smrtící dávka pro člověka je asi 1 µg. Mechanismus toxického účinku spočívá ve vazbě toxinu na nervosvalovou ploténku, kde inhibuje uvolňování acetylcholinu a blokuje tak nervosvalový přenos. **(Patočka, 2004)**

Všechny formy botulismu mají stejné akutní neurologické příznaky dané intoxikací nervového systému: liší se však přítomností gastrointestinálních symptomů. Ty se objevují na počátku onemocnění v podobě nauzey, zvracení a bolestí v břiše. Základní neurologické příznaky charakterizuje klasická triáda: 1) symetrické sestupné paralýzy s prominentním bulbárním ochrnutím, 2) afebrilita a 3) nezkalené vědomí a vnímání. Postupné bulbární ochrnutí charakterizují: diplopie, dysfagie, dysfonie a dysarthrie. Afebrilnímu nemocnému se nejprve kalí zrak, při pohledu na stranu vidí dvojité, šilhá, má pokleslá víčka, mydriatické, nereagující zornice. Vyvíjí se paréza jazyka, měkkého patra, vážne polykání a hlas. Pacient má žízeň a sucho v ústech. Pokračuje sestupná symetrická ztráta hybnosti: periferní svalovina je oslabena a reflexy šlachové snižené.

Smrt nastává srdečním selháním nebo selháním dýchacích svalů, mnohdy již ve 12-24 hodinách. U lehčích případů dochází po 7-10 dnech ke zlepšení stavu, u těžších případů se může rekonvalescence protáhnout na 2-3 měsíce. **(Ježek, 2002)**

4.1.4 Klinické příznaky intoxikace

V rámci prvotních obranných opatření bude nutno v místě předpokládaného rozptýlu aerosolu či jiného použití botulotoxinu okamžitě aktivně vyhledávat všechny osoby s příznaky diplopie, dysfagie, dysfonie, dysarthrie a pokračujících paréz a zajistit jejich okamžitou léčbu ve zdravotnickém zařízení. Vzhledem k omezeným zásobám botulinového antitoxinu a k pravděpodobně většímu počtu exponovaných osob, nebude možno chránit každého dosud zdravého jedince vystaveného botulotoxinu profylaktickou aplikací koňského botulinového antitoxinu nebo specifickým lidským hyperimunním globulinem. V postižené oblasti je však nutno bezodkladně zavést režim denní medicínské kontroly zdravotního stavu všech pravděpodobně exponovaných, dosud symptomatických osob a jejich okamžitou léčbu antitoxinem při objevení se prvotních příznaků botulinové intoxikace. Post-expoziční vakcinace botulinovým toxoidem je z hlediska bioobrany bezpředmětná, protože postvakcinační imunita se vytváří až po několika měsících. **(Ježek, 2002)**

4.1.5 Diagnóza a diferenciatní diagnostika

Včasné rozpoznání botulismu rozhoduje často o životě postižených. Diagnostika botulismu nečiní větší potíže při hromadném postižení osob s příznaky diplopie, dysfagie, dysfonie a dysarthrie, které se objeví v rodinách nebo skupinách osob zúčastněných na společném jídle. Diagnostika je podstatně obtížnější v ojedinělých případech, kdy se vzhledem k afebrilii a absenci gastrointestinálních příznaků nemyslí na otravu, ale na samostatné cerebrovaskulární postižení např. subarachnoidální hemoragii. V diferenciatní diagnostice bývá botulismus zaměňován za intoxikace

organofosfáty, polyradikuloneuropatii Guillan-Barré, myasthenii gravis, či paralýzy virového původu.

Klinickou diagnózu botulismu lze potvrdit speciálním laboratorním vyšetřením, jehož provedení si vyžaduje několik dní. Každé podezření z botulismu nutno pokládat za potenciální zdravotnické nebezpečí vyžadující okamžitou intervenci orgánů veřejné zdravotnické služby. **(Ježek, 2002)**

Diagnostika (konfirmační) pochází z testů na myších, kde je toxin v krvi nebo stolici neutralizován vhodným antisérem. Provádí se zde intraperitoneální aplikace do podezřelé krve, séra a žaludečního obsahu myši. **(Patočka, 2005)**

4.1.5.1 Laboratorní diagnostika

Obvyklá laboratorní diagnostika botulismu je založena na detekci botulinového neurotoxinu na nemocničním pacientovi. **(Lindström, 2006)**

Odběr vzorků a jejich zaslání je nutno předem domluvit s příslušnou laboratoří. Na laboratorní vyšetření se posílá sérum nebo 15-30 ml krve, kterou je nutno odebrat ještě před aplikací antitoxinu. Odebírají se rovněž vzorky zvratků, stolice a žaludečních šťáv, které mohou být důležité i při inhalační formě botulismu. Dále se odebírají a zasílají vzorky podezřelých potravin. Všechny odebrané vzorky včetně séra nutno uchovat do odeslání v chladu. **(Ježek, 2002)**

Vlastní průkaz toxinu se děje formou neutralizačního testu na myších, kdy polovina zvířat je chráněna antisérem (BOSEA). Nechráněné myši v pozitivním případě hynou v průběhu 1 – 3 dní za příznaků celkové chabé obrny. **(Votava, 2000)**

Průkaz *Clostridium botulinum* ve vyšetřovaném materiálu tradičně vychází z kultivačních pokusů v různých obohacených či selektivních médiích. Zpravidla se materiál (krev, stolice, poživatina) nejprve inokuluje do pomnožovacího obohaceného média (např. glukózového bujónu s pomletým masem), z něhož se zakládají subkultury na selektivním žloutkovém agaru, což umožňuje detekci tvorby lipázy u *Clostridium botulinum*, typ A-G. Pozitivní test produkce lipázy na žloutkovém agaru je standardní

skriningová metoda k zachycení *Clostridium botulinum* ze smíšených kultur. (NRL, 2006)

4.1.5.2 Morfologie

Tyčinky *C. botulinum* mají typický klostridiový charakter, jsou G⁺, rovné, pohyblivé, šířky něco přes 1 mikrometr a délky kolem 10 i více mikrometrů. Tenčí, mírně zahnuté tyčinky má typ A, robustními tyčinkami šíře až 1 μm se vyznačují typy E a G. Spory jsou oválné, subterminální a tyčinku vydouvají. Jsou středně termorezistentní, ale některé mohou přežít i několika hodinový var. Pouze rezistence spor typu E k teplu, k záření i vysokému pH prostředí je výrazně nižší.

