

Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики

Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова, И.А.Дятлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Ботулизм – нервно-паралитическое заболевание человека и животных, вызываемое нейротоксинами (ботулотоксинами) *Clostridium botulinum* и некоторыми другими нейротоксинпродуцирующими клостридиями. Обзор посвящен анализу свойств различных фенотипических групп *C. botulinum* и клостридий видов *C. argentinense*, *C. butyricum* и *C. baratii*. Представлены данные о типах и субтипах токсинов, продуцируемых *C. botulinum*, об их структуре и механизмах патогенетического действия. Описаны формы ботулизма у человека: пищевой, раневой, младенческий и ятрогенный. Дан анализ современных лабораторных методов детекции возбудителя ботулизма: биологических, иммунологических и молекулярно-генетических. Сделан вывод о необходимости разработки отечественных молекулярно-генетических и других диагностических тест-систем для индикации нейротоксинов *C. botulinum*.

Ключевые слова: ботулизм, *Clostridium botulinum*, лабораторные методы, диагностика

Для цитирования: Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К., Дятлов И.А. Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики. Бактериология. 2018; 3(4): 47–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59

Botulism: characterization of the pathogen and the laboratory diagnostic methods

B.V.Eruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Botulism is a neuro-paralytic disease of humans and animals caused by *Clostridium botulinum* neurotoxins (botulinum toxins) and some other neurotoxin-producing clostridia. The review is devoted to the analysis of the properties of various *C. botulinum* phenotypic groups and other clostridial species: *C. argentinense*, *C. butyricum*, and *C. baratii*. The data on the types and subtypes of toxins producing by *C. botulinum*, about their structure and pathogenetic mechanisms of action are presented in the review. The forms of botulism in humans are described: food, wound, infant and iatrogenic. The analysis of modern laboratory methods for the detection of botulism agent are presented: biological, immunological and molecular genetics. The conclusion is the necessity to develop the domestic molecular-genetic and other diagnostic test-systems for the indication of *C. botulinum* neurotoxins.

Keywords: botulism, *Clostridium botulinum*, laboratory methods, diagnostics

For citation: Eruslanov B.V., Svetoch E.A., Mitsevich I.P., Fursova N.K., Dyatlov I.A. Botulism: characterization of the pathogen and the laboratory diagnostic methods. Bacteriology. 2018; 3(4): 47–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59

Ботулизм – тяжелое нервно-паралитическое заболевание человека и животных, симптомы которого впервые описаны в медицинской литературе в конце XVII – начале XVIII вв. Первые вспышки заболевания среди людей были связаны с употреблением кровяной и ливерной колбас. В дальнейшем сходные симптомы болезни отмечали также у людей, употреблявших копченую ветчину, соленую рыбу, заготовленные впрок овощи и фрукты. В 1897 г. бельгийский ученый Э. ван Эрменгем показал, что нервно-паралитические синдромы связаны с бактериальными токсинами:

из остатков съеденной ветчины, а также из селезенки и толстой кишки умершего человека исследователь выделил спорообразующую анаэробную культуру микроба, фильтраты питательной среды которой вызывали у морских свинок, кроликов, кошек, голубей и обезьян заболевание с летальным исходом. По предложению Э. ван Эрменгема это заболевание было названо ботулизмом (от латинского *botulus* – колбаса), а выделенная культура получила название *Bacillus botulinus*, по современной номенклатуре – *Clostridium botulinum* [1].

Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
Телефон: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 24.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biology), leading researcher of the antimicrobial agents laboratory, the molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 24.04.2018, accepted for publication 25.12.2018

Характеристика возбудителя ботулизма

C. botulinum – грамположительные палочковидные анаэробные спорообразующие подвижные бактерии, принадлежащие к роду *Clostridium* (рис. 1). Таксономическим признаком этих бактерий является их способность синтезировать ботулинический нейротоксин (ботулотоксин), вызывающий у человека и животных ботулизм. К настоящему времени у *C. botulinum* описаны и хорошо изучены семь типов ботулотоксинов: А, В, С, D, Е, F и G. Недавно идентифицирован новый восьмой серотип токсина – Н-тип, называемый еще мозаичным токсином F/A. Серотипы токсинов А, В, Е и F имеют подтипы. Помимо *C. botulinum*, ботулотоксины типов Е и F продуцируют соответственно клостридии видов *C. argentinense*, *C. butyricum* и *C. baratii*. На основании типов и субтипов ботулотоксинов, культуральных, ферментативных и генетических свойств, а также особенностей экологии ботулотоксинпродуцирующие клостридии подразделяются на шесть фенотипических групп, существенно отличающихся друг от друга (табл. 1). Клостридии групп I, II, IV, V и VI вызывают ботулизм у человека, а группы III – у животных. Важно отметить, что *C. botulinum* фенотипических групп I, II и III генетически близки с нетоксигенными клостридиями соответственно видов *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* и *C. novyi*, а токсин-образующий вид *C. argentinense* близок по свойствам к нетоксигенным клостридиям вида *C. subterminale*. Указанное родство между видами клостридий необходимо учитывать при культуральных методах выделения возбудителя ботулизма из исследуемого материала [2].

C. botulinum повсеместно присутствует в окружающей среде: в почве, в пыли, в прибрежных отложениях морей, рек и озер, водно-болотных угодий, где споры сохраняются десятилетиями. Загрязненные почвы, морские и речные отложения являются основной экологической нишей для спор *C. botulinum* и могут служить первоначальным источником для распространения патогена на территории проживания чело-

века. Другим резервуаром *C. botulinum* для человека являются домашние и дикие животные, мало восприимчивые к токсинам *C. botulinum*: свиньи, собаки, кошки, львы, грифы и т.д., в содержимом кишечника которых может находиться патоген. Серьезным резервуаром *C. botulinum* являются также речная и морская рыба, водоросли, водные растения и простейшие. Формированию территорий с повышенным содержанием *C. botulinum* способствуют разлагающиеся тушки погибшей от ботулизма водоплавающей птицы, трупы грызунов, крупных диких животных. Размножение *C. botulinum* и накопление ботулотоксинов может происходить в гниющей растительной массе, других органических отходах, а также в сточных водах с большим содержанием органических веществ. Условия окружающей среды, такие как температура, оптимальная для роста *C. botulinum* (25–42°C), мелководные щелочные воды с многочисленными популяциями беспозвоночных и разлагающимися тушками животных, также способствуют накоплению *C. botulinum* на определенных территориях.

Ботулинические нейротоксины

Ботулотоксины являются чрезвычайно мощными нейротоксинами. Смертельная доза для человека весом 70 кг при оральном пути попадания в организм равна 70 мкг, при вдыхании – 0,8–0,9 мкг, при внутривенном введении – 0,09–0,15 мкг [3]. Ботулотоксины представляют собой цинксодержащие эндопептидазы, длина которых колеблется от 1251 а.к. (ботулотоксин Е) до 1296 а.к. (ботулотоксин А). Они синтезируются бактериями в виде одноцепочечных полипептидов с молекулярной массой 150 кДа, высвобождаются после лизиса бактерий, а затем расщепляются путем протеолитического гидролиза бактериальными или тканевыми протеазами до активного токсина, который состоит из легкой (LC, 50 кДа) и тяжелой (HC, 100 кДа) цепей, связанных дисульфидной связью [4]. С-концевой домен HC молекулы отвечает за связыва-

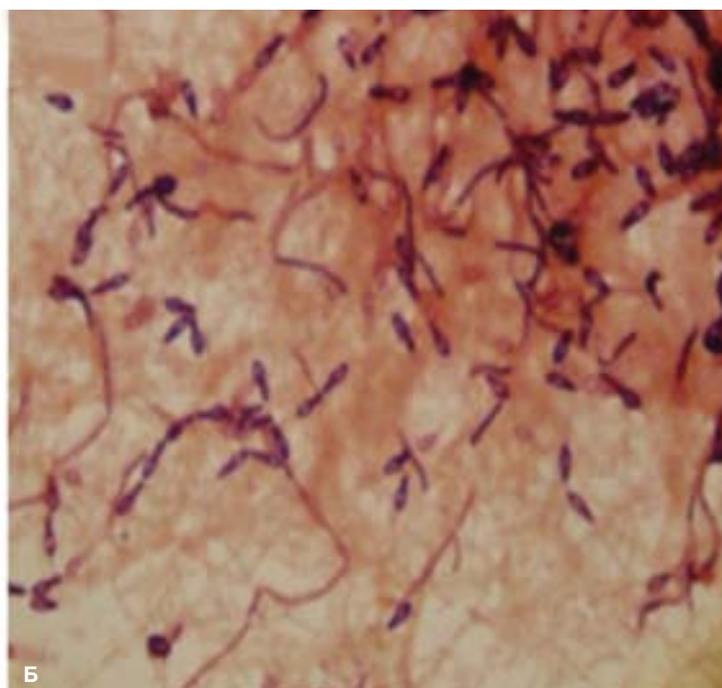


Рис. 1. Микрофотография клеток *C. botulinum*: А – сканирующий электронный микроскоп $\times 13\,300$; Б – окраска по Граму культуры, выращенной на плотной питательной среде $\times 1150$ [63].

ние с рецептором мембраны нервных клеток и интернализацию молекул токсина посредством эндоцитоза, N-концевой домен HC – за перемещение токсина из эндосомального пузырька в нервную клетку, позволяя LC-каталитическому домену цинксодерживающей эндопептидазы переноситься в цитоплазму, где находится мишень его действия (рис. 2).

