

RISCHIO DA BOTULISMO INFANTILE CONSEQUENTE A CONSUMO DI MIELE

RISK OF INFANT BOTULISM RELATED TO HONEY CONSUMPTION

CARLO D'ASCENZI ⁽¹⁾, SALVO RINDI ⁽¹⁾, PAOLA VANNUCCI ⁽²⁾

RIASSUNTO

Il botulismo infantile è una grave malattia alimentare che si manifesta in bambini al di sotto di un anno di età. Gli studi epidemiologici segnalano casi di questa tossinfezione in tutto il mondo. Negli Stati Uniti la prevalenza del botulismo infantile ha superato le altre forme di botulismo, sia quella alimentare classica che quella conseguente a traumi. In molti casi si è potuto constatare la corrispondenza fra il *Clostridium* tossigeno rilevato nel paziente e lo stesso microrganismo riscontrato nel miele che era stato somministrato al bambino.

Le ricerche eziologiche e patogenetiche hanno chiarito che la malattia non consegue al consumo di tossina formata dal microrganismo nelle fasi precedenti il consumo, come avviene nella forma classica del botulismo alimentare, ma semplicemente per l'ingestione di spore dell'agente eziologico, che troverebbero nell'ambiente intestinale del bambino le condizioni adatte per la germinazione e la tossinogenesi. Tale evidenza ha posto il miele fra gli alimenti a rischio per il botulismo infantile. Tuttavia, le particolarità che caratterizzano questa malattia alimentare, in aggiunta alla scarsa informazione sull'argomento, possono esporre le parti interessate, consumatori, produttori, commercianti, autorità competenti, pediatri, alla sottostima del rischio sanitario, pregiudicando ogni possibile azione di prevenzione.

Gli autori descrivono le acquisizioni scientifiche in materia, valutando al contempo le varie opzioni praticabili in ambito di gestione della prevenzione.

Parole chiave: sicurezza alimentare, botulismo infantile, miele.

SUMMARY

Infant botulism is a serious food borne disease which occurs in children who are younger than one year of age. Epidemiological surveys show cases of this toxic infection all around the world. In United States the prevalence of infant botulism surpassed both classic food-borne and wound forms of botulism. In most of the cases correspondence was observed between toxin producing *Clostridium* collected in patients and microorganism found in honey given out the child.

⁽¹⁾Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

⁽²⁾Collaboratore esterno.

Il lavoro spetta in parti uguali agli Autori.

Aetiological and pathogenetic researches explained that disease does not occur for ingestion of toxin produced by the microorganism during steps before consumption, as it happens in the classic form of food-borne botulism, but simply for ingestion of spores of aetiological agent, which could find good conditions for germination and toxin producing in intestinal environment. This evidence places honey among risky foods in order to infant botulism. Nevertheless specific peculiarities characterizing this food-borne disease, with the addition of insufficient information about the topic, might expose stakeholders, as consumers, manufacturers, traders, competent authority, paediatricians, to underestimate the health risk, compromising all the possible preventive measures.

Authors show scientific knowledge about this matter, and at same time they value various practicable options of risk management.

Key words: food safety, infant botulism, honey.

INTRODUZIONE

Il miele è segnalato fra gli alimenti responsabili di una grave tossinfezione alimentare, nota come botulismo infantile. Tale patologia, sostenuta da diverse specie di *Clostridium* spp., interessa i bambini al di sotto dell'anno di età. La prima segnalazione mondiale risale al 1976 negli USA, ma i dati epidemiologici raccolti in ambito mondiale ci dimostrano che si tratta di una malattia alimentare a diffusione cosmopolita. Il primo caso italiano risale al 1984. Negli Stati Uniti il botulismo infantile ha già una prevalenza superiore sia alla forma classica di botulismo alimentare che alla forma conseguente a traumi (Cox & Randy, 2002).

