

**Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
“Уральская государственная медицинская академия”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии**

**Литусов Н.В.**

**ВОЗБУДИТЕЛЬ БОТУЛИЗМА**

**Иллюстрированное учебное пособие**

**Екатеринбург, 2013**

УДК 612

Рецензент: доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней ГБОУ ВПО УГМА Борзунов В.М.

Литусов Н.В. Возбудитель ботулизма. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМА, 2013. - 31 с.

В иллюстрированном учебном пособии рассматриваются вопросы истории открытия и изучения возбудителя ботулизма, его морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства, факторы патогенности, эпидемиология, патогенез и клинические симптомы заболевания, профилактика и лечение ботулизма.

Учебное пособие предназначено для внеаудиторной подготовки студентов, обучающихся по специальностям 060101 (лечебное дело), 060103 (педиатрия), 060105 (медико-профилактическое дело), 060201 (стоматология) и 060301 (фармация).

© Литусов Н.В.

© УГМА, 2013

## Содержание

Историческая справка.....	4
Классификация.....	6
Морфологические и тинкториальные свойства.....	6
Культуральные и биохимические свойства.....	8
Антигенная структура.....	11
Резистентность.....	11
Факторы патогенности.....	12
Эпидемиология.....	14
Патогенез ботулизма.....	15
Клиника ботулизма.....	18
Иммунитет.....	20
Диагностика ботулизма.....	21
Лечение.....	23
Профилактика ботулизма.....	24
Использование ботулинического токсина в медицине.....	25
Вопросы для контроля усвоения материала.....	27
Тренировочные тесты.....	27
Список учебной литературы.....	29

## Историческая справка

Ботулизм (лат. *botulus* – колбаса, ихтиизм – греч. *ichthys* – рыба, аллантиазис – греч. *allantos* – колбаса) - тяжелый пищевой токсикоз (пищевая интоксикация), развивающийся после употребления продуктов, содержащих ботулинический токсин. Заболевание характеризуется развитием парезов и параличей поперечно-полосатой и гладкой мускулатуры в результате блокады токсином выделения ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах.

Заболевание известно с древних времен (IX - X века) после употребления в пищу кровяной колбасы. В связи с этим византийский император Лев VI (рисунок 1) запретил употребление в пищу кровяной колбасы.



Рисунок 1 – Византийский император Лев VI (866 – 912 гг.).

В 1793 г. в Германии после употребления в пищу копченой кровяной колбасы одновременно заболело 13 человек, из них 6 человек скончалось. Аналогичные пищевые отравления колбасой с гибелью людей были описаны в Германии в 1795-1813 гг. Болезнь получила название ботулизм (лат. *botulus* - колбаса).

Впервые анализом причин возникновения ботулизма занялся немецкий профессор медицины Й. Аутенрит (рисунок 2).



Рисунок 2 – Йохан Аутенрит (Johann Hermann Heinrich Ferdinand von Autenrieth, 1772-1835 гг.).

В 1817 г. он опубликовал перечень симптомов, характерных для ботулизма. Этот список включал желудочно-кишечные расстройства и нарушения со стороны органов зрения (двоение в глазах и расширение зрачков). Описание многих случаев заболевания ботулизмом Й. Аутенриту представил немецкий санитарный врач Ю. Кернер (рисунок 3).



Рисунок 3 – Юстинус Кернер (Justinus Andreas Christian Kerner, 1786 – 1862 гг.).

Ю. Кернер считал, что причиной заболевания является наличие в колбасе “колбасного яда”, “жирного яда” или “жировой кислоты”. В 1822 г. он опубликовал монографию, в которой подробно описал эпидемиологию и клинику большого количества случаев ботулизма у человека и результаты испытаний яда на животных. Проведенные исследования позволили Ю. Кернеру сделать вывод о том, что ботулинический токсин нарушает передачу импульса в периферической нервной системе.

Возбудитель ботулизма открыл в 1869 г. бельгийский бактериолог Э. ван Эрменгем (рисунок 4), который выделил его из остатков ветчины и организма человека, погибшего после употребления этой ветчины.



Рисунок 4 - Эмиль ван Эрменгем (Emile Pierre Marie Van Ermengem, 1851-1932 гг.).

Э. Эрменгем установил, что в толще ветчины образуется токсин, который является причиной заболевания. В результате дальнейших исследований

выделенный Э. Эрменгемом возбудитель ботулизма был отнесен к типу А. С 1910 по 1960 гг. были выделены клостридии ботулизма, принадлежащие к типам В, С, D, Е, F, G.

В России ботулизм подробно описал в 1818 г. Эдуард Фердинанд Зенгбуш под названием ихтиизм. Возникновение заболевания связывалось с употреблением соленой и копченой рыбы.

За период с 1818 по 1913 г. в России было зарегистрировано 98 групповых вспышек ботулизма, при которых заболело 608 человек. За 1974-1982 гг. зарегистрирована 81 вспышка. С 2007 г. в Российской Федерации ежегодно регистрируется около 200 случаев заболеваемости ботулизмом с числом пострадавших около 300 человек. Летальность при ботулизме составляет 10-11% от числа заболевших. Так, в 2007 г. отмечено 15 летальных случаев. В 2010 г. в России зарегистрировано 26 летальных случаев. В 2011 г. зарегистрирован 91 случай ботулизма, при этом пострадало 160 человек (14 летальных случаев), в том числе 7 детей.

### Классификация

Возбудители ботулизма относятся к отделу *Firmicutes*, порядку *Clostridiales*, семейству *Bacillaceae*, роду *Clostridium*, виду *Clostridium botulinum*. Возбудитель ботулизма образует экзотоксины, различающиеся по антигенным свойствам. По структуре продуцируемого экзотоксина клостридии ботулизма подразделяются на 7 серотипов: *Cl. botulinum* А, *Cl. botulinum* В, *Cl. botulinum* С (подтипы С1 или С $\alpha$  и С2 или С $\beta$ ), *Cl. botulinum* D, *Cl. botulinum* Е, *Cl. botulinum* F и *Cl. botulinum* G. В патологии человека преобладают серотипы А, В, Е и редко - F.

### Морфологические и тинкториальные свойства

Возбудитель ботулизма может находиться в двух формах – вегетативной и споровой. Вегетативные клетки возбудителя ботулизма представляют собой крупные **грамположительные палочки** с закругленными концами размером (0.6-1,0)х(4-9) мкм. В мазках палочки располагаются одиночно, небольшими скоплениями или в виде коротких цепочек. Возбудитель ботулизма в неблагоприятных условиях образует **споры** (рисунок 5).

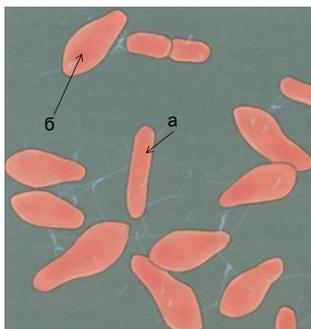


Рисунок 5 – Вегетативные клетки возбудителя ботулизма (а) и клетки со спорами (б), компьютерное изображение.