Основной патогенетический механизм действия ботулотоксина заключается в торможении высвобождения ацетилхолина в терминалях холинергических нейронов в районе нервно-мышечного взаимодействия, что предотвращает передачу нейротрансмиттеров и подавляет сокращение мышц, вызывая у них вялый паралич. Патогенетический механизм токсина реализуется поэтапно: вначале тяжелая цепь ботулотоксина связывает молекулу со специфическим

рецептором на мембране терминаля аксона, причем токсин каждого серотипа имеет свой уникальный рецептор; далее, за счет рецепторопосредованного эндоцитоза, токсин попадает в терминаль аксона с одновременным образованием пузырька – интернализация [5]. На последующем этапе легкая и тяжелая цепи нейротоксина разделяются, и легкая цепь выходит в цитоплазму клетки – мембранная транслокация. Попавшая в цитозоль терминаля аксона легкая цепь нейротоксина при помощи цинксодерживающих специфических протеаз вызывает гидролиз синаптомаально-ассоциированных SNARE-белков, предотвращая образование транспортного комплекса, и тем самым блокирует высвобождение ацетилхолина из синаптического пузырька в синаптическую щель, что приводит к расслаблению мышцы (рис. 3).

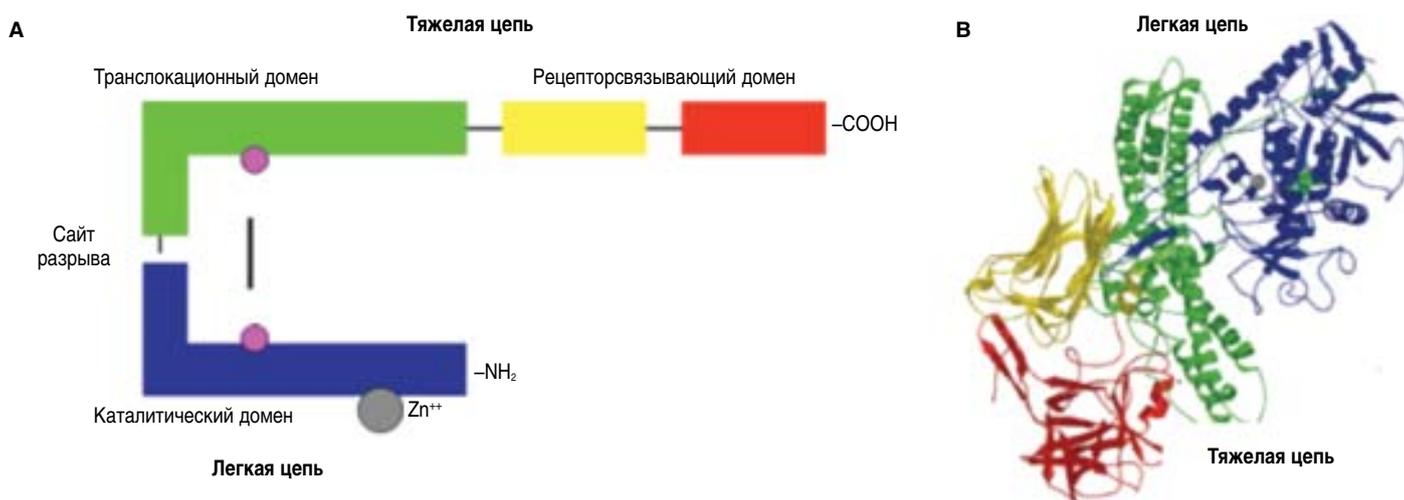


Рис. 2. Структура ботулотоксина: А – схема строения; В – модель третичной структуры белка [64].

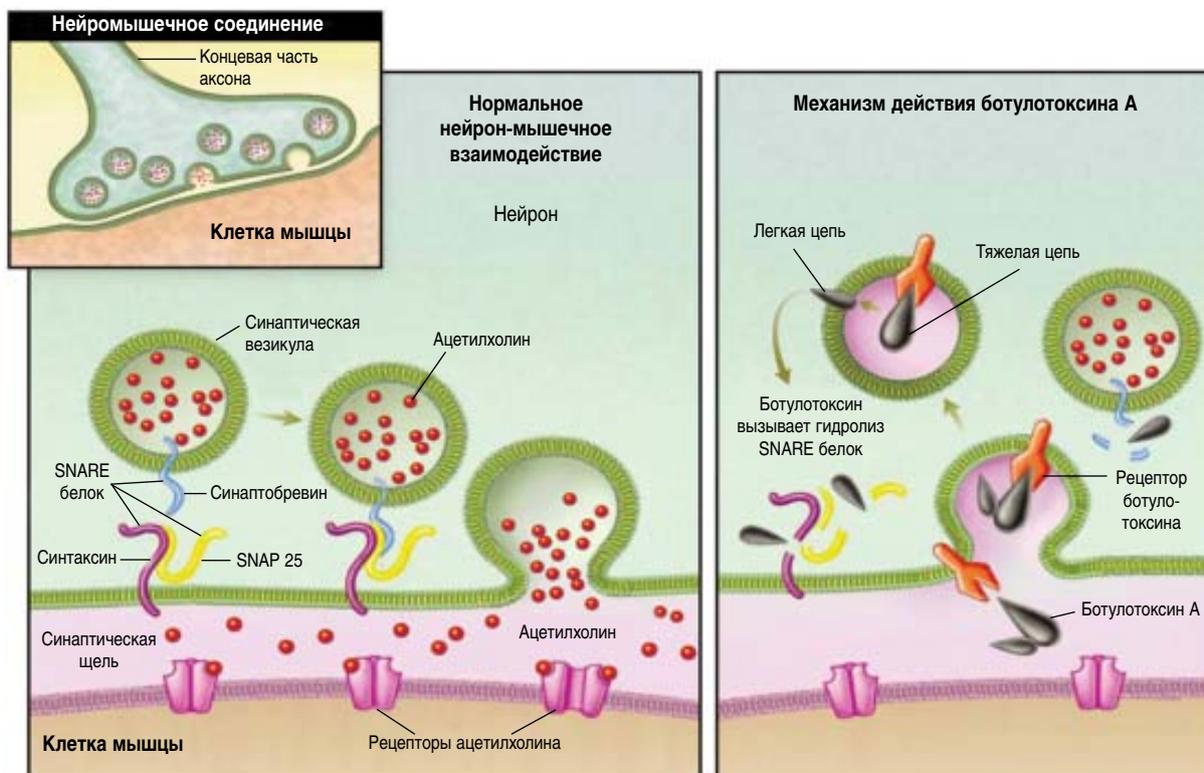


Рис. 3. Механизм патогенетического действия нейротоксина *C. botulinum* [6].

Каждый серотип ботулотоксина (анатоксина), имея характерный только для него состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи (разница у разных типов нейротоксинов может достигать 70%), индуцирует в макроорганизме образование специфических нейтрализующих антител, при этом антитела, специфичные к одному типу токсина, не могут нейтрализовать нейротоксины другие типов.

Нейротоксины типов А, В, Е и F подразделяются на 41 субтип, которые могут различаться между собой структурой аминокислотных последовательностей на 2,6–31,6%. Эти различия могут влиять на аффинность и каталитическую эффективность токсинов по отношению к их субстрату, а также на активность связывания и нейтрализации их моноклональными и поликлональными антителами. Ботулотоксин типа А существенно отличается по своей специфичности от ботулотоксинов всех других типов; нейротоксины С, D, C/D и D/C близки друг другу, так же как и нейротоксины серотипов В/G и E/F. Недавно обнаруженный нейротоксин типа Н по своей специфичности находится между серотипами F и А [6].

Отдельные штаммы *C. botulinum* могут продуцировать несколько нейротоксинов. Имеются сообщения о штаммах *C. botulinum* с двумя типами токсинов. В таких штаммах два нейротоксина обычно продуцируются в разных количествах: Аа, Ва, Af и Bf, где заглавными буквами обозначены преобладающие типы токсина. Так, у штаммов *C. botulinum*, продуцирующих нейротоксины типов Ва и Bf, токсина В продуцируется в 10 раз больше, чем токсинов А или F соответственно [7]. Описаны штаммы *C. botulinum*, продуцирующие нейротоксин А и несущие в своих геномах неактивные гены токсина В, такие штаммы обозначают как А(В) [8]. Неактивный ген токсина В был обнаружен и у нетоксигенной культуры *C. subterminale* [9]. Недавно описан штамм *C. botulinum*, экс-

прессирующий одновременно три нейротоксина: хромосомные А2 и F4 токсины и плазмидный токсин F5 [7].

Бактерии *C. botulinum* фенотипической группы III, кроме нейротоксинов С и D, продуцируют также токсины C/D и D/C, которые представляют собой мозаичные токсины, возникающие, как считается, в результате генетической рекомбинации между генами синтеза токсинов С и D (табл. 1). К мозаичным токсинам относится и недавно описанный нейротоксин Н, представляющий собой гибридоподобную структуру, содержащую области двух токсинов – А1 и F5 [10].

Генетика *C. botulinum*

К настоящему времени в базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) размещены нуклеотидные последовательности геномов 107 штаммов *C. botulinum*, что свидетельствует о большом генетическом разнообразии данного патогена. Геномы *C. botulinum* представлены кольцевыми ДНК, длины которых для разных фенотипических групп различны (табл. 1). Большинство токсигенных штаммов *C. botulinum* имеют плазмиды и профаги, размеры которых варьируют от 16 до 270 Kb. Содержание ГЦ у большинства видов клостридий одинаково.