La consapevolezza scientifica dei fattori coinvolti nel determinismo della malattia non consente ancora l'adozione in modo diffuso e completo di strumenti di prevenzione efficaci. In ambito internazionale l'approccio alla prevenzione di questa malattia presenta posizioni tutt'altro che omogenee.

Le particolari caratteristiche intrinseche del miele, la qualità alimentare attesa da questo prodotto, le scarse opportunità tecnologiche per il perseguimento del risanamento, il temuto impatto sul consumatore della informazione del rischio, rendono la gestione della prevenzione alquanto problematica. Una evoluzione positiva della situazione potrebbe essere rappresentata dalla conoscenza dei dati scientifici riguardanti questo argomento, in modo che da parte delle parti interessate, rappresentate da consumatori, produttori, commercianti, auto-

rità competenti, si possa raggiungere un accordo condiviso sulle modalità con cui garantire la sicurezza alimentare di questo prodotto. Particolarmente rilevante risulta in questo contesto il ruolo del veterinario igienista, che da professionista competente può svolgere la mediazione tecnico-culturale nella fase operativa della prevenzione, operando non solo ai fini della verifica dei requisiti legali, ma anche sul fronte della formazione degli operatori coinvolti.

IL PERICOLO RAPPRESENTATO DAL BOTULISMO INFANTILE

Sul piano eziologico, *Clostridium botulinum* sostiene la maggior parte della casistica mondiale di botulismo infantile; in causa sono prevalentemente i tipi A e B, più raramente i tipi E ed F. Non mancano segnalazioni di casi sostenuti da *Clostridium barati* con produzione di tossina F simile (Arnon, 1998; Aureli et al., 1986; Snowdon, 1997) e *Clostridium butyricum* tipo E (Censi et al., 1989).

Diversamente dal botulismo alimentare (forma classica) nel botulismo infantile non si ha l'assunzione della tossina preformata con l'alimento ma delle spore. Quest'ultime trovano le condizioni ottimali di sviluppo a livello del colon di neonati al di sotto dei 12 mesi di età, cosicché si trasformano in forma vegetativa e in fase di moltiplicazione producono la tossina. Dalla sede intestinale, la neurotossina botulinica raggiunge, per via sanguigna, le placche neuromuscolari, dove agisce impedendo la liberazione dell'acetilcolina, determinando la comparsa della sintomatologia clinica.

L'età è il principale fattore di rischio per l'insorgenza del botulismo infantile; il 98% dei casi riguarda lattanti tra le 2 settimane ed i sei mesi di età (Arnon & Damus, 1981; Snowdon, 1997). La particolare sensibilità dell'ospite è influenzata dagli effetti indotti nell'ambiente intestinale dalla microflora (Sullivan et al., 1988), dalla motilità intestinale (Spika et al., 1989), dal tipo di alimentazione e dalla modalità di allattamento (Arnon e Damus, 1981; Bisicchia et al., 1986; Goldman & Goldblum, 1989). Con il progredire dell'età del bambino, tutti i fattori coinvolti nella patogenesi della malattia evolvono naturalmente, fino ad escludere progressivamente il verificarsi di condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo ed alla tossinogenesi dell'agente eziologico.

La sintomatologia classica è caratterizzata da costipazione (sintomo prodromico, che tende a precedere di alcuni giorni tutti gli altri), difficoltà di suzione, pianto debole, letargia, e dalla comparsa di una paralisi flaccida discendente simmetrica, che richiede l'intubazione al fine di contrastare la paralisi respiratoria. In linea generale la prognosi è buona, i casi ad *exitus* fatale sono meno del 2% del totale (Cox & Randy, 2002).

