



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## INCIDENCIA DE BOTULISMO EN ALIMENTOS

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A N  
CAROLINA MORAN ROMERO  
VILA ANDREA ZAVALA AGUILAR  
MEXICO, D. F. 1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1979  
LAB \_\_\_\_\_  
AÑO M.T. ~~248~~ 248  
FECHA \_\_\_\_\_  
PREC \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



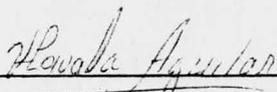
Jurado Asignado Originalmente Según el Tema

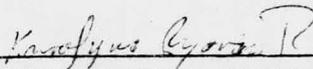
Presidente:	Prof.	NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA
Vocal:	"	NINFA GUERRERO
Secretario:	"	RUBEN BERRA GARCIA - COSS
1er. Suplente:	"	ENRIQUE CALDERON GARCIA
2do. Suplente:	"	LUIS RAUL TOVAR GALVEZ

Sitio donde se Desarrolló el Tema:

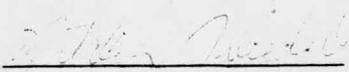
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

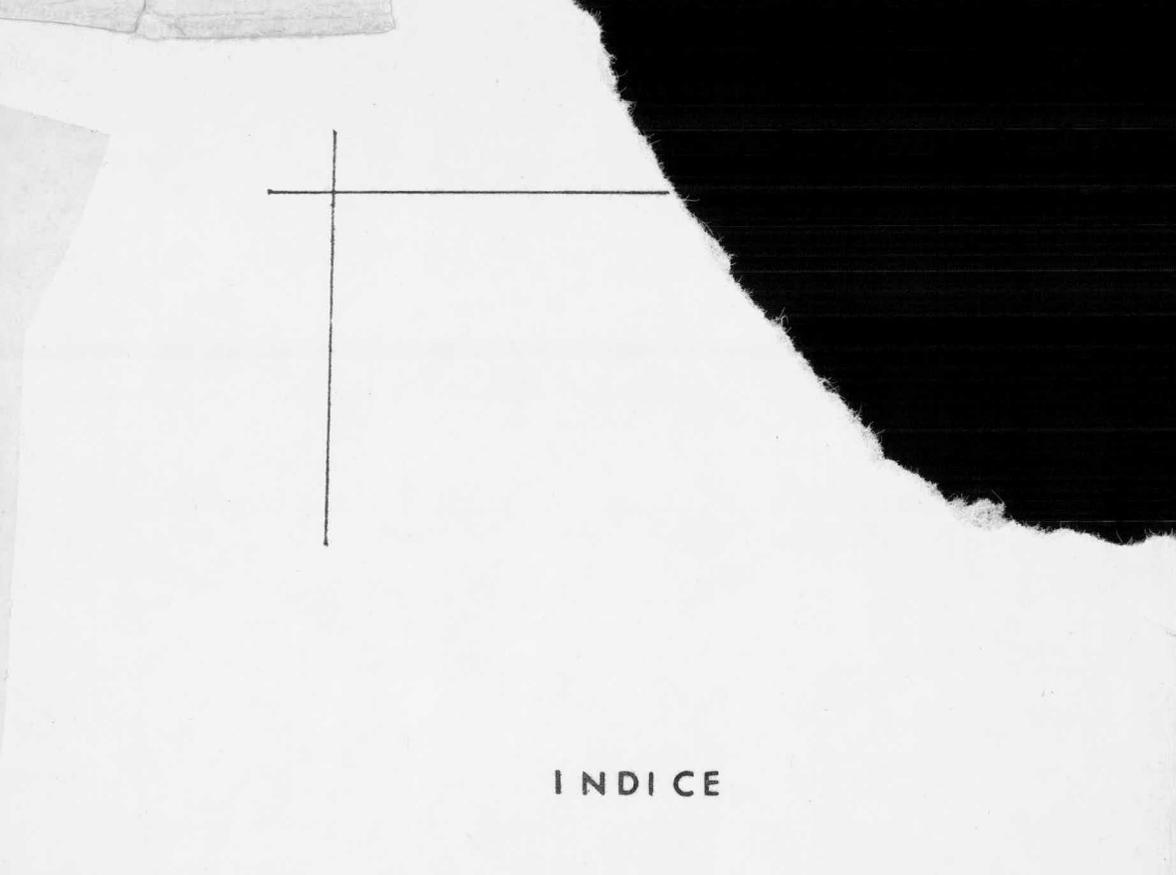
Nombre completo y Firma  
de los Sustentantes:

  
VILA ANDREA ZAVALA AGUILAR

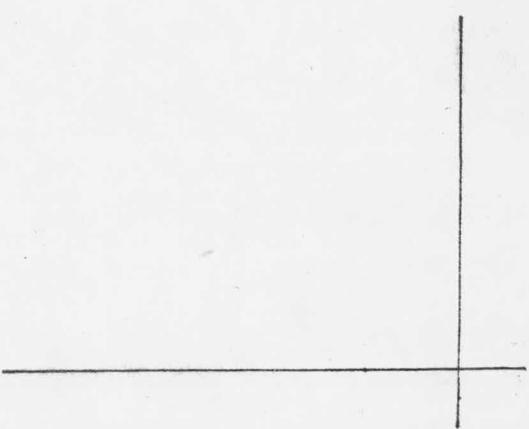
  
CAROLINA MORAN ROMERO

Nombre completo y Firma  
del Asesor del Tema:

  
Prof. NATALIA SALCEDO O.



INDICE



CAPITULO I		Pág.
<u>INTRODUCCION</u>		
I.1	Cl. Botulinum	2
CAPITULO II		
<u>GENERALIDADES</u>		
II.1	Antecedentes.	8
II.2	Morfología.	10
II.3	Obtención de la energía metabólica.	12
II.4	Forma vegetativa.	13
II.5	Factores que influyen para el crecimiento de <u>Cl.botulinum</u> .	14
II.6	Identificación.	16
II.7	Formación de esporas.	18
II.8	Distribución de esporas.	20
II.9	Tinción de esporas.	21
II.10	Resistencia al calor de las esporas.	21
II.10.1	Resistencia de las esporas en diferentes medios de cultivo.	24
II.10.2	Estudio particular de cepas.	25
II.10.3	Reacción del medio en que son calentadas las esporas.	26
II.10.4	Concentración de esporas.	27
II.10.5	Edad de las esporas.	27
II.10.6	Presencia de sal.	27
II.10.7	Influencia del azúcar.	28
II.10.8	Influencia de las grasas en la <u>resistencia al calor</u> .	28
II.10.9	Efecto de proteínas, almidón y espesantes.	29

## CAPITULO III

Pág.

CARACTERISTICAS DE LA TOXINA

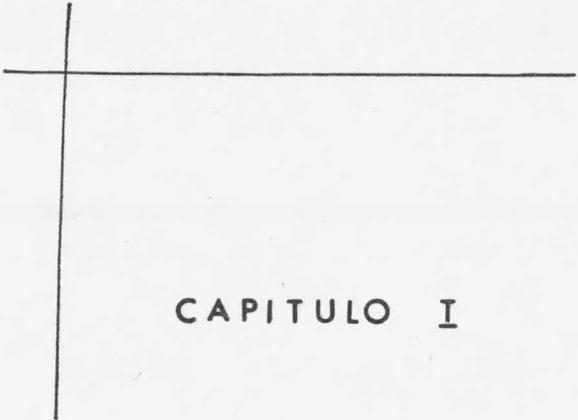
III.1	Características generales y clasificación.	32
III.2	Características comparativas de las toxinas.	33
III.3	Toxina botulínica.	37
III.4	Relación entre ciertos bacteriófagos y la toxicidad en <u>Cl.botulinum</u> .	42
III.5	Actividad de la toxina botulínica.	43
III.6	Unidad tóxica.	45
III.7	Toxina tipo "A"	46
III.8	Toxina tipo "B"	51
III.9	Toxinas "C" y "D"	53
III.10	Toxinas "E"	58
III.11	Toxina tipo "G"	61
III.12	Inhibición de <u>Cl.botulinum</u> tipo "A y "B" por hemaglutinación con azúcar.	64

## CAPITULO IV

ALIMENTOS MAS SUSCEPTIBLES DE CONTAMINARSE

IV.1	Introducción	70
IV.2	Alimentos precocinados.	71
IV.3	<u>Cl.botulinum</u> en alimentos congelados.	74
IV.4	<u>Cl.botulinum</u> en leche condensada.	76
IV.5	<u>Cl.botulinum</u> en el pan.	77

		Pág.
IV.6	Desarrollo de <u>Cl.botulinum</u> en productos cárnicos.	77
IV.7	<u>Cl.botulinum</u> en alimentos ácidos.	79
IV.8	<u>Cl.botulinum</u> en pescado.	81
CAPITULO V		
<u>INCIDENCIA DE BOTULISMO EN ALIMENTOS</u>		
V.1	Introducción	83
V.2	condiciones para el brote de botulismo en alimentos.	85
V.3	Identificación de botulismo en alimentos.	89
V.4	Síntomas de botulismo en humanos y - su probable alivio.	97
V.5	Datos estadfsticos reportados de brotes de botulismo.	103
V.6	Formas posibles de combatir el botulismo.	115
V.7	Otras formas de contraer el botulismo.	120
CAPITULO VI		
	<u>CONCLUSIONES</u>	125
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	132



CAPITULO I

INTRODUCCION

Objetivo:

En este trabajo se pretende elaborar un estudio bibliográfico sobre la incidencia de botulismo en los alimentos, tratando de mostrar los factores que intervienen para la formación de la exotoxina.

Cabe señalar que el botulismo no es la única intoxicación diseminada por alimentos, pero por la importancia que tiene para la salud pública merece una atención especial.

De ahí que se insiste en el conocimiento del microorganismo para tener al alcance las bases necesarias para su destrucción, o por lo menos evitar su proliferación.

Otro de los objetivos que se persiguen es resumir la información dispersa sobre el botulismo, para que pueda servir en un futuro próximo como base de estudios experimentales.

## Clostridium botulinum

La extrema gravedad que representa el consumo de alimentos contaminados con este microorganismo, debido a fallas en el procesamiento de algunos alimentos susceptibles, tanto a nivel industrial como casero, nos ha llevado a investigar las causas que pueden dar origen a esta contaminación en alimentos.

Debido a que en México la industrialización de alimentos es muy reciente, nos hemos encontrado con la falta de registros de intoxicaciones provocadas por este género, tanto en Instituciones Gubernamentales como privadas, por lo que la mayoría de las incidencias las hemos tomado de los registros de los Estados Unidos de Norteamérica.

Remotándonos a los inicios de la intoxicación, nos encontramos que en el momento en que surge la necesidad de preservar los alimentos es cuando, debido al crecimiento de la población o a la escases de alimento en algunas épocas del año, aparecen, -- juntamente con ello, los problemas de contaminación.

En un principio no fue posible de evitar el desarrollo del microorganismo completamente, produciéndose intoxicaciones con síntomas antes desconocidos.

Eso creó la necesidad de investigar las causas de estas anomalías en el consumo alimenticio de los pueblos, como por ejemplo en lo tocante a carne ahumada, embutidos, conservas de pescado, así como a frutas y legumbres. Dichos alimentos se preparaban muchas veces sin ninguna vigilancia de tipo microbiológico y basándose exclusivamente en propiedades organolépticas (color, olor, sabor, textura). Con tales preparados se logró un mayor comercio entre los pueblos y una abundancia en la disponibilidad de alimentos para nutrir a la cada vez mayor población.

Surge en este momento la necesidad de que los alimentos conservados tengan una calidad organoléptica y sanitaria aceptables para el consumidor.

Este es el punto de partida para investigar la manera de mejorar las preparaciones alimenticias, y mantener a los alimentos libres de contaminación; en este caso específico, exentos de bacterias como Cl. botulinum.

Cl. botulinum: prolifera en el alimento y provoca la aparición de diversos géneros de toxinas específicas: A, B, C, D, E, F, las cuales causan trastornos específicos al ingerir el alimento contaminado con este microorganismo. En ciertos casos sobreviene la muerte, ya que después de la ingestión del alimen-

to contaminado no es inmediata la aparición de los primeros sintomas, y por lo tanto no es rápido el tratamiento con la antitoxina adecuada para contrarrestar tal efecto tóxico. Para evitar estos casos extremos se han investigado condiciones de temperatura y humedad adecuadas, acidez, pH, adición de colorantes, sales, radiaciones, etc..... con la finalidad de evitar la proliferación del microorganismo y mantener a los alimentos exentos de ellos y en condiciones aptas para el consumo humano.

En la medida de lo posible ha sido nuestro propósito presentar las incidencias del botulismo en México; pero como ya se dijo existen pocos datos que nos permitan hacer inferencias estadísticas sobre la distribución, zonas de mayor peligro, medidas tomadas en los alimentos enlatados, etc.... y de esta manera hacer un diagnóstico de la realidad nacional respecto al botulismo.

Sin embargo, no deja de tener importancia este estudio biobliográfico, pues existe un índice más o menos elevado de mortalidad por causa de intoxicaciones no diagnosticadas.

Es conveniente señalar que hasta la fecha siguen las investigaciones sobre el botulismo, ya que aún no se conoce totalmente el mecanismo de formación de la exotoxina; de manera que este trabajo es un aporte preliminar para otras investigaciones

más profundas y esperamos que sirva de base para la formación de los futuros egresados de la Facultad en el área de alimentos.

En la parte de generalidades se presentan los factores -- que intervienen en el crecimiento de Cl. botulinum, su identificación y eliminación.

Se ha comprobado que la alta resistencia de las esporas - al calor permite su conservación en los alimentos enlatados, que a su debido tiempo, y bajo condiciones adecuadas, germinarían dando células que producen la exotoxina.

En el capítulo de toxinas se tratará lo relativo al peso molecular, dosis mínima letal, aislamiento, efecto sobre el sistema nervioso, importancia para el hombre de las toxinas tipo A, B, y E.

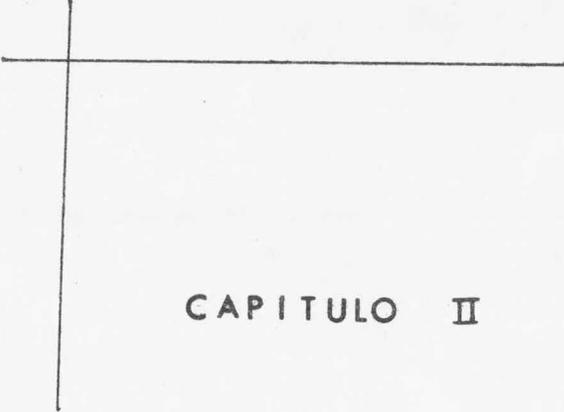
En la medida en que estemos en capacidad de conocer las características de la exotoxina podremos disponer de las medidas necesarias para prevenir las intoxicaciones del "veneno más venenoso" (2) en los alimentos enlatados.

Por lo naterior, se presentan los alimentos más susceptibles de "contaminarse", a fin de que al adquirirlos se tengan --

los cuidados de observar las características externas de los alimentos enlatados y de fabricación casera que se conservan en condiciones anaerobias. Cabe resaltar el hecho de que los envases - contaminados presentan abombamiento y éste es uno de los indicadores visuales de importancia.

Obviamente que el consumo de un alimento con presencia de exotoxina puede traer como corolario brotes epidémicos con consecuencias irreversibles que conduzcan hasta la muerte.

En el capítulo V se dan datos estadísticos y muertes con los alimentos que más intoxicaciones han provocado.



CAPITULO II

GENERALIDADES

## II.1 Antecedentes:

El botulismo es una intoxicación acompañada de neuroparálisis, producida por la ingestión de alimentos que contienen exotoxinas de C1.botulinum. (31)

Etimológicamente la palabra botulismo viene del latín "botulus", embutido (intoxicación por los venenos de los embutidos). C1 botulinum fué descrito por vez primera en Wurtemberg, Alemania, en 1873. Fue descubierto por Evans Emergen, en 1876, quien lo llamó - "Bacillus botulinum". Vinculó la intoxicación que produce a una -- toxina del mismo nombre.

Originalmente el bacilo fue aislado de un jamón curado -- que había sido la causa de la intoxicación de 34 personas. También -- fué aislado del intestino y del bazo de personas fallecidas a consecuencia de la intoxicación. (35)

Todos hemos ingerido este organismo alguna vez, pero la -- bacteria misma no es infecciosa y es incapaz de acusar síntomas de -- envenenamiento en el hombre.

Cuando el organismo crece bajo condiciones favorables en el alimento (ausencia de aire) se produce la toxina. La intoxicación es ocasionada por una poderosa toxina. Si la toxina es consumida, el resultado es el botulismo. Una cucharada de toxina puede matar a un millón de personas; bastan 0.2  $\mu$ g para matar a una persona.

