

БОТУЛИЗЪМ – РЯДКО ЗАБОЛЯВАНЕ И МНОГО ВЪПРОСИ

М. Пишмишева-Пелева¹, Ст. Коцев¹, Й. Ненчева¹, Ст. Панайотов², Б. Цафарова²¹Инфекционно отделение, МБАЛ – Пазарджик²Национална референтна лаборатория по особено опасни инфекции,
Национален център по заразни и паразитни болести – София

BOTULISM – A RARE ILLNESS AND A LOT OF QUESTIONS

M. Pishmisheva-Peleva¹, St. Kotsev¹, Y. Nencheva¹, St. Panaiotov², B. Tsafarova²¹Infectious Ward, Multiprofile Hospital for Active Treatment – Pazardzhik²Reference Laboratory of Special Bacterial Pathogens, National Center of Infectious and Parasitic Diseases – Sofia

Резюме. Ботулизъмът е рядко, но животозастрашаващо заболяване, което се причинява от токсина на Gr(+) положителния анаеробен бактерия *Clostridium botulinum*. Познати са 9 типа токсини, като най-често заболяването се причинява от типове А, В, Е и по-рядко от други: F, H. При човека заболяването протича с развитие на десцендиращи симетрични вяли парализи и вегетативни нарушения. Целта на съобщението е да представим случай на ботулизъм. Касае се за 52-годишен мъж с ботулизъм. Диагнозата е потвърдена молекулярно-биологично и чрез доказване на токсин В във фекална маса. Заболяването при пациента започва с отпадналост, ретенция на урината, слабост на мускулатурата на врата и на крайници, дисфагия, дисфония, пареза на мекото небце, а по-късно се развива офталмоплегичен синдром. Приехме, че се касае за токсинфекция с продуциране на токсин *in vivo*. Лечението бе проведено с конски хетероложен противоботулинов серум. Заболяването завърши с оздравяване, като месец след изписването пациентът продължи да се оплаква от отпадналост. **Заключение:** Липсата на противоботулинов серум може да застраши живота на болния и да затрудни работата на медицинския персонал. Ботулиновият токсин може да причини заболяване, но намира широко приложение за лечение и облекчаване на редица заболявания, както и в естетичната дерматология. Прилагането му изисква компетентност и знания и трябва да се извършва от квалифициран персонал.

Ключови думи: ботулизъм, парализи, противоботулинов серум

Abstract. Botulism is a rare but life-threatening disease caused by the toxin of the Gram-positive anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*. Nine distinct types of toxins have been identified. Types A, B and E are the most prevalent causes of the disease. Types F and H are responsible for less cases. In human subjects, the onset of the disease is characterized by descending symmetrical flaccid paralysis and vegetative disorders. The objective of the present report is to present a case of botulism. A 52-year-old male patient has been diagnosed with botulism. The diagnosis was confirmed by laboratory molecular biology methods and detection of toxin B in fecal sample. The patient's illness began with symptoms including weakness, urinary retention, weakness of the muscles of the neck and limbs, dysphagia, dysphonia, and paresis of the soft palate. Consequently, he developed ophthalmoplegic syndrome. We assumed that the poisoning was of a toxic nature, with the toxin being produced *in vivo*. The treatment was carried out with equine heterologous anti-botulinum serum. The patient's recovery was successful. A month after being discharged he continued to experience fatigue. **Conclusion:** The absence of anti-botulinum serum could compromise patient treatment and impede the efforts of the medical personnel. Botulinum toxin is extensively utilized in the treatment and alleviation of numerous diseases, as well as in esthetic dermatology. The application of botulinum toxin necessitates a degree of expertise and must be undertaken by personnel who have been adequately trained and are therefore qualified to perform the task.

Key words: botulism, paralysis, anti-botulinum serum

ВЪВЕДЕНИЕ

Ботулизъмът е рядко, животозастрашаващо заболяване при хора и топлокръвни животни. Причинява се от токсини (BoNT) на анаеробни, спорообразуващи бактерии от вида *Clostridium botulinum*. Някои щамове на *C. butyricum*, *C. baratii*, *C. argentinense* също отделят невротоксини. Неклостридиални видове, напр. *Enterococcus faecium* и др., могат да продуцират BoNT подобни токсини и също да причинят заболяване, подобно на ботулизъм [1, 2, 3].