Бактерии *C. botulinum* разных фенотипических групп имеют генетическое и физиологическое родство с определенными видами нетоксигенных клостридий (см. табл. 1) [11]. Ген *bont*, кодирующий синтез ботулотоксина, имеет длину приблизительно 3,8 т.п.н. Его нуклеотидная последовательность сходна с геном коллагеназы, что позволяет предположить, что они произошли от общего предка [12]. Различия в нуклеотидных последовательностях токсинов типов А-Н составляют 24,5–44,7% (см. табл. 1). Аминокислотные последовательности каждого подтипа отличаются от других не менее чем на 2,1%. Подтипы нейротоксинов подразде-

Таблица 1. Фенотипические группы *Clostridium botulinum* и их характеристика [4]

Основные свойства	<i>C. botulinum</i> группа I	<i>C. botulinum</i> группа II	<i>C. botulinum</i> группа III	<i>C. argentinense</i> группа IV	<i>C. butyricum</i> группа V	<i>C. baratii</i> группа VI
Типы нейротоксинов	A, B, F, H	B, E, F	C, C/D, D, D/C	G	E	F
Субтипы	A1; A2; A3; A4; A5; A6; A7; A8; A9; A10; B1; B2; B3; B5 (Ba); B6; B7; A(B); Ab; Af; Af84; Bf; F1; F2; F3; F4; F5	B4; E1; E2; E3; E6; E7; E8; E9; E10; E11; F6	C; D; CD; DC		E4; E5	F7
Экологическая ниша	Почва	Водная среда	Почва	Почва	Водная среда	Почва
Размер генома, Mbp	3,9–4,1	3,6–4,1	3,2–4,0	3,5–4,2	3,7–4,1	3,6–4,1
GC содержание в геноме, %	26–28	26–28	24–27	26–28	23–27	26–28
Генетическое разнообразие	Ограниченное	Широкое				
Генетическое родство с нетоксигенными видами	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. subterminale</i>	Нетоксигенные <i>C. butyricum</i>	Нетокси-генные <i>C. baratii</i>
Протеолитическая активность	+	–	–	+	–	–
Липазная активность	+	+	+	–	–	–
Лецитиназная активность	–	–	+	–	–	–
Оптимальная температура роста, °C	37	25	40	37	30–37	30–45
Минимальная температура роста, °C	10–12	2,5	15		12	10–15
Резистентность спор к нагреванию*	D104°C, 2,22 мин	D82,2°C, 2,4 мин	D104°C, 0,9 мин	D104°C, 1,1 мин	D100°C, <0,1 мин	
Рост ограничен при pH	4,3–4,5	5,0–5,1	4,3–4,5	5,3–5,5	5,0–5,1	4,3–4,5
Рост ограничен при концентрации NaCl в водной фазе, %	10	5	10	7	5	5
Передача клостридий через продукты	Овощи, мясо, консервы, мед	Рыба, мясо, и минимально обработанные, упакованные продукты	Овощи, мясо, консервы	Овощи, мясо, консервы	Рыба, овощи	Овощи, мясо, консервы

*DT, десятично снижаемое время при температуре T.

ляются на протеолитические токсины – А1–А8, В1, В2, В3, В5 (Ва), В6 и В7 и непротеолитические – В5, С, С/Д, D, D/С, Е1–Е11, F1–F7 и G, а также новый тип Н (F/A) [13]. Между генами подтипов токсинов имеется 92–95% идентичности нуклеотидных последовательностей, что соответствует 84–90% идентичности аминокислотных последовательностей. Среди генов подтипов В нуклеотидные последовательности различаются на 2–4%, а аминокислотные – на 3–6% [14]. Гены мозаичных токсинов С/Д и D/С отличаются от генов классических типов С и D тем, что гены каталитической активности у них, соответственно, представлены генами С и D, а гены активности связывания токсина с рецептором – генами D и С [7]. Нуклеотидные последовательности гена токсина Е имеют 12 подтипов, 10 из которых имеют 99% идентичности нуклеотидных последовательностей 97–99% идентичности аминокислот [15]. Внутри группы генов подтипов токсина F нуклеотидные последовательности различаются между собой довольно существенно (до 25%) и, в свою очередь, подразделяются на семь подтипов. Последовательности генов *bont* подтипов F1–F5 и F6 образуют кластер, отличающийся от кластера подтипа F7 [16]. Небольшое количество доступных штаммов, продуцирующих нейротоксин D, не позволяет оценить разнообразие генов этого токсина.

Гены ботулотоксинов могут быть локализованы на разных генетических элементах бактериальной клетки – в хромосоме, в профагах и на плаزمиде [17]. Гены нейротоксинов протеолитических и непротеолитических *C. botulinum* I и II фенотипических групп находятся либо на хромосоме, либо на плазмиде [18]. У *C. botulinum* III и IV фенотипических групп гены нейротоксинов располагаются соответственно в бактериофаге и на плазмиде [19, 20]. Геномный анализ бактериофагов *C. botulinum* группы III, кодирующих нейротоксины типов С, С/Д, D и D/С, показал, что эти фаги являются кольцевыми плазмидными профагами, которые не интегрированы в хромосому хозяина; токсин продуцируется во время лизогенного состояния фага [21]. Локус *bont* E *C. botulinum* фенотипической группы V расположен на плазмиде, тогда как локус *bont* F в клетках *C. baratii* фенотипической группы VI расположен на хромосоме [22].

Установлено, что ген *bont* локализован в строго определенных локусах хромосомы или плазмид *C. botulinum*. У штаммов I и II фенотипических групп это три специфических сайта: оперон *ars*, участвующий в восстановлении мышьяка, оперон *oppA/brnQ*, кодирующий транспорт аминокислот, и ген *rarA*, кодирующий синтез резольвазы, участвующей в рекомбинационных событиях и в процессе инсерции транспозонов. Именно рекомбинационные процессы, а также возможный горизонтальный перенос генов между клостридиями с помощью IS-элементов и транспозонов объясняют множественность типов и подтипов нейротоксинов у *C. botulinum*, циркулирующих в природе.

Клинические формы ботулизма

В зависимости от источника и пути проникновения ботулотоксина в организм человека, болезнь подразделяют на две категории: классический пищевой ботулизм и ботулизм как токсикоинфекция (ботулиническая токсикоинфекция). Последняя, в свою очередь, включает раневой ботулизм, детский

ботулизм и ботулизм, возникающий при колонизации кишечника взрослых людей бактериями *C. botulinum* (рис. 4).

Классический пищевой ботулизм развивается у человека в результате приема пищевых продуктов, содержащих ботулотоксины, наработанные *C. botulinum* или другими нейротоксинпродуцирующими клостридиями. Ботулиническая токсикоинфекция возникает при попадании клостридий (но не токсинов) в организм человека через раны или *per os*; клостридии размножаются в тканях или в кишечнике, локально продуцируют нейротоксин, который всасывается в кровь и вызывает системные поражения, аналогичные таковым при пищевом ботулизме. У больных развиваются черепная невралгия и прогрессирующая периферическая мышечная слабость. Зачастую отмечаются тяжелые неврологические нарушения, при лечении приходится использовать искусственную вентиляцию легких. Ботулизм человека чаще всего связан с нейротоксинами *C. botulinum* типов А, В и Е, редко – типов F, G и H. Нейротоксины типов С и D заболевания у человека не вызывают, поскольку плохо всасываются через слизистую кишечника [23].

Пищевой ботулизм, вероятно, сопровождал человечество в течение всей его истории [24]. Вспышки или спорадические случаи пищевого ботулизма, как правило, связаны с употреблением приготовленных в домашних условиях консервированных овощей, грибов, рыбных и мясных продуктов, реже – с употреблением некачественных промышленных консервов, приготовленных с нарушением технологии производства. Пищевой ботулизм встречается относительно редко, но в некоторых регионах мира чаще, чем в других, из-за особенностей пищевых традиций. Вспышки ботулизма, вызванные токсинами *C. botulinum* типов А и В, обычно регистрируют в районах с умеренным и теплым климатом: в США, Китае, Южной Америке и странах южной Европы, где традиционно употребляется много овощей. В Центральной Европе ботулизм чаще связан с употреблением консервированных мясных продуктов, вспышки здесь ассоциируются со штаммами *C. botulinum* группы II, продуцирующими ботулотоксин типа В [25]. В таких странах, как Канада, Финляндия, Япония, Норвегия, Швеция, США (Аляска), основной причиной ботулизма является нейротоксин Е [26]. В Российской Федерации отмечаются случаи ботулизма, вызванного нейротоксинами типов А, В, Е и F.

В 1965–1990 гг. в провинции Пуатье (Франция) было зафиксировано 108 случаев пищевого ботулизма [27]. В 2014 г. во Франции было зарегистрировано еще 4 вспышки ботулизма, связанных с употреблением коммерческого соуса песто или домашней ветчины и зеленых бобов. При этом пострадали 11 человек. Недавно сообщалось о вспышке ботулизма в штате Техас, США, в которой пострадали 15 человек, отравившиеся ботулиническим токсином типа А, источником которого явился неправильно хранившийся перец чили [28]. В 2010 г. в США было зарегистрировано 9 случаев пищевого ботулизма, среди которых три случая были связаны с токсином типа А, три случая – с токсином типа В, два случая – с токсином типа Е и один случай – с токсином неустановленного типа. В 2017 г. в США было зарегистрировано два случая ботулизма, вызванного токсинами типов А и Е, которые были связаны с употреблением домашних консервированных персиков и рыбьего жира соответственно.