Su base clinica la diagnosi è alquanto complessa e richiede di applicare un numero elevato di prove differenziali, per escludere patologie neonatali, disordini metabolici e/o intossicazioni di altra origine (meningiti, encefaliti, intossicazioni da metalli pesanti, organofosforici, narcotici, anticolinergici, encefalopatia epatica, acidosi metabolica, poliomielite, *myastenia gravis congenita*, sindrome di Guillain-Barré, ecc.). La diagnosi definitiva si ottiene solo con l'isolamento della tossina dai campioni di siero e dell'agente eziologico (spore e forme vegetative) e della tossina nelle feci prelevati dai pazienti (Cox & Randy, 2002). Il Ministero della Sanità Italiano (Circolare 9, 1 luglio 1996, "misure di prevenzione e controllo delle intossicazioni da botulismo") ed il Center for Disease Control (CDC) statunitense richiedono l'espletamento della prova biologica (*mouse neutralization test*) per la diagnosi.

Ai fini informativi è necessario che la ricerca del clostridio sia estesa anche ai campioni di suolo, miele ed altri cibi, con i quali il paziente è venuto in contatto, in modo da risalire, quando possibile, alla fonte d'infezione.

La terapia prevede interventi esclusivamente di sostegno, con ventilazione meccanica, che risulta indispensabile. L'utilizzazione dell'antotossina trivalente è sconsigliata nel botulismo infantile, per l'alta incidenza di reazioni avverse fino allo shock anafilattico; anche se buoni risultati si sono ottenuti in California con l'utilizzazione di una immunoglobulina umana (BIG; *Botulinum Immune Globuline*) (Cox & Randy, 2002, Arnon, 1998).

Sul piano epidemiologico, gli USA, che sono dotati del migliore sistema di sorveglianza al mondo, riportano il 90% della casistica mondiale (Tanzi & Gabay, 2002): in questo paese si diagnosticano 70-100 casi annui di botulismo infantile (CDC 1995). In Europa dal 1978 al 2002 sono stati diagnosticati poco meno di 50 casi (Aureli et al., 2002). I ricercatori sono tuttavia consapevoli che i dati raccolti in

ambito mondiale rappresentino solo una parte del fenomeno, tenuto conto del carattere atipico della patologia e le conseguenti difficoltà diagnostiche (Maggi, 1997)

La casistica italiana riflette la situazione europea, con alcune peculiarità riguardanti l'agente eziologico. Le prime segnalazioni hanno, infatti, riportato all'attenzione il ruolo eziologico del *Clostridium butyricum* (Aureli et al., 1986 b; Aureli et al., 1986 a). Il primo caso italiano, ed europeo, sicuramente correlato all'ingestione di miele contaminato (*Clostridium botulinum* tipo B) risale al 1991 (Fenicia et al., 1993).

Il miele è stato, fin dalle prime segnalazioni, l'alimento maggiormente incriminato come veicolo del botulismo infantile. Dalle segnalazioni europee si desume come l'anamnesi indichi che oltre la metà dei pazienti aveva consumato miele, e nel 16% dei casi il tipo di clostridio isolato dal materiale biologico era analogo a quello isolato dal miele somministrato (Aureli et al., 2002). Complessivamente, il quadro epidemiologico europeo non si discosta sostanzialmente da quello nordamericano (Arnon et al., 1981; Arnon et al., 1979; Chin et al., 1979).

Numerosi studi sono stati effettuati per stimare la percentuale di contaminazione del miele. I risultati hanno fornito dati sovrapponibili in tutto il mondo. Studi statunitensi riportano valori di contaminazione, con spore di *Clostridium botulinum* tipo A e B, intorno al 7,5% dei campioni sottoposti ad analisi (Arnon et al., 1981; Midura et al., 1979; Sugiyama et al., 1978); in Brasile la prevalenza dei campioni contaminati si attesta al 7,6% (Schocken-Iturrino et al., 1999), in Giappone all'8.5%, in Finlandia al 7%, ecc. (Nevas et al., 2002).