Podle glykoproteinového antigenu stěny tyčinek se pomocí IF reakce dají botulinové klostridie rozdělit do skupin. Proteolytické typy tvoří společnou skupinu, v jejímž rámci jednotlivé typy touto reakcí nelze rozlišit. Totéž platí o sacharolytických typech. Z nich se však vyděluje typ E jako samostatný. (Krměčık , 2006)

4.1.5.3 Fyziologické vlastnosti

Na krevním agaru pro anaeroby *C. botulinum* tvoří kruhové, bělavé, necharakteristické kolonie obklopené u všech typů zónou úplné hemolýzy. Sacharolytické typy štěpí omezený počet sacharidů, přitom pH půdy klesá jen mírně. Všechny typy až na typ G produkují lipázu. Proteolytické typy, k nimž patří také typ G, hydrolyzují želatinu a natravují masové částičky vložené do tekuté půdy. (Krměčık, 2006)

4.1.6 Terapie

Soudobá terapie se skládá z léčby koňským antitoxinem a podpůrné terapie. Včasné nasazení botulinového antitoxinu minimalizuje následné poškození nervových buněk, ale nemůže ovlivnit již existující paralýzy. Proto je nutno co možno nejdříve

aplikovat antitoxin pacientům, u nichž jsou zjištěny neurologické příznaky botulismu a nečekat na výsledky laboratorního testování. **(Ježek, 2002)** V případě, že neznáme antigenní typ toxinu, odpovědného za onemocnění, podáváme co nejdříve 80 000 j. polyvalentního antitoxinu i. v. **(Přecechtěl, 1988)**

K současné léčbě antitoxinem se používá trivalentní botulinový antitoxin, obsahující neutralizační protilátky proti botulotoxinu typu A, B a E, které se nejčastěji uplatňují v lidských otravách. **(Bossi, 2007)** Antitoxin nutno aplikovat podle návodu výrobce. V minulosti se aplikovala dávka 30-50 ml po 2 až 5 dní. Aplikace komerčně připravovaných antitoxinů v koňském séru může způsobit u recipientů řadu vedlejších účinků a komplikací. V současnosti je komplikací méně, protože lze aplikovat pouze jedinou dávku obsaženou v 10 ml ampulce, rozředěnou 1:10 fyziologickým roztokem v pomalé intravenózní infuzi. Tato jediná dávka obvykle obsahuje množství typově specifických neutralizačních protilátek, které mnohokrát překračuje hladinu toxinu v krvi postižené osoby. Proto není nutno aplikaci séra opakovat.

Pacienti trpící botulismem vyžadují intenzivní podpůrnou léčbu a péči. V jednotlivých epidemiích alimentárního a intestinálního botulismu se pohyboval počet postižených vyžadujících ventilační podporu od 20 do 60 %. Antibiotika nemají přímý účinek na botulotoxin. Případné doprovodné sekundární infekce si vyžadají aplikace antibiotik. Antibiotika řady aminoglykosidů a klindamycin jsou kontraindikovány pro jejich schopnost podstatně zhoršit neuromuskulární blokádu. **(Ježek, 2002)**

Antitoxin, vakcína, a F(ab')₂ imunní fragment jsou diskutovány jako přídavky k podpůrné terapii. **(Horowitz, 2005)**

4.1.6.1 Hospitalizace

Úkolem hospitalizace je zajištění léčby botulinovým antitoxinem, podpůrné terapie a dlouhodobé péče. Onemocnělé není nutno izolovat, protože botulismus, včetně jeho inhalační formy, není nakažlivý. Přesto zdravotnický personál, který pečuje o postižené pacienty, by se měl chránit standardním postupem. V současnosti je k léčbě používán trivalentní botulinový antitoxin, obsahující neutralizační protilátky proti botulotoxinu

typu A, B a E. Pokusy na zvířatech prokázaly jeho účinnost i proti inhalační formě botulismu. Pokud by při bioútoku došlo k použití jiných typů toxinů než obvyklých A, B a E, byla by aplikace trivalentního antitoxinu neúčinná. Heptavalentní antitoxin, obsahující neutralizační protilátky proti botulotoxinům typu A, B, C, D, E, F, G, který mají k dispozici pouze některé armády (např. US Army), není v současné době dostupný pro civilní použití.

Asi u 10 % recipientů koňského antitoxinu se objevují vedlejší účinky a komplikace. Nejčastější je sice urtikárie, ale objevuje se i sérová nemoc. Do 10 minut po aplikaci antitoxinu se může též vyvinout anafylaktický šok. Proto je nutno před aplikací celé dávky pátrat po možné hypersensitivitě postiženého. Pokud reaguje na malé (tzv. „challenge“) dávky koňského antitoxinu dermálním pupencem či zarudnutím je nutno provést postupnou desensibilizaci. V průběhu infuze nutno mít po ruce adrenalin. V současnosti je rovněž těžko dostupný lidský antitoxinní hyperimunní globulin, který by bylo možno použít v intravenózní aplikaci pacientům v riziku alergických reakcí.

Pacienti postižení botulismem vyžadují intenzivní podpůrnou péči, kterou bude řídit intenzivista nebo anesteziolog podle zásad péče o nemocné s dechovou nedostatečností. Při hromadném útoku by mohl vzniknout nedostatek technických pomůcek, zvláště ventilátorů, i odborně vycvičeného personálu. V takovém případě lze podle Amona et al nouzově použít uložení do obrácené Trendelenburgovy polohy (20-25°) s podloženou krční páteří, což ulehčí dýchání a omezí zatékání sekretů do dýchacích cest. Je-li třeba užít antibiotik, vyhnout se aminoglikosidům a linkosamidům.