Заслуга в изучаването на заболяването има Юстинус Андреас Кристиан Кернер. През 1817 г. той установява, че токсинът се продуцира в „развалени“ колбаси при анаеробни условия, описва действието на токсина върху мускулите и нервната система, потвърждава хипотезата, че токсинът е с биологичен произход и изказва предположението, че токсинът има и терапевтичен потенциал [4]. Кернер издава две монографии, в които описва подробно клиничните симптоми на ботулизма. Първата монография включва 76 болни, а втората – 155, като в нея се съдържат

както аутопсионни проучвания, така и неговите експерименти върху животни [4]. Независимо че Кернер не успява да изолира токсина в чиста форма, той много точно описва неговите ефекти.

Емил ван Ерменгем (Emil Pier Mary van Ermengem) през 1895-1897 г. изолира за първи път *Clostridium botulinum*, доказва анаеробното му култивиране и способността му да се размножава в консервирана храна, както и доказва експериментално, че отделя силен токсин, който той нарича „ботулинов“.

През 1946 г. Eduard Schanz първи изолира в чиста кристална форма ботулиновия токсин, като неговите препарати са одобрени за приложение върху хора. Разработва и първия ботулин-съдържащ препарат, използван в клиничната практика. Към настоящия момент ботулиновият токсин намира широко приложение при лечение на редица заболявания и облекчаване на редица симптоми.

Clostridium botulinum е грам-положителен бактерий, широко разпространен в природата. Той образува ендоспори, чийто диаметър е по-голям от този на вегетативната форма, затова прилича на тенис ракета. Спорите са устойчиви на изсушаване, топлина, ултравиолетова светлина и алкохол и могат да оцелеят при кипене до 4 часа. Вегетативните форми са слабо устойчиви във външната среда.

Спорите обикновено преминават невредими през здрава човешка храносмилателна система. При новородени и възрастни индивиди със заболявания на ГИТ и/или дисбиоза е възможно да се наблюдава колонизация на червата с клостридии и последваща продукция на токсини. *Clostridium botulinum* е нормален сапрофит в чревния тракт на много бозайници и птици и чрез фекалиите им се отделя във външната среда. Въз основа на произвеждания тип токсин щамове на *C. botulinum* се разделят на четири групи (I-IV). Към групи I и II принадлежат щамове, патогенни за човека. Група I продуцират протеолитични типове токсини А, В и F, а щамове от група II включват непротеолитични типове В, Е и F. Двете групи щамове са напълно различни по своите фенотипни характеристики, температурни изисквания, биохимичен профил и производство на метаболити. Основен патогенен фактор е ботулиновият невротоксин (BoNT). Той се продуцира както от бактериите, така и при автолиза на бактериалните клетки. Микроорганизмите в рамките на вида се различават по антигенния тип на токсините, които произвеждат, и обикновено произвеждат по един вид токсин. Познати са 9 имунологично различни токсина, А-Н и Х [5]. Ботулизъм при човека се предизвиква от токсини А (най-силен и с най-продължителен ефект), В и Е, по рядко от тип F. Ботулинови токсини А, В и F имат по 8 субтипа, а BoNT Е – 12 субтипа. Токсини тип С и D причиняват ботулизъм при жи-

вотни. Ботулизъмът при овцете и козите протича свръхостро, при конете и говедата – остро. Особено чувствителни към токсина са норките, при които леталитетът достига до 70-90%. Лисиците и кучетата са нечувствителни. *C. botulinum* тип Е е разпространен във водна среда и риби. Рядко се среща в храна, месо или фекален материал. Лабораторната диагноза ботулизъм се поставя чрез откриване на невротоксин и клетки на *C. botulinum* в хранителна проба или фецес. Стандартният метод за откриване на токсина е тест върху мишки. Тестът отнема време, скъп е и поражда етични опасения поради използването на експериментални животни. Конвенционалното изолиране и идентифициране на *C. botulinum* е трудно, освен ако токсичността на изолатите не е потвърдена на мишки. PCR тестовете се основават на откриването на гена на ботулиновия невротоксин. В сравнение с конвенционалните методи тези тестове са бързи и чувствителни за откриване на токсин-продуциращи *C. botulinum*. Повечето от PCR тестовете използват специфични праймери за типа токсин. Има разработени мултиплексни PCR тестове за едновременно откриване на *C. botulinum* типове А, В, Е и F в храна и фекални материали. Преди изолиране на ДНК пробите може да се набогатят в TPGY бульон (дрождев, пептон-глюкозен бульон, Difco Laboratories, САЩ) при 30 и 37°C при анаеробни условия в продължение на 5 дни.