La situazione italiana sembrerebbe in linea con gli altri paesi, nonostante che alcune ricerche abbiano fornito dati più rassicuranti. Se da una parte, alcuni autori hanno riportato percentuali di contaminazione intorno al 6.5% (Aureli et al., 2002; Criseo et al., 1983), altri non hanno evidenziato *Clostridium botulinum* nei campioni di miele analizzati (Fiorni et al., 1986; Quaglio et al., 1988). A questo proposito occorre segnalare come i risultati di molte ricerche analitiche effettuate in Europa vengano contestati dai ricercatori nordamericani, sulla base della considerazione che il metodo di analisi impiegato non sarebbe adeguato per rilevare i ceppi E ed F di *Clostridium botulinum* (Hauschild et al., 1988).

L'analisi critica dei dati sulla contaminazione del miele fa emergere comunque altri aspetti che meritano di essere presi in considerazione. Il 12% dei campioni risultano contaminati da altre specie di clostridi, tra cui *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* e *Clostridium subterminale* (Quaglio et al., 1988; Hatheway et al., 1980; Hall et al., 1985; Mc Croskey et al., 1986; Arnon, 1984; Annibaldi et al., 2002), con caratteristiche ecologiche assimilabili al *Clostridium botulinum*. Inoltre, è importante notare come sia stata rilevata, anche in miele di produzione italiana, la presenza di spore di *Clostridium barati* e *Clostridium butyricum*, di cui è stato accertato il ruolo eziologico nel botulismo infantile (Censi et al., 1989). Risulta pertanto limitativo focalizzare l'attenzione esclusivamente sulla presenza di spore di *Clostridium botulinum*; la ricerca va infatti estesa anche a tutte le altre specie di *Clostridium* in grado di produrre la tossina botulinica.

LA PREVENZIONE DEL RISCHIO

La contaminazione del miele può avvenire in modo primario in alveare (polvere, api bottinatrici), oppure in fasi secondarie di lavorazione (smielatura, confezionamento). Tuttavia, malgrado l'adozione di pratiche igieniche possa minimizzare le possibilità di contaminazione, tenuto anche conto della diffusione nell'ambiente delle spore di *Clostridium botulinum*, si ritiene che la contaminazione non sia escludibile a priori.

Sul piano dell'adozione di tecniche di risanamento, questa risulta problematica, in quanto tali trattamenti risultano poco compatibili con la salvaguardia delle caratteristiche qualitative di pregio riconosciute nel miele. I trattamenti termici in grado di distruggere le spore botuliniche determinerebbero la caramellizzazione degli zuccheri, pertanto non sono applicabili. La pastorizzazione, pratica commerciale utilizzata per impedire la cristallizzazione (fenomeno naturale, non dannoso ma poco gradito a molti consumatori) non permette la rimozione delle forme sporigene.

L'ultrafiltrazione è una metodica efficace, applicata al miele utilizzato in formulazioni specifiche (es.: farmaceutica, cosmesi). Si tratta di un processo di filtrazione su membrana a pressione, con produ-

zione di un “permeato” e di un “concentrato”. Solitamente si effettua a temperature di 60-71° C (Lagrange, 1991). A dispetto della efficacia risanante posseduta da questa tecnica, il miele ultrafiltrato presenta variazioni più o meno significative di viscosità, colore e aroma rispetto a quello non trattato.

Le radiazioni ionizzanti (cobalto 60, a 18-25 kGy) permettono una sterilizzazione adeguata, anche se inducono variazioni cromatiche e formazione di bolle di gas nel prodotto (Molan & Allen, 1996; Postmese et al., 1995). Tuttavia, nonostante l’irraggiamento sia una metodica dotata di efficacia, la legislazione in vigore ne vieta l’utilizzazione (D.L. 30.01.2001 n° 94).

Relativamente all’applicabilità di strumenti tecnologici in grado di risanare il miele, occorre considerare come quelli efficaci presentino anche dei costi ragguardevoli, sia in termini di apparecchiature e di gestione dei processi produttivi, che in termini di riduzione del valore commerciale del prodotto. In particolare, per le radiazioni ionizzanti, ammesso che ne venisse consentito l’uso, i prodotti alimentari così trattati sarebbero valutati con molto sospetto dai consumatori. Un tale atteggiamento provocherebbe delle conseguenze catastrofiche in un prodotto come il miele, la cui qualità alimentare si identifica nell’essere “naturale”.