Protože botulismus se nemůže šířit interhumánním přenosem, není nutno profylakticky chránit osoby (kontakty), které žily v těsném či intimním styku s pacientem do doby jeho hospitalizace. **(Ježek, 2002)**

4.1.6.2 Protiepidemická opatření

Základním preventivním opatřením je kontrola a správná úprava surovin k přípravě stravy tak, aby se zamezilo kontaminaci potravin sporymi původce. Je nutné dodržovat

standardní opatření u zdravotnických pracovníků ošetřujících nemocné. Choroba není přenosná z člověka na člověka. K dekontaminaci postačí voda, detergent nebo neředěný Jodonal B. K plošné dezinfekci Chloramin B v 3 % roztoku po dobu 30 minut. **(Ježek, 2002)**

4.1.7 Profylaxe a prevence

Zdravé osoby, vystavené botulotoxinu, lze chránit před onemocněním aplikací koňského botulinového antitoxinu nebo specifickým lidským hyperimunním globulinem. Použití antitoxinu je limitováno jeho nedostatkem a reaktivitou. V minulosti při výskytu ojedinělých případů či menších epidemií bylo exponovaným symptomatickým osobám aplikováno 20-40 ml koňského antitoxinového séra. V současnosti se více uplatňuje režim denní lékařské kontroly zdravotního stavu exponovaných osob a jejich okamžitá léčba antitoxinem při objevení se prvotních příznaků botulinové otravy.

K prevenci osob, jež se nacházejí ve vysokém riziku expozice botulotoxinu, se používá multivalentní botulinový toxoid. V průběhu posledních 30 let byl tento toxoid aplikován několika tisícům laboratorních pracovníků. V USA se používá „pentavalentní (ABCDE) botulinový toxoid“ k ochraně vybraných vojenských jednotek. Není však určen k masovému použití v běžné populaci. Po aplikaci botulinového toxoidu se imunita vytváří až po několika měsících. Proto toxoid není vhodný pro post-expoziční profylaxi. V současnosti probíhá výzkum a vývoj účinnější rekombinantní vakcíny. **(Ježek, 2002)**. Účinná vakcína proti působení toxinu není v České republice registrována, avšak některé z antitoxinů používajících se k léčbě pro použití u nás registrovány jsou. **(Prymula, 2002)**

4.1.8 Detekce

Protože bioteroristé neinformují předem o svých aktivitách, lze předpokládat, že jejich útok by proběhl zcela utajeně. Je málo pravděpodobné, že by se podařilo

detekovat rozptyl toxického aerosolu v ovzduší v okamžiku teroristické akce. Použití biologických integrovaných detekčních systémů (BIDS), sloužících k detekci botulotoxinu pomocí enzymového imunisorbčního testu či biologických sensorů (BS), využívajících polymerázovou řetězovou reakci, které mohou detekovat toxin do 30 respektive 15 minut, je dosud krajně omezeno. Proto prvním průkazem utajeného rozptylu botulotoxinu by byl s největší pravděpodobností až větší počet afebrilních osob v ordinacích lékařů s akutními příznaky diplopie, dysfagie, dysfonie a dysarthrie a s pokračujícími chabými parézami, z nichž část by zemřela v průběhu prvních dvou dnů na srdeční selhání či selháním respiračního svalstva.

Včasná klinická diagnóza je základem pro rychlá ochranná opatření. Každé podezření z botulismu je nutno dnes pokládat za potenciální zdravotnické nebezpečí ať již pro možnost, že přirozeně kontaminovaná potrava zůstává v oběhu a může být požitá dalšími osobami, nebo že botulotoxin mohl být úmyslně rozšířen. V obou případech je nutná okamžitá intervence orgánů zdravotnické služby, aby se zabránilo dalším případům. V každém případě je nutno jakékoliv podezření z botulismu okamžitě telefonicky hlásit hygienické službě, která zajistí dodávku terapeutického antitoxinu, laboratorní diagnostiku a epidemiologické vyšetřování. S hlášením nelze čekat do výsledků laboratorních testů.

Laboratorní diagnostika, vzhledem k času potřebnému k zaslání a vyšetření vzorků odebraných materiálů, poslouží až k verifikaci klinické diagnózy, případně patologického nálezu. (Ježek, 2002)

4.1.9 Botulotoxin jako lék v současné medicíně a kosmetice

4.1.9.1 Současná medicína

Velmi široké je využití botulotoxinu v neurologii, např. u krční dystonie, hemifaciálních spasmů, blefarospasmu, Meigeho syndromu apod. Velmi úspěšná je aplikace botulotoxinů při bolestech, např. hlavy či zad. Pokud se potvrdí léčebný účinek

u bolestí zad, mohl by se stát botulotoxin lékem volby pro tuto novodobou civilizační chorobu.

Terapie botulotoxinem je úspěšná u celé řady spastických bolestí vyvolaných např. špatným držením těla, u fibromyalgií, u bolestí kloubů, u bolestí hlavy vyvolaných chronickou tenzí hlavového svalstva apod. **(Patočka, 2005)**

Nicméně botulinové neurotoxiny jsou Centry pro kontrolu onemocnění a prevenci klasifikovány jako jedny z šesti nejrizikovějších hrozeb bioterorismu. **(Dickerson, 2007)**

4.1.9.2 Botulotoxinové injekce

Když se Botulinum toxin typu A (známý pod obchodními názvy DYSPORT, BOTOX) vstříkne do určité oblasti, tak oboustranně zablokuje impulsy z nervů k malým obličejovým svalům, které jsou vázány na mimické čáry. Díky tomu se svaly nemohou stahovat a navíc mají tendenci se uvolnit. Když jsou svaly uvolněné, překrývající kůže zůstane hladká a bez vrásek, zatímco nezasažené obličejové svaly se kontrahují normálně a běžná obličejová mimika mimo ošetřené oblasti není zasažena.

(Lucák, 2007)

Speciální sérum proti vráskám, obsahuje látky na bázi peptidů (uvolňují svalová vlákna) dokonce zabraňuje vzniku vrásek při jeho preventivním použití. Je vhodné jak pro ženy, tak pro muže. **(Vocilková, 2007)**

4.2 Poučenost o botulotoxinu

V oblasti poučenosti o vlastnostech botulotoxinu jako jedu z veřejných informačních internetových portálů zaměřených na ochranu obyvatelstva podle výsledků mého hledání nemůže být obyvatelstvo dostatečně informováno, lze nalézt pouze rady, jak se chovat při nálezů nebezpečné látky (biologické, chemické), na jaký úřad se obrátit, definice těchto látek, i jejich seznam, není uveřejněn žádný průzkum informovanosti obyvatelstva na toto téma. Co zde chybí, jsou konkrétní informace o vlastnostech každé látky, čím mohou být v případě zneužití člověku nebezpečné.