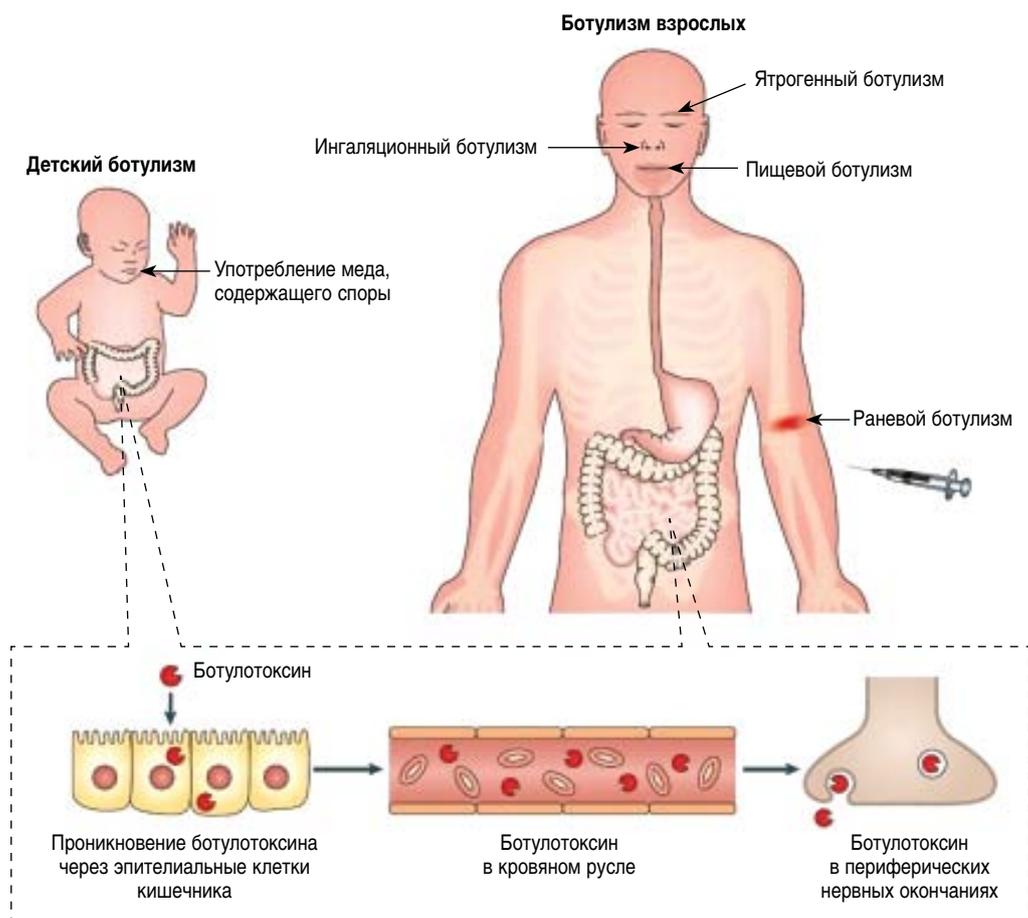


Рис. 4. Клинические формы ботулизма у человека [7].

Заболеваемость ботулизмом в РФ в основном связана с употреблением продуктов домашнего приготовления: вяленой рыбы, консервированных грибов и овощей. Начиная с 2007 г. в РФ ежегодно регистрируется около 300 случаев ботулизма. По информации Роспотребнадзора, в 2007 г. от ботулизма умерли 15, а в 2010 г. – 26 россиян. С января по ноябрь 2011 г. в нашей стране от ботулизма пострадали 160 человек, семь из которых дети; скончались 14 пострадавших. В июле 2015 г., во время вспышки ботулизма в республике Марий Эл, люди отравились ботулотоксином F из консервированных томатов промышленного производства.

Раневой ботулизм – редкое заболевание, возникающее вследствие загрязнения ран, в которых создаются условия, близкие к анаэробным. Попавшие в рану споры *C. botulinum* прорастают в вегетативные формы, которые продуцируют ботулотоксины; у пациентов развиваются типичные для ботулизма неврологические расстройства. В последние годы отмечено увеличение заболеваемости раневым ботулизмом среди людей, злоупотребляющих инъекциями наркотических препаратов. Так, в Англии до 1999 г. случаев раневого ботулизма не регистрировалось, в 2000 г. сообщалось о шести случаях раневого ботулизма, а в 2001 г. – о 13 случаях [29]. В США в 2010 г. зафиксировано 17 случаев раневого ботулизма [30]. В РФ сообщений о случаях раневого ботулизма нет.

Младенческий ботулизм – крайне редкое заболевание, но отдельные его случаи отмечались во многих странах мира [31, 32]. Чаще всего такие случаи связаны с добавлением

в молоко младенцам пищевых продуктов, например меда, в которых могут присутствовать споры *C. botulinum*, которые, попадая в незрелый кишечник ребенка, прорастают в вегетативные клетки, продуцирующие токсин. Младенческий ботулизм может проявляться в разных формах: от «синдрома гибкого ребенка» до внезапной детской смерти («смерть в кроватке»). Симптомы заболевания являются результатом системного распространения токсина в холинэргических нервных окончаниях. В США в 2010 г. было зарегистрировано 85 случаев младенческого ботулизма в 24 очагах, при этом токсин типа A был обнаружен у 30 пострадавших детей, токсин типа B – у 54 детей и токсин типа F – у одного ребенка. В 2017 г. в США заболели ботулизмом 135 младенцев: 57 случаев болезни были связаны с токсином типа A, 74 случаев – с токсином типа B, три случая – с токсином типа F, один случай – с токсином подтипа Bf [17].

Другие виды человеческого ботулизма встречаются крайне редко. Ятрогенный ботулизм может возникать после введения людям лицензированного или нелицензированного токсина для терапевтических или косметических целей [33]. О случаях ингаляционного ботулизма, вызванного вдыханием аэрозоля ботулотоксина, сообщалось в 1961 г. [34].

Симптомы и лечение ботулизма

Первые признаки заболевания ботулизмом у человека могут появиться уже через 2 ч после употребления пищи, содержащей ботулотоксин, однако в среднем инкубационный период составляет от 12 до 36 ч, иногда он может про-

должаться несколько суток. Типичными симптомами ботулизма являются нарушение зрения, затрудненное глотание, нарушение речи, паралич мышц лица, нисходящий двусторонний вялый паралич и общая мышечная слабость. Если больного ботулизмом не лечить, это может привести к фатальной дыхательной недостаточности и параличу сердечной мышцы [35].

Быстрая диагностика болезни и наличие хорошо скоординированной междисциплинарной помощи, в том числе применение искусственной вентиляции легких, представляют собой наиболее эффективные меры при лечении ботулизма. Поддерживающее лечение обычно продолжается от нескольких дней до нескольких недель. Единственным специфическим средством лечения ботулизма является антитоксическая сыворотка. Она может остановить прогрессирование паралича и сократить время госпитализации, но только при условии, что сыворотка будет применена не позднее 24 ч после появления первых симптомов болезни, когда нейротоксин еще не попал в постсинаптическое пространство. Следует, однако, заметить, что антитоксическая сыворотка, получаемая от лошадей, в 15–25% случаев ее применения может вызвать у больного тяжелые осложнения, включая сывороточную болезнь и анафилаксию. Как только токсин достигает центральной нервной системы и связывается со своими мишенями, антитоксин становится неэффективным, а полное выздоровление больного занимает месяцы [36]. Смертность от пищевого ботулизма может достигать 5–20%, в то время как смертность при детском и раневом ботулизме в настоящее время составляет примерно 15% и 1% соответственно [37].

Ботулизм животных

У животных выделяют две основные формы ботулизма: ботулизм, связанный с поеданием корма, в котором накопился ботулотоксин (кормовой ботулизм), и ботулиническая токсикоинфекция, вызываемая прорастанием спор *C. botulinum* и размножением клеток патогена в кишечном тракте или ране животного. Вспышки ботулизма среди сельскохозяйственных и диких животных представляют серьезную экологическую и экономическую проблему из-за возможности формирования локальных очагов, резервуаров *C. botulinum* для человека и высокой смертности среди больных ботулизмом животных и птицы. Чаще всего ботулизмом поражаются крупный рогатый скот, лошади и птица, в том числе водоплавающая. Отмечались случаи массовой гибели рыбы от ботулизма.