Споры возбудителя ботулизма овальные, располагаются терминально и субтерминально, придавая клетке форму **теннисной ракетки** (рисунок б).

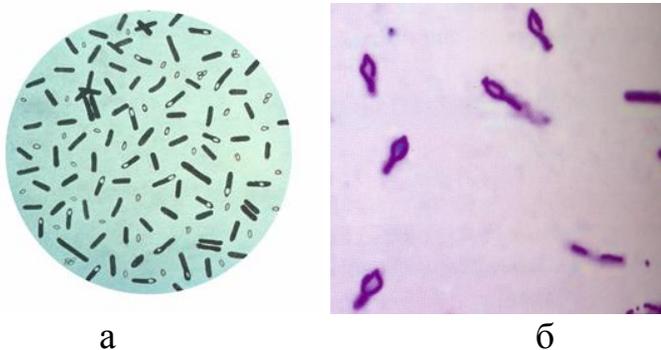


Рисунок 6 – Клетки возбудителя ботулизма в стадии спорообразования: а – схематическое расположение спор, б - окраска по Граму.

В окружающей среде споры сохраняют жизнеспособность десятилетиями. Кора споры состоит из пептидогликана, содержащего диаминопимелиновую кислоту. Снаружи и внутри кора имеет покрытия, содержащие вещества типа кератина (рисунок 7).

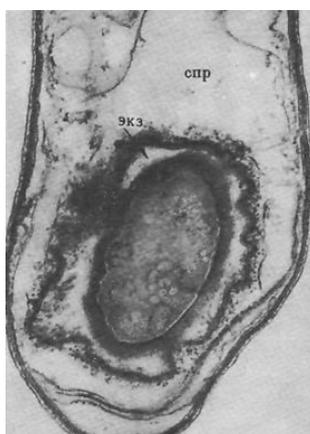


Рисунок 7 – Сформировавшаяся спора *Cl. botulinum* располагается в спорангии (спр) материнской клетки и окружена споровыми оболочками и экзоспориумом (экз).

Клостридии ботулизма не образуют капсул. За счет перитрихально расположенных жгутиков вегетативные клетки возбудителя ботулизма обладают подвижностью. У одной клетки может быть от 4 до 35 жгутиков (рисунок 8).

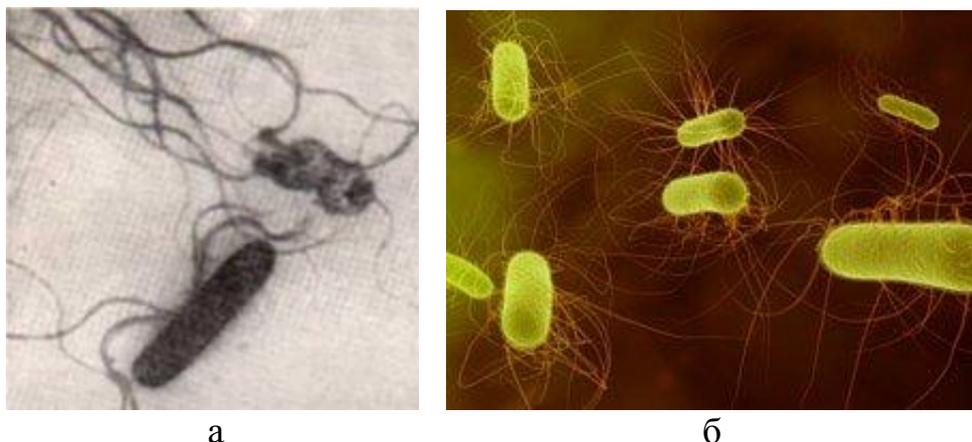


Рисунок 8 – Жгутики возбудителя ботулизма: а - электронная микроскопия, б – компьютерное изображение.

### Культуральные и биохимические свойства

Возбудитель ботулизма является строгим анаэробом. Оптимальная температура роста и токсинообразования  $28-35^{\circ}\text{C}$  в зависимости от серотипа возбудителя, рН - 7,3-7,6. Для выращивания клостридий применяется жидкая среда Китта-Тароцци, а также плотные питательные среды (печеночный агар, железосульфитный агар, глюкозно-кровоной агар Цейслера).

В среде Китта-Тароцци и МПБ в анаэробных условиях рост клостридий ботулизма сопровождается равномерным помутнением и небольшим газообразованием, при этом отмечается запах прогорклого масла (рисунок 9).

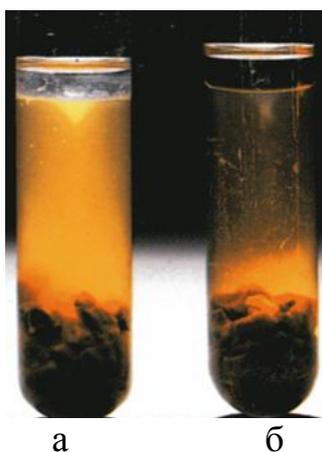


Рисунок 9 – Среда Китта-Тароцци: а - рост возбудителя ботулизма, б – контроль.

На печеночном или сахарном агаре в анаэробных условиях клостридии ботулизма формируют шероховатые колонии (рисунок 10).



Рисунок 10 – Рост клостридий ботулизма на печеночном агаре.

На кровяном агаре возбудитель ботулизма образует колонии с ровными или изрезанными краями и блестящей поверхностью, окруженные зоной гемолиза (рисунок 11).



Рисунок 11 – Рост возбудителя ботулизма на кровяном агаре.

На желатиновой среде формируются сероватые колонии, окруженные зоной разжиженного желатина. Протеолитические свойства наиболее выражены у бактерий, продуцирующих токсины типов А и В. Менее выражены протеолитические свойства у бактерий, синтезирующих токсин типа F, а у бактерий, продуцирующих токсины типов С, D и E, протеолитическая способность очень слабая.

На железо-сульфитном агаре (среде Вильсона-Блера) клостридии ботулизма в анаэробных условиях формируют колонии черного цвета за счет образования сульфида железа под влиянием продуцируемого бактериями сероводорода (рисунок 12).

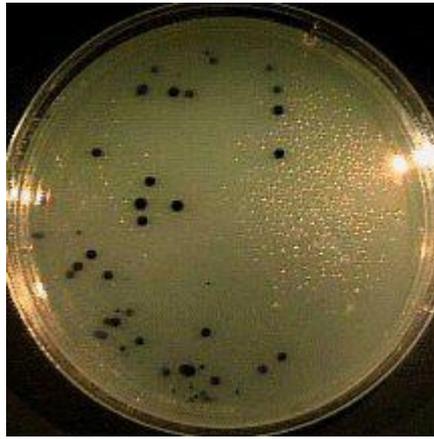


Рисунок 12 – Рост клостридий ботулизма на среде Вильсона-Блера.