Del resto, in questo segmento produttivo, deve essere valutato con attenzione l’impatto economico-sociale della prevenzione, visto che costituisce una risorsa per le economie di zone svantaggiate e marginali.

Sul piano dell’informazione del consumatore, molti Autori rilevano come allo stato attuale questa patologia sia poco conosciuta in Italia, sia tra gli addetti ai lavori, che, a maggior ragione, tra i consumatori. Negli USA, dove sono stati registrati 1.442 casi di botulismo infantile tra il 1976-1996 (Arnon, 1998), l’approccio al problema è stato affrontato con la messa in atto di campagne d’informazione, alle quali partecipano gli enti governativi deputati alla tutela della salute pubblica, le associazioni di produttori di miele e le associazioni dei medici pediatri. Le campagne d’educazione sono associate alla comunicazione del pericolo attraverso specifiche indicazioni riportate in etichetta. Questo approccio ha permesso di diminuire la percentuale di casi di botulismo infantile legati al consumo di miele. Nel periodo 1976-1979, in USA, si stimava che il 34% dei casi di botulismo infan-

tile fossero causati dall'ingestione di miele contenente spore di *Clostridium botulinum*. Grazie alle campagne divulgative, questa percentuale era già calata al 4.4% nel periodo 1988-89 (Snowdon, 1997).

DISCUSSIONE

La particolare eziopatogenesi del botulismo infantile, incentrata sulla sussistenza, nell'ambiente intestinale del neonato, di condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo e la tossinogenesi dell'agente eziologico, ci induce a modificare la valutazione del rischio sui prodotti alimentari e sulle sostanze che possono essere ingerite dai bambini nell'arco dei loro primi 12 mesi. Il miele, in virtù della propensione dei bambini verso gli alimenti dolci, rientra fra i prodotti alimentari che vengono somministrati in vario modo anche ai lattanti. La peculiare sensibilità dimostrata da questi soggetti, limita di fatto la precedente reputazione del miele in fatto di sicurezza microbiologica. Infatti, tale alimento, in funzione delle caratteristiche fisico-chimiche e della presenza di sostanze antibatteriche, dimostra di essere un substrato inadatto, non solo alla crescita, ma anche alla sopravvivenza, di gran parte delle specie microbiche che si trovano in forma vegetativa. Le spore di *Clostridium* e *Bacillus* sono le uniche forme batteriche che riescono a sopravvivere a condizioni ambientali così estreme (Maggi, 1997; Baggio et al., 2003).

Gli studi epidemiologici avevano dimostrato fino agli anni '70, la refrattarietà dell'ambiente intestinale a consentire lo sviluppo delle spore di *Clostridium botulinum*, confermata dall'assenza di casi conseguenti a tossinogenesi successiva all'ingestione. Il botulismo infantile pone invece in termini di relatività la presunta inerzia patogenetica delle spore, limitandola agli individui di età superiore all'anno.

La valutazione della proponibilità dei vari strumenti di prevenzione, ci induce a considerare la problematica con un approccio globale. A nostro avviso la combinazione di strumenti di formazione (produttori, medici pediatri) con momenti di informazione (consumatore) è da considerarsi fra i metodi più appropriati. Alle campagne d'informazione ed ai "formatori" spetterebbe il compito di spiegare la particolare eziopatogenesi del botulismo infantile, il ruolo del miele quale veicolo alimentare, i consumatori a rischio. Le campagne di informa-

zione dovrebbero avere anche il fine di preparare i consumatori ad un coinvolgimento consapevole nella prevenzione, attraverso la corretta percezione del rischio e l'esclusione del miele dall'alimentazione dei neonati.

In tale contesto, il grado di consapevolezza del rischio e l'efficacia della prevenzione contribuirebbero a tutelare anche gli interessi dei produttori, i quali sarebbero meno esposti agli effetti traumatici prodotti da allarmismi incontrollabili.