4.3 Provedení praktického výzkumu

4.3.1 Předvýzkum

Dotazníkový průzkum byl proveden u dvou skupin obyvatel: u laické veřejnosti a u odborné veřejnosti reprezentované členy integrovaného záchranného systému v Českých Budějovicích. Bylo zjišťováno jaká je informovanost obyvatelstva o botulotoxinu a bioterorismu obecně. Obyvatelé všem otázkám rozuměli a na základě své poučenosti jej vyplnili.

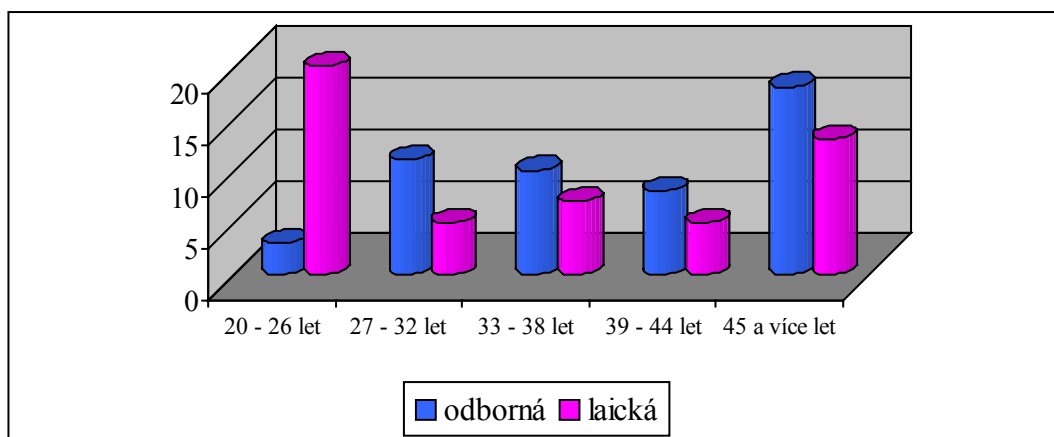
4.3.2 Výsledky dotazníkového šetření

Hodnocení dotazníků je provedeno ve dvou okruzích. První okruh se týká identifikačních údajů, druhý okruh obecné informovanosti.

K vyhodnocení dotazníků jsem použila bodové hodnocení; body 1, $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$ a 0.

Hodnocení okruhu I (Identifikační údaje):

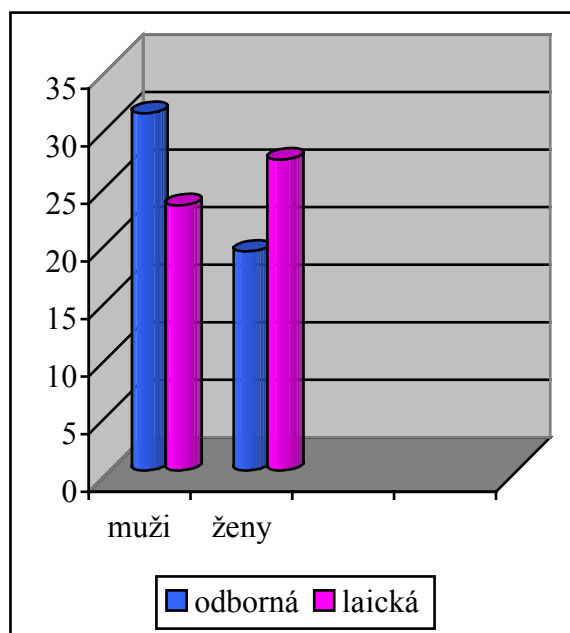
Graf 1: Věk obyvatelstva



zdroj: vlastní výzkum

Na otázku 1, týkající se věku obyvatelstva uvedlo u odborné veřejnosti 3 (6%) věk od 20 do 26 let včetně, 11 obyvatel (22%) uvedlo věk od 27 do 32 let včetně, 10 obyvatel (20%) uvedlo věk od 33 do 38 let včetně, 8 obyvatel (16%) uvedlo věk od 39 do 44 let včetně a 18 obyvatel (36%) je starší 45 let. U laické veřejnosti uvedlo 20 obyvatel (40%) věk od 20 do 26 let včetně, 5 obyvatel (10%) uvedlo věk od 27 do 32 let včetně, 7 obyvatel (14%) uvedlo věk od 33 do 38 let včetně, 5 obyvatel (10%) uvedlo věk od 39 do 44 let včetně a 13 obyvatel (26%) je starší 45 let.

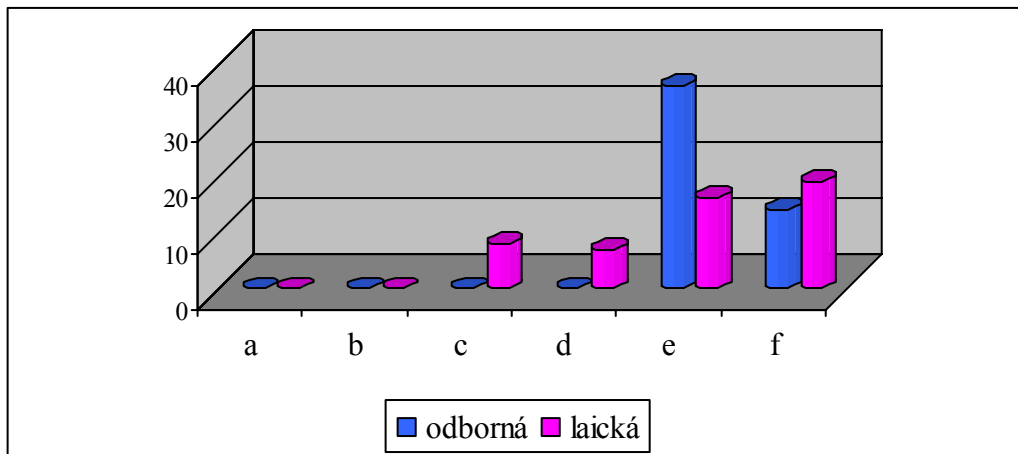
Graf 2: Pohlaví obyvatelstva



zdroj: vlastní výzkum

Na otázku 2, týkající se pohlaví, označilo u odborné veřejnosti 31 obyvatel (62%) mužské pohlaví a 19 obyvatel (38%) označilo ženské pohlaví. U laické veřejnosti označilo 23 obyvatel (46%) mužské pohlaví, a 27 obyvatel (54%) ženské pohlaví.