У разных видов животных чувствительность к ботулотоксинам различается: крупный рогатый скот наиболее чувствителен к токсину типа D/C, меньше – к токсину D; птица в основном поражается токсином C/D, хотя иногда болезнь может быть вызвана токсинами C и D/C [38]. Мозаичный токсин типа C/D более опасен для цыплят, чем токсин C [39]. У дикой птицы, погибшей от ботулизма, также тестировался в основном токсин типа C/D; у водоплавающей птицы, поедающей зараженную рыбу, – типа E. В пробах рыбы, воды и ила преобладал токсин типа E [39, 40]. Вспышки ботулизма с высоким уровнем смертности, вызванные токсином E у водоплавающей птицы и рыбы, были отмечены в США на Великих озерах [39]. Ботулизм у лошадей может быть вызван токсина-

ми типов B, C или A [41]. Пушные звери, такие как лисы, хорьки и норки, больше всего чувствительны к токсинам C и C/D, редко – к токсинам A и E [42]. Свины, по-видимому, обладают естественной устойчивостью к ботулотоксинам, хотя описаны единичные случаи ботулизма у свиней, которые были вызваны токсином типа C. Свины могут быть резервуаром *C. botulinum* для человека [43]. Кошки, собаки и дикие звери-падальщики заболевают ботулизмом редко. Устойчивы к ботулизму птицы-стервятники [44]. При изучении ботулизма среди водоплавающей птицы было замечено, что для эпизоотических вспышек характерным является циклическое течение инфекции – цикл птичьего ботулизма. В этом цикле тушка птицы, павшей от ботулизма, вновь становится источником ботулотоксина для другой птицы и окружающей среды, а также источником ботулотоксина для развившихся на тушке личинок мух, при склевывании которых, даже единичной личинки, птицы погибают [45].

Больные сельскохозяйственные животные и птицы, а также животные-бактерионосители *C. botulinum* могут явиться серьезным источником для формирования на отдельных территориях очагов повышенной концентрации *C. botulinum*, что представляет потенциальную опасность для человека. Особенно опасны для человека очаги, которые сформированы животными, чувствительными к тем же типам ботулотоксинов, что и человек, – типов A, B, E и F. В связи со значительной ролью животных в распространении *C. botulinum*, в том числе опасных для человека типов, ряд авторов считают возможным рассматривать ботулизм как зооантропоноз [45].

Лабораторная диагностика ботулизма

Поскольку ботулизм является весьма опасным для жизни человека заболеванием, ранний и точный диагноз болезни с одновременным определением серотипа нейротоксина, вызвавшего ее, имеет решающее значение для назначения больному соответствующего антитоксина, что во многом определяет успех терапии. В настоящее время в арсенале специалистов имеется достаточно большой набор диагностических тестов, способных быстро и точно идентифицировать ботулотоксин в клиническом материале и продуктах питания (табл. 2).

Биологические методы диагностики. Биопроба на мышцах считается «золотым стандартом» для обнаружения и идентификации ботулотоксина. LD₅₀ нейротоксина для мышей составляет 5–10 пг. Для обнаружения токсина обычно исследуют образцы сыворотки крови больного, содержимое желудочно-кишечного тракта, образцы паренхиматозных органов, материал из раны, пробы пищи, фекалий или образцы из окружающей среды. Мышам внутрибрюшинно вводят проверяемый образец и наблюдают за ними в течение 4 дней, хотя признаки болезни обычно развиваются в течение 6–24 ч после введения материала, содержащего нейротоксин. Типичными симптомами поражения ботулотоксином у мышей являются взъерошенность шерстного покрова, паралич задних конечностей, сокращенный живот («осиная» талия) и затрудненное дыхание. Тип токсина идентифицируют по результатам защищенности мышей от токсина после введения им активных против определенных типов токсинов нейтрализующих антител.

Хотя биопроба считается наиболее высокочувствительным тестом для индикации ботулотоксина, в ряде случаев можно получить ложноотрицательный результат, а именно: если токсин в исследуемых образцах уже разложился или если в пробе сыворотки крови больного токсин обнаружить не удается, поскольку период, в течение которого токсин может тестироваться в крови, короткий. Другим недостатком биопробы является частичная перекрестная реактивность мозаичных типов токсинов. Например, токсин C/D может быть нейтрализован антитоксином типов C и D, а иногда только антитоксином типа D [46]. Кроме того, метод биопробы трудоемок, дорог и создает этические проблемы для исследователей.

Недавно Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA) для замены биопробы предложило использовать метод обнаружения ботулотоксинов с помощью перевиваемых клеток CbrA. Анализ заключается в инкубации клеток с исследуемым материалом в течение определенного периода времени с последующим удалением несвязавшегося токсина и определением его активности в клетках с помощью вестерн-блоттинга или иммуноферментного анализа (ИФА). Предложенный метод превышает чувствительность биопробы и является высокоспецифичным [47].

Иммунологические тесты. Наиболее распространенным иммунологическим тестом на ботулотоксины является ИФА. Образцы, в которых предполагается наличие токсина, добавляют к токсинспецифическим поликлональным или моноклональным антителам. Комплексы токсин-антитело выявляют, используя второе токсинспецифическое антитело, связанное с ферментом (фосфатазой или пероксидазой), генерирующим световой сигнал посредством ферментативного расщепления хромогенного субстрата [48]. С развитием методов усиления сигнала ИФА этот метод по чувствительности сравнялся с биопробой. Разработан вариант ме-

тода ИФА для обнаружения нейротоксинов *C. botulinum* типов A, B, E и F. В анализе используют поликлональные антитела, специфичные к указанным типам токсинов, в качестве вторичных антител применяют дигоксигенин (DIG). Этот метод детектирования требует добавления хромогенного субстрата и антител против DIG, конъюгированного с пероксидазой хрена. Чувствительность этого теста для токсина A, обнаруженного в различных образцах пищевых продуктов, составила ~60 пг/мл [49]. Недавно разработан метод ИФА для одновременного обнаружения нейротоксинов серотипов A, B, C, D, E и F с чувствительностью ~0,2 пг/мл [50].

Иммуно-ПЦР – это группа сверхчувствительных методов, которые сочетают специфичность распознавания антигенов антителами и чувствительность ПЦР (табл. 2). Метод основан на использовании моноклональных антител, соединенных со специфическими ДНК, контролирующими разные типы ботулотоксинов. Антитело связывается со специфическим нейротоксином, после чего, с помощью реакции амплификации, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводится экспоненциальное усиление сигнала. В отличие от ИФА, иммуно-ПЦР позволяет в ходе одного опыта определить сразу большое число различных антигенов, благодаря тому, что после связывания антител с антигенами эти антитела легко могут быть идентифицированы по уникальным олигонуклеотидным последовательностям ДНК, присоединенным к антителам [51]. Исследователи из Франции использовали иммуно-ПЦР для выявления культур *C. botulinum*, продуцирующих токсины типов A, B, E и F, в образцах рыб и донных отложений. Было показано, что *C. botulinum* сравнительно часто (14,5%) встречаются в этих образцах. Чувствительность иммуно-ПЦР для детекции ботулотоксина A, по данным авторов, на несколько порядков превосходит ИФА для определения того же токсина [52].

Латексная проба – метод, позволяющий для обнаружения ботулотоксина в исследуемом материале использовать

Таблица 2. **Диагностические методы, применяемые для детекции ботулотоксинов**

Метод	Время анализа	Тип токсина	Чувствительность	Исследованные образцы	Особенность метода	Ссылки
Биопроба на мышах	1–4 дня	A, B, C, D, E, F, G	20–30 пг/мл	Бактериальная культура, сыворотка крови, фекалии, желудочное содержимое, продукты питания, пробы окружающей среды	Стандартный метод	46
Иммуноферментный метод (ИФА)	8 ч	A, B	4–8 нг/мл	Фекалии, фасоль и грибы	Поливалентные лошадиные антитела	48–50
	8 ч	E, F	0,5–2 нг/мл	Человеческая сыворотка	Поливалентные кроличьи антитела	49
	8 ч	A, B, E	9–45 пг/мл	Загрязненное землей мясо индейки	Поливалентные кроличьи антитела	48
Усиленный ИФА (ELISA-ELCA)	8 ч	A	2–4 пг/мл	Консервированные лосось и солонина	Моноклональные антитела с биотинил-тирамидной системой	49
	8 ч	A	12–14 пг/мл	Бактериальные культуры из сыра, вызвавшего вспышку ботулизма	Поликлональные антитела с биотинил-тирамидной системой	48
	8 ч	A, B, E, F	0,2 нг/мл	Перец чили и картофель	Поликлональные антитела с биотинил-тирамидной системой	51
Иммуно-ПЦР	8 ч	A	5 пг/мл	Очищенный токсин	Моноклональные антитела, связанные с олигонуклеотидами	52
Хемилюминесцентный иммунный блот	6 ч	E	4 пг/мл	Бактериальная культура, загрязненная землей рыба	Поликлональные антитела, меченные люминесцентной меткой	53
Иммунохроматографический метод	15–30 мин	A, B, E	150 пг/мл 10 нг/мл	Молочные продукты, овощи и морепродукты		53
Эндопептидазный тест	6 ч	A, B, D, F	5–10 пг/мл	Треска, мясной фарш, колбасы	Пептидные субстраты, специфичные для SNARE белков. Иммунологическая детекция	55

цветные полистирольные или суперпарамагнитные латексные частицы, сенсibilизированные специфичными антителами против ботулотоксинов. Сенсibilизированные латексные частицы смешивают вместе с исследуемым образцом, в случае наличия в образце токсина выявляют комплекс латексных частиц и токсина с помощью вторых биотинилированных антител против ботулотоксина и конъюгата стрептавидин-фикоэритрина. Образовавшийся комплекс считывают двухлучевым лазерным детектором на основе проточного цитофлуориметра. Один луч лазера классифицирует и определяет наличие токсина, второй – определяет величину сигнала, которая прямо пропорциональна количеству связанного ботулотоксина. Используя данный метод, токсины А и В были обнаружены в образцах пищевых добавок, в которых также содержались примеси других токсинов – холерного токсина, рицина и стафилококкового энтеротоксина В. Чувствительность метода составляет ~21 пг/мл [53].