Екзотоксинът се отделя под формата на протеинов комплекс и се състои от **токсичен (BoNT)** и **нетоксичен** компонент (хемаглутинин), който предпазва токсина от действието на ензимите в гастроинтестиналния тракт и подпомага проникването му през чревната стена. **BoNT** представлява двуверижен протеин с лека L- и тежка H-верига – едната предизвиква уврежданията, а втората осигурява проникването на токсина в клетките. Ботулиновият токсин е термолабилен [3, 6]. **BoNT** е най-силната позната биологична отрова и може да се използва като биологично оръжие. Леталната доза е 1-3 ng/kg телесна маса, а минималното количество, което може да причини заболяване при човека, е 50 ng. Независимо от различията на отделните токсини те имат еднакъв фармакологичен ефект – блокират освобождаването на ацетилхолин в синаптичната цепка, в резултат на което не може да се осъществи мускулно съкращение и се развиват вяли парализи. Познати са следните форми на ботулизъм: **хранителна интоксикация** – най-често срещаната форма – поглъщане на невротоксин, отделен се в анаеробна среда в хранителния продукт. Това са най-често домашно консервирани храни. Тежестта на заболяването се свежда до погълнатото количество токсин. **Токсоинфекция при възрастни** – бактериите

колонизират лигавицата на червата и произвеждат токсин. Токсинообразуването продължава до елиминиране на инфекцията. По-рядко срещана форма при възрастни индивиди. **Кърмачески ботулизъм** – колонизация на червата с бактерии. Най-често се причинява при консумация на пчелен мед от кърмачета. По тази причина мед не се препоръчва за деца до 1-годишна възраст или се предлага пастьоризиран. **Ранев ботулизъм** – при попадане на спори в рана и последващо развитие на вегетативни форми с производство на токсин. **Инхалаторен ботулизъм** – не е естествена форма на заболяването. Възможно е да възникне инцидентно в лабораторни условия. **Ятрогенен ботулизъм** – при предозиране с токсин при козметични манипулации.

Ботулизмът в типичната си форма протича като афебрилна десцендираща, най-често симетрична вяла парализа. Най-често се развива офталмоплегичен синдром поради засягане на n. abducens, n. oculomotorius, n. trochlearis. Описва се първичен комплекс – 4D – диплопия, дисфония, дисфагия, дизартрия [3]. При десцендиране на парализите се развиват дихателна недостатъчност, пареза на червата, обстипация, паралитичен илеус и токсичен мегаколон. Израз на вегетативни нарушения са сухота в устата, сърдечносъдови нарушения. Съзнанието е съхранено през цялото време. При ранев ботулизъм може да има фебрилитет поради вторична бактериална инфекция, а при кърмачески – обща мускулна слабост, отказ от прием на храна, обстипация.

ОПИСАНИЕ НА КЛИНИЧНИЯ СЛУЧАЙ

Представяме случай на ботулизъм, протекъл с някои особености. Касае се за 52-годишен мъж, автомонтьор и учител. Заболява на 23.09.2023 г. с еднократно повръщане, а на 24.09. е с болки във врата. На 25.09. болният не отделя урина и е хоспитализиран в урологично отделение, където е установен пълен с урина пикочен мехур и след поставяне на уретрален катетър е възстановена диурезата. По това време болният е и със запек. На 05.10. е хоспитализиран в нервно отделение поради двойно виждане, световъртеж, афония. На 04.10. е имал затруднения с гълтането. След образни изследвания (КТ, МР) са отхвърлени остър съдов инцидент и пространство-заемащ процес и пациентът е изписан. На 09.10. е хоспитализиран в инфекциозно отделение със съмнение за ботулизъм.

От прегледа при постъпването се установи **офталмоплегичен синдром** – неподвижни очни ябълки, невъзможност за поглед нагоре, неподвижни разширени зеници без фотореакция. Лицето беше масковидно, с изгладени назолабиални гънки. Налице бяха още пареза на мекото небце, дисфоничен глас, сухи лигавици на устната кухина и очите. Сетивността и сухо-