Graf 3: Dosažené vzdělání



zdroj: vlastní výzkum

Na otázku 3, týkající se dosaženého vzdělání odpovědělo u odborné veřejnosti 36 obyvatel (72%) možnost e) středoškolské odborné a 14 obyvatel (28%) možnost f) vysokoškolské. U laické veřejnosti odpovědělo 8 obyvatel (16%) možnost c) vyučen(a) v oboru, 7 obyvatel (14%) možnost d) středoškolské všeobecné, 16 obyvatel (32%) možnost e) středoškolské odborné a 19 obyvatel (38%) možnost f) vysokoškolské.

Hodnocení okruhu II (Obecná informovanost):

K vyhodnocení okruhu II jsem použila bodové hodnocení; body 1, $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$ a 0. Soubory u obou skupin obyvatelstva zahrnují 100 respondentů, pro výběrový statistický soubor VSS₁ a VSS₂ byl proveden stratifikovaný výběr na základě konzultace s odborníkem. Pro interpretaci výsledků jsem vybrala metody: Elementární statistické zpracování, Neparametrické testování a Parametrické testování.

Elementární statistické zpracování:

K zjištění stupně informovanosti dané problematiky bylo třeba určit průměrný stupeň informovanosti na škále 1 až 5 (1 – minimální stupeň, 5 - maximální stupeň). Proto bylo vybráno stratifikovaným výběrem na základě konzultace s odborníkem 50 testů odborné veřejnosti a 50 testů laické veřejnosti, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tab.1: Výsledky zpracování 50 dotazníků odborné veřejnosti

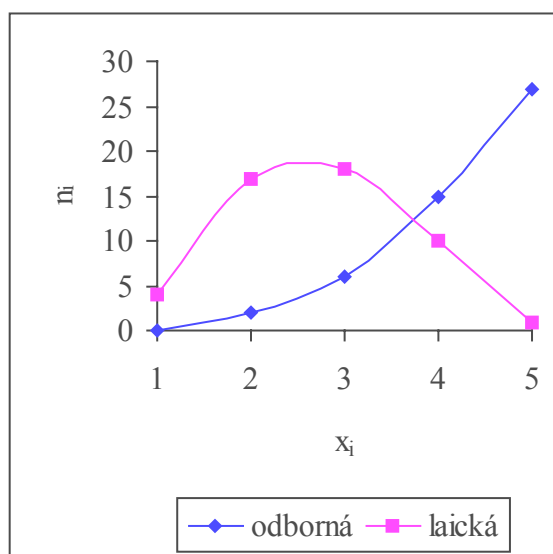
x_i	n_i	n_i / n	$\Sigma (n_i / n)$	$x_i \cdot n_i$
1	0	0	0	0
2	2	0,04	0,04	4
3	6	0,12	0,16	18
4	15	0,30	0,46	60
5	27	0,54	1,00	135
	$\Sigma 50$	$\Sigma 1,00$		$\Sigma 217$

Tab. 2: Výsledky zpracování 50 dotazníků laické veřejnosti

x_i	n_i	n_i / n	$\Sigma (n_i / n)$	$x_i \cdot n_i$
1	4	0,08	0,08	4
2	17	0,34	0,42	34
3	18	0,36	0,78	54
4	10	0,20	0,98	40
5	1	0,02	1,00	5
	$\Sigma 50$	$\Sigma 1,00$		$\Sigma 137$

Na obrázku 1 je znázorněn polygon absolutních četností odborné a laické veřejnosti.

Obr. 1: Polygon absolutní četnosti odborné a laické veřejnosti



zdroj: vlastní výzkum

Použité vztahy pro obecné a centrální parametry:

Obecný moment r-tého řádu : $O_r(x) = \frac{1}{n} \sum n_i \cdot (x_i)^r$

Obecný moment 1. řádu: $O_1(x) = \bar{x}$ (aritmetický průměr)

Centrální moment r-tého řádu: $C_r(x) = \frac{1}{n} \sum n_i \cdot (x_i - \bar{x})^r$

Centrální moment 2. řádu: $C_2(x) = S_x^2$ (empirický rozptyl)

Směrodatná odchylka : $S_x = \sqrt{C_2(x)}$

Výpočty empirických parametrů - obecného momentu 1. řádu, centrálního momentu 2. řádu a směrodatné odchylky:

pro odbornou veřejnost:

$$O_1(x) = 4,34 = \mu$$

$$C_2(x) = 0,72$$

$$S_x = 0,85 = \sigma$$

pro laickou veřejnost:

$$O_1'(x) = 2,74 = \mu'$$

$$C_2'(x) = 0,89$$

$$S_x' = 0,94 = \sigma'$$

V tabulce 3 a 4 je uvedeno stanovení počtu intervalů a jejich hranic, v rámci zjišťování, zda empirické rozdělení lze nahradit normálním rozdělením.

Tab. 3: Intervalové rozdělení četností odborné veřejnosti

x_i	interval	n_i	n_i / n	$\Sigma (n_i / n)$	$x_i \cdot n_i$
1	$(-\infty ; 1,5\rangle$	0	0	0	0
2	$(1,5 ; 2,5\rangle$	0,04	0,04	4	2
3	$(2,5 ; 3,5\rangle$	0,12	0,16	18	6
4	$(3,5 ; 4,5\rangle$	0,30	0,46	60	15
5	$(4,5 ; \infty)$	0,54	1,00	135	27
		$\Sigma 1,00$		$\Sigma 217$	$\Sigma 50$

Tab. 4: Intervalové rozdělení četností laické veřejnosti

x_i	interval	n_i	n_i / n	$\Sigma (n_i / n)$	$x_i \cdot n_i$
1	$(-\infty ; 1,5\rangle$	0	0	0	0
2	$(1,5 ; 2,5\rangle$	0,04	0,04	4	2
3	$(2,5 ; 3,5\rangle$	0,12	0,16	18	6
4	$(3,5 ; 4,5\rangle$	0,30	0,46	60	15
5	$(4,5 ; \infty)$	0,54	1,00	135	27
		$\Sigma 1,00$		$\Sigma 217$	$\Sigma 50$

Neparametrické testování:

Při testování bude použit χ^2 – test, při jeho aplikaci bude písmeno k označovat počet intervalů intervalového rozdělení četností, které odpovídají absolutní četnosti, písmeno r pak počet parametrů normálního rozdělení ($r = 2$). Výraz $k-r-1$ vyjadřuje počet stupňů volnosti, který umožňuje společně s určitou hladinou významnosti určovat pomocí statistických tabulek kritickou teoretickou hodnotu $\chi^2_{\text{teor}} = \chi^2_{k-r-1}$. Hladina významnosti je volena $\alpha = 0,05$.