El alimento responsable puede tener apariencia normal; - pero generalmente está podrido, huele a una combinación de mantequilla rancia y carne podrida.

En el botulismo, de hecho, no hay invasión de tejidos por que no es en sí el organismo mismo o sus esporas lo que producen la intoxicación, sino la exotoxina formada en condiciones anaeróbicas. Lo anterior se ha comprobado en condiciones experimentales, inyectando dosis masivas de esporas a cobayos sin observar efectos tóxicos.

Sin embargo, se ha encontrado botulismo en heridas contaminadas y en cultivos mezclados con bacterias aerobias y anaerobias. Por lo tanto, en circunstancias extrañas puede proliferar en los tejidos. (2 )

Para evitar la producción de la toxina hay que inhibir-  
la actividad del microorganismo, su esporulación y la germinación  
de las esporas.

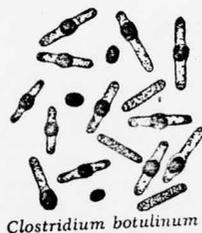
La toxina y la forma vegetativa son termolábiles; pero-  
las esporas son termorresistentes y es sumamente peligroso que --  
contaminen los alimentos. (31)

C1. botulinum es un organismo patógeno, saprófito, co-  
mún del suelo. Hay por lo menos seis tipos A, B, C, D, E y F de  
los cuales veremos aquí los A, B y E porque producen botulismo en  
el hombre. Los otros tipos son tóxicos para los animales. (2)

## II.2 Morfología:

C1. botulinum pertenece a la parte 16, bacterias Gram-  
positivas, esporuladas, familia Bacillaceae, género Clostridium,  
especie botulinum (según el "Manual de Bergey de Bacteriología De  
terminativa", octava edición). La palabra Clostridium significa-  
"fusiforme" y describe el aspecto de miembros del género. Se cla-  
sifican de acuerdo a la posición de las esporas y por sus caracte-  
rísticas fisiológicas. Pueden ser sacarolíticos (que descomponen  
el azúcar) o proteolíticos (que atacan a las proteínas). (15)

El agente etiológico del botulismo (*Cl.botulinum*) es un bacilo en forma cilíndrica, Gram positivo y polimorfo, de extremidades redondas, con una longitud de 3 a 8 micras y un grosor de 0.5 a 0.8 micras que forma elementos acortados o filamentos alargados, móvil, poseyendo de 3 a 4 flagelos. Es anaerobio, del suelo, saprófito, formador de gas. En el medio exterior produce esporas ovoides centrales o subterminales, dándole al microbio un aspecto parecido al de una raqueta de tenis. Se presenta en dos formas: vegetativa y esporulada (ver 11.4 y 11.7) (35)



Pertenece a las especies proteolíticas; desintegra, en medios líquidos, trozos de tejidos y albúmina de huevo, licúa la gelatina y desprende ácido sulfhídrico, amoníaco, aminas volátiles cetonas, alcoholes y los ácidos acético, butírico y láctico; peptoniza la leche con desprendimiento de gas. Fermenta la glucosa, la levulosa, la maltosa y la glicerina, con formación de ácidos y gas. (35)

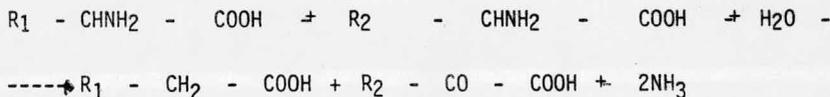
### II.3 Obtención de la energía metabólica:

C1.botulinum, por ser una especie proteolítica, fermenta los hidratos de carbono con producción de gas, pero a veces esta producción no se observa fácilmente y por lo tanto obtiene su energía metabólica por oxidación de aminoácidos. Los aminoácidos esenciales son: cistina, leucina, lisina, y prolina.

Como son anaerobios estrictos su último aceptor de hidrógeno no es el oxígeno molecular, sino los propios aminoácidos, o los productos de su metabolismo.

C1.botulinum lleva a cabo la oxidación anaerobia por medio de la oxidación de unos aminoácidos, mientras que los otros se reducen. A esta reacción se le denomina reacción de Stickland.

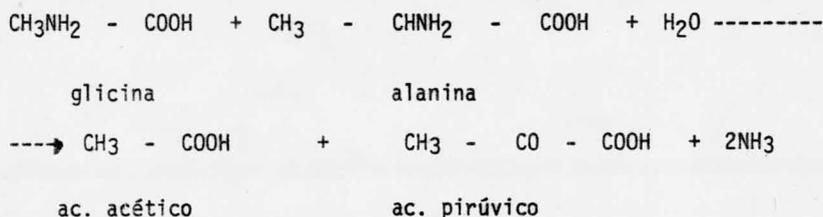
Reacción general.



El aminoácido (1) recibe átomos de hidrógeno de (2) y se reduce a ácido graso, en tanto que (2) es oxidado a cetoácido.

Para el efecto se requiere de varias enzimas, una deshidrogenasa específica para cada uno de los aminoácidos que intervienen y una coenzima portadora del hidrógeno y finalmente la intervención de un piridín nucleótido.

Ejemplo de una reacción de Stickland:



Los aminoácidos que intervienen en estas reacciones se dividen en dos grupos: donadores y aceptores de hidrógeno.

Cualquier donador en presencia de cualquier aceptor de hidrógeno producirá una reacción de Stickland. Esta oxidación-reducción es muy rápida, igual que la reacción aerobia de los hidratos de carbono por los microorganismos de la fermentación.

La reacción de Stickland bien puede ser la principal fuente de energía para C1. botulinum porque esterifica el fósforo inorgánico y se sintetiza ATP. (2)

#### II.4 Forma vegetativa:

Se encuentran constantemente en el contenido intestinal del hombre y de los animales, expulsándose al exterior con las heces fecales. Estas formas, al caer al suelo conservan durante mucho tiempo (años) su forma de espora. (15)

#### Clasificación:

Bergey (octava edición del "Manual de Bacteriología Determinativa"), sugiere que el término C1. botulinum se refiera al tipo no ovulítico y el de C1. parobotulinum para el ovulítico.

Las cepas de Cl.botulinum se desarrollan con menor rapidez que las del tipo parabotulinum.

En placas de gelosa-sangre de cordero y glucosa, las colonias superficiales son sumamente granulosas, con bordes dentados, producen gas con olor de ácido butírico, no producen cambio alguno en la leche, no licúan la carne cocida, el suero de Loffler, el suero coagulado y la clara de huevo. La licuefacción de la gelatina empieza lentamente hacia el séptimo día y no es completa sino hasta la tercera semana. Produce ácido y gas de la glucosa, la fructosa, la maltosa, la sacarosa, la dextrina, el glicerol, adonita e inosita; no fermenta a la lactosa ni a la salicina. (31)

Cl.parabotulinum se desarrolla con mayor rapidez en gelosa-sangre-glucosa, da olor pútrido, digiere la leche, el huevo y la carne. Licúa pronto el suero y la gelatina. Fermenta la salicina y no la sacarosa.(31)

## II.5 Factores que influyen en el crecimiento de Cl.botulinum:

1. Nutrientes: proteínas, hidratos de carbono, sales minerales, - (cloro, sodio, fósforo, fierro, etc....).
2. Humedad: En general las bacterias necesitan de más agua que -- las levaduras y mohos. Sin embargo, es la cantidad de agua disponible y no la humedad total la que determina el límite de humedad mínima para el crecimiento.

La mayoría de las bacterias crecen bien en medios con una actividad de agua,  $a_w$  (presión de vapor de la solución dividida por la presión de vapor del disolvente) próxima a la unidad. Para C1.botulinum el  $a_w$  es de 0.95. (15)

3. Temperatura: Pueden considerarse mesófilas, es decir que crecen bien a temperatura ambiente. La temperatura óptima es de 25 a 30°C. En el laboratorio crecen a 35 - 37°C.

Se ha apreciado que C1.botulinum del tipo E puede crecer lentamente y producir toxina a una temperatura de 3.3°C.

4. Concentración de hidrógeno: El pH óptimo para su crecimiento es casi neutro; pero también pueden crecer en un medio débilmente alcalino, (7.3 y 7.6). El pH mínimo de crecimiento y producción de toxina depende del tipo de alimento y de la temperatura.

En los laboratorios de la "National Canners Association" se ha estudiado la germinación de esporas y producción de toxina por variedades de los tipos A y B de C1.botulinum en diversos alimentos ajustados a diferentes niveles de pH. (15)

En productos ácidos puede crecer C1. botulinum si está presente, cuando el ácido haya sido utilizado por otros (mohos) organismos, aumentando el pH en algunos puntos o en todo el alimento. (12)

5. Potencial de óxido-reducción: Son anaerobios estrictos.
6. Sustancias inhibitoras: Otros microorganismos que crecen en el mismo medio (alimento) pueden actuar como inhibidores, porque originan productos que favorecen la reacción ácida.

7. Sustancias químicas que actúan como conservadoras: Un contenido de sal de 6 a 8% en el medio de cultivo y los nitratos.

## II.6 Identificación:

Para el crecimiento de los Clostridia, los medios, especialmente la gelosa-sangre, deben ser tan recientes como sea posible. Para los anaerobios estrictos la gelosa-sangre incubada anaeróbicamente puede dar mejores resultados.

Cuando pueden hacerse cultivos en estría los resultados son mejores que las siembras por picadura. En general Cl.botulinum es difícil de aislar en cultivos puros.

Pasos para la identificación:

1. Se emulsiona el material sospechoso en agua peptonada al 0.1%
2. Se siembran varios tubos de medio de (Robertsen) con carne cocida.
3. Se calienta la mitad de los tubos a 75°- 80°C durante 30 minutos, para liberarlos de la microflora asporógena extraña y se enfrían.
4. Se incuban todos los tubos (los calentados y los no calentados) - a 35°C durante 3 - 5 días.
5. Se siembra en gelosa-sangre recientemente preparada y se incuban anaeróbicamente a 35°C, durante 2 - 3 días.
6. Como el microorganismo es anaerobio estricto, es preferible dividir las placas colocándolas en dos jarros de anaerobiosis, por si alguna de ellas no funciona bien.

7. Si el material está fuertemente contaminado, se calienta parte de la emulsión, como se ha descrito antes. Se hacen varias diluciones seriadas del material calentado y se añaden cantidades de 1 ml. a 15 - 20 ml. de gelosa nutritiva glucosada fundida a 50°C, puesta en tubos de 15 cm x 2.5 cm. Se mezcla, se enfría y se incuba. Se corta el tubo cerca del punto en el que se observaron colonias sospechosas, se recogen éstas con una pipeta-Pasteur y se siembra en placas de gelosa-sangre.( 8 )

"Cultivo"

Medio:	Desarrollo:
Glucosa-sangre de Zeissler	Colonias irregulares con expansiones o ramificaciones delgadas o filamentosas. Alrededor de las colonias se forman zonas de hemólisis.(31)
Gelosa sembrada por picadura.	Formación de colonias en forma de bolas de algodón o conglomerados compactos. Presentan ramificaciones filamentosas.(31)
Gelatina	Colonias circulares, transparentes, rodeadas por pequeñas zonas de licuefacción. Luego, -- las colonias se hacen turbias, parduscas, con apéndices en forma de espinas.(31)
Caldo-higado (medio Kitt-Tarozzi)	Al comienzo se forma enturbiamiento. Luego -- aparece en el fondo un sedimento compacto, al par que se aclara el líquido.( 8 ).

Medios de cultivo:

En medio de gelosa-sangre las colonias son grandes, transparentes, fimbriadas y hemolíticas.

En carne cocida: de color negro. La digestión es positiva, no hay olor y sí producción de gas.

En leche tornasolada hay digestión: ( 8 )

Reacciones con azúcares.

Glucosa: Positiva

Sacarosa: Negativa

Lactosa: Negativa

Salicilina: Negativa

Reacción indol: Negativa

Licuación de gelatina: Positiva

Lecitinasa: Positiva

## II.7 Esporas y esporogénesis:

Las esporas son formaciones intracelulares, esféricas u ova-  
les. La génesis de las esporas es uno de los estadios del ciclo de de-  
sarrollo de determinados microorganismos, que se ha formado en el pro-  
ceso de la evolución en la lucha por la conservación de la especie. --  
(12)

No hay unanimidad de opinión sobre la función de la espora-  
en la naturaleza o sobre los factores involucrados en su formación, ya  
que no tiene lugar la multiplicación como resultado del ciclo celular-  
vegetativo: célula- espora- forma vegetativa. Muy pocos bacteriólogos  
aceptan el concepto de que la espora es un conjunto de células separa-  
das para la reproducción; en lugar de ésto se dan explicaciones de la-  
naturaleza biológica y la función de las esporas bacterianas.

Dicen que las esporas son etapas de un ciclo de desarrollo de -  
ciertos organismos, o que son formas para el reordenamiento del material  
nuclear; éstas son tan sólo algunas de las teorías en discusión. (12)

La formación de esporas tiene lugar en el medio externo (en el terreno y en los medios de cultivo) y no se observa en los tejidos del cuerpo humano o de los animales.(31)

El proceso de esporogénesis se desarrolla consecutivamente en cuatro estadios:

- 1). Estadio Preparatorio
- 2). Estadio de preespora
- 3). Estadio de la formación de la envoltura
- 4). Estadio de maduración.

Al ir a parar los bacilos a un medio determinado, sobre todo de condiciones desfavorables, se operan en ellos ciertas modificaciones estructurales. En uno de los segmentos de la célula el citoplasma se condensa, formándose la preespora, que se cubre después de una envoltura densa, multiestraficada, poco permeable, mientras que el resto de la célula termina por sucumbir. En lugar de la forma vegetativa se genera una espora madura, que representa aproximadamente la décima parte de la célula materna. Este proceso de la formación de la espora se determina en el curso de 18 a 20 h.

Las esporas se caracterizan por presentar una gran refrigerancia a la luz y al observarlas con el microscopio, sin tñir, ofrecen el aspecto de granos brillantes, que toman con dificultad los colorantes. a consecuencia de poseer una envoltura compacta, formada por multitud de capas de estructura laminar, una -

cantidad mínima de agua libre y una elevada proporción de calcio y lípidos. Cuando la espora va a dar a un medio favorable se -- desarrolla y vuelve a convertirse en forma vegetativa.(31)

## II.8 Distribución de las esporas:

Se estima que el habitat de C1.botulinum es el suelo,- por haberse hallado esporas tanto en terreno virgen como cultiva do.

Las cosechas vegetales pueden contaminarse a partir -- del suelo, el consumo de tales plantas contaminaría el contenido intestinal y por tanto, el estiércol de los animales.

Las esporas de tipo E se encuentran, además de en el - suelo, en lodos marinos y de lagos y en el pescado, principalmen te en su intestino.(15)

<u>Tipo de toxina.</u>	<u>Proteólisi de la clara de huevo coagulada</u>	<u>Incidencia</u>	<u>Distribución</u>
A	Ovolítica	hombre, gallina	Suelos, alimentos en conserva alterados,-heridas, etc....
B	Ovolítico (tipo Nevin)	hombre, gallina	suelos, alimentos en conserva alterados,-heridas.
C	No ovolíticos	hombre, gallina	suelos, alimentos <u>en</u> latados.
D	No ovolíticos	animales	alimentos alterados-heridas
E	No ovolíticos	hombre, peces	suelos, peces
F	No ovolíticos	peces	suelos, peces

## II.9 Tinción de esporas.

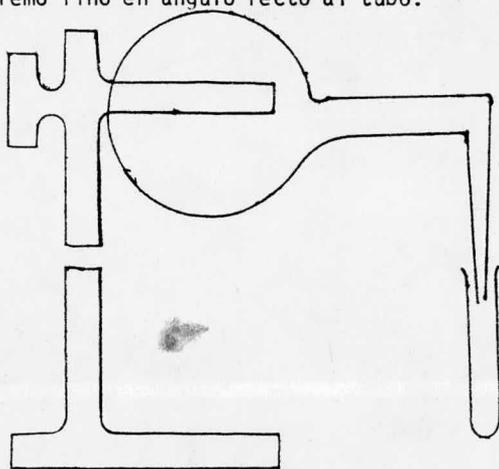
- a. Hacer una delgada capa que se tiñe durante tres minutos con fuchsina fenicada caliente (Ziehl-Neelsen)
- b. Lavar, inundar con solución acuosa de cloruro férrico al 30% durante dos minutos.
- c. Decolorar con solución de sulfito sódico al 5%
- d. Lavar y teñir de contraste con verde de malaquita al 1%
- e. La técnica de Flemming emplea la nigrosina para la tinción de contraste. Con el borde de otro portaobjeto se extiende la nigrosina sobre la preparación.
- f. Las esporas se tiñen de rojo. Las células son verdes o, con el método de Flemming, transparentes sobre un fondo gris. (8)

## II.10 Resistencia térmica de las bacterias y de sus esporas.

Debido al desconocimiento de la naturaleza de las esporas, los investigadores aún no llegan a conclusiones definitivas sobre las causas de la resistencia al calor de las esporas de Clostridium. Por lo tanto hasta la fecha se ha tenido que recurrir a explicaciones

experimentales, de donde, dependiendo de las condiciones de su realización, se han obtenido resultados no homogéneos en lo relativo al tiempo de muerte térmica.

