

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 614.9-036:616.981.558, 616-078

О.А. Носкова ¹, Т.Ю. Загоскина ¹, Е.Н. Субычева ¹, Е.Ю. Марков ¹,
С.Е. Лекомцева ², О.Б. Бодрых ³, С.В. Балахонов ¹КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОТУЛИЗМА В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ¹ ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока» (Иркутск)² Управление Роспотребнадзора по Иркутской области (Иркутск)³ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области (Иркутск)

Иркутская область является одним из регионов, где практически ежегодно регистрируются случаи заболевания ботулизмом. Проанализирована заболеваемость ботулизмом в области за десятилетний период (с 2002 г.), выявлены клинико-эпидемиологические особенности ее проявления на современном этапе. Заболеваемость проявлялась в виде доминирующего числа спорадических случаев (81,9 %). В структуре пищевых отравлений в Иркутской области доля ботулизма с 2006 г. составляет 100 %. Значительную роль в качестве факторов передачи инфекции играет употребление в пищу рыбы непромышленного изготовления, преимущественно копченого или соленого байкальского омуля (90,9 %). В 30 % случаев пострадавшие приобретали рыбу у частных лиц в неустановленных местах торговли, 60 % употребляли рыбу собственного посола. Ботулизм в Иркутской области регистрируется чаще всего с июля по ноябрь с пиками в июле (58,3 %) и сентябре (20,8 %), что связано с активизацией продаж рыбной продукции непромышленного изготовления в сочетании с неблагоприятными условиями хранения данных пищевых продуктов. Ботулизм встречается в различных возрастных группах с преобладанием возрастной категории 30–49 лет (47,8 %). Наиболее часто поражается социально активное трудоспособное население (72,3 %), что увеличивает социальную значимость заболевания. Регистрировались в основном среднетяжелые (56,5 %) и тяжелые (34,8 %) формы заболевания. Первичный симптомокомплекс проявлялся в двух вариантах – диспепсическо-паралитическом и офтальмоплегическом.

При анализе этиологической структуры заболеваемости ботулизмом установлено, что ведущая роль в возникновении заболеваний на территории Иркутской области принадлежит ботулотоксину типа E (73,9 %). Исследования клинического материала и пищевых продуктов на наличие ботулотоксина проводились параллельно стандартным методом в реакции биологической нейтрализации токсина на белых мышах по общепринятой схеме и методом дот-иммуноанализа с применением разработанной нами тест-системы. Проведена оценка возможности применения в лабораторной диагностике ботулизма дот-иммуноанализа, как экспресс-метода, обладающего высокой специфичностью, чувствительностью и простотой постановки.

Ключевые слова: ботулизм, эпидемиология, лабораторная диагностика, дот-иммуноанализ

CLINICAL-EPIDEMIOLOGICAL FEATURES AND IMPROVEMENT
OF BOTULISM LABORATORY DIAGNOSTICS IN IRKUTSK REGIONО.А. Noskova ¹, T.Yu. Zagoskina ¹, E.N. Subycheva ¹, E.Yu. Markov ¹, S.E. Lekomtseva ²,
O.B. Bodrykh ³, S.V. Balakhonov ¹¹ Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East (Irkutsk)² Administration of Rospotrebnadzor in Irkutsk Region (Irkutsk)³ Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region (Irkutsk)

Irkutsk Region is one of the Russian Regions where botulism cases are registered yearly. Botulism morbidity in Irkutsk Region is analysed for the ten-year period (since 2002); its clinical-epidemiological features are revealed at the present stage. Sporadic cases of botulism are dominated (81,9 %). From 2006 in Irkutsk Region botulism share makes 100 % in food poisoning number. A considerable role in the infection transmission plays consumption of fish, mainly smoked or salty Baikal omul (90,9 %). In 30 % of cases injured people purchased fish at private persons in unascertained trade places, 60 % of patients ate own salting fish. In Irkutsk Region botulism is registered more often from July till November with peaks in July (58,3 %) and September (20,8 %) that is connected with activation of unprofitable fabricated fish selling in combination with adverse conditions of this foodstuff storage. Botulism affects various age groups of population with prevalence of the age category 30–49 years old (47,8 %). Socially active able-bodied population (72,3 %) is most often affected that increases the social importance of the disease. Mainly, moderate severe (56,5 %) and severe (34,8 %) disease forms were registered. Primary symptoms include two variants – dyspeptically-paralytic and ophthalmologic-neurological forms.