Římské písmeno Φ označuje Laplaceovu funkci závisící na normované náhodné veličině u_i (u_i je normovaná hodnota odrážející horní mez x_i příslušného intervalu intervalového rozdělení četností). Pravděpodobnosti p_i jsou rozdílem příslušných hodnot označující empirické absolutní četnosti (viz tabulky 1, 2, a 3, 4).

Potřebné vztahy pro χ^2_{exp} , p_i a u_i :

$$\chi^2_{\text{exp}} = \sum \frac{(n_i - np_i)^2}{np_i} \quad \wedge \quad p_i = \Phi(u_i) - \Phi(u_{i-1}) \quad \wedge \quad u_i = \frac{x_i - \mu}{\sigma}$$

Tab. 5: Výpočty u_i , $\Phi(u_i)$, p_i a np_i odborné veřejnosti

x_i	interval	n_i	u_i	$\Phi(u_i)$	p_i	np_i
1	$(-\infty ; 1,5\rangle$	0	-3,341	-0,113	0,333	16,65
2	$(1,5 ; 2,5\rangle$	2	-2,165	0,03	0,745	37,25
3	$(2,5 ; 3,5\rangle$	6	-0,988	0,169	0,14	7,00
4	$(3,5 ; 4,5\rangle$	15	0,188	0,544	0,28	14,00
5	$(4,5 ; \infty)$	27	∞	1,00	0,0233	1,165

Tab. 6: Výpočty u_i , $\Phi(u_i)$, p_i a np_i laické veřejnosti

x_i	interval	n_i	u_i	$\Phi(u_i)$	p_i	np_i
1	$(-\infty ; 1,5\rangle$	4	-1,319	0,109	0,087	43,50
2	$(1,5 ; 2,5\rangle$	17	-0,255	0,475	0,347	17,35
3	$(2,5 ; 3,5\rangle$	18	0,809	0,763	0,316	15,80
4	$(3,5 ; 4,5\rangle$	10	1,872	0,957	0,166	8,33
5	$(4,5 ; \infty)$	1	∞	1,00	0,0233	1,165

Tabulka 7 a 8 reagují na požadavek, že při testu normality musí být v každém intervalu nejméně 5 výsledků měření. Současně jsou v těchto tabulkách provedeny další výpočty umožňující stanovit experimentální hodnotu statistického kritéria.:

Tab. 7: Úprava počtu intervalů, výpočet χ^2_{exp} odborné veřejnosti

x_i	n_i	np_i	$\frac{(n_i - np_i)^2}{np_i}$
1	4	16,65	16,65
2	17	37,25	33,36
3	18	7,00	0,143
4 + 5	42	15,165	47,49

$$\Sigma = 97,643 = \chi^2_{\text{exp}}$$

Tab. 8: Úprava počtu intervalů, výpočet χ^2_{exp} laické veřejnosti

x_i	n_i	np_i	$\frac{(n_i - np_i)^2}{np_i}$
1	4	43,50	0,028
2	17	17,35	0,007
3	18	15,80	0,306
4 + 5	11	9,495	0,239

$$\Sigma = 0,58 = \chi^2_{\text{exp}}$$

V poslední části neparametrického testování bylo potřebné určit prostřednictvím určeného počtu stupňů volnosti $v = k-r-1 = 4-2-1 = 1$ a pomocí statistických tabulek kritickou teoretickou hodnotu $\chi^2_{\text{teor}} = \chi^2_v = \chi^2_{k-r-1} = \chi^2_{4-2-1} = \chi^2_2 = 3,84$ při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Prostřednictvím kritické teoretické hodnoty již bylo možno zapsat pravostranný kritický obor $W = \langle \chi^2_v(\alpha); +\infty \rangle$.

Odborná veřejnost: jelikož experimentální hodnota statistického kritéria $\chi^2_{\text{exp}} = 97,643$ (tj. $\chi^2_{\text{exp}} \in W$), lze učinit průkazný závěr týkající se testu neparametrické hypotézy: Experimentální hodnota χ^2_{exp} patří do kritického oboru, lze proto přijmout alternativní hypotézu H_a .

Laická veřejnost: jelikož experimentální hodnota statistického kritéria $\chi^2_{\text{exp}} = 0,58$ (tj. $\chi^2_{\text{exp}} \notin W$), lze učinit průkazný závěr týkající se testu neparametrické hypotézy: Experimentální hodnota χ^2_{exp} nepatří do kritického oboru, lze proto přijmout hypotézu H_0 .

Parametrické testování:

V případě dvojbýřového testování, které v této práci použijí lze hypotézu H_0 a H_a formulovat ve tvaru:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 \text{ nebo } H_0: \sigma_1 = \sigma_2, \quad H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \text{ nebo } H_a: \sigma_1 \neq \sigma_2.$$

Dvojbýřový t-test:

Statistické kritérium:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{(n_1 - 1)Sx^2 + (n_2 - 1)Sy^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Kritické hodnoty: $-t_{n_1+n_2-2}(\alpha/2), t_{n_1+n_2-2}(\alpha/2)$

Kritický obor: $W = (-\infty, -t_{n_1+n_2-2}(\alpha/2)) \cup (t_{n_1+n_2-2}(\alpha/2), \infty)$

$$t_{98}(0,025) = 1,96 \Rightarrow W = (-\infty; -1,96) \cup (1,96; +\infty)$$

Hodnoty vypočítané při elementárním statistickém zpracování jsou $S_x^2 = 0,72 = \sigma$,
 $\bar{x} = \mu_1 = 4,34$; $\bar{y} = \mu_2 = 2,74$; $S_x'^2 = 0,89 = \sigma'$, $n_1 = 50$, $n_2 = 50$. Po dosazení:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{(n_1 - 1)S_x^2 + (n_2 - 1)S_y^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = 8,909 \Rightarrow t_{\text{exp}} \in W$$

Interpretace výsledku:

Experimentální hodnota t_{exp} patří do kritického oboru, na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ lze zamítnout nulovou hypotézu H_0 . Zkoumaný výběrový soubor VSS_1 a další výběrový soubor VSS_2 nemohly být vybrány z jednoho a téhož vnějšího souboru ZSS. Rozdíl mezi $\bar{x} = \mu_1$ a $\bar{y} = \mu_2$ je na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významný.