Sternbeg propuso aislar el organismo en tubo antes de exponerlo al calor. El bulbo de Sternbeg consiste en un bulbo de vidrio con el cuello hacia abajo, con un extremo fino en ángulo recto al tubo.



Para llenarlo, el tubo se calienta suavemente, - después se sumerge en el cultivo y se determina el tiempo de muerte térmica. A medida que el bulbo se enfría, parte del cultivo se dirige hacia éste. El cuello entonces se sella a la llama. (43)

El bulbo queda suspendido por un alambre en un baño de agua o de aceite. La temperatura se toma periódicamente.

dicamente. Eijkman señaló que tal tratamiento puede - desactivar la célula afectando su reproducción.

Magen y muchos otros han señalado que las altas-resistencias de las esporas no constituyen una propiedad fija, sino que dependen de varios factores. Dickson y otros observaron variaciones en la resistencia al calor en las esporas de C1. botulinum.

El elemento más difícil de regular es la reproducción de las esporas. Hasta el momento se atribuye - la variación del tiempo de muerte térmica a factores ta les como: concentración de sal, y ésto puede deberse a la variación en las funciones de las esporas. Los siguientes efectos se suponen causados por la resistencia bacterial al calor de las esporas en suspensión. (43)

Muchas hortalizas contienen sustancias que dismi nuyen la resistencia al calor de las esporas. (43)

Townsend, Easty y Base (1932) hicieron una investigación para determinar estadísticamente el tiempo de muerte térmica en varios alimentos y comparar el organismo 3679 (anaerobio putrefactivo) en lo que se refiere a la resistencia al calor. Este organismo es casi - idéntico a C1. botulinum tipo C, con excepción de la -

formación de toxina. Por lo tanto se emplea en trabajos experimentales cuando no puede usarse C1. botulinum. (43)

Easty y Mayer (1932) observaron que la resistencia al calor de las esporas de C1. botulinum variaba -- considerablemente aún en esporas de la misma muestra. -- Este fenómeno lo explicaba diciendo que había algunos -- factores conocidos y otros desconocidos. En esta investigación se mostró la importancia que tiene el empleo -- del medio adecuado. Publicaron que existía formación -- de esporas en diferentes puntos del mismo medio, y que -- preparadas y manejadas exactamente de igual manera, pro -- ducían esporas con marcadas diferencias de resistencia -- al calor. Los mismos investigadores hicieron sus obser -- vaciones en suspensiones de esporas de muestras de C1. -- botulinum y descubrieron que la resistencia al calor -- de este organismo, en alimentos enlatados, era diferen -- te cuando se trataba con fosfatos neutros. (43)

#### II.10.1 Resistencia de las esporas en diferentes medios de cultivo.

Las esporas producidas en diferentes medios han -- mostrado poseer variaciones en la resistencia al calor. Se ha comprobado que, debido al cambio en el sustrato -- nutritivo, se produce un cambio en la resistencia al ca

lor. Summer, en 1930, creó esporas de Cl. botulinum - en un 4% de pectona, mostrando resistencia que iba de media, una y dos horas. Agregando fosfato la resistencia aumentó a 4 horas. (43)

Curran y Evans en (1929) observaron que, cuando las esporas son expuestas a un tratamiento previo de ultravioleta con una longitud de onda mayor de 2000Å, bajo condiciones aceptables, se sensibilizan las esporas al calor.

Angeres también comprobó que varios tratamientos, antes de aplicar el calor, sensibilizan a las esporas. La ciencia aún no ha podido determinar y regular todos los parámetros que intervienen en la variación de la resistencia de las esporas. (43)

#### II.10.2 Estudio particular de cepas.

Eickson observó que dos cepas diferentes de Cl. botulinum se comportan siempre de modo diferente, o mejor dicho, no son exactamente iguales. Esto quedó demostrado en el estudio que se realizó y cuyos resultados se indican a continuación:

Tiempo						
min.	4	10	32	100	330	
°C	120	115	110	105	100	

El autor, a pesar de los resultados obtenidos, sugiere que dichos resultados deben ser corroborados -- por otros investigadores. (43)

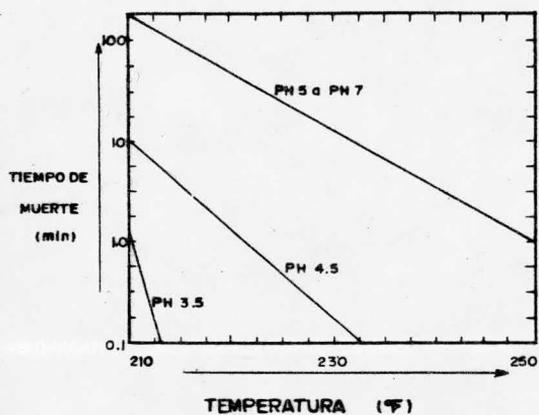
### II.10.3 Reacción del medio en que son calentadas las esporas.

Este es un factor muy importante en la preservación de los alimentos en la industria alimenticia. Los microorganismos mueren con mucha mayor facilidad en un medio ácido que alcalino, cuando son sometidos a un tratamiento térmico.

Weiss observó que las esporas de Cl. botulinum, sucumbían a un calor más bajo cuando el medio era ácido. Las esporas aumentan su resistencia al calor en la medida en que el pH se aproxima al neutro; pero a medida que el pH se hace ácido la muerte de las esporas de Cl. botulinum aumenta; por ejemplo, la resistencia al calor de las esporas fue mayor en productos de pescado -- con una escala en el pH de 5.2 a 6.8, que en alimentos de un pH menor de 5. Se nota una marcada reducción en la resistencia al calor. Sin embargo, estas diferencias en la resistencia al calor no pueden ser explicadas sólo en base al pH (12) fig. 2

A - N - E  
H<sub>0</sub> ✓ TT  
sap ✓ ✓ Resist

FIG. 2 INFLUENCIA DEL PH DEL MEDIO DE CALENTAMIENTO SOBRE LA RESISTENCIA AL CALOR DE LAS ESPORAS. MIENTRAS MAS ACIDO ES EL SUBSTRATO ES MENOR LA RESISTENCIA AL CALOR EN LAS SUSPENSIONES DE ESPORAS



#### II.10.4 Concentración de esporas

Es razonable pensar que, a una mayor concentración de esporas por mililitro, el tratamiento térmico tiene que ser más intenso. El tiempo de tratamiento tendrá también que ser mayor. Esto es una consideración importante para la preservación de los alimentos, pues se depende, como conclusión, que hay que mantener una concentración de "carga bacteriana" baja. (12) fig.3

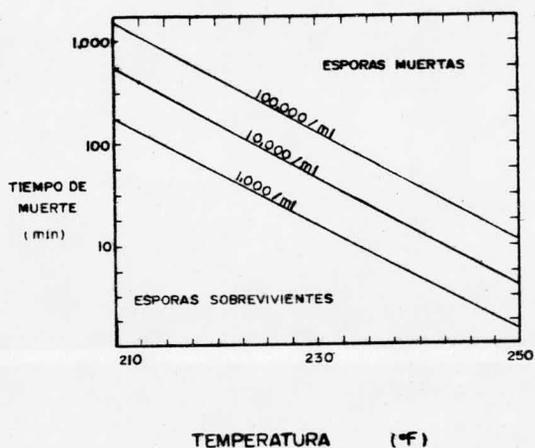
#### II.10.5 Edad de las esporas

Weiss observó que las esporas jóvenes son más resistentes al calor que las viejas. Las esporas de un mes resisten tres veces más que las esporas de 5 meses. Existe una resistencia decreciente con respecto a la edad, las esporas más resistentes cambian más rápidamente que las menos resistentes. (12)

#### II.10.6 Presencia de sal.

Este factor de mucha importancia, porque varias comidas se salan para su preservación antes de enlatarlas. Weiss determinó que cuando *C. botulinum* se encontraba en un medio salado, la resistencia del microorganismo al calor disminuía. En una concentración de

FIG. 3 A MAYOR CONCENTRACION DE ESPORAS MAYOR RESISTENCIA AL CALOR DE LA SUSPENSION. RESISTENCIA AL CALOR DE UN CULTIVO, MEDIDO POR LA PRESENCIA DE SOBREVIVIENTES, RELACIONADA CON LA CONCENTRACION DE ORGANISMOS



4% puede aumentar la resistencia al calor y a una concentración de 8% o más disminuir. (12)

#### II.10.7 Influencia del azúcar.

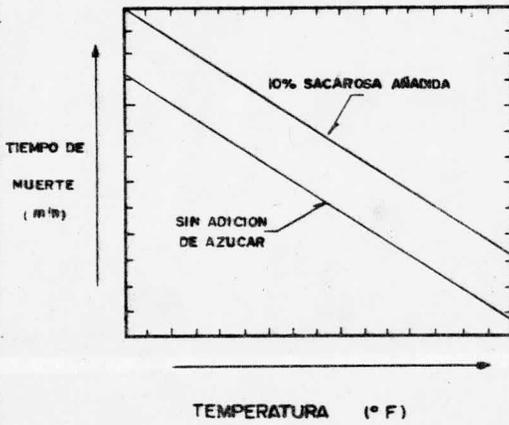
Los organismos son más difíciles de destruir en almibar o azúcar. Entre más espeso es el jarabe más difícil es la destrucción de las esporas. Weiss observó lo anterior en Cl. botulinum. A igual conclusión llegó Fay (1943) con los helados. Las observaciones anteriores están basadas en la alteración del medio ambiente y no en la célula. El calor de los jarabes concentrados puede ser la explicación. (43)

Otros investigadores piensan que las soluciones de azúcar aumentan la resistencia al calor de las esporas, dando como explicación una deshidratación parcial del protoplásmo de la célula, que protege así a las proteínas de la coagulación. (43) fig. 4

#### II.10.8 Influencia de las grasas en la resistencia al calor. --

Existe poca información al respecto; pero se supone -- que las esporas de Cl. botulinum sobreviven más allá de lo razonablemente esperado. cuando son calentadas en una suspensión de aceite. Esto se debe a que las esporas quedan atrapadas en la fase de aceite y así el ca--

FIG. 4 INFLUENCIA DEL AZUCAR SOBRE LA RESISTENCIA AL CALOR DE LAS ESPORAS BACTERIANAS. LAS CONCENTRACIONES DE AZUCAR PROTEGEN A LAS ESPORAS.



lor difícilmente penetra. (43)

#### II.10.9 Efecto de proteínas, almidón y especias.

Los materiales proteicos ofrecen una cierta protección a las esporas contra el calor. Los aceites - - esenciales de muchas especias y materiales que imparten sabor (mostaza, cebollas, clavo, pimienta....) ejercen marcada influencia en el sentido de disminuir la resistencia al calor de las esporas.

Los valores para "z" en un medio a base de alim~~en~~to fueron de 13.4 a 15.6; en contraste, en el fosfato neutro fueron de 16.5 a 18. La resistencia al calor del organismo 3679 se encontró diferente a la de Cl. botulinum. (37).

La muerte de la población bacteriana sometida al calor sigue una curva logarítmica. Esta consideración también se extiende para las esporas. Unicamente diffiere en el valor "D", conocido como ciclo de reducción de cimal y representa el tiempo en minutos, a una temperatura específica, para destruir el 90% de los organismos de una población.

Valor F: Número de minutos requeridos para des-

truir una cantidad dada de organismos a una temperatura determinada, generalmente 121°C.

Valor Z: Aumento en °C necesarios para disminuir 10 veces el tiempo de mortalidad por la temperatura.

$$F_0 = m \times \text{antilog} \frac{T - 121^\circ\text{C}}{18}$$

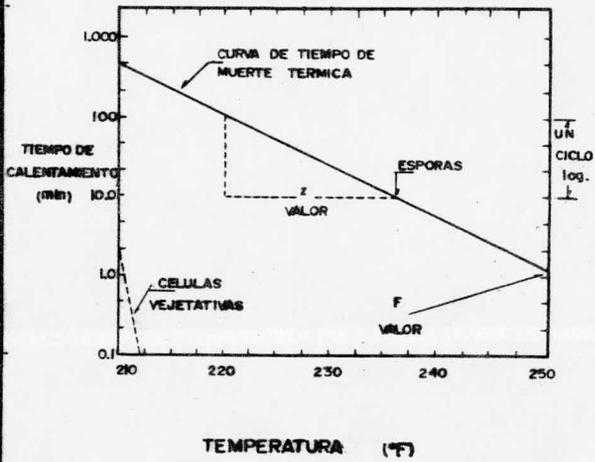
m: minutos

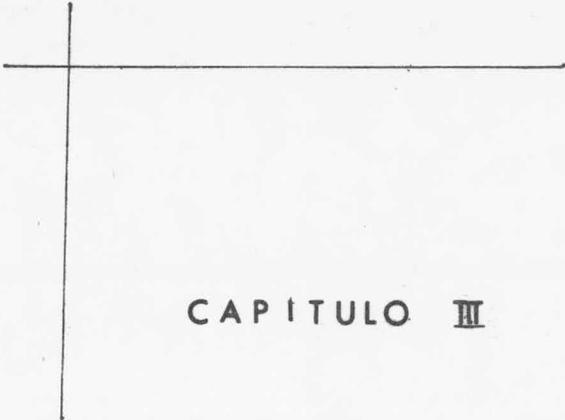
T: Temperatura en grados centigrados

Para tener un margen de seguridad se utilizan como indicador las esporas de Bacillus stearothermophilus, que tienen mayor resistencia al calor que las de Cl. botulinum. Como se ha dicho, la resistencia de las esporas es función de la concentración por mililitro; pero también se ha comprobado que en tales situaciones el indicador se encontraría en una población y concentración mayores: (34) pero ambos eran casi similares en fosfato neutro. Los valores de "z" del "indicador" fueron mayores que los de Cl. botulinum.

Por otra parte, también determinaron los factores de muerte térmica de Cl. botulinum en fosfato neutro - (37) fig. 5

FIG. 3 CURVAS TÍPICAS DE TIEMPO DE MUERTE TÉRMICA PARA ESPORAS Y CELULAS VEGETATIVAS DE ORGANISMOS RESISTENTES AL CALOR.-- LAS ESPORAS SON RESISTENTES AL CALOR, LAS CELULAS VEGETATIVAS, POR LO GENERAL NO LO SON.





CAPITULO III

CARACTERISTICAS DE

LA TOXINA

### III.1 Características generales y clasificación

Por el carácter del lugar donde actúan las toxinas microbianas se subdividen en exotoxinas y endotoxinas. -

Entre las exotoxinas se incluyen las que producen los agentes del botulismo, del tétano, de la gangrena gaseosa anaerobia, de la difteria, de estafilococos y estreptococos.

Las exotoxinas se difunden fácilmente desde la célula al medio circundante en que se nutren, se caracterizan por su elevada toxicidad y ejercen su acción sobre el organismo susceptible a dosis muy reducidas. Las exotoxinas tienen propiedades enzimáticas capaces de hidrolizar sustancias de importancia vital para las células, tejidos y órganos. Desde el momento de la introducción de las exotoxinas en el organismo animal, hasta el comienzo de la intoxicación, transcurre un determinado período de latencia, que varía desde algunos minutos (toxinas de estafilococo y de *C1. septicum*) hasta varias horas y días (toxina botulínica). Las exotoxinas ejercen efectos farmacológicos selectivos, afectando determinados órganos y tejidos del organismo.

Cuando se inyectan parenteralmente exotoxinas en el organismo, en la sangre se producen sustancias específicas (anticuerpos) capaces de neutralizarlas.

Por su estructura química algunas de las exotoxi-nas pertenecen a las sustancias de naturaleza proteínica; son poco resistentes a la acción de la luz, del oxígeno y de la temperatura, se destruyen a 60 - 80°C en el curso - de 10 a 60 minutos e instantáneamente por la ebullición.- En estado seco son más resistentes a la acción de la temperatura elevada, a la de la luz y la del oxígeno. La adi-ción de sacarosa a las toxinas aumenta su resistencia al calor. Bajo la acción de formalina al 0.3-0.4% y de una temperatura de 38-40°C, la exotoxina diftérica pierde sus propiedades tóxicas al cabo de 30 días, transformándose en toxoide.