Все типы возбудителя ботулизма продуцируют желатиназу и лецитиназу (рисунок 13).



Рисунок 13 – Образование лецитиназы (радужный венчик вокруг колоний) возбудителем ботулизма.

*C. botulinum* ферментирует с образованием газа и кислоты глюкозу, левулезу, мальтозу, глицерин, декстрин, салицин, адонит, инозит и не разлагает галактозу, сахарозу, дульцит, маннит, арабинозу и рамнозу. Однако эти свойства непостоянны.

По биохимическим свойствам выделяют 4 группы *Cl. botulinum*:

- бактерии I группы обладают выраженными протеолитическими свойствами, гидролизуют желатин и эскулин, ферментируют глюкозу и мальтозу, проявляют липазную активность (в эту группу входят штаммы, продуцирующие нейротоксин типа А, и протеолитические штаммы, продуцирующие нейротоксины типов В и F);

- бактерии II группы ферментируют глюкозу и мальтозу, но не обладают протеолитической активностью (эта группа объединяет непротеолитические штаммы, продуцирующие нейротоксины типов В и F, и все штаммы, продуцирующие токсин типа E);

- бактерии III группы обладают липазной активностью и гидролизуют желатин (группа включает штаммы, продуцирующие токсины типов С и D);

- бактерии IV группы гидролизуют желатин, но не обладают сахаролитическими свойствами и липазной активностью (эта группа представлена

протеолитическими, но не сахаролитическими штаммами, продуцирующими токсины типа G).

### Антигенная структура

Серотипы возбудителя ботулизма сходны по морфологическим, культуральным свойствам и действию на организм человека. Каждый тип токсина отличается друг от друга по антигенной структуре. Поэтому выделяют 7 антигенных вариантов возбудителя ботулизма (А, D, С, D, Е, F, G). Специфичность каждого варианта выявляют в реакции с анитоксическими сыворотками.

В вегетативных клетках возбудителя ботулизма выявляют соматический О-антиген и жгутиковый Н-антиген. Эти антигены идентифицируются в реакции агглютинации. Соматический О-антиген является групповым, общим для протеолитических штаммов *C. botulinum* сероваров А и В. Жгутиковый Н-антиген является типоспецифическим. Он идентичен у бактерий, различающихся по варианту экзотоксинов.

### Резистентность

В природе возбудитель ботулизма встречается в почве, навозе, воде, иле водоемов, в кишечнике животных и рыб. В окружающей среде споры возбудителя ботулизма сохраняются в течение длительного времени, а при благоприятных условиях прорастают и размножаются. Споры выдерживают кипячение в течение 3-6 часов, автоклавирование – в течение 30 минут. Под воздействием 20% формалина и 6% перекиси водорода споры погибают через 24 часа, под воздействием 10% раствора соляной кислоты – через 1 час. В 14-15% растворе хлористого натрия споры сохраняют жизнеспособность в течение 2 месяцев.

Споры клостридий ботулизма разных сероваров различаются по устойчивости к повышенной температуре. Например, споры сероваров А, В и F наиболее устойчивы к кипячению; споры серовара Е обладают низкой устойчивостью, а споры сероваров С и D имеют промежуточную степень терморезистентности. При нагревании до 105°C споры возбудителя ботулизма погибают через 2 часа, при 120°C - через 20-30 минут. Поэтому надежным способом обезвреживания спор возбудителя ботулизма является автоклавирование при 120°C в течение не менее 30 минут.

В высушенном состоянии споры сохраняют жизнеспособность несколько десятилетий. Они хорошо переносят низкие температуры. При температуре минус 16°C споры сохраняются в течение года.

Вегетативные клетки возбудителя ботулизма при температуре 80°C погибают через 30 минут, при кипячении - через 5 минут.

Ботулинический токсин достаточно устойчив к воздействию неблагоприятных условий внешней среды. Он выдерживает температуру 80°C в течение 30-60 минут, кипячение - в течение 10-25 минут. Токсин устойчив к

действию пепсина и трипсина, выдерживает высокие концентрации поваренной соли, не разрушается в консервированных продуктах, содержащих различные специи. В консервах ботулинический токсин сохраняется в течение 6-8 месяцев. При температуре ниже 8<sup>0</sup>С токсин в консервированных продуктах обычно не накапливается. Образование токсина не происходит при концентрации в консервах хлорида натрия более 11%. При производстве консервов также учитывают, что *Cl. botulinum* не развивается в продуктах с рН ниже 3,7. Для исключения опасности заражения целесообразно равномерно прогреть консервированный продукт при температуре 100<sup>0</sup>С в течение 10 минут или при температуре 80<sup>0</sup>С в течение 30 минут. Копчение, вяление, соление и замораживание продуктов не снижает активности токсина.

### Факторы патогенности

Основным **фактором патогенности** возбудителя ботулизма является ботулинический экзотоксин, продуцируемый вегетативными клетками. К факторам патогенности клостридий ботулизма относятся также **ферменты агрессии**: протеиназы, лецитиназы, декарбоксилазы.

**Ботулинический токсин** представляет собой белок, обладающий **нейротоксическим действием**. Ботулотоксин является самым сильным ядом: 1 г кристаллического токсина содержит 10<sup>12</sup> смертельных для человека доз. Смертельная доза для человека составляет 1 нг/кг массы тела, то есть менее 1 мкг на человека. Например, для человека весом 70 кг летальная доза ботулинического токсина типа А составляет около 0,09-0,15 мкг внутривенно или внутримышечно, 0,7-0,9 мкг ингаляционно и 70 мкг перорально. Летальность при поражении ботулиническим токсином составляет 35-85%.

Токсинообразование у бактерий типов С, D и E детерминировано генами умеренных фагов и проявляется при интеграции ДНК бактериофага в бактериальную хромосому. У остальных типов возбудителя токсинообразование определяется хромосомными генами.

Ботулинические токсины всех типов синтезируются в виде комплексов (протоксинов), состоящих из нейротоксина и нетоксического белкового компонента, включающего гемагглютинин (НА) и нетоксический негемагглютинирующий белок (NTNH). Протоксин имеет молекулярную массу 450 кД. Действующим началом является нейротоксин. Однако нейротоксин без других белков комплекса является очень лабильным. Белковый компонент является стабилизатором и защищает нейротоксин от действия протеолитических ферментов и соляной кислоты пищеварительного тракта. У ботулинических токсинов идентифицировано 3 типа гемагглютининов (НА17, НА35 и НА70). Структура ботулинического токсина представлена на рисунке 14.