5. DISKUSE

5.1 *Shrnutí podkladů pro diskusi*

Po 11. září 2001 jsme si náhle uvědomili reálnost a závažnost hrozby terorismu, dříve více, či méně v našich myslích potlačované. K teroristickému útoku bývají používány výbušniny, ale může se jednat i o zneužití chemických látek a biologických prostředků – infekčních agens. Jako biologická zbraň může být použita přírodní i geneticky upravená infekční agens například mikrobiální toxin botulotoxin.

V současnosti je velmi pravděpodobné jeho nasazení jako biologické zbraně hromadného ničení. V přírodě využívají některé bakterie toxiny ke své obraně i k agresi. Lidé se občas stanou jejich obětmi, ale také těmi, kteří budou chtít znalost účinků obrátit ve svůj prospěch. Rusko a USA byly a jsou jedny ze států, které pracovaly na výzkumu biologických zbraní už od druhé světové války. Před a po událostech z 11. září 2001 se také velmi významně zásobil tímto prostředkem Irák.

Proč je toto biologické agens tak atraktivní? Myslím si, že hlavně díky snadné přípravě, vysoké účinnosti a nanogramových množstvích dostačující k vyvolání otravy, a to jsou aspekty, které tuto látku stavějí na žebříček jedné z nejjedovatějších. Statistika ukazuje, že botulotoxin A je 15000 – 100 000krát toxičtější než sarin.

V případě použití botulotoxinu lze rozlišit dva typy útoků. Prvním typem je kontaminace vody nebo jídla. Při pečlivém plánování a efektivním využití biologických zbraní se mohou oběti takového útoku pohybovat v řádu stovek. Útok tohoto typu je v krátkém časovém horizontu nejvíce pravděpodobný.

Druhým typem je útok na cílovou oblast aerosolovými částicemi, které budou obsahovat příslušné patogeny nebo toxiny. Tento typ je sice nejvíce účinný, ale zároveň představuje největší technologické komplikace. Bojová látka by musela být určena pro aerosolový rozptyl a částice by musely mít optimální velikost a odolnost vůči environmentálnímu působení. Navíc je takový útok zcela závislý na meteorologických podmínkách.

Jaké jsou možnosti příslušníků armády dostat se do styku s tímto agens: vdechováním zamořeného vzduchu, proniknutí zárodků nemoci přes kůži a sliznice, požití zamořené potravy a vody, napadení infikovaným hmyzem, stykem se zamořenými předměty, poranění střepinami biologických zbraní a stykem s dalšími nemocnými osobami. Úmrtnost neléčených osob se pohybuje okolo 65 %, u těch co přežili dochází k úplnému vymizení příznaků až po 2 – 6 měsících. A proto vzdejme hold příslušníkům Chemické, biologické a radiační obrany, kteří jsou nedílnou součástí každé mise do válečných oblastí.

Terapie botulismu musí být především intenzivní, spočívá v podpůrné péči a pasivní imunizaci pacienta antitoxinem. V současné době jsou k dispozici dva druhy antitoxinových preparátů připravovaných z koňského séra. Ústavy veřejného zdraví mají udělenou licenci na trivalentní antitoxin proti botulotoxinům A, B, a E. Armáda USA má ještě pokusný antitoxin proti všem typům. Prevence inhalační formy spočívá především ve včasném podání pasivních protilátek z koňského séra, nebo aktivním pentavalantním toxoidem proti typům A až E.

Dnes se u nás detekcí biologických agens a toxinů zabývá Laboratoř biologického monitorování a ochrany. Laboratoř je vybavena přístrojovou technikou pro detekci patogenů pomocí molekulárních metod, mikrobiologické kultivace a hmotnostní spektrometrie.

Jedním z hlavních úkolů laboratoře je podpora dozoru prováděného Státním úřadem pro jadernou bezpečnost, jemuž byla svěřena státní správa v oblasti kontroly dodržování zákazu bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní zákonem č. 281/2002 Sb. Obě pracoviště se rovněž zabývají výzkumnou činností.

Myslím, že je otázkou času do jaké míry se biologický terorismus rozvine. Hrozba je každopádně reálná, a proto jsou připravovány a ve většině případů již připraveny systémy detekce a identifikace jednotlivých patogenů, jsou vytvořeny integrované záchranné systémy vycházející z různých krizových plánů.

5.2 Diskuse splnění cílů a hypotéz práce

Cíle práce byly stanoveny ve dvou oblastech: a) poukázat na problematiku intoxikace bakterií *Clostridium botulinum*, b) zjistit míru informovanosti laické a odborné veřejnosti. Splnění těchto cílů mělo být ověřováno prostřednictvím dvou hypotéz:

H1: Odbornou veřejností je botulotoxin považován za jeden z nejpravděpodobnějších jedů, který by mohl být zneužit jako nástroj bioterorismu a jeho studiu je věnována velká pozornost.

H2: Laickou veřejností je botulotoxin vnímán spíše jako kosmetický prostředek k odstraňování vrásek v obličeji a o jeho teroristickém zneužití má jen málo informací.

Obě hypotézy byly postupně zkoumány teoretickou částí práce a praktickou částí práce. Návaznost těchto dvou částí představovala metodiku bakalářské práce.

6. ZÁVĚR

I když je botulotoxin považován za nejúčinnější známý jed a z hlediska teroristy je jako biologická zbraň výhodný, je jeho použití omezené některými faktory. Především tím, že se nešíří endemicky z člověka na člověka a také existuje proti němu specifické antisérum. Na druhé straně, přirozený producent toxinu, anaerobně žijící bakterie *Clostridium botulinum*, se vyskytuje téměř všude, není tedy velký problém ji získat. Toxin se využívá i v kosmetických procedurách – čili i zde může být skryt potenciální zdroj suroviny pro případný útok.

Z hlediska ohrožení populace je důležité zajištění její bezpečnosti a to na základě znalostí zasahujících složek Integrovaného záchranného systému v případě bioteroristického útoku. Na základě výsledků mého průzkumu mohu konstatovat, že složky Integrovaného záchranného systému jsou dostatečně informovány o problematice botulotoxinu a bioterorismu. Laická veřejnost naopak vnímá botulotoxin jako pomůcku v oblasti kosmetiky.