Varias exotoxinas ( diftérica, tetánica y la de la gangrena gaseosa ) se destruyen bajo la acción de las enzimas digestivas, a consecuencia de lo cual son ino--cuas cuando se introducen por vía bucal, mientras que o--tras ( la botulínica, las de Cl. perfringens y las de los estafilococos patógenos ) no se destruyen en el estómago--ni en el intestino, por lo que pueden provocar la intoxi--cación del organismo cuando se ingieren por vía oral.

### III.2 Características comparativas de las toxinas.

#### Exotoxinas:

Poseen las propiedades de las enzimas, habiéndose obtenido algunas en estado cristalizado. Difunden fácil--mente de la célula al medio circundante. Son altamente --

tóxicas, caracterizándose por provocar lesiones selectivas de algunos órganos y tejidos. Algunas son termolábiles. Inyectándolas por vía parenteral suscitan la formación de anticuerpos muy activos: las antitoxinas. Bajo la influencia de la formalina al 0.3-0.4% y de la temperatura de 38-40°C se transforman en toxoides.

#### Endotoxinas:

Constan de complejos glúcidos-lípido-proteicos, de combinaciones glúcido-lipídicas y de complejos polisacáridos específicos. Están firmemente fijadas al cuerpo de la célula bacteriana pues forman parte de su pared celular. Son menos tóxicas y su acción selectiva poco pronunciada. Son termoestables. Cuando se inyectan parenteralmente se forman precipitinas, lisinas, opsoninas, albutininas, anticuerpos fijadores del complemento. Por la acción de la formalina y de temperatura se inactivan parcialmente. Por su composición química, las toxinas se dividen en proteínicas, glucidolipídicas y polisacáridicas.

Las toxinas de naturaleza proteínica fueron obtenidas primitivamente de plantas y animales. Las toxinas proteínicas, por el carácter de sus relaciones recíprocas con las células que las producen, se clasifican en tres grupos:

1) Toxinas presentes en el medio de cultivo y - que se separan de las células bacteriana mediante la -- filtración. Tales toxinas se denominan exotoxinas, ya - que salen de las células al medio nutritivo que las ro- dea.

2) Toxinas vinculadas más íntimamente al cuerpo bacteriano y que se obtienen mediante su extracción con ácidos o álcalis débiles.

3) Toxinas que están íntimamente fijadas al -- cuerpo de las bacterias, siendo necesario acudir, para- su extracción, a la destrucción mecánica de las células al empleo del ultrasonido, de la congelación y desconge- lación repetidas, a la digestión enzimática y de agen- tes químicos. El segundo y el tercer grupo son endotoxi- nas bacterianas, a las cuales pertenece la mayoría de - las toxinas bacterianas.

Una gran parte de las toxinas bacterianas de na- turaleza proteica cataliza determinados procesos quími- cos, destruyen sustancias de importancia vital, actúan- a dosis extraordinariamente reducidas, presentan un pe- ríodo de latencia y deprimen las funciones defensoras - de los tejidos.

Las toxinas bacterianas se caracterizan por su organotropismo ( mono y politropismo ), a consecuencia- del cual los microbios toxigénicos condicionan la necro-

sis del tejido en el foco de localización del agente -- etiológico. La manifestación necrótica de las toxinas\_ transforma el tejido vivo y reactivo en sustrato innocuo para el microbio patógeno y en segundo término -- el tejido necrotizado defiende al parásito de la acción que sobre él podrían ejercer las reacciones defensivas- del macroorganismo.

Las exotoxinas tienen la propiedad de provocar- el fenómeno de la potenciación, cuando bajo la influen- cia de una mezcla de toxinas actúan con mayor intensi-- dad sobre el organismo. Con particular evidencia se ma- nifiesta la acción potenciante de las toxinas de Clostri dia.

#### Toxinas glúcido-lipídicas:

Estas toxinas se encuentran en las bacterias -- Gram negativas, no las contienen las Gram positivas. -- Por su composición química, las toxinas glúcido-lipídi- cas son combinaciones de polisacáridos ( 50-65% ), con- ácidos grasos, (20-25% ) además, ácidos acético y fosfó- rico. Su estudio ulterior ha permitido demostrar que es- te género de toxinas no son combinaciones puras glúcido- lipídicas, sino que en su composición entran también -- sustancias nitrogenadas y proteínas, por lo que se las- debe considerar como complejos glúcido-lípido-proteicos.

#### Toxinas polisacáridas:

Muchos investigadores han logrado extraer de las bacterias sustancias tóxicas que no contienen pro-teínas y que por su composición, son polisacáridos específicos, que se diferencian de los polisacáridos co-munes porque contienen glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, ramnosa, aminosacáridos, lípidos y otras sustancias.

Las toxinas polisacáridas, a pesar de la gran variedad de su composición química, se caracterizan por sus propiedades hemolíticas, leucotóxicas y neuró-tropas (34)

### III.3 Toxina botulínica

Antes de 1945 poco se conocía de la naturaleza química de la toxina de Cl. botulinum, en ese entonces se sospechaba que eran proteínas. Hoy existen métodos suficientemente avanzados para la purificación de toxinas, y se ha demostrado que son simples - proteínas globulares. Una proteína simple ha sido de- finida como compuesta exclusivamente por aminoácidos.

Las moléculas de toxinas en solución en un campo eléctrico, presentan el fenómeno de electrofo-resis, el cual consiste en la separación de aminoácidos que se lleva a cabo al poner una gota de la mezcla que se desea identificar en un papel filtro adecuado, el cual se humedece a continuación con una solución regu-

ladora ( sistema que tiende a impedir el cambio de pH --- cuando se agregan iones H u OH ) de pH determinado, (28) Los extremos de la hoja se sumergen en los recipientes - que contienen los electrodos y se aplica un campo eléc-- trico, de voltaje elevado, con refrigeración. A causa de sus diferentes valores de  $pK'$  ( transformación logarftmi ca de  $K'$  constante de disociación aparente ), los amino-- ácidos emigran en direcciones diferentes a distintas ve-- locidades, que dependen del pH del sistema y de la fuer-- za electromotriz aplicada (30).

El conocimiento de las propiedades ácido-básicas de los aminoácidos permite seleccionar las condiciones, - de tal modo que se logre la separación de cualquier mez-- cla dada de aminoácidos. Durante la ultracentrifugación-- analítica aparece un sedimentado simple. El punto iso-- eléctrico es de 5.6, (30).

Es complicado el efecto de las toxinas botulf--- nicas cuando son venenosos orales, el hecho es que las -- toxinas son protefínas típicas las cuales pasan con el -- bolo alimenticio.

Desde los reportes antiguos de la literatura se sabe que las toxinas botulínicas son resistentes a la destoxificación por enzimas proteolíticas, en algunos trabajos-- recientes, con técnicas cuantitativas adecuadas a los nú-- meros de animales utilizados en el experimento, los ti--

pos de toxina "A" varían en grado de pureza, como muestra la capacidad de destoxificación por tripsina, enzima del intestino delgado.

Los resultados con pepsina han sido conflictivos; con la toxina tipo "E" la tripsina ha efectuado como agente activador. El mecanismo de este fenómeno de activación aún no está claro; algunos científicos japoneses han declarado que la acción de la toxina tipo "E" está asociada de alguna manera con el ARN, y que después de su activación con la tripsina la fracción tóxica se separa de su componente nucleico. Este reporte subraya que existen algunos descubrimientos experimentales que corroboran esta declaración. En ese experimento las preparaciones tóxicas fueron purificadas antes y después de su activación tróptica, y se comprobó que estaban libres de ARN. El contacto en vivo de esta toxina con la tripsina lleva a un incremento inicial en el número de dosis parenterales letales, seguidas de un decremento.

La toxina botulínica puede pasar igual que un veneno oral, porque se absorbe después de entrar al intestino delgado. El atractivo de esta hipótesis ha disminuído ya que la absorción ocurre en un grado significativo en el estómago, donde la toxina puede exponerse sólo a la pepsina, (18).

No hay estudios críticos que definan las posibi-

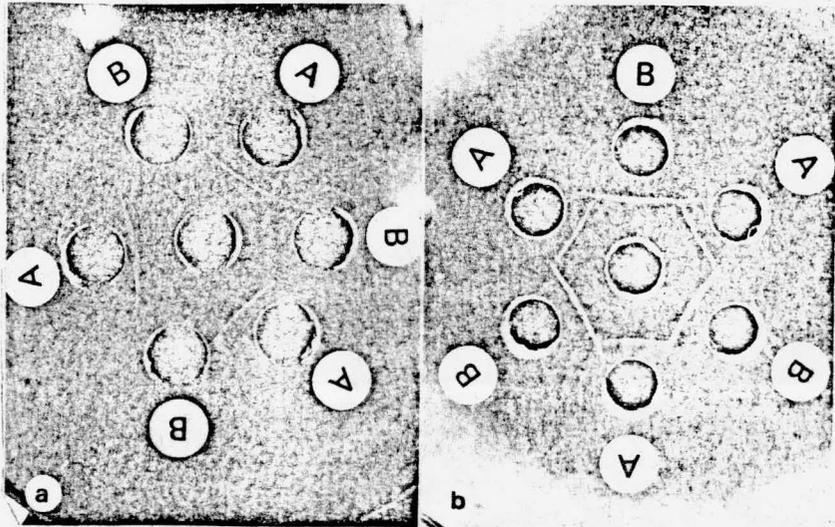


Fig. 1

lidades de que el faríngeo y el esófago actúen en mejor forma que la absorción sistemática que se ha reportado, dado que una demostración puede ayudar a explicar los reportes del botulismo que han ocurrido en humanos antes de la mera prueba de sabor con alimentos contaminados.

Se conoce que la toxina puede absorberse en bajo nivel por efectos respiratorios, pasa sólo por una delgada capa de las células epiteliales y a través de abrasiones y quemadas en la piel y las membranas mucosas, tal vez como la saliva y la posibilidad de algunas caries dentales que permiten la absorción de toxina después del contacto con algunas enzimas proteolíticas -- cuando ocurre el acto alimenticio.

Esas interesantes consideraciones pueden llevar a buenas conjeturas y tener mérito a menos que una nueva investigación diga lo contrario. En base a las evidencias publicadas, el intestino delgado puede considerarse como el mejor sitio de absorción sistemática en los casos naturales de envenenamiento por ingestión de toxinas. El estómago y el colon son sitios de menos absorción, de donde concluimos que la ingestión de toxina parece tener muchas oportunidades por contacto con las enzimas proteolíticas (28).

Actualmente puede ser significativa la persistencia de cantidades residuales de toxicidad por largos periodos de tiempo en la fase de destrucción de la toxina por enzimas proteolíticas. (28)

En vivo la velocidad de destoxificación decrece con el tiempo y cuando la reducción de la toxicidad tiende a cero lleva a una aproximación asintótica. Estas correlaciones se han repetido en vivo; en relación a las proteínas, tales como la caseína, las enzimas proteolíticas actúan más lentamente cuando el sustrato es una toxina "A", estas observaciones implican que la toxina no necesariamente es resistente a la proteólisis enzimática en un sentido absoluto, como para actuar como un veneno oral. Esto es necesario sólo cuando la velocidad de digestión de la toxina, después de la completa distribución, puede llegar a una dosis letal y pasar las barreras del conducto alimenticio. Semejante situación podría estar de acuerdo con la observación, a menudo repetida, de la gran cantidad de toxina. Es también posible que se conozca la diferencia en potencia de dosis oral de varios tipos de toxina en un especie dada de animal, o la dosis oral de un tipo de toxina en diferentes especies (y estas diferencias son considerables) y se puedan reflejar las diferencias en resistencias de varios tipos de toxina a los jugos digestivos de diferentes especies de

animales. Un ejemplo es la no susceptibilidad del mono - Rhipsus ( macaco de la India ) a las toxinas "C" y "D" - administradas oralmente (28).

#### III.4 Relación entre ciertos bacteriófagos y la toxicidad de - Cl. botulinum

Hasta el momento la producción de toxina de Cl.-botulinum está asociada con la presencia de ciertos bacteriófagos específicos (23).

En 1968, Hohhaido de la Universidad de Sapporo,- Japón, demostró la incidencia de ciertos fagos en la formación de la toxina de Cl. botulinum tipo: "A", "B", "C" "D" y "F"; utilizando como medio 0.1% de tioglicolato de sodio, 3% de tripticase, 2% de extracto de levadura, 1% de glucosa (23).

A continuación se describe el experimento:

Se emplearon cepas toxigénicas del tipo "C" y "D", tratando de obtener cepas no toxigénicas o mutantes (23) a partir de la cepa de Cl. botulinum tipo "C".

A un medio de TYG que contenía anaranjado de -- acridina en una concentración de 25 a 50 microgramos por ml., se le adicionaron unas cuantas gotas de cada una de las cepas "C" y "D". Después se mantuvo a 37°C durante - 18 horas, luego se inocularon por estría en placas de gelosa sangre e incubaron anaeróbicamente a 37°C durante - 48 horas. Las colonias recogidas fueron transferidas a -

medio de carne cocida, se probó su toxicidad por medio de inyecciones intraperitoneales en ratones. De 188 cepas --- del tipo "C", se determinaron 8 cepas no toxigénicas y -- de 190 colonias procedentes de cepas del tipo "D" se en-- contraron también 8 no toxigénicas. Mediante la prueba -- lítica, con ruptura de la célula, se demostró que los mu-- tantes obtenidos eran no lisogénicos, y no producían to-- xinas.

Para confirmar lo anterior se indujeron fagos en cepas no toxigénicas; las cepas toxigénicas y los lisados inducidos de cepas toxigénicas que contenían fagos fueron mezclados con 2 ml. de medio TC fresco y los tubos fueron incubados a temperatura constante de 37°C durante 6 horas. Luego se inocularon placas de gelosa sangre y se incuba-- ron anaeróbicamente a 37°C durante 2 ó 3 días y se probó-- la toxicidad del sobrenadante por medio de inyección in-- traperitoneal en ratones. Las mutantes no toxigénicas se - convirtieron en toxigénicas mediante la inducción de lisa-- dos del tipo "C", se vió que el tratamiento con calor des-- truye la habilidad de conversión del lisado; pero no a -- 55°C y durante 30 minutos (23)

### III.5 Actividad de la toxina botulínica.

La actividad de la toxina botulínica ha sido estu-- diada con bastante detalle; se ha visto que la acetilcoli  
na produce contracción en el músculo intoxicado por toxi-

na botulínica, y esto no lo hace cuando la intoxicación  
es con curare. Este hecho se ha interpretado como indi-  
cio de que no se produce acetilcolina en las placas ter-  
minales del animal envenenado, que la acción de la toxi-  
na es de localización proximal con relación a donde és-  
ta se produce. De acuerdo con lo anterior se piensa que  
no se libera acetilcolina durante la parálisis neuromus-  
cular producida por la toxina. El sitio de acción de la  
toxina es en la fibrilla nerviosa, ya que libera ace--  
tilcolina después de estimular directamente el diafrag-  
ma aislado del cobayo; la parálisis neuromuscular que -  
ocurre en el animal envenenado resulta de interferencia  
con la conducción en las ramas terminales de los ner---  
vios motores en los puntos de ramificación terminal o -  
cerca de ellos; pero proximales con relación al lugar -  
donde se libera acetilcolina. Sin embargo, se desconoce  
completamente la naturaleza de la actividad de la toxi-  
na que produce la interferencia en la conducción (2). -  
Actúa junto al lugar de la liberación de la acetilcoli-  
na en la extremidad del axón, o sea por impedir la sín-  
tesis o por impedir la liberación. La acetilcolina es -  
el mediador natural o estimulante de las terminaciones-  
postganglionares parasimpáticas y es también el transmi-  
sor en los ganglios en la unión neuromuscular (2).

Los efectos generales producidos por la estimulación parasimpática con la liberación natural de la acetilcolina, incluyen la contracción de las pupilas, salivación, bradicardia, broncoconstricción, aumento de la peristalsis y dilatación de los vasos esplénicos (27).

### III.6 Unidad tóxica

La unidad más simple de toxina es la dosis mínima letal (DML), que viene a ser la cantidad de toxina que mataría a un cobayo de 250 gramos de peso en un período de 96 horas después de una inyección subcutánea. Desde hace poco se emplea la dosis letal media D L 50 para medir la virulencia, no sólo de la toxina, sino también de otros agentes infecciosos, especialmente los virus; así, el punto máximo será la dosis que mate aproximadamente al 50% de un grupo de animales y no la que mate la totalidad de ellos, tratando de este modo de equilibrar las diferencias en susceptibilidad, un método simple para el cálculo de la dosis media fue publicado por Reed y Muench. (21)

Las unidades de antitoxinas varían en los diferentes países, y esto ocasiona confusión, que se está tratando de evitar mediante los intentos por establecer unidades internacionales que paulatinamente serán adoptadas por todos los países.