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – иммунохимический способ выявления ботулотоксинов, основанный на реакции между гомологичными антителом и антигеном непосредственно в биологическом материале. Осуществляется реакция на специальных тест-полосках, которые погружают в исследуемую жидкость, в которой предполагается наличие ботулотоксина. Жидкость начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. На тестовой линии полоски иммобилизованы антитела, специфичные к ботулотоксину, а на контрольной линии – антивидовые антитела, специфичные к первичным антителам. Если в образце содержится токсин, происходит его связывание с антителами, конъюгированными с меткой. Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он взаимодействует со вторичными специфичными антителами, образуя «сэндвич» с меткой. Избыток несвязавшегося конъюгата соединяется с антивидовыми антителами на контрольной линии. Появление двух линий на хроматографической полоске является положительным результатом теста. При отсутствии токсина в образце конъюгат связывается с антивидовыми антителами только на контрольной линии, образуя одну линию на тест-полоске. ИХА-тесты просты в исполнении, результаты

регистрируются визуально в течение 15 мин. Разработаны ИХА-тесты для качественного обнаружения ботулотоксинов в пищевых продуктах, их чувствительность находится в диапазоне 5–50 нг/мл [54]. Однако этот метод детекции имеет ограничения из-за сложности получения высококачественных моноклональных антител. Кроме того, генетические изменения в геноме клостридий, касающиеся серотипа токсина, могут привести к снижению аффинности теста и, как следствие, к появлению ложноотрицательных результатов. Другое ограничение метода ИХА состоит в том, что он не способен различать активные и инактивированные токсины.

Эндопептидазный тест – это новый метод, основанный на выявлении активности цинксодержащей протеазы ботулотоксина на искусственном специфическом субстрате, содержащем те же сайты гидролиза, что и природные синаптические белки SNARE. Антитела против нейротоксинов *C. botulinum* конъюгируют на поверхности латексных частиц, к ним добавляют образец, предположительно содержащий ботулотоксины А, В или F. В случае их наличия в образце они иммобилизируются соответствующими специфическими антителами. Для того чтобы определить экспрессию активных нейротоксинов, в реакционную смесь добавляют синтетические пептиды, имеющие те же сайты гидролиза, что и белки SNARE. После инкубации активный ботулотоксин ферментативно гидролизует эти белки с образованием пептидов различной молекулярной массы [55]. У каждого серотипа ботулотоксинов есть уникальный сайт гидролиза на SNARE-белках. Фрагменты, полученные в результате расщепления синтетических пептидов, специфичны для каждого типа токсина. Эту специфичность определяют с помощью масс-спектрометрии с лазерной времяпролетной десорбционной ионизацией (MALDI-TOF-MS). Эндопептидазный тест очень чувствителен и высокоспецифичен – позволяет детектировать 40–200 пг/мл ботулотоксина. Такой функциональный подход позволяет обнаруживать активные молекулы токсина и различать типы ботулотоксинов в одном эксперименте.

Молекулярно-генетические методы основаны на ПЦР, как в классическом режиме, так и в режиме реального времени. Гены, кодирующие разные типы ботулотоксинов,

Таблица 3. ПЦР-тест-системы, применяемые для обнаружения и идентификации генов синтеза ботулотоксинов *Clostridium botulinum* в исследуемых образцах

Тип образца	Метод	Определяемый тип токсина	Чувствительность	Ссылка
ДНК, выделенная из чистой культуры	ПЦР + гель электрофорез	A, B, E, F	0,3 нг	51
	ПЦР в реальном времени	A, B, C, D, E, F	2,5 пг	
ДНК, выделенная из спор, инокулированных в пищевых продуктах	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	0,015–0,5 пг	52
	ПЦР в реальном времени	A	10 ² –10 ³ спор/мл	
ДНК, выделенная из предварительно обогащенных пищевых продуктов	ПЦР + гель электрофорез	A, B, E, F, G	10 клеток/г	51
	ПЦР + гель электрофорез	A, B, E	0,1–21 спор/г	
ДНК, выделенная из предварительно обогащенных пищевых продуктов, образцов внешней среды и клинического материала	ПЦР в реальном времени	A, B, E	10 ² спор/г	57
	ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 клеток/г	
ДНК, выделенная из предварительно обогащенных пищевых продуктов и клинического материала	ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 клеток/г	59, 60
ДНК, выделенная из нагретых и предварительно обогащенных фекалий	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10–10 ³ спор/г	58
ДНК, выделенная из содержимого ран	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E	10–10 ² клеток	63
Грубый клеточный лизат, полученный из бульона для обогащения	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 ² клеток	62
Грубый клеточный лизат, полученный из предварительно обогащенных пищевых продуктов	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 ² спор/г	55

Методы	<i>C. botulinum</i> I–IV группы	Время, необходимое для работы с чистой культурой	Особенности метода	Область применения	Ссылка
Гель-электрофорез в пульсирующем (электрическом) поле (PFGE)	Штаммы	5–7 дней	Рестрикция ДНК кластридиальными эндонуклеазами влияет на выполнении анализа	Эпидемиологические исследования, сравнение штаммов	35, 59
Секвенирование генов рибосомальной РНК	Группы	3–4 дня		Таксономия	33, 49
Риботипирование	Группы	3–5 дней		Филогенетические исследования, идентификация штаммов	60
Полиморфизм длин продуктов амплификации, AFPL	Штаммы и группы	3 дня		Эпидемиологические исследования, сравнение клинических штаммов	60
Метод случайных праймеров, RAPD	Штаммы	1–2 дня	Могут использоваться грубые клеточные лизаты	Быстрое сравнение клинических изолятов	60

могут быть локализованы на хромосоме, на плаزمиде или в составе профага *C. botulinum* [56]. Гены каждого типа токсина высокоспецифичны и представляют собой идеальную генетическую мишень для их обнаружения [57]. Разработаны методы ПЦР для детекции как отдельных типов ботулотоксинов, так и мультиплексные системы для определения одновременно нескольких их типов (табл. 3). В качестве мишени использовали ген *ntnh*, кодирующий синтез гемолизина, поскольку этот ген всегда присутствует в генетическом локусе, кодирующем ботулотоксины [58]. Однако детекция гена токсина не означает, что токсин экспрессируется. Имеются методы ПЦР, позволяющие обнаруживать экспрессию генов *bont*, используя для этого ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени. Этот метод в основном применяют для исследовательских целей, поскольку для получения высококачественной мРНК требуется много времени. Важно заметить, что исследуемые образцы, особенно образцы окружа-

ющей среды, могут содержать ингибиторы ПЦР, поэтому при постановке обычной диагностической ПЦР в ней должны обязательно присутствовать внутренний контроль амплификации и внутренний положительный контроль.

Генотипирование и полногеномное секвенирование *C. botulinum* как инструмент диагностики ботулизма у человека используют для установления эпидемически значимых генетических линий или клонов бактериальных патогенов, циркулирующих в том или ином регионе. Его применяют также для установления источника возбудителя вспышки пищевой инфекции путем сравнения идентичности генотипа штаммов патогена, выделенных от больных, предполагаемых бактерионосителей и непосредственно из продуктов питания, после употребления которых заболели люди. Генотипирование особенно актуально для анализа вспышек ботулизма, поскольку культуры *C. botulinum* отличаются большим фено- и генотипическим разнообразием. Это раз-