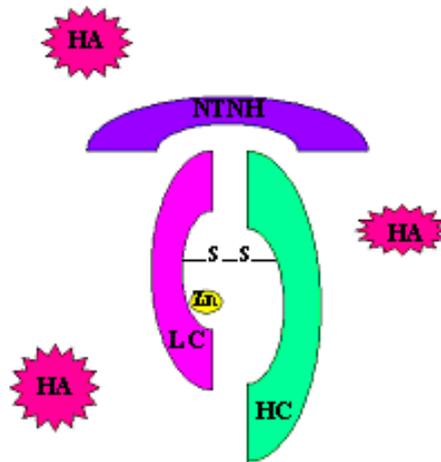


Рисунок 14 – Структура ботулинического токсина. Нейротоксин состоит из 2 субъединиц (легкой цепи LC и тяжелой цепи HC), соединенных дисульфидной связью. Токсин удерживает около себя нетоксичные протеины: гемагглютинины (HA) и негемагглютинин (NTNH).

Все ботулинические нейротоксины синтезируются в виде полипептида с молекулярной массой около 150000 Д. В результате действия протеаз происходит активация токсина. У большинства типов возбудителя протеолиз осуществляется собственными клостридиальными (эндогенными) протеазами, а у возбудителя типа E – экзогенными протеазами желудочно-кишечного тракта. В последующем в результате действия протеаз токсин распадается на 2 субкомпонента: L-легкую цепь (молекулярная масса 50 кД) и H-тяжелую цепь (молекулярная масса 100 кД). Между ними сохраняется дисульфидная связь. Легкая цепь после разрушения дисульфидной связи приобретает цинк-эндопептидазную активность (рисунок 15).

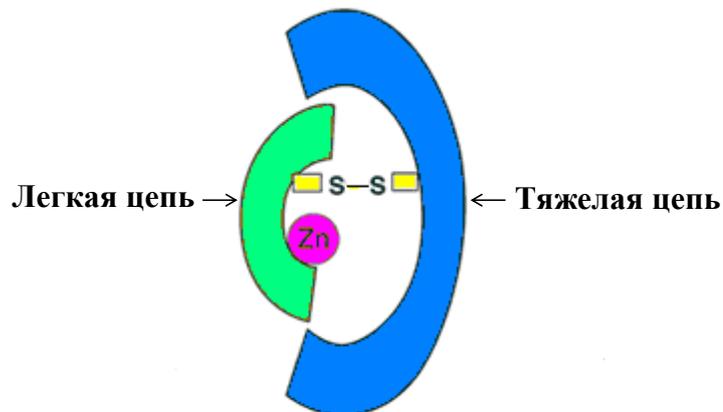


Рисунок 15 – Структура ботулинического нейротоксина.

Тяжелая цепь соответствует фрагменту B (акцептор) бинарного токсина. Посредством С-концевого (рецепторсвязывающего) домена тяжелая цепь связывается с рецепторами на мембране аксона, а с помощью N-концевого (транслокационного) домена перемещает легкую цепь через мембрану в цитозоль нервной клетки. Легкая цепь токсина соответствует фрагменту A (активатору) бинарного токсина и оказывает непосредственное токсическое действие на клетку-

мишень (мотонейрон). Легкая цепь разрушает транспортные белки, отвечающие за слияние секреторного пузырька с пресинаптической мембраной (рисунок 16).

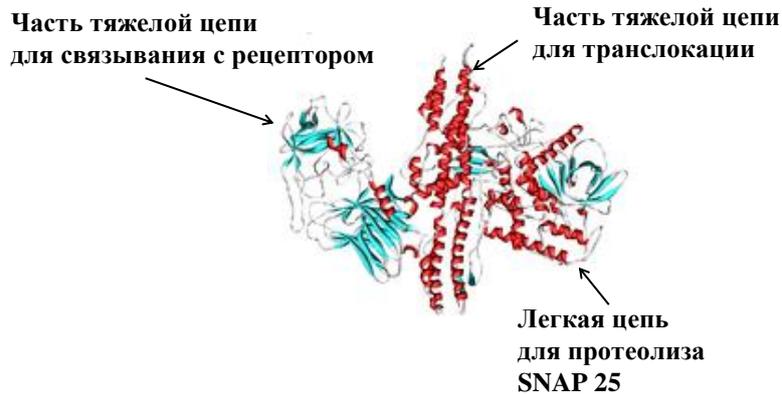


Рисунок 16 - Трехмерная структура молекулы ботулинического нейротоксина типа А.

В результате протеолиза транспортных белков нарушается слияние синаптического пузырька с мембраной, высвобождение ацетилхолина в синаптическую щель и передача импульса с нервного волокна на мышцу.

Гены, детерминирующие синтез ботулинического токсина, собраны в кластер, который располагается на бактериальной хромосоме, плазмиде или в геноме бактериофага. Обычно клетки одного штамма продуцируют один тип токсина. Гены токсинообразования могут переноситься между разными штаммами посредством трансформации, конъюгации или трансдукции.

Добавление к ботулиническому токсину 0,3-0,5% формалина и инкубирование смеси в термостате при температуре 36-37°C в течение 3-4 недель приводит к полной потере токсичности. Обезвреженный таким способом токсин называется **анатоксином**. Ботулинический анатоксин используют для иммунизации людей, а также для гипериммунизации животных (лошадей) с целью получения гипериммунных сывороток (антитоксинов).

## Эпидемиология

Возбудитель ботулизма обнаруживается в почве, иле озер и прудов, в кишечнике разных видов домашних и диких животных, птиц и рыб (транзитное состояние). Ботулизм регистрируется повсеместно. Больной человек не представляет опасности для окружающих. В естественных условиях **резервуаром и источником** возбудителя инфекции является **почва**. **Механизм передачи – фекально-оральный. Путь передачи – алиментарный**. Попадая в пищевые продукты, споры клостридий ботулизма прорастают и образуют токсин. Наибольшую опасность представляют приготовленные с нарушением технологического режима мясные, рыбные и овощные герметически укупоренные консервы домашнего приготовления, ветчина, колбасы, копченая и вяленая рыба,

маринованные в домашних условиях грибы. В России чаще регистрируются заболевания, связанные с употреблением консервированных в домашних условиях грибов, копченой или вяленой рыбы, в европейских странах – мясных и колбасных изделий, в США – бобовых консервов, в Японии – рыбы и морепродуктов. В некоторых плотных пищевых продуктах отмечается неравномерное (“гнездное”) накопление токсина, поэтому часто встречаются вспышки, при которых заболевают не все лица, употреблявшие один и тот же продукт. Токсин образуется в продуктах питания при подходящих условиях (рН более 4,5, отсутствие кислорода). При этом внешний вид продуктов и их органолептические свойства не меняются (рисунок 17).



Рисунок 17 – Продукты питания - причина ботулизма.

Иногда при размножении возбудителя в результате образования газов наблюдается бомбаж (вздутие) консервных банок.

Ботулизм регистрируется в виде спорадических случаев и групповых заболеваний. Сезонность не выражена.