Al veterinario igienista viene richiesto di svolgere un duplice ruolo nella prevenzione:

a) un ruolo di controllore dell'igiene nella produzione e vendita del prodotto;

b) un ruolo di formatore.

In conclusione, nonostante che il miele non rappresenti il solo alimento responsabile, è parere univoco che debba essere allontanato dall'alimentazione della prima infanzia (Spika et al., 1989). Infatti, tale limitazione alimentare non crea problemi di tipo nutrizionale, ed è al contrario una metodica valida per prevenire l'incidenza del botulismo infantile. Grazie a questa politica gli USA hanno visto calare i casi di botulismo infantile correlati al consumo di miele dal 34% al 4.4% (Snowdon, 1997; Arnon et al., 1981).

BIBLIOGRAFIA

- ANNIBALI F., FENICIA L., FRANCIOSA G., AURELI P. (2002). Influence of pH and temperature on the growth of and toxin production by neurotoxicogenic strains of *Clostridium butyricum* type E. *J. Food Prot.*, 65: 1267-1270.
- ARNON S.S. (1984). Breast feeding and toxigenic intestinal infections: missing link in crib death?. *Riv. Infect. Dis.*, 6: 193-201.
- ARNON S.S. (1998). *Textbook of Pediatric Infectious Disease*, R.D. Feigin, J.D. Cherry eds; 4th ed., W.B Saunders Company, Philadelphia. 45-66.
- ARNON S.S., DAMUS K., CHIN J. (1981). Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 3: 45-66.
- ARNON S.S., MIDURA T.F., DAMUS K., THOMPSON B., WOOD R.M., CHIN J. (1979). Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *J. Pediatr.*, 94: 331-336.
- AURELI P., FENICIA L., PASOLINI B., GIANFRANCESCHI M., McCROSKEY L.M., HATHEWAY C.L. (1986). Two cases of Type E Infant Botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *J. Infect. Dis.*, 154: 207-211.
- AURELI P., FRANCIOSA G., FENICIA L. (2002). Infant botulism and honey in