Analysis of botulism etiological structure showed that the leading part in the disease occurrence in Irkutsk Region belonged to botulinum type E (73,9 %). Clinical material and foodstuff testing to botulinum toxin presence was conducted in parallel by the standard reaction of biological toxin neutralisation in white mice and dot-immunoanalysis with application of the test system that we have developed. Possibility of dot-immunoassay application in laboratory diagnostics of botulism is estimated as the express method with high specificity, sensitivity and simplicity.

Key words: botulism, epidemiology, laboratory diagnostics, dot-immunoassay

Ботулизм занимает особое место среди инфекционных заболеваний в силу полиморфизма клинических проявлений, тяжести течения и особенностей распространения. Широкое использование домашнего консервирования, соление, копчение рыбы и мясных продуктов без соблюдения соответствующих технологий влияет на интенсивность эпидемических проявлений данной инфекции. Заражение людей происходит преимущественно в результате употребления в пищу продуктов, содержащих ботулотоксины и самих возбудителей *Clostridium botulinum*. Течение и исходы заболевания определяются выраженностью клинических симптомов и своевременностью проведения специфической терапии. Чаще ботулизм протекает тяжело, летальность варьирует от 20 до 70 % [5, 7]. Диагностика ботулизма проводится на основании клинических, эпидемиологических и лабораторных данных. Применяемые в настоящее время методы лабораторной диагностики ботулизма трудоемки, затратны и требуют создания особых условий проведения анализа или использования специального дорогостоящего оборудования [3].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявление клинико-эпидемиологических особенностей ботулизма на территории Иркутской области. Оценка возможности применения метода дот-иммуноанализа (ДИА) в лабораторной диагностике ботулизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы архивные материалы Управления Роспотребнадзора по Иркутской области о случаях заболеваемости ботулизмом в регионе за 10 лет (2002–2011 гг.). Результаты исследования были оценены согласно общепринятым методам статистического анализа.

Исследования клинического материала и пищевых продуктов на наличие ботулотоксина

проводились параллельно стандартным методом в реакции биологической нейтрализации токсина на белых мышах (РБНТ) по общепринятой схеме и методом дот-иммуноанализа (сэндвич вариант), включающим адсорбцию исследуемого материала, содержащего ботулотоксин, на нитроцеллюлозном мембранном фильтре, нагруженном противоботулиническими антителами, блокирование свободных участков связывания раствором инертного белка, детекцию адсорбированного токсина с помощью специфических антител, меченных наночастицами коллоидного серебра, визуализацию результатов раствором проявителя [1, 6]. В качестве источника антител использовали коммерческие диагностические противоботулинические поливалентные и моноспецифические сыворотки типов А, В и Е [2].

Пробы, содержащие токсин, проявлялись на мембране в местах нанесения образцов в виде темно-серых пятен. В качестве отрицательных контролей использовались объекты окружающей среды (земля), пищевые продукты (рыба горячего копчения и свежая), клинический материал (рвотные массы, промывные воды желудка больного с диагнозом «дизентерия») и разводящая жидкость. В отрицательных контролях и материале, не содержащем ботулинический токсин, окрашивания пятен не происходило, что свидетельствовало о специфичности разработанной тест-системы [2]. Время проведения анализа составляло 2,5–3 часа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Иркутская область является территорией риска для возникновения заболеваний ботулизма и эпидемических проявлений различной интенсивности. Акватория озера Байкал отличается своеобразием природных и ландшафтных характеристик, экологических условий и социальных особенностей водопользования, благоприятствующих сохранению возбудителя этой инфекции.



Рис. 1. Динамика заболеваемости ботулизмом в Иркутской области (2002–2011 гг.).