Заболевание, возникшее в результате попадания нейротоксина в желудочно-кишечный тракт вместе с пищевыми продуктами, протекает как пищевой токсикоз или пищевая интоксикация. В некоторых случаях заболевание развивается при попадании спор возбудителя в рану и размножении в ней (раневого ботулизма) или в результате размножения попавших с пищей спор в кишечнике ребенка (ботулизм детского возраста). В этих случаях происходит размножение возбудителя и продуцирование токсина в организме пострадавшего. Заболевание при таких путях заражения протекает как токсикоинфекция.

### Патогенез ботулизма

Патогенез пищевого ботулизма включает следующие стадии:

1. Споры возбудителя ботулизма попадают в пищевые продукты, где в процессе размножения в анаэробных условиях продуцируют токсин.

2. Токсин вместе с пищевыми продуктами попадает в организм человека, сорбируется на клетках слизистой оболочки кишечника и всасывается в кровь. Токсин может всасываться также через слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей.

3. Вместе с кровью токсин разносится по организму, попадает в мышцы и достигает периферических нервных окончаний, где нарушает передачу сигнала с

нервного окончания на мышечное волокно путем блокировки выделения ацетилхолина в мионевральные синапсы (“химическая денервация”). В результате этого нарушается передача нервного импульса в мышцу, и развиваются характерные параличи мышц.

В норме для передачи сигнала с нервной клетки на мышечное волокно необходим выброс ацетилхолина из нервного окончания в синаптическую щель (рисунок 18).

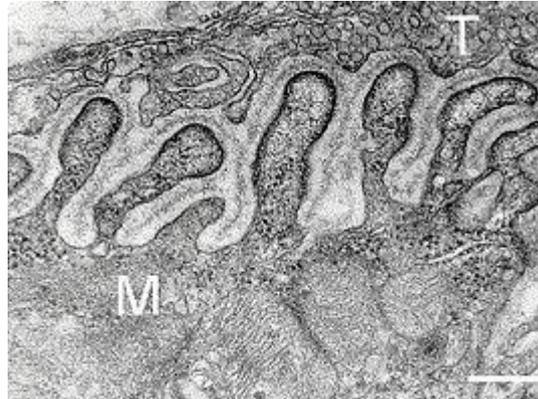


Рисунок 18 - Электронная микрофотография среза нервно-мышечного синапса: Т – окончание аксона, М – мышечное волокно.

Для этого выброса мембрана находящегося в нервном окончании синаптического пузырька, содержащего ацетилхолин, сливается с пресинаптической мембраной аксона. В процессе выброса ацетилхолина из синаптического пузырька в синаптическую щель участвуют специфические транспортные белки нервной клетки, входящие в белковый комплекс SNARE.

**SNARE** (англ. soluble NSF attachment receptor) – это группа белков, осуществляющих слияние внутриклеточных везикул с клеточной мембраной и экзоцитоз нейромедиаторов в синаптическую щель. В комплекс SNARE входят белки синаптобревин, синтаксин и SNAP-25. **Синаптобревин** является небольшим трансмембранным белком секреторных везикул (везикуло-ассоциированный мембранный белок, VAMP). **SNAP-25** (синаптосомально-ассоциированный протеин) осуществляет стыковку синаптического пузырька с пресинаптической мембраной нейрона, а синтаксин обеспечивает слияние синаптического пузырька с пресинаптической мембраной. При этом синаптобревин располагается на поверхности синаптического пузырька, а синтаксин и SNAP-25 - на пресинаптической мембране. Ацетилхолин, высвобождающийся из нервного окончания в синаптическую щель, связывается с рецепторами на поверхности мышечной клетки и вызывает сокращение иннервируемой мышцы (рисунок 19).

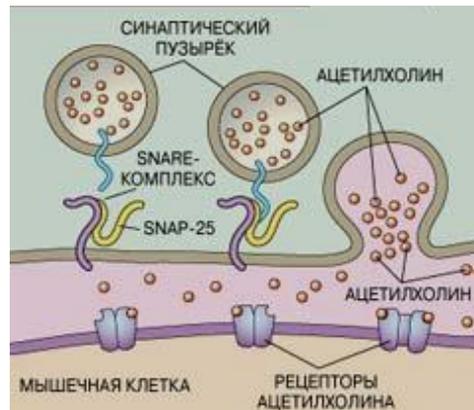


Рисунок 19 – Процесс передачи нервного импульса на мышечную клетку в норме.

При ботулизме попавший в продукт возбудитель размножается и синтезирует токсин. Вместе с пищей токсин проникает в организм человека. Всасывание токсина происходит через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, начиная с полости рта, но наибольшее количество - через слизистую оболочку желудка и тонкой кишки. Всосавшийся токсин попадает в лимфу, а затем - в кровь. С током крови токсин заносится в синаптическую щель. В синаптической щели ботулотоксин с помощью тяжелой цепи связывается со специфическими гликопротеиновыми рецепторами на пресинаптической мембране и в течение 30 минут путем рецептор-опосредованного эндоцитоза проникает в нервное окончание (интернализация токсина).

В нервном окончании токсин формирует везикулы, в которых дисульфидный мостик между цепями токсина разрывается, и легкая цепь через поры выходит в цитозоль нервной клетки. В цитозоле легкая цепь связывается с синаптическими белками, которые участвуют в выбросе ацетилхолина из нервного окончания в пресинаптическую щель, и разрушает эти белки. В частности, мишенью для токсинов типов А и Е является белок SNAP-25, токсинов типов В, D, F и G – синаптобrevин, токсина типа С – синтаксин и SNAP-25. В результате разрушения синаптических белков не происходит слияния ацетилхолиновых пузырьков с пресинаптической мембраной, ацетилхолин в синаптическую щель не попадает, и сигнал на мышцу не поступает (рисунок 20).



Рисунок 20 – Действие ботулинического токсина в организме.

Результатом действия ботулинического токсина является развитие вялых параличей. Экспериментально установлено, что для блокирования одного синапса достаточно 10 молекул ботулинического токсина. В первую очередь нарушается иннервация мышц глазодвигательного аппарата, мышц глотки и гортани. В результате нарушения вегетативной иннервации снижается секреция слюнных, слезных, потовых желез (парез желудочно-кишечного тракта, гипогидроз).

Поражение, вызванное ботулиническим токсином, является обратимым и со временем двигательная функция полностью восстанавливается. Восстановление двигательной активности происходит за счет образования новых синаптических связей.

### Клиника ботулизма

В соответствии с рекомендациями ВОЗ различают 4 категории ботулизма:

- **пищевой ботулизм**, возникающий после употребления в пищу продуктов, содержащих накопившийся ботулинический токсин;
- **раневой ботулизм**, развивающийся при загрязнении почвой раны, в которой имеются анаэробные условия для прорастания попавших спор и токсинообразования;
- **ботулизм детского возраста** (ботулизм новорожденных, ботулизм младенцев), возникающий у детей первого года жизни при попадании спор возбудителя ботулизма с пищей;
- **неклассифицированный ботулизм**, при котором не бывает установленной связи заболевания с каким-либо пищевым продуктом.