- Europe: a commentary. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21: 866-868.
- AURELLI P., HATHEWAY C.L., FENICIA L., FERRINI A.M. (1986). Prime segnalazioni di casi di botulismo infantile in Italia. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 22: 855-858.
- BAGGIO A., PRANDIN L., DAMOLIN O., MUTINELLI F., PAVOLETTI E. (2003). Monitoraggio microbiologico nelle sale di smielatura. *Industrie Alimentari*, XLII: 717-720.
- BISICCHIA R., GOZIO E., FOSCHINI M., ZUNIN C. (1986). Influenza dell'adattamento biochimico di un latte formulato artificialmente sull'ecosistema microbico intestinale. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 22: 895-898.
- CENSI A., CREMASCO S., MAGGI E. (1989) *Clostridium* spp. nel miele. *Atti S.I.S. Vet.*, XLIII: 125-129.
- CHIN J., ARNON S.S., MIDURA T.F. (1979). Food and environmental aspects of infant botulism in California. *Rev. Infect. Dis.*, 1: 693-697.
- COX N., RANDY H. (2002). Infant botulism. *Am. Fam. Physician*, 65: 1388-92.
- CRISEO G., BOLIGNANO M.S., DE LEO F. (1983). Isolation of *Clostridium botulinum* type B from sycilian honey samples. *Riv. Sci. Alimentari*, 2: 176-181.
- FENICIA L., FERRINI A.M., AURELI P., POCECCO M. (1993). A case of infant botulism association with honey feeding in Italy. *Eur. J. Epidemiol.*, 9: 671-673.
- FIORNI C., DONATO R., TISCIONE E., BIGALLI M.P., ADEMOLLO B. (1986). Sui caratteri microbiologici di alcuni mieli in commercio. *Riv. It. Ig.*, XLVI: 28-37.
- GOLDMAN A.S., GOLDBLUM R.M. (1989). Immunologic system in human milk: characteristic and effects. *Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy*. E. Leberthel ed., II ed., Raven Press, Ltd., New York. 654-670.
- HALL J.D., Mc CROSKEY L.M., PINCOMB B.J., HATHEWAY C.L. (1985). Isolation of *Clostridium baratii* which produces type F botulin toxin from an infant with botulism. *J. Clin. Microbiol.*, 21: 654-655.
- HATHEWAY C.L., WHALEY D.N., DOWELL V.R. (1980). Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. *Food Technology*, 3: 77-80.
- HAUSCHILD A.H.W., HILSHEIMER R., WEISS K.F., BURKE R.B. (1988). *Clostridium botulinum* in honey, syrups and dry infant cereals. *J. Food Prot.*, 51: 892-894.
- HOFFMAN R.E., PINCOMB B.J., SKEELS M.R., BURKHART M.J. (1982). Type F infant botulism. *Am. J. Dis. Child.*, 136: 270-271.
- LAGRANGE V. (1991). Ultrafiltration of honey. *American Bee Journal*, 131: 453.
- MAGGI E. (1997). Possibilità di contaminazione da *Cl. Botulinum* in alimenti secondari: il caso del miele. *Atti workshop "Il Clostridium botulinum nella catena alimentare"*, Cernobbio (CO), 31 gennaio 1997.
- McCROSKEY L.M., HATHEWAY C.L., FENICIA L., PASOLINI B., AURELI P. (1986). Characterization of an organism that produces type E botulin toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E *Botulinum*. *J. Clin. Microbiol.*, 23: 201-202.
- MIDURA T.F., SNOWDEN S., WOOD R.M., ARNON S.S. (1979). Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. *J. Clin. Microbiol.*, 9: 282-283.
- MOLAN P.C., ALLEN K.L. (1996). The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity honey. *J. Pharm.*, 48: 1206-1209.

- NEVAS M., HIELM S., LINDSTROM M., KOIVULETHO K., KORKEALA H. (2002). High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 45-52.
- PAISLEY J.W., LAURER B.A., ARNON S.S. (1995). A second case of infant botulism Type F caused by *Clostridium barati*. *Pediatric Infect Dis. J.*, 14: 912-914.
- POSTMES T., VAN DER BOGAARD A.E., HAZEN M. (1995). The sterilization of honey with cobalt 60 gamma radiation: a study of honey spiked with spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis*. *Experientia*, 29: 986-989.
- QUAGLIO P., MESSI P., FABIO A. (1988). Indagine sulla presenza di stiptiti batterici del genere *Clostridium* in campioni di miele. *Ig. Mod.*, 90: 486-496.
- SCHOCKEN-ITURRINO R.P., CARNEIRO M.C., KATO E., SORBARA J.O., ROSSI O.D., GERBASI L.E. (1999). Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 24: 379-382.
- SNOWDON J.A. (1997). Infant botulism: an overview. For the National Honey Board, 1-12. 390, Lashley Street, Longmont Co 80501-6010.
- SPIKA J.S., SHAFFER N., HARGRETT-BEAN N., COLLIN S., Mac DONALD K., BLAKE P.A. (1989). Risk factors for Infant Botulism in the United States. *Am. J. Dis. Child.*, 143: 828-832.
- SUGIYAMA H., MILLS D.C., CATHY KUO L.J. (1978). Number of *Clostridium botulinum* spores in honey. *J. Food Prot.*, 41: 848-850.
- SULLIVAN N.M., MILLS D.C., RIEMANN H.P., ARNON S.S. (1988). Inhibition of growth of *Clostridium botulinum* by intestinal microflora isolated from healthy infants. *Microbial. Ecol. Hlth. Dis.*, 1: 179-192.
- TANZI M.G., GABAY M.P. (2002). Association between honey consumption and infant botulism. *Pharmacotherapy*, 22: 1479-1483.