El fabricante debe elaborar su propia toxina y probarla mezclándola en cantidades variables con una unidad estándar de antitoxina; en esta forma conocerá la dosis L de su toxina. Luego debe mezclar cantidades variables de su antitoxina comercial con la cantidad de toxina que representa la dosis L e inyectarla a cobayos de 250 gramos de peso. Los que mueren a los cuatro o cinco días indican la cantidad que contiene el equivalente de una unidad estándar de antitoxina. El fabricante debe indicar el valor de unidades de su antitoxina en los envases comerciales, al usarla debe tomarse en cuenta el margen de deterioro desde el día de su elaboración, debiendo mantenerse en lugares fríos (21).

### III.7 Toxina tipo "A"

Es la sustancia tóxica más potente conocida. Esta toxina se ha preparado en forma cristalina mediante precipitación alcohólica en frío, y por precipitación con sulfato de sodio ácido. Las preparaciones parecen ser de proteínas puras con las propiedades de una globulina de peso molecular de  $9$  a  $11 \times 10^5$ . La  $DL_{50}$  para ratón contiene  $4.5 \times 10^{-9}$  mg de  $N_2$  (2)

La composición de aminoácidos de la toxina botulínica tipo "A" cristalina, no tiene nada de extraordinario

nario. Se ha supuesto que la toxicidad pueda ser propiedad de un grupo prostético unido a la molécula de la --  
proteína, pero esto no parece ser cierto; los datos conocidos indican que la toxicidad es una propiedad de la estructura de la molécula de la toxina, posiblemente de la disposición de los aminoácidos constituyentes en la --  
proteína. Doscientos gramos de esta toxina serían suficientes para matar a toda la población del planeta (2).

Lamanna y col. en 1946 determinaron el peso molecular: 900,000; además comprobaron que era un complejo de unidades pequeñas, lo cual ha sido confirmado por Stefane y col., quienes encontraron una unidad, repetida --  
con histidina, de peso molecular 15,400, otra con cistina de 27,400 y una tercera de cisteína de 26,700 (18).

Marshall y Quinn (1967) encontraron que la toxina-tipo "A" produce 7 inhibiciones definidas reproducibles de la acetilcolinesterasa, la inhibición de la enzima se evita eficazmente por la antitoxina homóloga. Esta toxina tiene un peso molecular de 900,000 y es 15 veces más tóxica que la aconitina, el medicamento más tóxico conocido. La DML por gramo es de  $2.4 \times 10^8$ .

La toxina es una proteína del tipo de las globulinas que no se destruye por las enzimas proteolíticas ordinarias, lo cual explica por qué es tóxica su ingestión

La toxina se destruye por calentamiento a 80°C -- durante 30 minutos (18).

La toxina tipo "A" es de color blanco, sin olor, de elevado peso molecular. Con respecto a la purificación propiamente dicha, se tropieza con la dificultad de decidir si el aislamiento corresponde a una especie molecular simple o no. Algunos de los criterios comunes referentes a la homogeneidad molecular son considerados para el material cristalino de la toxina tipo "A".

Separadamente, las muestras preparadas muestran constantemente la actividad biológica y la composición de aminoácidos. Estos son los mismos para materiales -- cristalinos amorfos. La recristalización no aumenta la potencia tóxica (2).

Aislamiento de la toxina tipo "A" y metodología de laboratorio:

El aislamiento de la toxina tipo "A" fué reportado por Lamanna y col. y por Abrams y col. (1946). A través de los métodos fraccionados permitidos para el aislamiento de toxinas cristalinas de elevada actividad, ellos encontraron la dificultad de aplicarla a una escala adecuada para preparaciones rutinarias de toxina-toxoide. Se acordó que la purificación de la toxina fuera reinvestigada ( Duff y col. 1952 ) y los métodos --

fraccionados simplificados se describen a continuación.

#### Materiales y métodos:

Medio: El medio para la producción de toxina fue compuesto de 2.% de caseína pancreática digerida - ( N-Z-amino-tipo B, Sheffield Farms, Norwich, N.Y) 0.5% ( en términos de sólidos secos ) levadura autolizada (Vico tipo # 75, Vico Products Co. Chicago, Illinois) y 0.5% de glucosa.

El medio fue ajustado a pH 7.2 antes de pasarlo a la autoclave. La glucosa fue esterilizada aparte - con un 20% de solución y adicionada asépticamente.

#### Producción de la toxina:

Se usó una de las cepas puras de C1.botulinum tipo "A", que tuvo que ser seleccionada por su toxigenidad por el Dr. Ralph E. Lincoln.

La cepa fue cultivada por un período de 24 a 28 h a 35°C en un volumen de 2,000 ml. de un medio compuesto de infusión de carne y 1% de peptona. Después del desarrollo, el sobrenadante fue distribuido en pequeños tubos, enfriados rápidamente a - - - 60°C y guardados a - 20°C. La esporulación no se observó en estas cepas, el subcultivo fue preparado anualmente.

Cuando se requiera inóculo para la producción de toxina, 2.0 ml. de un tubo de cultivo de la cepa fueron transferidos a 10 ml. de un medio de Brewer tioglicolato (Difco), e incubados a 37°C por 18 -24 h. Entonces se hicieron transferencias en serie con grandes volúmenes del medio de producción de toxina para obtener un volúmen de inóculo igual a 5% del cultivo final. Estos cultivos fueron incubados a 35°C por un período de 18 -24 h. Se desarrolló la producción de toxina a 35°C durante 4 días en botellas con 3 litros de medio. Después del crecimiento el pH fue de 5.6, casi - ocurrió la lisis completa y la toxicidad promedio es aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  mg N.

Valoración de la toxicidad por medio de análisis volumétrico:

El regulador de pH usado para la dilución de la toxina contenía 0.2% de gelatina y 0.4% de fosfato dibásico de sodio y fue ajustado a un pH de 6.8 con ácido clorhídrico. Los ratones blancos, que pesaban de 18 a 20 g fueron inyectados intraperitonealmente con una alícuota de 0.5 ml. de la dilución de toxina y se observaron 4 días. El número de ratones por dilución variaba de 4 a 16, dependiendo de la exactitud deseada. La LD<sub>50</sub> fue

calculada por un método gráfico probado con anterioridad (10).

#### Neutralización de la valoración:

La antitoxina diluida para contener entre 0.1 y 0.01 unidades por 0.25 ml. fue mezclada con un volumen igual de varias diluciones de toxina. La mezcla fue dejada en reposo a temperatura ambiente por 1 h y 0.5 ml. fueron inyectados intraperitonealmente a cada 4 ratones.

Las determinaciones de LD fueron llevadas a cabo en un baño de agua a 40°C con 1.0 ml. de toxina diluida y variando la cantidad de antitoxina. El antisuero crudo contenía 100 unidades de antitoxina por ml.

#### Determinación de nitrógeno:

El nitrógeno total fue determinado por un procedimiento colorimétrico de nesslerización(13)

### III.8 Toxina tipo "B"

Esta toxina es menos potente que la toxina tipo "A". Ha sido preparada como proteína pura homogénea; la dosis LD<sub>50</sub> para ratón contiene de 5 a 9 x 10<sup>-9</sup> mg. de nitrógeno. Al igual que la toxina tipo "A" se prepara en formas sumamente purificadas, mediante precipitación

preliminar a pH de 3.5 con ácido mineral y subsecuente-  
mente mediante etanol en frío (2).

Las cepas tipo "B" pueden ser proteolíticas o no-  
proteolíticas. Algunos investigadores han sugerido que  
sólo se designen como C1. botulinum las variedades no -  
proteolíticas y las que sí lo son se llamen C1. parabo-  
tulinum (14).

La toxina tipo "B" tiene un peso molecular de --  
60,000 consiste en una molécula grande que contiene una  
hemoaglutinina y una exotoxina. Gerwing y col. (1961) -  
demostraron que las unidades variaban en peso molecular  
de 9,000 a 10,000 y un sólo aminoácido con N terminal -  
que fue identificado como arginina (38).

La toxina tipo "B" fue aislada por Lamanna y ---  
Glassman en 1947 en forma amorfa. Es tan tóxica como la  
"A" comparada en peso. Los requisitos térmicos de esta-  
toxina son variables. La técnica de aislamiento de la -  
toxina tipo "B" es igual que la de la tipo "A", mostran  
do además las mismas propiedades, excepto la serológica  
(2).

La  $DL_{50}$  es de  $3.0 \times 10^6$  mg N. El espectro de ab-  
sorción en el ultravioleta enseña que ambas toxinas, la  
"A" y "B", tienen similares proporciones de aminoácidos  
aromáticos estando libre el ácido nucleico. En términos

prácticos tienen el mismo peso molecular ya que tienen la misma constante de sedimentación (14.5 obtenida por cristalización de la toxina "A", previa medida de difusión), aunque la toxina "B" es menos cristalizable que la "A".

El toxoide de toxina "B", se obtiene por incubación en presencia de formalina, teniendo una reacción similar a la de la toxina "A".

Parece ser que las diferencias químicas dependen en parte de los métodos de aislamiento; aunque la especificidad serológica muestra diferencias en su estructura química, hay la tendencia a considerar que estas -- son menos profundas de lo que se creía en un principio.

### III.9 Toxinas C y D

La capacidad del microorganismo para formar toxinas en el conducto alimentario del mamífero es casi nula; sin embargo, se le ha encontrado en el buche de -- las aves, (21).

En Estados Unidos de Norteamérica, Buckle y Shippen y Graham y colaboradores ( 1920 ), estudiaron el botulismo en caballos. Hart (1920) describió un brote en una granja avícola grande; y Hall y Stiles (1938) -

comunicaron un brote en visones cautivos. En los Estados Unidos de Norteamérica se diagnostica frecuentemente botulismo en animales; pero parece que la mayor parte de tales diagnósticos son incorrectos.

Bengston (1924) encontró el tipo "C" originalmente en larvas de moscas, que obtuvo de cadáveres en putrefacción de los cuales se estaban alimentando. Cuando se alimentaron pollos con estas larvas, se les produjo una enfermedad característica que fue considerada por mucho tiempo como una entidad clínica, cuello flácido. Las aves sufren somnolencia y finalmente son incapaces de sostener sus cabezas a consecuencia de la parálisis flácida de los músculos del cuello. Generalmente sobreviene la muerte.

Dinter y Kull ( 1954 ) describieron un brote de botulismo en faisanes, producido por toxinas del tipo "C"-ingeridas con larvas de moscas ( Caliphora y Lucilia ) - que se alimentaban de cadáveres de conejos silvestres.

El título de la toxina era relativamente bajo en las larvas antes de ser ingeridas, pero aumentaba mucho en el buche de las aves. Esto indica que las larvas contienen no sólo la toxina, sino también microorganismos, y que el buche hizo las veces de incubadora.

Kalmbach y Gunderson (1934) demostraron que una en

fermedad de caracteres devastadores en los patos silvestres y otras aves acuáticas, en un área alrededor del -- Gran Lago Salado de Utah era debida a botulismo causado por un organismo del tipo "C". En el agua estancada, poco profunda de los charcos que se secan durante los meses de verano, la vegetación descompuesta provee un medio favorable para el desarrollo de este microorganismo y la producción de su toxina; de este modo ocasiona, cada año, la muerte de muchos miles de patos que se alimentan de esos restos vegetales. Esta enfermedad ha sido conocida por mucho tiempo como enfermedad occidental de los patos o como enfermedad del álcali, ya que se creyó debida a intoxicación por sales. En 1949 Quorstrup y --- Gorhan aislaron cepas de tipo "C" del estómago de patos procedentes del cenagoso Río Oso en Utah. La toxina de estas cepas mostró ser mucho más patógena para el visón y el hurón que las de los tipos "A" y "B". El tipo "C" -- constituye la causa más frecuente de intoxicación del visón en Suecia.

El organismo aislado por Theiler y Robison (1929) - de un cadáver de rata y descrito como causa de botulismo en mulas, fue designado originalmente tipo E, pero Robison demostró más tarde que pertenecía al tipo "C"

El botulismo del carnero en el oeste de Australia-

se debe al tipo "C". Estos animales se intoxican por ingestión de conejo en estado de putrefacción, que constituye el origen más frecuente de la toxina.

La cepa original de Bengston parece corresponder - al tipo "C". Se le concede patogenicidad únicamente para las aves. El tipo "C" de Seddon es patógeno para el ganado vacuno, para el carnero, para caballos y mulas. Probablemente fue la causa del envenenamiento humano tipo - "C", publicado por Meyer (1929).

El subtipo del tipo "C", responsable del botulismo en visones y hurones, no ha sido el causante de todas -- las epizootias, pero la descrita por Avery y col. (1959) se afirma que fue originada por el tipo "C".

El microorganismo del tipo "D" se ha encontrado -- sólo en la enfermedad del ganado vacuno de sudáfrica conocida como Lamzieke o "mal de cojera". La etiología de esta enfermedad fue aclarada por Theiler y col. (1926).- La enfermedad se presenta sólo en ciertas áreas, en los vacunos que están en pastoreo. En estas áreas, los animales tienen el hábito de masticar los huesos, lo cual se debe a una deficiencia de fósforo que crea ese apetito - anormal. Los huesos de los animales que mueren en los -- pastizales son ávidamente localizados y consumidos. Algunos de los huesos muestran un grado avanzado de descomposición, y en ellos la toxina del botulismo a menudo está

presente.

La enfermedad descrita se presenta también en -- ciertas partes de Texas donde hay deficiencia de fósforo. Gunnison, Cummings y Meyer (1936) propusieron que una cepa aislada de pescados descompuestos en Rusia se designara como tipo "E".

En 1957, murieron tres indias, en la parte norte - de la costa de Columbia Británica, después de comer huevos de salmón crudo que contenía toxina botulínica tipo "E". Aunque la patogenicidad de las toxinas del tipo "E" es variable, en general afecta a las aves, los monos, hombre y animales de laboratorio. Es evidente que todavía no se ha dicho la última palabra sobre la clasificación de estos tipos.

No se sabe con certeza qué condiciones favorables para la producción de toxina de botulismo pueden presentarse en los alimentos de los animales herbívoros, en la forma en que ordinariamente los consumen. Es posible que la toxina se forme en el heno y los granos enlameados expuestos a la humedad por determinado tiempo.

Diagnóstico: El diagnóstico bacteriológico del botulismo en los animales es difícil y hay muchos diagnósticos clínicos que no pueden ser probados en el laboratorio.-

El hallazgo del microorganismo en el tubo intestinal de los animales afectados, o su presencia en los materiales alimenticios no basta para establecer su conexión con la enfermedad. (21)

### III.10 Toxina tipo "E"

Las especies de Ci. botulinum tipo "E" producen toxinas de baja capacidad mortal en ratones (administradas intraperitonealmente) en relación con la alta letalidad que produce en el hombre. La explicación de esta peculiaridad parece radicar en la activación de la toxina mediante una enzima, como por ejemplo tripsina, siempre que estén en un medio con pH adecuado. El mismo proceso de activación trip-tico ocurre en realidad al ser ingerida y el ataque por -- las enzimas la hace más potente.

Gerwing y sus colaboradores (1960) demostraron que - en el tubo de ensayo la tripsina activa a la toxina y encontraron que 18 de los residuos aminoácidos originales se separaban y el péptido tóxico activo residual tiene un peso molecular que varía de 10,000 a 12,000 ( 16).

#### Aislamiento de la toxina

De un pescado intoxicado se aisló toxina del tipo -- "E" para realizar el trabajo. Se probó que la toxina tiene una DLM por ml. entre 1,000 y 3,000 unidades tóxicas para-ratón.

A una infusión de carne de 24 horas (500 g. de carne molida por litro de agua), se le añadió 1.0% de péptona proteasa, 0.5% de cloruro de sodio, 0.2% de fosfato ácido de sodio y 0.1% de tioglicolato de sodio. El medio se clarificó por filtración y después se esterilizó en autoclave. Posteriormente se pipeteó dentro del medio una solución de glucosa al 50% suficiente para obtener una concentración final del 2%. Los microorganismos se desarrollaron dentro de bolsas de papel celofán por el método de Vinet y Fredette (1951). Un inóculo de 15 ml. de un cultivo de 18 horas fue introducido dentro de las bolsas de diálisis las cuales contenían 1 litro de solución salina fisiológica. La incubación se llevo a cabo a 30°C por 5 días. Antes de la purificación química todas las toxinas fueron pasadas a través de un filtro esterilizador Seitz.