Доля ботулизма в структуре пищевых отравлений в Иркутской области составляла в разные годы (2002 – 2011 гг.) от 50,0 % в 2004 г. до 100 % в 2006 – 2010 гг. Всего за анализируемый период зарегистрировано 38 случаев ботулизма с числом пострадавших 56 человек. В последние годы наблюдается тенденция к снижению заболеваемости ботулизмом (рис. 1).

Число заболевших за последние пять лет снизилось в сравнении с предыдущей пятилеткой (2002 – 2006 гг.) в 1,8 раза. Заболеваемость проявлялась в виде доминирующего числа спорадических случаев (81,9 %). В середине июля 2008 г. в с. Иваническое Аларского района был зарегистрирован групповой случай заболевания ботулизмом, когда в течение суток заболело 12 человек. Заболевания были связаны с употреблением соленого и копченого байкальского омуля, приобретенного на частном рынке п. Култук Слюдянского района. Один случай закончился летальным исходом. Ботулизм отличается выраженной территориальная неравномерность. Случаи заболеваний регистрируются в Слюдянском, Аларском, Иркутском, Усолье-Сибирском районах, г.г. Иркутске, Ангарске, Братске – районах, традиционно связанных с промыслом, в т.ч. браконьерским, и непромышленной переработкой рыбы, выловленной во внутренних водоемах. Рыба приобреталась пострадавшими в основном у случайных лиц в несанкционированных местах торговли (в п.п. Листвянка, Култук, Еланцы, на железнодорожных вокзалах).

Анализ причин возникновения ботулизма за последние годы свидетельствует о том, что доминирующую роль в качестве факторов передачи инфекции играет употребление в пищу рыбы, пораженной *Cl. botulinum* (95,6 %) – преимущественно копченого или соленого байкальского омуля (90,9 %). Доля прочих причин (употребление соленых грибов) составила лишь 4,4 %. Среди пострадавших, употреблявших рыбу, 30 % приобретали ее у частных лиц в неустановленных местах торговли, 60 % пострадавших употребляли рыбу собственного посола, 10 % употребляли рыбу, приобретенную в торговой сети.

Ботулизм не имеет четко выраженной сезонности в силу многофакторности причин заболеваемости, регистрируется преимущественно с июля по ноябрь с пиками в июле (58,3 %) и сентябре (20,8 %), что связано с активизацией продаж рыбной продукции непромышленного изготовления в сочетании с неблагоприятными условиями хранения данных пищевых продуктов.

Ботулизм встречается в различных возрастных группах, но наибольшая доля заболеваний в Иркутской области (47,8 %) пришлось на возрастную категорию 30 – 49 лет. Наиболее часто поражается социально активное трудоспособное население (72,3 %), что увеличивает социальную значимость заболевания. В структуре заболеваемости городские жители занимают 43,5 %. Половой состав не выявил преимуществ поражений, мужчины составили 52,2 %, женщины – 47,8 %.

Инкубационный период в 27,3 % случаев длился менее 12 часов, в 68,2 % – от 12 до 24 часов, и бо-

лее 24 часов – в 4,5 %. За медицинской помощью в первые сутки от начала заболевания обратились только 45,5 % заболевших, в течение 24 – 48 часов – 45,5 % больных и на третьи и более сутки – 9,0 %. Госпитализация заболевших осуществлялась своевременно в 90,9 % – в день обращения в медицинское учреждение и подозрения на заболевание ботулизмом. Диагноз ботулизма в 95,5 % случаев устанавливался в первые сутки обращения за медицинской помощью на основании клинико-эпидемиологических данных.