Doufám, že tato práce přispěje k rozšíření znalostí o botulotoxinu a jeho možného bioteroristického použití u zájemců z řad odborné i laické veřejnosti.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALASTAIR, R., : *Když máme co dělat s bioterorem*. Update. Iktus, 2003, roč. 4, č. 8&9, s. 48-52

BARTÁK, P., : *Botulotoxin v kosmetické praxi*, [online] [cit. 2007-2-20] dostupné z <<http://www.ghc.cz/cznews/0210/0401bartak4.htm>>

BEZPEČNOSTÍ INFORMAČNÍ SLUŽBA: *Terorismus*, [online] [cit. 2007-2-20] dostupné z <<http://www.bis.cz/terorismus.html>>

BOLDIŠ, P. : Bibliografická citace dokumentu podle ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2: Část 1 – Citace: metodika a obecná pravidla. Verze 3.3. Poslední aktualizace 11. 11. 2004. 21s. Dostupné z <<http://www.boldis.cz/citace/citace2.pdf>>

BOLDIŠ, P. : Bibliografická citace dokumentu podle ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2: Část 2 – Modely a příklady citací u jednotlivých typů dokumentů. Verze 3.0. Poslední aktualizace 11. 11. 2004. 16 s.

BOSSI, P., BRICAIRE, F. : *Botulism toxin, bioterrorist weapon*. Presse Med., 2003, Mar 15, vol. 32, č.10, str. 463-5.

DANEŠ, L.: *Bioterrorismus*. 1.vyd. Praha, Karolinum, 2003. 99 str., ISBN 80-246-0693-3

DICKERSON, T., JANDA, K.: *The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication*. ACS Chem. Biol., 2006 Jul 21, vol. 1, č.6, str. 359-69.

DONAGHY, M.: *Neurologists and the threat of bioterrorism*. J Neurol Sci., 2006 Nov 1, vol. 249, č.1, str. 55-62.

GÖPFERTO VÁ, D., JANO VSKÁ, D., DOHNAL, K., MELICHERČÍKOVÁ, V
Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena. 3. vyd.. TRITON, Praha, 2002. 142 str., ISBN 80-7254-223-0

HAVRÁNEK, J., HAVRÁNKOVÁ R., VURM, V., ZÁŠKODNÝ, P.,: *Základy zdravotnické statistiky*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2004. 100str., ISBN 80-7040-663-1

HOROWITZ, B.: *Botulinum toxin*. Crit Care Clin., 2005 Oct., vol. 21, č. 4, str. 825-39

- HRDINA, V.:** *Vojenská toxikologie*. Vojenská lékařská akademie v Hradci Králové, 1991, svazek 260. 266 str., ISBN 80-85109-36-0
- JEŽEK, Z., KRÍŽ, B.:** *Botulotoxin jako biologická zbraň*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2002, roč. 8, č.3, s. 103-109. ISSN: 1211- 264X
- JURAN, L.:** *Terorismus, fenomén organizovaného zločinu*, [online][cit. 2007-2-20] dostupné z <<http://www.mvcr.cz/casopisy/policista/2002/09/teror.html> >.
- KRMENČÍK, P.:** *Clostridium botulinum*, [online] [cit. 2006-9-12] dostupné z <<http://www.biotox.cz/toxikon/> >.
- LINDSTRÖM, M., KORKEALA, H.:** *Laboratory diagnostics of botulism*, [online] [cit. 2006-9-20] dostupné z <<http://cmr.asm.org/cgi/content/abstract/19/2/298>>.
- LUCÁK, O.:** *Princip funkce botulotoxinu*. [online] [cit. 2007-2-20] dostupné z <<http://www.plastickachirurgie.com/cz/procedure.php?id=175>>
- LUKÁŠEK, L.:** *Fenomén mezinárodního terorismu ve světě současného mezinárodního práva*. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň1999. 162 str.,ISBN 80 7082-571-5
- NAVRÁTIL, L., BRÁDKA, S. :** *Úkoly krizového managementu v ochraně obyvatelstva*. 1. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích ZSF, 2006. 80 str., ISBN 80-7040-881-2
- NRL PRO ANAEROBNÍ BAKTERIE:** *Clostridium baratii a Clostridium butyricum jako původci botulismu?*, [online] [cit. 2006-9-12] dostupné z <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab08.php>> .
- ONDROVČÍK, P., VOTAVA, M.:** *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. Masarykova univerzita v Brně r. 2000. 91 str., ISBN 80-210-1805-4
- PATOČKA, J.:** *Botulotoxin: užitečný jed*. Kontakt. Zdravotně soc. fakulta, Jihočeská univerzita v Č.Budějovicích. 2002, č. 4, str. 23-29. ISSN: 1212-4117
- PATOČKA, J. a kolektiv:** *Vojenská toxikologie*. GRADA Publishing,a.s, Praha, 2004.180 str., ISBN 80-247-0608-3
- PATOČKA, J., ŠPLÍNO, M., MERKA, .:***Botulism and bioterrorist: how serious is this problem?*.Acta Medica (Hradec Králové) 2005, vol. 48, č.1, str.23-8
- PRYMULA, R., a kolektiv:** *Biologický a chemický terorismus*. GRADA Publishing

spol. s.r.o., Praha, 2002. 152 str., ISBN 80-247-0288-6

PŘECECHTĚL, F., a kolektiv: *Lékařská mikrobiologie*. Masarykova univerzita v Brně, 1990. 330 str., ISBN 80-210-0143-7

SÚJB: *Biologické zbraně*. [online][cit. 2007-2-20] dostupné z <http://www.sujb.cz/?c_id=233>

ŠEDIVÝ, J.: *Nové bezpečnostní prostředí po 11. září a Evropská unie*. Ústav mezinárodních vztahů ve spolupráci Friedrich-Ebert-Stiftung v České republice, Praha, 2002. 27 str.

VOCILKOVÁ, A.: *Jak se vráskám bránit?*, [online][cit. 2007-2-20] dostupné z <<http://www.botoceutical.cz/cz/poradna.htm>>

VOTAVA, M. a kolektiv : *Lékařská mikrobiologie II*. Masarykova univerzita v Brně r. 2000. 309 str., ISBN 80-210-2272-8

VOTAVA, M. a kolektiv: *Lékařská mikrobiologie speciální*. NEPTUN, Brno, 2003. 495 str., ISBN 80-902896-6-5

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Clostridium botulinum

Biologická zbraň

Biologická agens

Bioterrorismus

Botulotoxin

Botulismus

Antitoxin