El proceso de purificación se llevó a cabo usando una modificación del método descrito por Gordon y col. (1957). Se adicionó 95% de etanol al filtrado tóxico para obtener una concentración final del 35%. El precipitado se formó dejando la solución a 15°C toda la noche. Después fué centrifugado a 1,500 rpm. a -7°C por 45 min. y resuspendido en 1/20 del volumen original de una solución reguladora 0.05 M de acetato de sodio a un pH de 6.0. Una

posterior purificación fué llevada a cabo en columna de celulosa de intercambio iónico, conteniendo 20 g. de celulosa que se ionizaron previamente con acetato de sodio a 4°C durante 24 horas, lavándose con agua destilada y tres veces con etanol al 95% y luego se secaron. - Esta celulosa se inyectó a presión ( 2 cm de diámetro y 20 cm de altura ); se pasaron 10 ml. de toxina a través de dicha columna con una concentración reguladora progresiva para mantener el pH a 6.5. Se recolectó un volúmen de 5 ml. en un colector automático de fracciones. Las fracciones se analizaron inicialmente en un espectrofotómetro con una longitud de 280 milimicras y 260 milimicras (19).

Activación de la toxina con tripsina:

Para la activación de la toxina tipo "E" a una parte del producto se le adicionó tripsina en solución al 1% hasta obtener una concentración final de 0.1%. La preparación fué incubada en baño de agua a 37°C por 75 min., después se ajustó el pH a 5.8 por adición de HCl o NaOH al 0.1N según se requería.

Este experimento se repitió hasta obtener una toxina bastante pura en términos DLM por mg. de N<sub>2</sub>. Se comprobó por medio de cromatografía.

Gordon y col. (1957) utilizaron el etanol -- como un mejor precipitador en la purificación de toxinas, obteniendo entre 8.5 y 9.4 x 10<sup>4</sup> DLM por mg. de N.

Julie Gernine, Claude Dolman y Arnott - - (1960) en los experimentos que realizaron llegaron a purificar toxina tipo "E" en un rango de 3.6 a 7.2 x 10<sup>5</sup> DLM por mg. de N., seis veces más potente que la obtenida por Gordon y colaboradores (19).

Sakaguchi y Sakaguchi (1960) demostraron - que la toxina está siempre asociada a un ácido ribonucleico antes y no después de la activación con tripsina. Sugirieron que el posible mecanismo de la activación puede ser algún grupo químico contenido en el ácido ribonucleico que active la tripsina (16).

Duff y col. (1956) publicaron que la toxina activada e inyectada intraperitonealmente a ratones incrementó doblemente su toxicidad (16).

### III.11 Toxina tipo "G"

Cl.botulinum tipo "G" fué aislado por Giménez y Ciccarelli en 1969 en un maizal en la Provincia - de Mendoza, Argentina. El aislamiento produjo una toxina capaz de activarse por la tripsina, lábil al calor,-

parecida a la toxina botulínica y que no fué neutralizada por antitoxina de las otras toxinas botulínicas conocidas (tipos: A, B, C, D, E y F).

La antitoxina, producida con el toxoide preparado de la nueva toxina, neutraliza sólo al homólogo de esta toxina. Las señales que aparecieron en ratones y el tiempo de muerte después de administrar dosis altas y bajas de toxina tipo "G", eran similares a aquellos observados después de administrar toxinas botulínicas del tipo "A" al "F".

Los estudios llevados a cabo con cepas especiales obtenidas de esta toxina, en este caso cepa 89 del tipo "G", demostraron que se producía muy poca toxina, era uniforme en medio especial y fué débilmente proteolítica y sacarolítica.

Con nuevos estudios se mostró que la cepa 89 produce una "crioproteína" que parece estar sin relación con los factores tóxicos y hemaglutinativos producidos por el organismo.

Las características bioquímicas y toxigénicas del cultivo son: móvil, hemolítico, asacarolítico, débilmente proteolítico, lipasa y lecitinasa negativas, produjo, en caldo peptonado con extracto de levadura-glucosa, los siguientes ácidos: acético, isobutírico, butírico e isovalérico.

Se produjeron muy bajos niveles de toxina en caldos ordinarios de cultivo, pero los cultivos --- dializados produjeron 30,000 dosis letales medias pa--- ra ratón por ml. Los perros y corderos son resisten--- tes a una dosis intragástrica de más de 75,000 dosis-- ratón LD<sub>50</sub> por Kg. de peso del cuerpo. Los changos ma--- cacos de la India, pollos y conejillos de Indias son-- susceptibles a dosis aplicadas en forma enteral y paren--- teralmente de la toxina. Estas especies mostraron seña--- les de botulismo después de la aplicación de esta to--- xina tipo "G" que eran similares o idénticas a las ob--- servadas en otros estudios con otros tipos de toxina - botulínica. La dosis letal LD<sub>50</sub> por kg. para los chan--- gos fué de 33,000 y 120 dosis para ratón, intragástri--- ca e intravenosamente respectivamente; para pollos era 3,125 y de 1,200 a 2,600 dosis para ratón oral y sub--- cutánea respectivamente; y para conejillos de Indias - fué de 10,000 a 20,000 y 100 dosis para ratón, intra--- gástrica e intraperitoneal, respectivamente.

La relativamente elevada susceptibilidad - de changos y pollos a la administración oral o intra--- gástrica de toxina tipo "G", indica que C1.botulinum - tipo "G" es un peligro potencial cuando se encuentra - presente.

Este primer indicio de susceptibilidad hace que sea más urgente contestar a la pregunta ¿Qué tan susceptible es el humano a esta toxina?.

El botulismo de tipo "G" no ha sido encontrado en forma natural, esto puede quizás atribuirse a su baja toxicidad.

Un cultivo de toxina botulínica tipo "G" - produce 40 LD<sub>50</sub> por ml. en un medio en el cual un cultivo de toxina botulínica tipo "A" produce de 10,000 a 1.000,000 LD<sub>50</sub> por ml. (6).

Observando los resultados anteriores se demuestra su baja toxicidad.

### III.12 Hemaglutininas botulinales.

Se sabe que varios tipos de neurotoxinas - de Ci. botulinum producen sustancias hemaglutinantes.- La síntesis de hemaglutininas coincide con la producción de toxinas y en el proceso de purificación empleado hasta la fecha, la hemaglutinina acompaña a la toxina.

Las hemaglutininas producidas por organismos de tipos A y B son recíprocamente neutralizadas -- por antitoxinas específicas A y B producidas comercialmente. Las hemaglutininas producidas por los tipos C -

y D son neutralizadas recíprocamente por el antisuero-específico de estas cepas. La hemaglutinina tipo E es neutralizada sólo por el tipo específico de antisuero-E.

Las condiciones de adsorción determinan el grado en el cual la toxina acompaña a la hemaglutinina en ataques posteriores a la adsorción. También se observa que el coeficiente de difusión de la toxina empieza a incrementarse cuando la hemaglutinina es removida. La toxina liberada de la hemaglutinina tiene una medida molecular pequeña.

En los cultivos botulinales la toxina no existe libre de la hemaglutinina. Esto se debe a que los métodos disponibles que se usaron para el aislamiento y purificación de toxina fueron desarrollados antes que se conociera la existencia de la hemaglutinina. Es obvio que la toxina tipo "A" cristalina es un complejo en el cual la toxina y la hemaglutinina existen en una asociación íntima de naturaleza desconocida. Esto nos demuestra la capacidad de las hemaglutininas para combinarse o ser absorbidas por una variedad sin relación química o biológica de material proteínico -- (30).

Se han probado diferentes métodos para lograr la inhibición de las hemaglutininas en el proceso de purificación de toxinas; unos han tenido éxito, otros no, entre los de mayor efectividad está actualmente el de la inhibición de hemaglutininas de Cl.botulinum tipo "A" y "B" por azúcar.

Cl.botulinum tipo "A" produce una protefna que aglutina los eritrocitos de varias especies animales. Esta hemaglutinina está complicada con neurotoxinas, y en cultivos fluidos las dos se recuperan juntas en forma de cristales neurotóxicos. Otra hemaglutinina de menor actividad aglutinante, forma un complejo con la neurotoxina tipo "B" en cultivos proteolíticos de Cl.botulinum tipo "B". Las hemaglutininas tipo A(HnA)-y B(HnB) están serológicamente relacionadas; pero no son idénticas, las neurotoxinas son antigénicamente -- distintas.

Las hemaglutininas generalmente actúan -- atando las ligaduras de azúcar sobre la superficie de los eritrocitos. Los enlaces a los cuales la hemaglutinina (Hn) se une pueden determinarse por el azúcar al cual inhibe la hemaglutinina activada.

Una serie de compuestos se estudiaron para

ver su capacidad de inhibición en la acción de las hemaglutininas (Hn).

La inhibición de la actividad hemaglutinante de la HnA por la D-galactosa y ciertos derivados de ella fué reportada por Balding y col. (1973); estudios de inhibición similar tanto de HnB como de HnA también fueron reportados por Das Gupta y Sugiyama (1974).

El aislamiento de las hemaglutininas para ese estudio se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna de Sephadex. Se encontró que en pruebas de inmunodifusión de HnA y HnB estas reaccionan con -- los homólogos y heterólogos del antisuero para formar un precipitado inmune (Ver figura III.12 - 1).

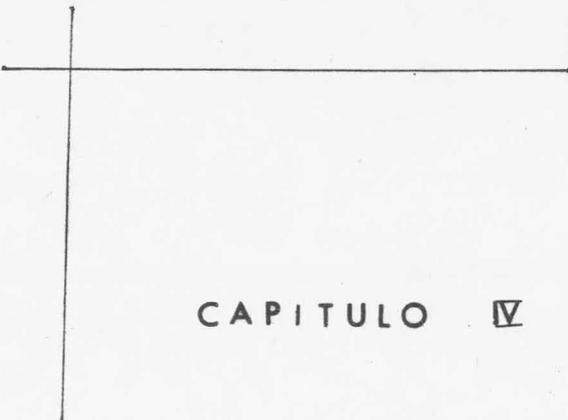
Colocando las muestras de Hn en recipientes adyacentes se ven las líneas de identidad parcial que muestran que tienen un antígeno común y un antígeno diferente cada una. No se ha tenido éxito aún en la separación de las dos entidades.

La concentración mínima de HnA que dió hemaglutinación fué de 0.06 g por ml para muestras almacenadas 6 meses a 4°C. Con preparados frescos de HnB - se necesitaron 325 g. por ml. para la hemaglutinación.

Los requerimientos estructurales de un azú

car para inhibir la actividad hemaglutinante de HnA parecen ser: D-galactosa, el carbonilo del carbono 1; la forma B del hidroxilo al carbono 1 parece tener más poder inhibitorio que la d; una unión glucosídica o tioglucosídica hace la estructura más inhibitoria; se requiere un hidroxilo en el carbono 5; la sustitución del carbono 6 reduce la actividad inhibitoria; un grupo carboxilo la evita, un grupo metilo la disminuye.

Balding y col. (1973) notaron que la rafinosa D-galactosamina y D-fucosa no son inhibitorias para la HnA. De los azúcares de ( 5, 6, 12 y 18 carbonos y algunos derivados de formas L y D ) probados, sólo la D-galactosa y algunos de sus derivados fueron hemaglutinantes para estas formas. La O-Nitrofenil-B-D-galactósida y la isopropil-B-D-tiogalactósida fueron los inhibidores más potentes (10).



CAPITULO IV

ALIMENTOS MAS SUSCEP\_  
TIBLES DE CONTAMINAR\_  
SE

#### IV.1 Introducción

La posibilidad que más peligro representa para el hombre en el consumo de alimentos enlatados. la constituye la supervivencia al calentamiento de las esporas de Cl. botulinum, con la germinación subsiguiente y producción de toxina mortal. Por fortuna los procedimientos modernos de conservación de alimentos, que recomiendan la cocción a presión al elaborar alimentos neutros o ácidos, salvaguardan al consumidor del botulismo. (15). No todos los alimentos tienen el mismo valor como medio de cultivo; la mayor parte de lo que al respecto se sabe es de carácter empírico.

Casi todos los estudios se refieren a la producción de toxinas en los distintos alimentos como carnes, pescados y alimentos enlatados de acidez media o baja. Esta acidez constituye el medio adecuado para la producción de toxina formada. Inclusive los mejores medios de cultivos varían en la potencia de la unidad tóxica. Se ha dicho que los medios que contienen leche, caseína, glucosa o maltosa y agua de maceración de maíz producen una toxina tipo A más potente que los otros y que el poder de la toxina en alimentos enlatados se puede ordenar de modo decreciente: Maíz mayor que guisantes, estos mayor que judías verdes y éstas a su vez mayor que espinacas (15).

El estaño de los botes, cuando se disuelve en pequeñas cantidades, inhibe el crecimiento microbiano y la producción de toxinas en verduras enlatadas.

En carnes deshidratadas se ha puesto de manifiesto -- que la producción de toxinas es más lenta si el contenido en agua es del 40% que cuando es del 60% y al llegar al 30% se inhibe la producción de toxina.

#### IV.2 Alimentos precocinados.

La mayoría de estos alimentos son carnes, pescados o productos avícolas, por ejemplo sopas, cremas, estofados, empanadas y chow mein (estofados de origen chino a base de pechuga de pollo desmenuzada, cebollas y trozos de tallarines o pastas semejantes a macarrones), carne asada, etc... ciertos productos de panadería, frutas y hortalizas que pueden cocinarse y después congelarse. El precocinado generalmente es suficiente para destruir cualquier patógeno que pudiese existir en el alimento crudo, reduciendo además el número total de microorganismos presentes, (43). Es muy importante evitar la contaminación del alimento después de cocido, pues cualquier organismo patógeno o causante de alteración que a él llegue hallará muy reducida la competencia que otros organismos pudieran ejercer y el alimento cocinado posiblemente constituya un mejor medio de cultivo que el original si se permiten oportunidades de crecimiento. De -

aquí que también sea importante realizar rápidamente el enfriamiento y congelación, para que no se presenten dichas oportunidades.

Si los alimentos precocinados o congelados se mantienen a una temperatura ambiente templada durante mucho tiempo después de su congelamiento, puede haber crecimiento y producción de toxina de Cl. botulinum, en caso de que se halla presente.

El cocinado o calentado final de los productos indicados, tanto en el hogar como en restaurantes, no siempre representa un tratamiento térmico suficiente para reducir en proporción bastante el número de microorganismos o para garantizar la total destrucción de patógenos y toxinas (43).

Se ha recomendado el uso en alimentación de antibióticos distintos de los usados para tratar enfermedades en el hombre. Los conserveros creen que al emplearlos en el tratamiento de los alimentos, en combinación con el calor, se destruyen las esporas de Cl. botulinum y se permite un margen de seguridad y que es preferible que el tratamiento destruya todos los microorganismos causantes de alteración y sus esporas. Si sobreviven esporas, el antibiótico debe permanecer en concentraciones suficientes para evitar su germinación o el crecimiento de células vegetativas. Esto quiere decir que el antibiótico debe permanecer en concen--

traciones bacteriostáticas o esporostáticas mientras dure -  
el almacenamiento del alimento enlatado.

Cuando los vegetales descongelados se conservan a tem <sup>YA</sup>  
peratura ambiente durante un período de tiempo considerable,  
pueden desarrollarse bacterias productoras de intoxicacion-  
es alimenticias y originar toxinas, Jones y Lochhead (1959)  
por ejemplo, encontraron en el maíz congelado Micrococcus -  
productores de enterotoxinas. Un maíz estéril, inoculado -  
con estafilococos productores de toxinas, congelado a con-  
tinuación y más tarde descongelado y mantenido a una tempe-  
ratura de 20°C durante un día completo, permitió el creci-  
miento de dichos cocos y la producción suficientemente alta  
de enterotoxinas para causar síntomas de envenenamiento en-  
gatitos. Se ha visto que algunas cepas de Cl. botulinum --  
pueden crecer y producir toxinas a 15°C y la mayoría puede -  
hacerlo a 20°C en unos tres días.

Se han encontrado esporas en verduras congeladas y --  
puede suponerse que se encuentran en ellas a menudo. Afor-  
tunadamente, no son frecuentes las condiciones necesarias -  
para el crecimiento y producción de toxinas. La cocción de  
las verduras congeladas no destruye todas las esporas de --  
Cl. botulinum, por lo que, después de cocinadas, no deben -  
dejarse a temperatura ambiente durante demasiado tiempo. La  
ebullición de las hortalizas durante 15 minutos destruye --

cualquier toxina botulínica producida (43)

#### IV.3 C1. botulinum en alimentos congelados.

Las esporas de C1. botulinum son resistentes a la con-  
gelación, y pueden permanecer por largo tiempo en el alimen-  
to y si éstos, al descongelarse, no son manejados adecuada-  
mente, pueden convertirse en peligrosos: lo anterior fue -  
demostrado por Straka y James, (1932) quienes prepararon --  
muestras empacadas en latas, envases de vidrio y cartón, --  
utilizados para conservar alimentos congelados, y usados pa  
ra producir condiciones de anaerobiosis. Algunos de los en  
vases fueron cerrados al vacío, veinticuatro envases de es  
taño se llenaron de guisantes y se inocularon con una mez--  
cla de toxina tipo A y B en concentraciones altas., luego -  
se congelaron y descongelaron manteniéndose así durante tres  
días. Al hacerles los análisis respectivos se vió que los-  
chicharos se volvieron tóxicos. Otros paquetes fueron ino-  
culados con mezcla ligera y también se comprobó su toxicí--  
dad después de ser congelados y permanecer así varios días.