Основной формой заболевания является **пищевой ботулизм**, который возникает при употреблении продуктов, содержащих ботулинический токсин. При этом **инкубационный период** колеблется от 2 часов до 4 дней в зависимости от дозы токсина. В единичных случаях инкубационный период продолжается до 9-12 дней. Чаще всего инкубационный период при ботулизме составляет 18-36 часов. Вначале появляются **желудочно-кишечные расстройства** - тошнота, рвота, боли в животе. Лихорадка, как правило, отсутствует. Затем развиваются **неврологические** симптомы. Наиболее типичными ранними признаками ботулизма являются офтальмоплегический и бульбарный синдромы. **Офтальмоплегический синдром** проявляется жалобами на нарушение зрения: двоение предметов (диплопия), туман перед глазами. При обследовании выявляются **блефароптоз** (опущение верхнего века), горизонтальный **нистагм** (непроизвольные колебательные движения глаз), **мидриаз** (расширение зрачка), **анизокория** (поражение сфинктера зрачка), вялая реакция зрачка на свет (рисунки 21 и 22).



Рисунок 21 – Блефароптоз.



Рисунок 22 – Мидриаз.

Одновременно с глазными симптомами появляются признаки поражения ядер IX и XII пар черепных нервов (**бульбарный синдром**): нарушение речи (гнусавость или осиплость голоса вплоть до полной афонии), затруднение глотания (дисфагия), ограничение подвижности мягкого неба и языка, гиперсаливация или гипосаливация (рисунок 23).



Рисунок 23 - Бульбарный синдром.

Для ботулизма характерна симметричность неврологической симптоматики. В последующем у больного отмечается прогрессирующая мышечная слабость в результате развития двусторонних нисходящих вялых параличей мышц: вялость движений, адинамия, парезы и параличи глоточных, гортанных мышц, мышц шеи и конечностей (рисунок 24).

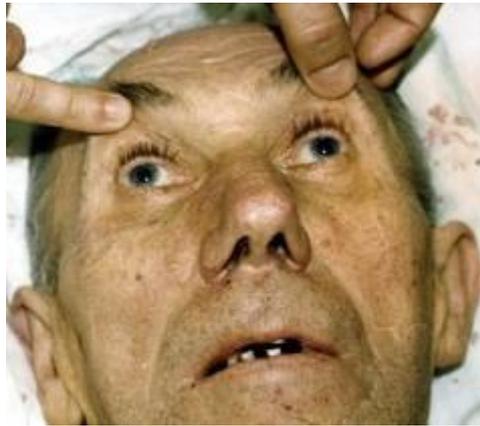


Рисунок 24 – Общий вид больного ботулизмом.

Слабость затылочных мышц приводит к тому, что голова свисает, и больные вынуждены поддерживать ее руками. Слабость межреберных мышц выражается поверхностным дыханием. Из-за слабости скелетной мускулатуры больные малоподвижны. Смерть наступает от острой дыхательной недостаточности на фоне сохраненной сердечной деятельности и ясного сознания. Выздоровление протекает медленно – в течение нескольких месяцев.

**Раневой ботулизм** возникает в результате попадания спор в рану, в которой создаются анаэробные условия. При прорастании спор и образовании вегетативных клеток продуцируется ботулинический токсин, который всасывается и вызывает развитие типичных неврологических симптомов. Симптоматика со стороны желудочно-кишечного тракта отсутствует.

**Ботулизм новорожденных** (ботулизм грудных детей, ботулизм младенцев) наблюдается у детей первого года жизни. Заболевание возникает в основном в социально неблагополучных семьях, проживающих в неудовлетворительных санитарно-гигиенических условиях. В кишечнике ребенка, у которого собственная микрофлора еще не сформирована, попавшие споры прорастают и продуцируют токсин. Образующийся токсин всасывается в кровь и достигает клеток-мишеней. Первыми симптомами заболевания являются вялость, слабое сосание, задержка стула. Затем появляются офтальмоплегические симптомы, хриплый плач.

## Иммунитет

У отдельных людей встречается индивидуальная устойчивость к ботулиническому токсину. Однако естественный иммунитет к ботулизму у человека отсутствует. После заболевания иммунитет также не формируется, так как поражающая доза токсина во много раз меньше иммуногенной дозы.

## Диагностика ботулизма

Диагностика ботулизма основана на клинической картине заболевания (нарушение зрения, глотания, речи, мышечная слабость), эпидемиологических данных (употребление подозрительных консервированных продуктов) и результатов лабораторных исследований. Лабораторная диагностика в первую очередь направлена на **обнаружение токсина и установление его типа**. Выделение возбудителя является вторичным этапом исследований.

**Исследуемым материалом при** диагностике ботулизма являются промывные воды желудка, кровь, рвотные массы, фекалии, моча, секционный материал, остатки пищевых продуктов. Пробы отбирают в максимально короткие сроки после заболевания в стерильную посуду, не обработанную дезинфицирующими средствами. Консерванты не добавляют. До поступления в лабораторию исследуемый материал хранят в холодильнике при температуре 4-6<sup>0</sup>С.

Кровь исследуют на наличие токсина (биопроба на мышах), фекалии – на наличие возбудителя (посев на питательные среды), остальной материал – на наличие токсина и возбудителя. В качестве экспрессных методов диагностики ботулизма используются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА).

Основным методом диагностики ботулизма является выявление токсина. Для обнаружения токсина в исследуемом материале используют **реакцию нейтрализации** токсина на лабораторных животных (биопроба). Для обнаружения токсинов для каждой пробы используют 4 белых мышей. Первое животное подкожно заражают только исследуемым материалом, а остальных мышей - смесью материала с 200 МЕ антитоксической диагностической сыворотки типов А, В и Е. Предварительно смеси выдерживают при комнатной температуре в течение 40 минут для нейтрализации токсина антитоксином. Наблюдение за животными проводят в течение 4 дней. При наличии в материале токсина в течение 4-5 часов погибают все животные, кроме той мыши, которой была введена смесь токсина и гомологичной антитоксической сыворотки (рисунок 25).

**Смеси исследуемого материала  
с антитоксическими сыворотками**

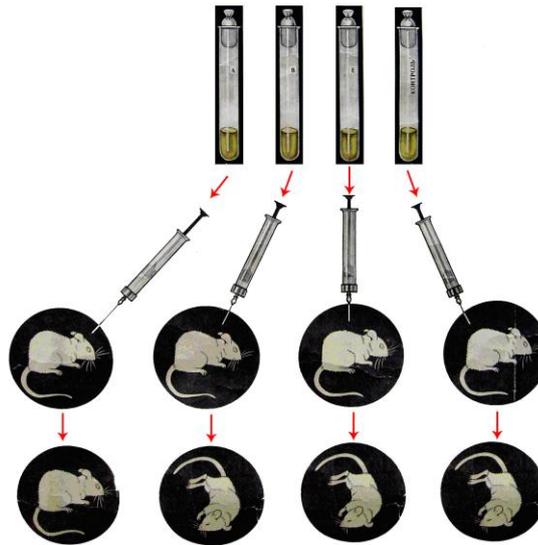


Рисунок 25 – Схема постановки биопробы на белых мышах.