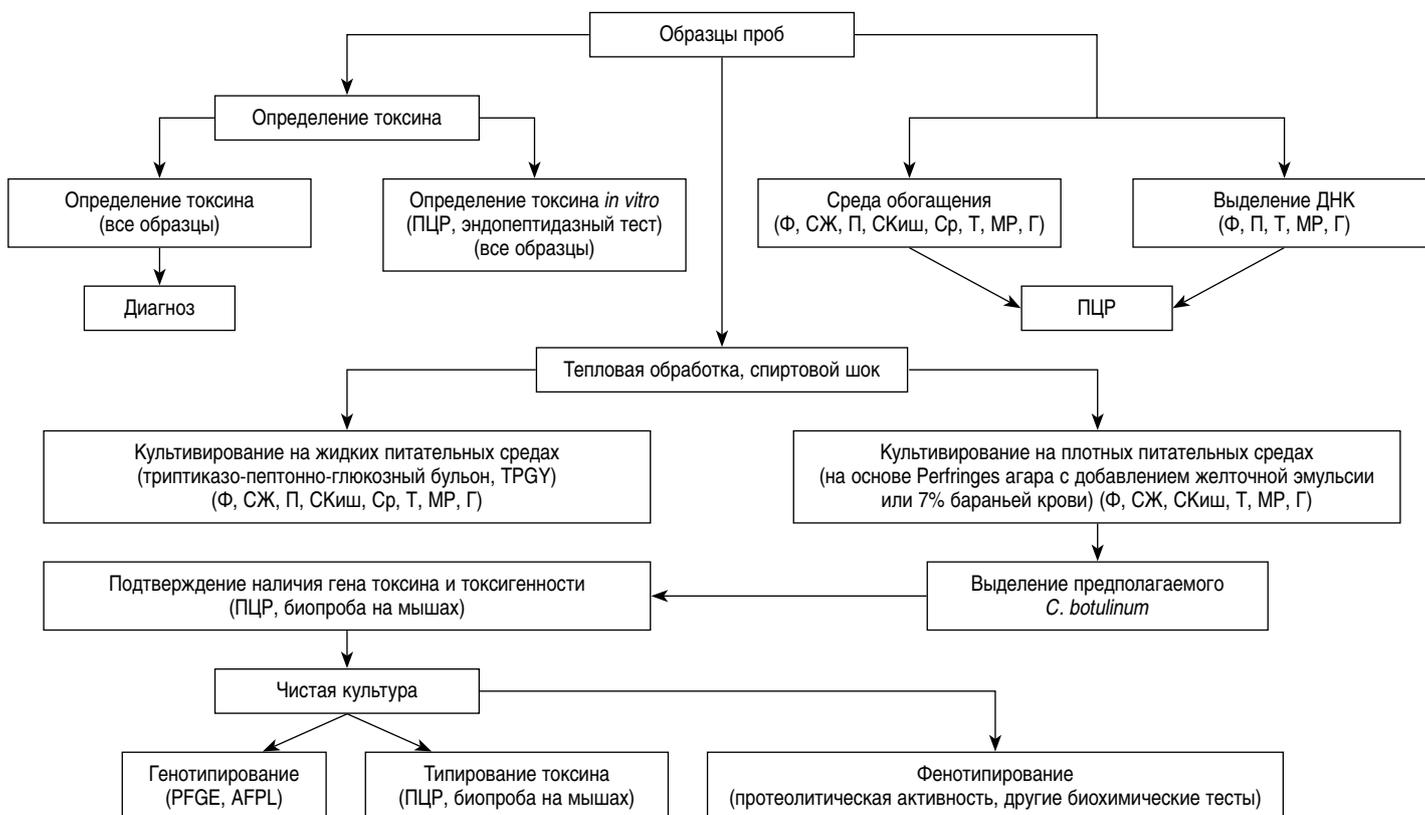


Рис. 5. Схема лабораторной диагностики ботулизма [61, 62].

нообразии обусловлено присутствием в их геномах детерминант разных типов и подтипов нейротоксина, в том числе гибридных, а также присутствием мобильных генетических элементов – плазмид, профагов, IS-элементов и др. [59, 60]. Среди других молекулярно-генетических методов, используемых для типирования *C. botulinum*, следует упомянуть гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), секвенирование генов рибосомальной РНК, риботипирование, определение полиморфизма длин продуктов амплификации (AFLP), метод случайных праймеров (RAPD) (табл. 4).

Огромное количество информации о *C. botulinum* можно получить при секвенировании нуклеотидных последовательностей всего генома возбудителя. Биоинформационное прочтение нуклеотидной последовательности генома *C. botulinum* позволяет установить генетические особенности штамма, наличие у него плазмид, профагов, детерминант антибиотикорезистентности, определить тип продуцируемого штаммом нейротоксина и т.д. Ожидается, что с расширением возможностей и снижением стоимости полногеномного секвенирования этот метод все больше будет заменять традиционные методы генетического типирования, используемые сейчас для характеристики бактерий. Одновременно полногеномное секвенирование позволяет нам лучше понять природу токсинпродуцирующих клостридий, их генетическое и биологическое разнообразие, генетическую пластичность [61, 62].

Схема диагностики ботулизма включает в себя все описанные выше современные диагностические тесты (рис. 5). Сравнительный анализ методов диагностики ботулизма, применяемых в мировой практике и в Российской Федерации, указывает на отсутствие в нашей стране многих отечественных современных иммунохимических и молекулярно-генетических методов индикации ботулотоксинов в клиническом материале и пищевых продуктах. Разработка отечественных тест-систем для детекции и типирования возбудителя ботулизма может рассматриваться как актуальная задача на современном этапе.

Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература/References

1. Ting PT, Freiman A. The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to Botox. Clin Med (Lond). 2004 May-Jun;4(3):258-61.
2. Maslanka SE, Luquez C, Dykes JK, Tepp WH, Pier CL, Pellett S, Raphael BH, Kalb SR, Barr JR, Rao A, Johnson EA. A Novel *Botulinum* Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, has a Hybrid-Like Structure with Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized with Serotype A Antitoxin. J Infect Dis. 2016;213(3):379-385. DOI: 10.1093/infdis/jiv327
3. Gonzalez-Escalona N, Thirunavukkarasu N, Singh A, Toro M, Brown EW, Zink D, Rummel A, Sharma SK. Draft Genome Sequence of Bivalent *Clostridium botulinum* Strain IBCA10-7060, Encoding Botulinum Neurotoxin B and a New FA Mosaic Type. Genome Announc. 2014 Dec 11;2(6). pii: e01275-14. DOI: 10.1128/genomeA.01275-14
4. Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. Res Microbiol. 2015;166:303-317. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010.

5. Benefield DA, Dessain SK, Shine N, Ohi MD, Lacy DB. Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 2;110(14):5630-5. DOI: 10.1073/pnas.1222139110.
6. Lam KH, Yao G, Jin R. Diverse binding modes, same goal: The receptor recognition mechanism of botulinum neurotoxin. Prog Biophys Mol Biol. 2015 Mar;117(2-3):225-231. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.004.
7. Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. Nat Rev Microbiol. 2014 Aug;12(8):535-49. DOI: 10.1038/nrmicro3295.
8. Popoff MR, Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. Toxicon. 2013 Dec 1;75:63-89. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.05.003
9. Poulain B, Lonchamp E, Jover E, Popoff MR, Molgo J. Mechanisms of action of botulinum toxins and neurotoxins. Ann Dermatol Venereol. 2009 May;136 Suppl 4:S73-6. DOI: 10.1016/S0151-9638(09)74531-4.
10. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K. *Botulinum* toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001 Feb 28;285(8):1059-70.
11. Auricchio B, Anniballi F, Fiore A, Skiby JE, De Medici D. Evaluation of DNA extraction methods suitable for PCR-based detection and genotyping of *Clostridium botulinum*. Biosecur Bioterror. 2013;11:200-206.
12. Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. J Infect Dis. 2014 Jan 15;209(2):183-91. DOI: 10.1093/infdis/jit449
13. Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. J Infect Dis. 2014 Jan 15;209(2):192-202. DOI: 10.1093/infdis/jit450
14. Ekblom R, Wolf JB. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. Evol Appl. 2014 Nov;7(9):1026-42. DOI: 10.1111/eva.12178.
15. Fillo S, Giordani F, Anselmo A, Fortunato A, Palozzi AM, De Santis R, et al. Draft Genome Sequence of *Clostridium botulinum* B2 450 Strain from Wound Botulism in a Drug User in Italy. Genome Announc. 2015 Apr 2;3(2). pii: e00238-15. DOI: 10.1128/genomeA.00238-15
16. Gismervik K, Bruheim T, Rorvik LM, Haukeland S, Skaar I. Invasive slug populations (*Arion vulgaris*) as potential vectors for *Clostridium botulinum*. Acta Vet Scand. 2014 Oct 3;56(1):65. DOI: 10.1186/s13028-014-0065-z
17. Hill KK, Smith TJ. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;364:1-20. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9_1.
18. Kull S, Schulz KM, Weisemann J, Kirchner S, Schreiber T, Bollenbach A, et al. Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0116381. DOI: 10.1371/journal.pone.0116381
19. Wangroongsarb P, Kohda T, Jittapasartsin C, Suthivarakom K, Kamthalang T, Umeda K, et al. Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates from foodborne outbreaks in Thailand, 2010. PLoS One. 2014;9(1):e77792.
20. Skarin H, Hafstrom T, Westerberg J, Segerman B. *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. BMC Genomics. 2011 Apr 12;12:185. DOI: 10.1186/1471-2164-12-185
21. Jacobson MJ, Lin G, Raphael B, Andreadis J, Johnson EA. Analysis of neurotoxin cluster genes in *Clostridium botulinum* strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes. Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2778-86. DOI: 10.1128/AEM.02828-07.
22. Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Oshima K, Fujinaga Y, et al. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 29;102(48):17472-7.

23. Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, Bouchier C, Bouvet P, Popoff MR. An atypical outbreak of food-borne botulism due to *Clostridium botulinum* types B and E from ham. *J Clin Microbiol*. 2015 Feb;53(2):722-6. DOI: 10.1128/JCM.02942-14
24. Ronald G, Labbé SG. Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition. WILEY Blackwell, 2013. 484 p. ISBN: 978-0-470-67142-9.
25. Mazuet C, King LA, Bouvet P, Legeay C, Sautereau J, Popoff MR. Le botulisme humain en France, 2010-2012. *Bull Epidemiol Hebd*. 2014;(5):106-14.
26. Souillard R, Le Marechal C, Hollebecque F, Rouxel S, Barbe A, Houard E, et al. Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet Microbiol*. 2015 Oct 22; 180(1-2):142-5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.032..
27. Roblot P, Roblot F, Fauchere JL. Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France. *J Med Microbiol*. 1994;40:379-384.
28. Kalluri P, Crowe C, Reller M. An outbreak of foodborne botulism associated with food sold at a salvage store in Texas. *Clin Inf Dis*. 2003;37:1490-1495.
29. Sam AH, Beynon HL. Images in clinical medicine: Wound botulism. *N Engl J Med*. 2010 Dec 16;363(25):2444. DOI: 10.1056/NEJMicm1003352
30. Choudhry SA, Anwar MJ, Afzal M, Shah A. Foodborne Botulism, I Only Had Nacho Cheese: A Case Report. *Cureus*. 2017 Sep 8;9(9):e1666. DOI: 10.7759/cureus.1666
31. Arnon SS. Infant botulism – anticipating the 2nd decade. *J Inf Dis*. 1986;154:201-206.
32. Shelley EB, O'Rourke D, Grant K, McArdle E, Capra L, Clarke A, et al. Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin: a novel environmental association with pet terrapins. *Epidemiol Infect*. 2015 Feb;143(3):461-9. DOI: 10.1017/S0950268814002672
33. Nunn F, Cave TA, Knottenbelt C, Poxton IR. Evidence that Key–Gaskell Syndrome is a toxico-infection caused by *Clostridium botulinum* type C/D. *Vet Rec*. 2004; 115:111-115.
34. Cook LV, Lee WH, Lattuada CP, Ransom GM. Methods for the detection of *Clostridium botulinum* toxins in meat and poultry products USDA/FSIS. *Microbiol Lab Guid*. 3rd Ed. Chapter 14. Methods For The Detection Of *Clostridium Botulinum* Toxins In Meat And Poultry Products, In: Microbiology Laboratory Guidebook. United States Department Of Agriculture, Food Safety And Inspection Service Office Of Public Health And Science, Microbiology Division, Washington, DC, 1998.
35. Kolho E, Lindstrom M, Forss N. [Botulism]. *Duodecim*. 2012;128(19):1963-9.
36. Raphael BH, Shirey TB, Luquez C, Maslanka SE. Distinguishing highly-related outbreak-associated *Clostridium botulinum* type A(B) strains. *BMC Microbiol*. 2014 Jul 16;14:192. DOI: 10.1186/1471-2180-14-192
37. MacDonald E, Arnesen TM, Brantsaeter AB, Gerlyng P, Grepp M, Hansen BA, et al. Outbreak of wound botulism in people who inject drugs, Norway, October to November 2013. *Euro Surveill*. 2013 Nov 7;18(45):20630
38. Souillard R, Le Marechal C, Hollebecque F, Rouxel S, Barbe A, Houard E, et al. Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet Microbiol*. 2015 Oct 22; 180(1-2):142-5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.032
39. Chun CL, Ochsner U, Byappanahalli MN, Whitman RL, Tepp WH, Lin GY. Association of toxin-producing *Clostridium botulinum* with the macroalga cladophora in the Great Lakes. *Environ Sci Technol*. 2013 Mar 19;47(6):2587-94. DOI: 10.1021/es304743m..
40. Jang I, Kang MS, Kim HR, Oh JY, Lee JI, Lee HS, Kwon YK. Occurrence of avian botulism in Korea during the period from June to September 2012. *Avian Dis*. 2014 Dec;58(4):666-9. DOI: 10.1637/10793-020414-Case
41. Johnson AL, McAdams-Gallagher SC, Aceto H. Outcome of adult horses with botulism treated at a veterinary hospital: 92 cases (1989-2013). *J Vet Intern Med*. 2015 Jan;29(1):311-9. DOI: 10.1111/jvim.12502.
42. Myllykoski J, Lindstrom M, Bekema E, Polonen I, Korkeala H. Fur animal botulism hazard due to feed. *Res Vet Sci*. 2011 Jun;90(3):412-8. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.06.024.
43. Raymundo DL, Gomes DC, Boabaid FM, Colodel EM, Schmitz M, Correa AMR, Dutra IS, Driemeier D. Type *C. botulism* in swine fed on restaurant waste. *Pesquisa Veter*. Brasil. 2012;32:1145-1147.
44. Elad D, Yas-Natan E, Aroch I, Shamir MH, Kleinbart S, Hadash D, et al. Natural *Clostridium botulinum* type C toxicosis in a group of cats. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5406-8. DOI: 10.1128/JCM.42.11.5406-5408.2004
45. Gismervik K, Bruheim T, Rorvik LM, Haukeland S, Skaar I. Invasive slug populations (*Arion vulgaris*) as potential vectors for *Clostridium botulinum*. *Acta Vet Scand*. 2014 Oct 3;56(1):65. DOI: 10.1186/s13028-014-0065-z
46. Torii Y, Goto Y, Takahashi M, Ishida S, Harakawa T, Sakamoto T, et al. Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon*. 2010 Feb-Mar; 55(2-3):407-14. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.09.005.
47. Pellett S. Progress in cell-based assays for botulinum neurotoxin detection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;364:257-85. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9_12
48. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, Hnasko R. A monoclonal antibody-based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. *Toxins (Basel)*. 2013 Nov 18;5(11):2212-26. DOI: 10.3390/toxins5112212
49. Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Feb;72(2):1231-8. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006
50. Zhang Y, Lou J, Jenko KL, Marks JD, Varnum SM. Simultaneous and sensitive detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using enzyme-linked immunosorbent assay-based protein antibody microarrays. *Anal Biochem*. 2012 Nov 15;430(2):185-92. DOI: 10.1016/j.ab.2012.08.021
51. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grou, J, Dargaigaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Dec;68(12):5870-6.
52. Fach P, Micheau P, Mazuet C, Perelle S, Popoff M. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *J Appl Microbiol*. 2009 Aug;107(2):465-73. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04215.x
53. Garber EA, Venkateswaran KV, O'Brien TW. Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteinaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and *Staphylococcus enterotoxins* A, B, and C in food. *J Agric Food Chem*. 2010 Jun 9;58(11):6600-7. DOI: 10.1021/jf100789n
54. Ching KH, Lin A, McGarvey JA, Stanker LH, Hnasko R. Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip. *J Immunol Methods*. 2012 Jun 29;380(1-2):23-9. DOI: 10.1016/j.jim.2012.03.008.
55. Tevell Aberg A, Bjornstad K, Hedeland M. Mass spectrometric detection of protein-based toxins. *Biosecur Bioterror*. 2013 Sep;11 Suppl 1:S215-26. DOI: 10.1089/bsp.2012.0072
56. Anniballi F, Fiore A, Lofstrom C, Skarin H, Auricchio B, Woudstra C, et al. Management of animal botulism outbreaks: from clinical suspicion to practical countermeasures to prevent or minimize outbreaks. *Biosecur Bioterror*. 2013 Sep;11 Suppl 1:S191-9. DOI: 10.1089/bsp.2012.0089.
57. Jang I, Lee JI, Kwon YK, Kang MS, Kim HR, Park JY, et al. Single-tube nested PCR assay for the detection of avian botulism in cecal contents of chickens. *Anaerobe*. 2015 Oct;35(Pt B):48-53. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2015.07.001
58. Raphael BH, Andreadis JD. Real-time PCR detection of the nontoxic nonhemagglutinin gene as a rapid screening method for bacterial isolates harboring the botulinum neurotoxin (A-G) gene complex. *J Microbiol Methods*. 2007 Dec; 71(3):343-6. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.09.016
59. Luquez C, Joseph LA, Maslanka SE. Molecular subtyping of *Clostridium botulinum* by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2015;1301:103-13. DOI: 10.1007/978-1-4939-2599-5_10

60. Hannett GE, Stone WB, Davis SW, Wroblewski D. Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Feb;77(3):1061-8. DOI: 10.1128/AEM.01578-10
61. Mayo B, Rachid CT, Alegria A, Leite AM, Peixoto RS, Delgado S. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Curr Genomics.* 2014 Aug;15(4):293-309. DOI: 10.2174/1389202915666140616233211
62. Baym M, Kryazhimskiy S, Lieberman TD, Chung H, Desai MM, Kishony R. Inexpensive multiplexed library preparation for megabase-sized genomes. *PLoS One.* 2015 May 22;10(5):e0128036. DOI: 10.1371/journal.pone.0128036.
63. Smith LDS, Hobbs G. Genus III *Clostridium* Prazmowski. In: BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition ed. Baltimore: William & Wilkins. 1974;1880: 23.
64. Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, Dasgupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol.* 1998 Oct;5(10):898-902.

Информация об авторах:

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Boris V. Eruslanov, Doctor of Medical Sciences, leading researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

Edward A. Svetoch, Doctor of Veterinary Sciences, professor, chief researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

Irina P. Mitsevich, senior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Безопасность пищевых продуктов: навозные жуки и почвенные бактерии снижают риск возникновения патогенных микроорганизмов

Известно, что фекалии диких и одомашненных свиней загрязняют продукты на местах, что приводит к болезням пищевого происхождения.

Навозные жуки, вероятно, убивают вредные бактерии, когда они потребляют и закапывают фекалии. Предыдущие исследования также показали, что у этих жуков есть антибиотикоподобные соединения в организме.

Обнаружили, что органическое земледелие способствует увеличению биологического разнообразия среди почвенных бактерий, что снижает выживаемость патогенных микроорганизмов.

Эти результаты показывают, что навозные жуки и почвенные бактерии могут улучшить естественное подавление патогенных микроорганизмов человека на фермах, что дает основания для сокращения использования инсектицидов и стимулирования большего разнообразия растений и насекомых.

Дополнительные лабораторные эксперименты показали, что виды навозных жуков и бактериальные сообщества, типичные для органических ферм, были значительно более эффективными в подавлении патогенных для человека *Escherichia coli* O157: H7 по сравнению с сообществами копрофагов на обычных фермах. Это говорит о том, что практика управления фермой, сохранение копрофагов и подавление патогенных микроорганизмов могут быть связаны.

В целом результаты исследований показывают, что насекомые и микробы могут быстро удалять фекалии, что может снизить устойчивость человеческих патогенов. Рекомендуется учитывать риски и преимущества, связанные с копрофагами, при принятии управленческих решений, касающихся безопасности пищевых продуктов.

Jones M.S., Fu Z., Reganold J.P., et al.

Organic farming promotes biotic resistance to foodborne human pathogens.

J Appl Ecol. 2019;00:1-11.