Según James (1933), las esporas secas de C1. botulinum  
no se eliminan ni se reducen por efecto del congelamiento -  
lento o rapido. Al respecto, Straka y James (1932) siguie-  
ron trabajando y tomaron setenta y dos envases de vidrio -  
llenos de chícharos.

Veinticuatro envases fueron inoculados fuertemente, - otros veinticuatro débilmente y los restantes veinticuatro se dejaron como testigo. No se presentó toxina en los chicharos que fueron descongelados y examinados inmediatamente ni en los que habían sido mantenidos en el refrigerador por tres días. Los envases inoculados fuertemente sí tuvieron toxina.

Todos los experimentos se realizaron con guisantes -- congelados y todos se refirieron a las toxinas de C1. botulinum. Sesenta envases experimentales de chicharos se examinaron para este organismo, de los cuales treinta se tomaron como testigo y se aisló C1. botulinum de quince de -- ellos. Los otros treinta se inocularon con el microorganismo (un millón de esporas por envase) recuperándose el mi--croorganismo en cada caso.

De ochenta y tres latas sin inocular, descongeladas y mantenidas a varias temperaturas 26.6°C, 15.5°C y 10°C de - dos a siete días, una mostró evidencia positiva. De quince envases que recibieron un inóculo concentrado treinta fueron descongelados y mantenidos a 26.6°C por dos días; quince - fueron descongelados y mantenidos a 15.5°C por seis días; - quince se descongelaron y se mantuvieron a 10°C por siete - días; y diez fueron descongelados y mantenidos a 5.5°C por siete días. De estas muestras nueve dieron evidencia defi

nitiva de toxina; seis habían sido mantenidas a temperatura de 26.6°C por dos días y tres a 10°C por siete días. - Los autores concluyen que cuando los guisantes conservados por congelamiento son propiamente tratados, no hay peligro de botulismo.

#### IV.4 Cl. botulinum en leche condensada

La posibilidad de desarrollo con formación de toxina botulínica en leche enlatada fue investigada por Easty, Mayer y Schoenhotz, (1923). Cinco latas fueron inoculadas -- con esporas de Cl. botulinum sin toxina y luego almacenadas a temperatura ambiente, después de diez días se le hizo una prueba al contenido de una lata, comprobándose que tenía toxina en poca cantidad, y la apariencia de la leche -- era normal. El contenido de las latas restantes se coaguló después de ciento veinte y dos días con desprendimiento de un fuerte olor a ácido butírico, resultando bastante tóxico para los cobayos al hacerse en ellos las pruebas. Otras -- inoculaciones en leches enlatadas condujeron a estos investigadores a las siguientes conclusiones:

1. El deterioro de la leche enlatada después de inoculada con Cl. botulinum puede ser bastante irregular, esta puede tener apariencia normal pero -- puede ser ligeramente toxica.
2. El número de células introducido aparentemente,-

no tiene importancia.

3. Al agregar tierra se aumenta el deterioro, pero no aumenta la formación de toxina, también hay -- pruebas que indican que la toxina, una vez formada en la leche, puede deteriorarla. (43)

#### IV.5 Cl. botulinum en el pan.

Pocos experimentos han sido realizados con organismos en el pan. Edmondson, Thom y Giltner (1923) inocularon con esporas de Cl. botulinum sin toxina, suficiente masa de pan para una hogaza, ésta se sometió al procedimiento usual, y finalmente se horneó a 220°C por treinta y cinco minutos. - Otra hogaza fue inoculada después de haber sido trabajada y antes de ser colocada en el molde para que volviera a esponjarse; la segunda hogaza se horneó de la misma manera que la primera, en ninguno de los dos experimentos pudo recobrase Cl. botulinum, no era de esperarse que las esporas fueran destruidas por las temperaturas alcanzadas durante el horneado del pan. (43)

#### IV.6 Desarrollo de Cl. botulinum en productos cárnicos.

Se sabe que las esporas de Cl. botulinum están ampliamente distribuidas en el suelo, no es difícil, por lo tanto, que siempre se presenten en varios productos cárnicos, ya que la carne es un medio ideal para el desarrollo de Cl. botulinum. La mayoría de los medios de laboratorio contienen car

ne molida a la que se les agrega agua.

Los brotes de botulismo surgidos, casi siempre pueden rastrearse hasta los productos cárnicos y constituyen la -- prueba presuntiva de que las carnes pueden tener esporas -- de Cl. botulinum.

Edmundson, Thom y Giltner (1923) inocularon albóndi-- gás de carnes con esporas sin toxina, las inocularon a 30°C, y formaron bastante toxina como para matar a un conejillo -- de indias en 18 horas. La muestra presentó un aspecto vis-- coso y tenía un olor desagradable. A 9°C no hubo forma-- ción de toxina en el transcurso de tres semanas. Los pro-- ductos de carne previamente preservados han estado aparente-- mente exentos de botulismo; cuando se consideran grandes -- cantidades, un cocinado a fondo podría destruir la toxina -- en un producto que se hubiera vuelto tóxico. Los productos cárnicos, notablemente, están exentos de botulismo, si se -- toma en cuenta las grandes cantidades que se conservan.(43)

Soleh y Orctale (1955) estudiaron la posibilidad de -- botulismo en alimentos precocinados y congelados: trabaja-- ron pollo a la reina, puesto que encontraron esporas de -- Cl. botulinum en muestras que aún no habían sido inoculadas y las incubaron a 30°C. Ellos concluyen en su estudio que-- existe la posibilidad de un peligro potencial de botulismo, siempre que se manipulen mal, los alimentos precocina-- dos y congelados (43).

#### IV.7 Cl botulinum en alimentos ácidos

Slocum y colaboradores (1941) pusieron en claro que -  
unos tomates con pH de 4.2 fueron fuente de toxina que re--  
sultó fatal en dos personas; también reportaron que nueve-  
brotes de botulismo provenían de alimentos ácidos: tomates,  
peras, chavacanos y demostraron que la superficie del reci-  
piente se encontraba enmohecida y los alimentos obviamente-  
fermentados. Se ha comprobado que en los Estados Unidos de  
Norte América, en un período comprendido de 1899 a 1973, -  
se han presentado un total de 27 brotes debido a consumo de  
frutas, verduras y conservas caseras condimentadas con pi--  
mienta, chile o salsa de chile.

El pH próximo a la neutralidad favorece el desarrollo  
de Cl. botulinum, el pH mínimo de crecimiento y producción-  
depende del tipo de alimento, del tipo de Cl. botulinum y -  
de la temperatura, Townsend y colaboradores (1954), estudia  
ron la germinación de esporas, crecimiento y producción de  
toxinas en cepas de los tipos A y B de Cl. botulinum, en di  
versos alimentos ajustados a diferentes niveles de pH. En-  
tre los alimentos estudiados se encuentran pimientos, bere-  
jenas, budines de frutas, spaghetti con salsa de carne, coc  
teles de jugos de frutas y otros, que a menudo se acidifi--  
can antes de ser sometidos al tratamiento térmico, para que  
éste pueda ser menos intenso (24). Los resultados obteni--

dos variaban con los diversos alimentos y cepas, pero las del tipo A, con una sola excepción, producían toxinas a un pH inferior a las del tipo B.

Llegaron también a la conclusión de que a pH menores de 4.5 se impide la formación de toxina en la mayoría de los alimentos; pero el pH a que puede germinar las esporas es mucho más alto. Los valores de pH mínimo a los que se ha encontrado crecimiento con producción de toxina tipo A son:

Caldo de ternera	5.01
Pan	4.8 a 5.0
Budín de arroz y piña	4.8

También se ha encontrado crecimiento y producción de toxina por Cl. botulinum en alimentos cuya acidez normales demasiado alta para este microorganismo; pero esto se debe a que el ácido lo consumen otros organismos (mohos), aumentando el pH en algunos puntos o en todo el alimento. (15) Lo anterior quedó demostrado en los experimentos que realizaron C. N Huhtanen, J. Naghski y col. (176) Inocularon jugo de tomate comercial con diferentes especies de Cladosporium y de Penicillium, respectivamente, conjuntamente con esporas de Cl. botulinum, dejando como testigo a una muestra a la que se le agregaron esporas de Cl. botulinum únicamente. Observaron que sólo hubo producción de toxina-

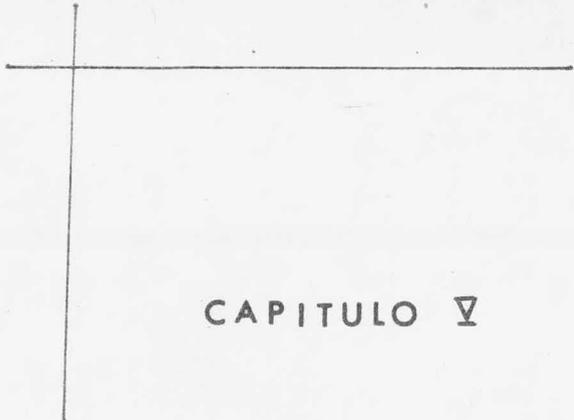
por Cl. botulinum en las muestras que fueron inoculadas -- con Cladosporium sp. y Penicillium sp. (24)

#### VI.8 Cl. botulinum en pescado.

En el capítulo número cinco se presenta un listado -- bastante amplio de los productos del mar que al contaminarse con Cl. botulinum y ser ingeridos por seres humanos han ocasionado intoxicaciones.

Se concluye, entonces, que los productos del mar son un medio apto para el desarrollo de Cl. botulinum tipo E, -- por tener un pH ligeramente alcalino y porque generalmente se prepara en aceite, y cuando las esporas se encuentran en un medio oleoso resisten más al calor.

Lang (1935) elaboró muchas pruebas microbiológicas en diferentes clases de pescado y llegó a comprobar que aún -- después de ser lavado y preparado, listo para su enlatado, las esporas de Cl. botulinum aún se encuentran presentes en un pescado que ha sido contaminado con este microorganismo, convirtiéndose, entonces, en una verdadera y constante amenaza para la industria de los enlatados. (43)



CAPITULO V

INCIDENCIAS DE BOTULIS\_  
MO EN ALIMENTOS

## V. INTRODUCCION

En este capítulo tratamos de recopilar en una forma breve los datos que nos ha sido posible obtener sobre diferentes aspectos del botulismo, como son la identificación de éste por diferentes métodos: desde el clásico bioensayo en animales llevado a cabo por diluciones de los alimentos sospechosos, orina de pacientes, sangre y otros, hasta los últimos que hemos encontrado y las modificaciones introducidas a éstos; así mismo se estudian las condiciones aptas para el desarrollo de las esporas botulínicas hasta llegar a ser toxinas en los alimentos; ya sea por el hecho de enlatar un alimento sin su debido procesamiento, un mal sellado de la lata o cierre de frascos etc... o por un mal transporte; hemos encontrado también que otras probabilidades de brotes se presentan cuando en las plantas mismas existen focos de infección y los que más comunmente han causado brotes de botulismo han sido los de elaboración casera.

Hicimos una breve revisión de los casos de botulismo que se han presentado y reportado, exponiendo en forma sencilla los síntomas generales que estos han manifestado; sin querer llegar a poner cuadros clínicos, fechas de ingresos a hospitales, forma en que fue consumido el alimento, -

horarios y demás, hasta los cuadros completos de resultados de pruebas que se presentaron al lograr la identificación - del tipo de toxina de los alimentos causantes de las intoxicaciones por no parecernos tan importantes para el enfoque - que le estamos dando a este estudio del botulismo.

Por otro lado, consignamos algunas de las formas - que nos parecen más adecuadas para combatir el botulismo en alimentos, ya que actualmente se han hecho estudios sobre - irradiaciones como métodos posibles de destruir las esporas botulínicas, así como también se estudia el empleo de sus--tancias químicas como el piperadol y otras para su destruc--ción; las que recomendamos aquí son del tipo que generalmente afecta al proceso en diferentes formas, ya sea por regu--lación de factores como temperatura, presión, tiempo, pH, - etc..., hasta condiciones higiénicas que deben presentar -- las plantas elaboradoras de alimentos. Finalmente se des--criben algunas formas no alimenticias de contraer el botu--lismo, de las cuales hemos logrado reunir información, sin entrar tampoco en detalles tales que incluyan una historia--clínica del paciente en todo el período de su intoxicación - y sólo hemos tratado en una forma somera estos casos; sin - embargo, hacemos notar el hecho de que en ellos no se han - presentado los síntomas clásicos del botulismo que conoce--

mos, y con ello damos por concluido este capítulo.

## V.2 Condiciones para el brote de botulismo en alimentos:

Dado que las esporas de Cl. botulinum del tipo "A" hasta el "G" se encuentran esparcidas en el suelo, y según estudios realizados por Christiansen y col. (1968) (5) en un trabajo que presentó, se demuestra Cl. botulinum tipo "E" se encuentra en la flora natural del pescado. La incidencia de estas bacterias en el conducto intestinal varía de 1 a 90%; también los estudios realizados por J.C. Craig y col. (1968) demuestran haber encontrado Cl. botulinum tipo "B" en diferentes tipos de pescado del noroeste del Pacífico, y ocasionalmente algunos tipos "E" y "A". Si se observa que las esporas de Cl. botulinum también están en el mar, se ve la facilidad de la contaminación de los alimentos por dichas esporas, las cuales por lo general llegan a eliminarse por los tratamientos a los cuales son sometidos los alimentos antes de ser consumidos; sin embargo, no todos los alimentos llevan el debido cuidado en su elaboración, lo cual origina los brotes de botulismo.

Algunas de las condiciones necesarias para que --- aparezcan brotes de botulismo en los alimentos son las siguientes:

- 
1. Presencia de esporas del tipo A, B, o E de Cl. botulinum en el alimento que se enlata o trata de otro modo.
  2. Un alimento en que las citadas esporas puedan germinar, crecer y producir toxinas.
  3. Supervivencia de las esporas, por ejemplo, por tratamiento térmico insuficiente durante el enlatado o por otro procedimiento de conservación mal realizado.
  4. Condiciones ambientales después del tratamiento, adecuadas para la germinación de las esporas, la multiplicación de los microorganismos y la producción de toxinas.
  5. Tratamiento térmico insuficientes para inactivar la toxina durante su preparación culinaria (7).
  6. Una refrigeración inadecuada puede proporcionar el medio adecuado para la producción de las toxinas.
  7. Un mal engargolado.
  8. Un alimento mal preservado o inadecuadamente almacenado.
  9. La utilización de comida en estado de descomposición.
  10. La utilización de una mala técnica en la elaboración del -- producto.

11. El uso de equipo industrial sucio o inadecuadamente aseado, - después de una jornada de trabajo.
12. La recirculación o estancamiento del agua usada para lavado - y elaboración del producto sin antes haberla tratado adecuadamente.
13. El descuido en el apego a las reglas sanitarias por parte del personal que labora en la industria alimenticia.
14. El no efectuar una verificación periódica del equipo indus-- trial usado, incluyendo manómetros, barómetros y otros, de - los cuales depende la seguridad del tratamiento.
15. El no efectuar una revisión periódica de las condiciones am- bientales de la fábrica o lugar de elaboración de productos- en sus distintas áreas.
16. La falta de un departamento de vigilancia de la calidad o en su caso la deficiente actuación de éste.
17. La mala especificación en el etiquetado del producto respec- to a las condiciones en que se debe conservar o consumir y - su respectiva fecha de caducidad.

18. El mal transporte del producto desde el momento en que sale de la fábrica hasta que llega al consumidor. (8)

El botulismo que se adquiere por comer pescado, o los brotes que se presentan, se deben a una serie de circunstancias que se aunan a las anteriormente mencionadas:

1. El pescado debe estar contaminado por esporas de Cl. botulinum en sus intestinos o partes más cercanas a ellos.
2. El pescado ha recibido un tratamiento inadecuado que no mató las esporas pero eliminó o evita el crecimiento de bacterias vegetativas que compiten con Cl. botulium. Esto podría ocurrir por fallas del proceso durante el tratamiento térmico o durante la fermentación, adición de muy poca sal o de muy poco ácido.
3. El pescado se mantuvo bajo condiciones que permitieron la -- germinación de las esporas de Cl. botulinum y la multiplicación de las células vegetativas y la producción de toxinas.- Cl. botulinum tipo "E", que es el que más comunmente se encuentra en productos del mar, puede crecer a temperaturas -- tan bajas como 3.3°C.