При введении материала, содержащего ботулинический токсин, у мышей отмечается учащенное дыхание, полное расслабление мышц, развивается типичный симптом поражения - “осиная талия” (рисунок 26).



Рисунок 26 – Внешнее проявление действия ботулинического токсина на белых мышей.

Для обнаружения и идентификации токсина используют также **РПГА** с эритроцитарными иммуноглобулиновыми диагностикумами моноспецифическими типов А, В и Е или диагностикумом ботулиническим эритроцитарным иммуноглобулиновым поливалентным типов А, В и Е. Иммуноглобулиновый (антительный) диагностикум представляет собой эритроциты, сенсibilизированные антитоксином соответствующего типа.

**ИФА** и **РПГА** используются для быстрого анализа подозрительных продуктов на присутствие в них ботулинического токсина.

Перспективным методом диагностики ботулизма является **ПЦР**, позволяющая идентифицировать возбудитель в пищевых продуктах и содержимом кишечника.

Выделение возбудителя производят из кала больного и остатков пищи путем посева в среду Китта-Тароцци и культивирования в анаэробных условиях. Выросшую культуру идентифицируют по морфологическим и тинкториальным свойствам (микроскопия окрашенных по Граму мазков), ферментативной активности и в реакции нейтрализации на мышах с противоботулиническими сыворотками.

Серологические исследования при диагностике ботулизма не проводятся, так как заболевание не сопровождается выработкой антител.

## Лечение

Лечение больного ботулизмом проводится в стационаре. Первая помощь заключается в промывании желудочно-кишечного тракта 2-5%-ным раствором гидрокарбоната натрия. После промывания желудка больным вводят энтеросорбенты. Затем вводят лечебные противоботулинические сыворотки, которые выпускаются в жидком и лиофильно высушенном виде. До установления типа токсина, вызвавшего заболевание, больному вводят внутримышечно **поливалентную антитоксическую сыворотку** или смесь сывороток типов А и Е по 10000 МЕ и типа В 5000 МЕ. После установления типа токсина на белых мышах вводят соответствующую **моновалентную антитоксическую сыворотку** (рисунок 27).



Рисунок 27 – Противоботулиническая сыворотка.

Перед введением сыворотки ставят внутрикожную пробу с разведенной 1:100 сывороткой для выявления повышенной чувствительности к лошадиному белку. Антитоксическую сыворотку вводят по методу Безредка (0,1 мл подкожно, через 15 минут - 0,2 мл, еще через 15 минут – внутримышечно всю дозу сыворотки, предварительно подогретой до 36-37°C). Противоботулиническая сыворотка представляет собой сыворотку крови лошадей, гипериммунизированных анатоксинами возбудителя ботулизма. В качестве консерванта в сыворотку добавляют 0,5% хлороформа.

Для лечения ботулизма младенцев в США разработан человеческий противоботулинический иммуноглобулин, получаемый от людей, иммунизированных пентавалентным ботулиническим анатоксином.

Наряду с сыворотками используют **антибиотики** (левомицетин, тетрациклин), детоксикационные, симптоматические и общеукрепляющие средства. Противопоказано применение аминогликозидных антибиотиков (гентамицина, тобрамицина), которые усиливают эффект ботулинических токсинов.

При раневом ботулизме проводят тщательную хирургическую обработку раны с последующим использованием антисептиков.

## Профилактика ботулизма

**Неспецифическая профилактика** включает комплекс санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на предотвращение попадания бактерий и их спор в пищевые продукты, соблюдение санитарно-гигиенических правил при производстве пищевых продуктов (колбас, консервов). Большое значение имеет разъяснительная работа с населением. При домашнем консервировании продукты следует тщательно мыть, использовать тепловую обработку банок, крышек, продуктов. Хранить домашние консервы следует при температуре 3-6<sup>0</sup>С. Консервы из банок, имеющих признаки бомбажа, не следует использовать в пищу. Приготовленные в домашних условиях консервированные продукты после вскрытия банок целесообразно перед употреблением прогреть при 100<sup>0</sup>С в течение 30 минут для разрушения токсина. Продукты питания, не подлежащие термической обработке (соленая или копченая рыба), должны храниться при температуре не выше 10<sup>0</sup>С.

Лицам, употреблявшим подозрительный продукт, проводят **экстренную профилактику** с помощью поливалентной или моновалентной (типов А, В, Е) лошадиной сыворотки. С этой целью внутримышечно вводят по 1000-2000 МЕ противоботулинических сывороток типов А, В, Е. За этими лицами проводят медицинское наблюдение в течение 12 дней. Остатки подозрительной пищи изымаются и подвергаются бактериологическому исследованию.

**Специфическая профилактика** проводится с помощью ботулинического **полианатоксина** (трианатоксина, содержащего анатоксины типов А, В, Е) в составе секстанатоксина, который кроме ботулинических анатоксинов содержит анатоксины *Cl. perfringens*, *Cl. novyi* и *Cl. tetani*. Иммунизация трехкратная. Последующие однократные ревакцинации проводят через каждые 5 лет.

Для специфической профилактики применяют также **тетраанатоксин** очищенный адсорбированный жидкий, формирующий иммунитет против ботулизма и столбняка продолжительностью не менее 5 лет. Этот препарат представляет собой смесь адсорбированных на геле гидроокиси алюминия ботулинических анатоксинов типов А, В, Е и столбнячного анатоксина (рисунок 28). Курс иммунизации состоит из 3 прививок.



Рисунок 28 – Тетраанатоксин.

Одна доза тетраанатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС анатоксина типа А, по 3 ЕС анатоксинов типов В и Е и 2,5 ЕС столбнячного анатоксина. Одна доза трианатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС анатоксина типа А и по 3 ЕС анатоксинов типов В и Е.

Активная иммунизация осуществляется лицам, имеющим контакт с ботулиническим токсином (работники медицинских предприятий, исследовательских лабораторий). Для установления напряженности иммунитета после вакцинации разработан метод иммуноферментного определения титров противоботулинических антител типа А в сыворотке крови. Наличие антител регистрируют в сыворотке крови в титре 1:400 – 1:3200 после второго введения препарата.

### **Использование ботулинического токсина в медицине**

В конце 60-х годов XX века Alan Scot открыл лечебные свойства ботулинического токсина. В 1977 г. впервые применили ботулинический токсин в качестве лечебного средства у пациентов со страбизмом (косоглазием). После этого ботулотоксин стали применять для лечения блефароспазма. В последующем препараты ботулинического токсина стали использоваться для лечения детского церебрального паралича, оро-мандибулярной дистонии, спастической кривошеи, ларингеальной дистонии, дистонии шейки матки, лицевого гемиспазма, гипергидроза. В косметологии ботулотоксин применяется для эстетической коррекции мимических морщин. В медицинской практике ботулинический токсин используется под торговыми названиями “Ботокс”, “Диспорт”, “Ксеомин”, “Нейроблок”, “Лантокс” и др. (рисунок 29).