жилните рефлекс бяха запазени. Установиха се **намалена мускулна сила за горни крайници и слабост на шийна мускулатура**. Пациентът бе с балониран корем, с **обстипация и с ретенция на урината**. Дихателна система – с нормална физикална находка. Сърдечносъдова система – **брадикардия 44-46 уд./min**. Хипотония – **90/50**. Работната диагноза бе **ботулизъм**, а диференциалната диагноза включваше: 1. **миастения гравис** – бавно начало, птоза на клепачи и диплопия, в началото – преходни, вечерни, после постоянни; автоантитела, 2. **синдром на Милър-Фишър** – остро настъпили офталмоплегия, атаксия, арефлексия; автоантитела, 3. **синдром на Гилен-Баре** – възходяща парализа с хипо- и арефлексия, 4. **синдром на Ламбърт-Итън** – бавно и постепенно начало, мускулна слабост, най-често започваща от долни крайници, сухота в устата, птоза на клепачите, други.

Диагнозата бе потвърдена с молекулярнобиологични методи чрез модифициран PCR анализ за откриване на BoNT гени, които са отговорни за синтеза на невротоксини тип А, В, Е и F на *Clostridium botulinum* във фекална маса и хранителни продукти. PCR методът, който ние приложихме [7], използва четири двойки праймери с еднакви температури на хибридизация, всяка от които е специфична за типа ботулинов невротоксин А, В, Е или F, и позволява едновременно откриване на четирите серотипа (табл. 1). Амплифицираните ДНК фрагменти бяха с дължини 782 bp за *C. botulinum* тип А, 205 bp за тип В, 389 bp за тип Е и 543 bp за тип F. Други бактериални видове, включително *C. sporogenes* и нетоксигенните непротеолитични организми, подобни на *C. botulinum*, не дават PCR продукт. По литературни данни чувствителността на PCR теста за типове А, Е и F е 100 клетки, а за тип В – 10 клетки на реакционна смес. След набогатяване на материала, границата на откриване в хранителни и фекални проби варира от 100 спори/g за типове А, В и F до 10 спори/g за тип Е. Анализът е чувствителен и специфичен и значително подобрява диагностиката на *C. botulinum*. В случая използвахме PCR микс 2x Blirt (Glory Biotechnologies Corp., Ю. Корея), 5 µl (2 pmol/µl) праймери и 5 µl ДНК от пробата. Общият обем на реакционната смес беше 20 µl. Условията на амплификация за всеки тип токсин-синтезиращ ген бяха: денатурация на 95°C за 10 min. 35 цикъла при 95°C за 30 s, 60°C за 30 s и 72°C за 1,30 s.

Завършващ цикъл при 72°C за 10 min. PCR продуктите бяха изследвани на 1,5% агарозен гел. Резултатът показва амплификация на фрагмент от 205 нб от гена, отговорен за синтеза на токсин тип В. Лабораторният PCR анализ доказва, че в изследвания фекален материал присъства микробен щам *C. botulinum* тип В.

Таблица 1. Използвани праймери [7] за амплификация на клъстера от *BoNT* гени за серотипове токсини А, В, Е и F при *C. botulinum*. Размер на фрагментите и температура на хибридизация

Тип	Праймер	Секвенция (5'-3')	Размер (бр)	Температура (°C)
A	CBMLA1	AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT	782	63.9
A	CBMLA2	CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG G		63.4
B	CBMLB1	CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA	205	64.3
B	CBMLB2	CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG		64.5
E	CBMLE1	CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA	389	63.7
E	CBMLE2	GCT ATT GAT CCAAAA CGG TGA		63.6
F	CBMLF1	CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA	543	64.1
F	CBMLF2	TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT		63.3

Лечението на пациента включваше: противоботулинов антитоксин – тривалентен – 10 000 Е анти-А, 10 000 Е анти-В, 2000 Е анти-Е. Антимикробен препарат – пеницилин – за 7 дни, инхибитори на холинестеразата – нивалин, калимин по схема, влияния и симптоматични средства. Заболяването завърши с оздравяване, като най-дълго персистирах ретенция на урината и хипотония – т.е. първите появили се симптоми се задържаха най-дълго време.

ОБСЪЖДАНЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С какво е интересен представеният случай: 1. Болният е единствен случай в семейството и в групата приятели; 2. Няма храна, която единствено болният да е консумирал; 3. Първите клинични прояви са ретенция на урината и слабост на горните крайници; 4. Офталмоплегичният синдром се развива на 10-ия ден от началото на първите клинични прояви; 5. Считаме, че в случая се касае за токсинфекция с производство на токсин *in vivo*. Липсват анамnestични данни за предшестващо заболяване на ГИТ до момента. Случаят е лабораторно потвърден за ботулизъм.