Первичный симптомокомплекс проявлялся в двух вариантах – диспепсически-паралитическом и офтальмоплегическом. Диспепсические проявления в начальном периоде заболеваний носили кратковременный характер вследствие развития в последующем атонии желудочно-кишечного тракта. Тошнота, рвота отмечались у $60,9 \pm 13,0$ % больных, боли в животе – у $39,1 \pm 16,3$ %, жидкий стул – у $26,1 \pm 17,9$ %. Третью случаев сопровождалась кратковременным повышением температуры до субфебрильных цифр. Поражения нервной системы (глазодвигательные и бульбарные нарушения различной степени выраженности) появлялись либо одновременно с общетоксическими явлениями, либо присоединялись позже. У большинства больных ($73,9 \pm 10,6$ %) отмечалась сухость слизистых оболочек. Расстройства глотания (чувство «комка» в гортани, затруднение при глотании твердой пищи, жидкости) отмечали $69,6 \pm 11,5$ % заболевших, изменения голоса (охриплость, гнусавость) – $65,2 \pm 12,3$ %. Нарушения со стороны зрения в виде потери четкости изображения предметов, «тумана», двоения перед глазами отмечали в первые сутки $87,0 \pm 7,5$ % больных. Миастенический синдром в виде прогрессирующей мышечной слабости отмечался у $91,3 \pm 6,1$ % заболевших, явления дыхательной недостаточности – у 13,0 % больных в основном с тяжелым течением заболевания. Ранние клинические проявления заболевания (первые сутки болезни) представлены в таблице 1.

Таблица 1
Клинические проявления начального периода ботулизма (в % $\pm$ m; n = 23)

Симптомы заболевания	Количество больных	
	абс.	% $\pm$ m
мышечная слабость	21	$91,3 \pm 6,1$
субфебрильная температура	7	$30,4 \pm 17,4$
головокружение	9	$39,1 \pm 16,3$
расстройство зрения	20	$87,0 \pm 7,5$
затруднение глотания	16	$69,6 \pm 11,5$
изменение голоса	15	$65,2 \pm 12,3$
сухость во рту	17	$73,9 \pm 10,6$
боли в животе	9	$39,1 \pm 16,3$
жидкий стул	6	$26,1 \pm 17,9$
тошнота	14	$60,9 \pm 13,0$
рвота	14	$60,9 \pm 13,0$

Регистрировались преимущественно средне-тяжелые (56,5 %) и тяжелые (34,8 %) формы заболевания.

За исследуемый период при проведении лабораторной диагностики в РБНТ установлен токсин возбудителя ботулизма у 86,4 % пациентов. При исследовании клинического материала наибольшее количество положительных результатов отмечено в промывных водах желудка (20,0 %) и крови (14,2 %). При анализе этиологической структуры заболеваемости ботулизмом установлено, что ведущая роль в возникновении заболеваний на территории Иркутской области принадлежит ботулотоксину типа Е (73,9 %), что характерно для проявлений «рыбного ботулизма» [7]. На долю токсина типа В (выявлен в соленых грибах) приходится лишь 4,4 %, в 21,7 % случаев тип токсина не установлен.

Методом дот-иммуноанализа проведено исследование 17 образцов клинического материала (кровь, промывные воды, моча, рвотные массы) от 7 больных, а также пробы пищевых остатков. Нами отмечено, что положительные результаты исследованных пищевых продуктов, клинического материала от больных людей, полученными в реакции биологической нейтрализации токсина на белых мышах, полностью совпадали с аналогичными результатами в ДИА, что подтверждает эффективность и специфичность используемой тест – системы (табл. 2).

Полученные данные показали, что сыворотки крови больных №№ 4 и 5 в РБНТ были отрицательными, несмотря на то, что остальной клинический материал (рвотные массы и промывные воды желудка) от тех же людей был положительным. В ДИА

все исследованные образцы дали положительный результат. На наш взгляд, это объясняется тем, что при тяжелом течении ботулизма больным в стационаре в экстренном порядке вводилась лечебная противоботулиническая сыворотка, при этом, находящийся в крови токсин частично нейтрализовался противоботулиническими антителами введенной сыворотки, и концентрация свободного ботулотоксина была очень низкой. Положительный результат в дот-иммуноанализе свидетельствовал о возможности обнаружения ботулотоксина в крови в составе циркулирующих иммунных комплексов, что повышает диагностическую ценность метода. При исследовании содержимого желудка больного № 2 отрицательный результат РБНТ объяснялся, по всей видимости, низким содержанием токсина на момент взятия материала.