Рисунок 29 – Лечебный препарат ботулинического токсина типа А “Ботокс”.

Эти препараты состоят из ботулинического токсина и вспомогательных веществ. В качестве вспомогательных веществ используют сыворотку крови человека, альбумин, лактозу, сахарозу, сукцинат натрия и др. Некоторые препараты (в частности, “Ксеомин”) не содержат нетоксичные белки (гемагглютинирующий и негемагглютинирующий протеины). Лечебные препараты ботулинического токсина оказывают миорелаксирующее действие, поэтому используются для разглаживания морщин, ослабления чрезмерной мышечной активности. Препараты вводятся подкожно в мимические мышцы (рисунок 30).



Рисунок 30 – Инъекция “Ботокса”.

При внутримышечном введении действие токсина проявляется спустя 2-3 дня, достигает максимума примерно через 2 недели, а спустя 2,5 месяца начинает медленно уменьшаться. Клинические эффекты проявляются через 2-10 дней. Отравление токсином при этих манипуляциях невозможно, так как используются очень низкие концентрации. При введении в терапевтических дозах ботулотоксин не проникает через гематоэнцефалический барьер.

Через 1-2 месяца после введения препарата начинается процесс отрастания новых терминалей от аксона, в котором был блокирован транспорт ацетилхолина. В результате этого образуются новые функционально активные нервно-мышечные синапсы. Рост аксонов в направлении клеток-мишеней, обеспечивающий

“реусиление” существующих связей, обозначается термином **спрутинг** (рисунок 31).

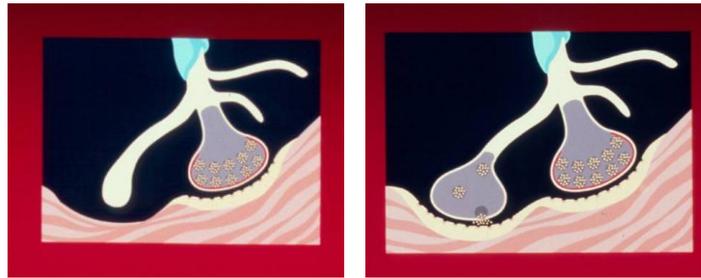


Рисунок 31 – Регенерация нервных отростков и формирование нового нервно-мышечного синапса (спрутинг).

В результате этого через 3-6 месяцев после инъекции мышечный тонус восстанавливается.

За 2011 г. во всем мире на медицинские и косметологические цели израсходовано около 1 г чистого ботулинического токсина.

### Вопросы для контроля усвоения материала

1. Расскажите о таксономическом положении возбудителя ботулизма.
2. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства возбудителя ботулизма.
3. Назовите культуральные и биохимические особенности возбудителя ботулизма.
4. Расскажите о структуре ботулинического токсина.
5. Как происходит заражение человека ботулизмом?
6. Охарактеризуйте патогенез ботулизма.
7. Назовите клинические симптомы ботулизма.
8. Расскажите о методах диагностики ботулизма.
9. В чем заключается профилактика ботулизма?
10. Какие средства применяют для лечения ботулизма?

### Тренировочные тесты

1. Возбудителя ботулизма открыл:
  - Л. Пастер
  - + Э. Эрменгем
  - Р. Кох
  - И.И. Мечников
  - И.Д. Ивановский

2. Возбудитель ботулизма относится к семейству:

- *Enterobacteriaceae*
- + *Bacillaceae*
- *Micrococcaceae*
- *Corynebacteriaceae*
- *Neisseriaceae*

3. Отличительные признаки клостридий:

- грамотрицательные палочки
- + спорообразующие бактерии
- капсулообразующие диплококки
- + перитрихи
- извитые бактерии

4. Для выращивания клостридий ботулизма используют питательную среду:

- Эндо
- Левина
- висмут-сульфитный агар
- + Китта-Тароцци
- + Вильсона-Блера

5. Факторами патогенности возбудителя ботулизма являются:

- энтеротоксин
- эндотоксин
- + нейротоксин
- муциназа
- уреазы

6. По механизму действия ботулотоксин является:

- лейкоцидином
- ингибитором синтеза белка
- активатором аденилатциклазы
- + блокатором передачи нервного импульса
- гемолизином

7. Путь заражения ботулизмом:

- контакт с больным человеком
- контакт с больным
- употребление воды из открытых источников
- + употребление инфицированных консервов
- эндоскопические исследования

8. Мишенью для ботулинического токсина является:

- гепатоциты
- + нервно-мышечные синапсы
- энтероциты

- потовые железы
- пейеровы бляшки

9. Основной метод диагностики ботулизма:

- определение специфических антител
- выделение чистой культуры
- кожно-аллергическая проба
- + обнаружение ботулотоксина в исследуемом материале
- обнаружение возбудителя в нервных клетках

10. Основное средство лечения ботулизма:

- пробиотики
- пенициллин
- анатоксин
- + антитоксическая сыворотка
- бактериофаг

### Список учебной литературы

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.: ил.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: М: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2002. – 736 с.
3. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.
4. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для студентов мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 759 с.: ил.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2006. – 704 с.; ил., табл.
6. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.
7. Медицинская микробиология: учебник. 4-е изд. Поздеев О.К. / Под ред. В.И. Покровского. – 2010. – 768 с.
8. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. Под ред. А.А. Воробьева. Учебники и учеб. пособия для высшей школы. Издательство: Медицинское информационное агентство, 2012. – 702 с.
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 1 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65

“Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 448 с.: ил.

10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 2 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.: ил.

11. Микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов (стоматология). / Под ред. В.Н. Царева. – М.: Практическая медицина, 2010. – 581 с.

12. Микробиология: учеб. для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060301.65 “Фармация” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 608 с.: ил.

13. Мотавкина Н.С., Артемкин В.Д. Атлас по микробиологии и вирусологии. М.: Медицина, 1976. – 307 с.: ил.

14. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II / Колл. авторов // Под редакцией Лабинской А.С., Костюковой Н.Н., Ивановой С.М. – М.: Издательство БИНОМ, 2010. – 1152 с.: ил.

15. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. акад. РАМН О.В. Бухарина. М.: Медицина; УрО РАН, 2002. - 342 с.

16. Информационные Интернет - ресурсы:

- <http://www.microbiology.ru>
- <http://ru.wikipedia.org>
- <http://www.rusmedserv.com>
- <http://www.molbiol.ru>
- [www.yandex.ru](http://www.yandex.ru)
- [www.Google.ru](http://www.Google.ru)
- [www.Rambler.ru](http://www.Rambler.ru)

Иллюстрированное учебное пособие

Литусов Николай Васильевич

Возбудитель ботулизма