В световен мащаб се съобщава за увеличаване броя на регистрираните случаи през последните години [6, 8]. Не са известни всички фактори за неравномерното разпространение на *Clostridium botulinum* по света – в Западните щати на САЩ се открива *C. botulinum* тип А, а в Източните и в Европа се среща по-често *C. botulinum* тип В [6]. По данни на НЦЗПБ за 2023 г. са регистрирани 8 случая на ботулизъм, а през 2022 г. – 1, като през предходните пет години случаи не са регистрирани [9]. През 2023 г. във Франция по време на Световната купа по ръग्би възниква взрив от ботулизъм – разболяват се 15 лица от различни страни и има един смъртен случай. Благодарение на бързите мерки, които се вземат от здравните власти, е идентифициран източникът – консервирани сардини, и са открити всички лица, които са ги консумирали [10]. По този начин е предотвратено възникването на тежки случаи.

Представеният от нас рядък случай на ботулизъм изискваше усилия за набавянето на ботулинов антитоксин за адекватно лечение. Във връзка с това е важно да има наличен противоботулинов серум или да е налице протокол, по който такъв да бъде намерен. Задължително е лабораторните специалисти да разполагат с контролни щамове или ДНК за различните типове токсини.

Ботулиновият невротоксин днес намира широко приложение в офталмологията за лечение на страбизъм, блефароспазм и др., в неврологията при тортиколис, хронична болка, мигрена, спастични състояния, в урологията при детрузорна активност и др., в гастроентерологията при затлъстяване, повишен тонус на сфинктера на Oddi, езофагеален спазъм, в дерматологията за разкрасителни процедури и др., в стоматологията при бруксизъм и др. Това повишава риска от възникване на ботулизъм. Затова всички тези процедури трябва да се извършват от компетентни лекари, които са добре запознати с „тъмната“ страна на токсина.

Благодарности: Изследването е подкрепено с финансова помощ по договор BG16RFPR002-1.014-0017 „Център за компетентност „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“, процедура BG16RFPR002-1.014 „Устойчиво развитие на центрове за върхови постижения и центрове за компетентност, в т.ч. и на конкретни инфраструктури или техни обединения от НПКНИ“, програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“ 2021-2027 г.

Библиография

1. Sugiyama H. Clostridium botulinum neurotoxin. Microbiol Rev. 1980; 44(3):419-48. doi: 10.1128/mr.44.3.419-448.1980.
2. Meng X, Karasawa T, Zou K, et al. Characterization of a neurotoxic Clostridium butyricum strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. J Clin Microbiol. 1997; 35(8):2160-2. doi: 10.1128/jcm.35.8.2160-2162.1997.
3. Rao AK, Sobel J, Chatham-Stephens K, Luquez C. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of botulism, 2021. MMWR Recomm Rep. 2021; 70(2):1-30. http://doi.org/10.15585/mmwr.r7002a1.
4. Ерменлиева Н. Ботулинов невротоксин. Монография. Стено, 2018. // Ermenlieva N. Botulinum neurotoxin. Monograph. Steno, 2018.
5. Chimienti S, Di Spirito M, Molinari F, et al. Botulinum Neurotoxins as Two-Faced Janus Proteins. Biomedicines. 2025;13(2):411. doi: 10.3390/biomedicines13020411.
6. Learoyd TP. Underreporting or Failed Notification? Global Botulism Reporting, 2000-2022. Health Secur. 2024; 22(3):203-209. doi: 10.1089/hs.2023.0081.
7. Lindström M, Keto R, Markkula A, et al. Multiplex PCR assay for detection and identification of Clostridium botulinum types A, B, E, and F in food and fecal material. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(12):5694-9. doi: 10.1128/AEM.67.12.5694-5699.2001.
8. Учебник по инфекциозни болести. Н. Янчева (ред.). Арбилис, 2023, 338-45. // Textbook of infectious diseases. N. Yancheva (ed.). Arbilis, 2023, 338-45.
9. Епидемиологичен бюлетин на НЦЗПБ, 2022-2023 г.
10. Meurice L, Filleul L, Fischer A, et al. Foodborne botulism outbreak involving different nationalities during the Rugby World Cup: critical role of credit card data and rapid international cooperation, France, September 2023. www.eurosurveillance.org.

✉ Адрес за кореспонденция:
Д-р Стефан Панайотов
e-mail: spanaiotov@yahoo.com