Достоинством разработанной нами тест-системы для ДИА является высокая чувствительность, позволяющая обнаруживать следовые количества ботулотоксина в клиническом материале от больных людей. Быстрота выдачи ответа в ДИА, простота постановки реакции и отсутствие необходимости использования дорогостоящего оборудования и лабораторных животных делает применение данного метода перспективным для практического здравоохранения. Возможность экспресс-диагностики ботулизма методом дот-иммуноанализа в первые часы заболевания является основой ранней диагностики заболевания и своевременности назначения специфической терапии.

Таким образом, анализ данных о заболеваемости ботулизмом, эпидемиологических и клини-

Таблица 2

Сравнительные результаты исследования клинического материала в РБНТ и ДИА

Проба №		Исследуемый материал	Результат РБНТ	Результат ДИА
11	больной № 1	промывные воды желудка	+	+
12		промывные воды кишечника	+	+
13		кровь	+	+
21	больной № 2	содержимое желудка	–	+
22		промывные воды кишечника	+	+
31	больной № 3	клизменные воды	+	+
41	больной № 4	рвотные массы	+	+
42		кровь	–	+
51	больной № 5	промывные воды желудка	+	+
52		кровь	–	+
53		моча	–	–
61	больной № 6	кровь	–	–
62		промывные воды желудка	–	–
63		промывные воды кишечника	+	+
71	больной № 7	кровь	–	–
72		промывные воды желудка	+	+
73		промывные воды кишечника	–	–

ческих особенностях его течения, используемых методов лабораторной диагностики в Иркутской области позволил выявить некоторые особенности его проявлений на современном этапе:

1. Преимущественное развитие «рыбного ботулизма» на территории Иркутской области. Основным источником заболевания является омуль неучтенного улова.
2. Отмечается тенденция к снижению заболеваемости ботулизмом в последние годы.
3. Наиболее часто поражается социально активное трудоспособное население.
4. Доминирующим этиологическим фактором в возникновении ботулизма на территории Иркутской области является ботулотоксин типа Е.
5. Дот-иммуноанализ позволяет эффективно (с высокой чувствительностью и специфичностью) проводить скрининг клинического материала и пищевых продуктов на ботулотоксин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю. Использование специфических анти-тел, меченых частицами коллоидного серебра,

для выявления антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа // Клиническая диагностика. — 2002. — № 6. — С. 38–39.

2. Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Носырева Л.И. Конструирование тест-системы для скрининга клинического материала и пищевых продуктов на ботулотоксин в дот-иммуноанализе // Журнал инфекционной патологии. — 2009. — Т. 16, № 3. — С. 20–23.

3. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Балахонов С.В. Детекция и идентификация ботулинических токсинов. Современные подходы // Инфекционные болезни. — 2012. — № 1. — С. 64–73.

4. Матвеев К.И. Ботулизм: Общая и частичная эпидемиология. — М., 1973.

5. Никифоров В.Н. Ботулизм. — Л.: Медицина, 1985.

6. Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Перспективы использования коллоидного серебра как маркера в иммуноанализе // Сибирь-Восток. — 2002. — № 3 (51). — С. 10–12.

7. Поставит В.А. Пищевые токсикоинфекции: 2-е изд., перераб. и доп. — Л.: Медицина, 1984.

Сведения об авторах

Носкова Ольга Александровна – младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-39; e-mail: noskovaepid@yandex.ru)

Загоскина Татьяна Юрьевна – доктор медицинских наук, заведующая отделом подготовки и усовершенствования специалистов ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Субычева Елена Николаевна – младший научный сотрудник информационно-аналитического сектора ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Марков Евгений Юрьевич – доктор медицинских наук, заведующий биохимическим отделом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Балахонов Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Лекомцева Светлана Евгеньевна – специалист отдела надзора за питанием населения Управления Роспотребнадзора по Иркутской области

Бодрых Ольга Борисовна – заведующая отделом особо опасных, вирусных и других природно-очаговых инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области»