Proct  
Procedido

4. El pescado se ha comido sin cocinar, ya que la toxina es termolábil. (1)

Se ha visto que algunas cepas de Cl. botulinum pueden crecer y producir toxinas a 15°C y la mayoría puede hacerlo a 20°C en unos 2 ó 3 días. Se han encontrado esporas en hortalizas con ellas a menudo. Las esporas de Cl. botulinum sobreviven largos periodos de almacenamiento en alimentos congelados, crudos, o cocidos. Afortunadamente no son frecuentes las condiciones necesarias para el crecimiento y producción de toxinas.

Los alimentos más frecuentemente contaminados son: en México, el atún enlatado, en Estados Unidos los vegetales y pescados enlatados, en Europa las carnes y pescados enlatados y en Europa Occidental los embutidos, en Rusia pescados esturiñidos y en Japón alimentos fermentados a base de pescado.

### V. 3 Identificación de botulismo en alimentos:

La determinación de botulismo en alimentos se inició con el descubrimiento de Cl. botulinum que se aisló de un maíz, posteriormente diferentes científicos han logrado determinar la causa de ciertas descomposiciones en alimentos, así como

evidenciar el posible botulismo que pudieran presentar algunos-pacientes con envenenamientos alimenticios; también se han trabajado tratando de encontrar las causas de intoxicaciones alimenticias en los animales, así como procurando mejorar las técnicas usadas para vigilar la calidad en las industrias alimenticias y con ello poder predecir a tiempo un futuro brote de botulismo.

Han sido muchos y diferentes los procesos inmunológicos y bacteriológicos que se han desarrollado para la identificación de toxinas botulínicas "in vitro", entre las técnicas de diferentes investigadores y las mejoras aportadas a algunas de ellas, citaremos:

Johnson y sus colaboradores (1967) desarrollaron un proceso sensitivo de hemaglutinación, suficiente para revelar la presencia de una unidad ratón de dosis letal media de toxina botulínica. (27)

Ouchterlony (1957) desarrolló un proceso que serológicamente mide la reactividad de algunas toxinas, entre ellas la botulínica, por un procedimiento de cromatografía en placa basándose en la difusión de la toxina. (32)

Vermylgea y colaboradores (1968) usaron una técnica -

de escurrimiento o difusión en placa (Ouchterlony) para descubrir las toxinas de Cl. botulinum en alimentos. Pero al usar este -- método encontraron la dificultad de almacenar las placas para uti-- lizarlas como testigo en un gran número de muestras. (44)

Greez y colaboradores (1962) describieron un método pa-- ra obtener las esporas de contaminantes usando lisozima (200 g/ml) y tripsina (100 g/ml). Sus efectos pudieron ser complementados - por el uso de ultrasonido a 10 kc por min. (20).

Perkins y Tsuji (1962) explican el uso de arginina para la estimulación de la esporulación de Cl. botulinum.

Johnston y colaboradores (1964) reportaron que usando-- etanol (50%) aislaron fácilmente a los microorganismos (tipo "E") (28).

Johannsen (1965) reportó que ciertas condiciones micro-- biológicas mejoran o disminuyen las condiciones ecológicas para-- el desarrollo de Cl. botulinum. Por ejemplo, estafilococos y -- Pseudomonas activaron su desarrollo, quizás por alterar el pH - del medio. Por otra parte Escherichia coli, Enterobacter aero-- genes y Proteus vulgaris pueden alterar el desarrollo de Cl. bo-- tulinum en diferentes formas, ya sea por producción de desarro-- llo más rapido o por la destrucción enzimática del desarrollo de

la toxina. (26)

Cann y colaboradores (1965) estudiaron en particular los parámetros tiempo, temperatura, y almacenamiento, en Cl. botulinum tipo "E" que crece en pescado empacado al vacío. (3)

Kautter y colaboradores (1966) detallaron el efecto de una sustancia llamada "Boticin E" la cual es bacteriolítica y bacteriostática principalmente para el desarrollo de la espora; su actividad es específica para el tipo "E". (20)

Chapman y Naylor (1966), en un artículo sobre aislamiento de Cl. botulinum tipo "E" obtenido de pescado de agua fresca, describieron técnicas de aislamiento y medios de cultivo. (9)

Bibbs y Freame (1965) describieron métodos para el aislamiento de Cl. botulinum en alimentos (17)

Shank en (1963) describió una técnica usando una película plástica para el aislamiento. (42)

El procedimiento más frecuentemente usado para revelar la presencia de toxina de Cl. botulinum es una inyección de la dilución de extractos sospechosos, puesta intraperitonealmente en ratones y determinando la dosis letal mínima (MLD) por

ml. o la dosis letal del 50% de la población ( $LD_{50}$ ) por ml. La técnica en la que se basa este procedimiento es, a grandes rasgos, la siguiente:

El material dedicado a la investigación se siembra en el medio de cultivo de Kitt Tarozzi, (caldo nutritivo -- con hígado molido), calentando previamente a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10-20 minutos. La mitad de los tubos sembrados se calienta hasta  $80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos para liberarlos de la flora esporógena extraña y se cultivan en condiciones anaeróbicas. El cultivo puro aislado se identifica de acuerdo con sus -- propiedades de cultivo, bioquímicas y toxigénicas (35).

Para demostrar la presencia de toxina se inyecta -- subcutánea o intraperitonealmente a cobayos, ratones blancos o gatos, y en algunos casos a conejillos de Indias, el filtrado de cultivo en caldo, sangre u orina de los enfermos o extractos de los residuos de los alimentos, habiéndose de inocular uno de los animales controles con material sin calentar y otro con material calentado. Además, 3 animales -- experimentales deben ser inoculados, uno con filtrado y suero antitóxico "A", otro con filtrado y suero antitóxico -- "B" y el otro con filtrado y suero antitóxico "E". Dependiendo del tipo de toxina con el que esté contaminado el -- alimento es el resultado obtenido. (35)

Hasta hace poco los bioensayos con ratones fueron -- la técnica válida para la identificación de toxina botulínica. El procedimiento involucraba la inyección intraperitoneal del producto en ratones. Cuando la muerte ocurre debe calcularse el factor letal, para ser neutralizado con anti-toxina de alguno de los tipos de toxina botulínica. La inyección de productos directamente a los ratones algunas veces no permitía especificar exactamente a que se había debido, si a las propiedades del producto mismo a la producción bacteriana de otras toxinas diferentes de la botulínica. Algunas muertes pudieron también ser causadas por la penetración de órganos vitales durante la inoculación.

Un sistema de difusión microcapilar en gelogel para revelar la presencia de toxina botulínica en alimentos y -- cultivos fue desarrollado y evaluado por Leonard W. M. ---- (1973), (33) se probaron toxinas tipos "A", "B" y "E" con - este sistema y con el de bioensayo en ratones para compa--- rar. La técnica seguida en este método es la siguiente:

El sistema de difusión en gel de Ouchterlony para - la identificación de toxina botulínica fue modificado para usarlo con tubos capilares. El medio de difusión fue gelosa al 1% en regulador salino de borato, a pH 8.4 como lo -

describió Carpenter. Se adicionó un gramo de gelosa especial de Noble (Difco) y se disolvió por ebullición. Después de enfriado se añadió 1 ml de Thimersol a 1% como preservativo. La gelosa fue distribuida en cantidades de 10 ml en tubos de ensayo con tapón de rosca que se almacenarán a 4°C.

La gelosa fundida fue enfriada a 40°C antes de ser usada. Se mezclaron tres mililitros de antitoxina sin diluir, con 2 ml de gelosa y 10 litros de esta mezcla fueron puestos en un extremo del tubo capilar de vidrio por medio de una jeringa de punta recta de 50 litros. El extremo libre del tubo se selló por inserción de aproximadamente 1 mm. de sílice y se calentó el extremo. Con una jeringa limpia, se colocaron cuidadosamente en la abertura libre del tubo 10 litros de toxina para evitar el atrapamiento de burbujas. Esto fue hecho por medio de la inserción de una aguja recta dentro del tubo de forma que quitara las burbujas que aparecieran, hasta que se solidificó la gelosa -antitoxina en la otra mitad del tubo. Los tubos preparados de esta manera son puestos horizontalmente en cajas de Petri con papel filtro humedecido. Se usaron sobre el papel, como soportes del tubo capilar, aplicadores de madera. Los tubos fueron observados de las 13 a las 24 h. después de incubar-

a 30 °C. Durante la incubación los tubos con reacciones po  
sitivas desarrollaron una línea de precipitación delgada --  
dentro de la mezcla gelosa-antitoxina. Esta línea fue de -  
aproximadamente 1 mm desde la interfase con la muestra de -  
toxina. Las líneas fueron fácilmente visibles bajo 1.5 uni  
dades de aumento usando luz reflejada contra un fondo obscu  
ro.

El método de difusión microcapilar en gel de agar -  
al ser comparado directamente con la técnica de Ouchterlony  
de difusión en placa con gel descrita por Vermilya y col. -  
muestra ventajas, ya que dicha técnica toma de 24 a 48 h --  
para la visualización de la línea de precipitación y pueden  
ocurrir reacciones cruzadas entre los diferentes tipos de -  
toxina. El sistema microcapilar toma de 3 a 24 h y no se -  
han observado reacciones cruzadas. También este sistema --  
microcapilar parece tener ventajas sobre el de bioensayo en  
ratones, ya que los tubos se llenan fácilmente, los resulta  
dos falsos positivos se reducen al no haber problemas de --  
muertes de ratón no específicas, o por choque proteínico o  
error humano en la inoculación, ésto y la gran cantidad de  
alimentos que deben ser examinados para revelar la presen--  
cia de botulismo parecen ser factores decisivos en favor de  
este sistema; el hecho de que la toxina tienda a desarro---

llarse in vivo estaría a favor del bioensayo en ratones, pero aún así hay que considerar que éste es un método rápido y barato, y que al corregirse algunas fallas que aún presenta lo haría, a nuestro parecer, el más conveniente para revelar la presencia de toxinas botulínicas. (33)

#### V.4 Síntomas de botulismo en humanos y su probable alivio.

El botulismo en humanos se ha presentado con los -- nuevos procesos y técnicas que se han venido desarrollando para lograr prolongar la vida útil de los productos alimenticios y conservarlos en condiciones aptas para su consumo. Estas intoxicaciones botulínicas no se han llegado a registrar en muchos países debido a la falta de un registro estadístico adecuado, o a que en algunos casos se confunden los síntomas y se declara la muerte por otro motivo diferente - al de la intoxicación botulínica.

La especie humana es tan sensible al botulismo que si hay toxina en cantidades apenas perceptibles en un alimento, todos los que lo ingieren se intoxican, y el comer una pequeña cantidad de alimento, como unos pocos guisan--

tes o una judía verde, puede causar la intoxicación y conducir hasta la muerte, pues como ya se ha mencionado anteriormente, 200 mg de toxina botulínica "A" bastarían para acabar con la población mundial.

Entre los casos de intoxicaciones que se han reportado, algunos de los pacientes admiten haber notado cierto cambio en alguna propiedad organoléptica del producto al comenzar a utilizarlo, pero no le dieron la debida importancia a este cambio, lo consumieron con resultados fatales para algunos de ellos, mas sin embargo, la mayoría de las veces no se han presentado cambios organolépticos apreciables en el producto al ser consumido, por lo cual se han presentado varios brotes de botulismo.

Los síntomas típicos del botulismo aparecen por lo general entre las 12 y 36 horas después de ser ingerido el alimento, aunque pueden requerirse periodos más largo o más cortos para su presencia. Por lo regular varía el periodo de incubación para los síntomas gastrointestinales de 6 1/2 a 21 h y los síntomas neurológicos tardan de 39 a 108 h. (15.

Los primeros síntomas suelen consistir en trastor--  
nos digestivos agudos, seguidos por nauseas y vómitos, e in-  
cluso diarrea, al mismo tiempo que fatiga, dolores de cabe-  
za y desvanecimiento. Más tarde aparece estreñimiento. En  
los primeros momentos puede ya presentarse doble visión y -  
con frecuencia resulta difícil hablar o tragar saliva. Los  
pacientes se quejan de tener la boca seca y la garganta con-  
traída, y la lengua se hincha. La temperatura del enfermo-  
es normal o inferior a la normal. Los músculos involunta--  
rios sufren parálisis, extendiéndose ésta al aparato respi-  
ratorio y al corazón; la muerte suele producirse por fallo-  
respiratorio.

En la década pasada ocurrieron varios brotes clási-  
cos de botulismo tipo "E" las señales y síntomas que fue---  
ron reportados con los siguientes:

"Signos y síntomas reportados por una o más vícti--  
mas de 7 brotes de botulismo tipo "E". (1)

Nauseas y/o vómitos	7
Visión borrosa, diplopia, fotofobia	6
Respiración dificultosa	5
Aturdimiento o vertigo	4
Dificultad para hablar	3
Debilidad general	3
Disfalgia	2
Dolor abdominal, calambres	2
Dificultad para orinar	1
Párpados pesados	1
Dilatación de las pupilas	1
Músculos específicos débiles o paralizados	1
Garganta, boca o lengua seca	1
Somnolencia	1
Frank L. Bryan	1973

Como se puede apreciar, los síntomas son parecidos en las intoxicaciones por los tipos "A", "B" y -- "E", aunque las náuseas, vómitos y retención de orina-- suelen ser más graves con la toxina tipo "E", sin em-- bargo, se ha visto que no todos los casos de intoxica-- ción son iguales, pues a pesar de haberse causado ésta por el consumo del producto, en una familia no todos - presentan los mismos síntomas, ni en todos los casos - de botulismo se dan todos los síntomas, ya que algunos llegan a morir sin haber presentado vómitos o diarreas que son los principales trastornos intestinales.

En los casos fatales, la muerte sobreviene en general de 3 a 6 días después de la ingestión del alimento contaminado, pero el período citado es algunas veces más largo y otras más corto.

De los reportes estadísticos que se tienen se sabe que en los Estados Unidos la mortalidad es del orden del 65%, pero en Europa es considerablemente inferior; en Alemania, por ejemplo, oscila alrededor de un 20%.

Por desgracia el tratamiento para este tipo de intoxicación es muy poco satisfactorio, ya que aquí el factor tiempo es primordial, pues el único procedimiento eficaz de tratar el botulismo es la administración de antitoxina. Desgraciadamente suele carecer de eficacia si se inyecta después de aparecidos los primeros síntomas gastrointestinales. (8)

Algunas recomendaciones a las que se ha llegado a un acuerdo para el tratamiento del paciente con botulismo, son las siguientes:

1. Todos los pacientes con botulismo deben ser mantenidos bajo estricta supervisión médica.
2. Se recomiendan catárticos, enemas altos y lavados-gástricos para la eliminación de toxina residual.

3. La traqueotomía debe ser practicada en pacientes - con respiración dificultosa.
4. La sangre para las pruebas de neutralización con - antitoxina en ratones debe ser obtenida tan pronto como sea posible después de la aparición de los -- primeros síntomas, o al sospecharse una probable - intoxicación.
5. Todos los casos diagnosticados como de botulismo - deberían recibir la antitoxina trivalente "A", "B" y "E" tan pronto como sea posible, esto es necesario independientemente del tipo de alimento que se haya consumido.
6. Conviene además mantener inmóvil al paciente.
7. Sostener el balance hídrico del organismo.
8. Cuando se reciben los resultados del laboratorio - con el tipo de toxina, entonces la antitoxina espe- cífica (monovalente "E" o "A" o "B") se debe dar - en dosis elevadas.
9. Todos los casos sospechosos se deben reportar inme- diatamente a las autoridades sanitarias encargadas de la salud pública en la respectiva localidad.

En la actualidad se dispone de una vacuna contra el botulismo, pero debido a que existen cinco tipos di- ferentes de botulismo y cada vez se descubren más, sería necesario elaborar una vacuna polivalente o varias mono

valentes para lograr la completa prevención del botulismo, sin embargo, ésto es algo que se encuentra aún en estudio y con muchos problemas en contra, pues habría que ver si no se producen reacciones cruzadas.

El padecimiento de la intoxicación deja tras de sí -- una inmunidad antiinfecciosa firme (antitóxica y antibacteriana). (49)

#### V.5 Datos estadísticos reportados de brotes de botulismo:

En la actualidad son pocos los casos sobre brotes de botulismo de los que se tiene conocimiento, ya que no -- todos los países tienen un registro estadístico adecuado como para dar tal información, ni en todos los países se registran los casos de botulismo como tales, debido a la reacción que el público pudiera tener sobre tal o cual marca si la prensa se llegara a enterar de dichas intoxicaciones. En nuestro país, desgraciadamente, no existe un debido registro estadístico sobre dicha intoxicación y por más búsquedas que se han llevado a cabo sólo se ha podido obtener un caso reportado de botulismo como tal, citado por los Dres. Abel-González Cortés y Guillermo Gosset Osuna (de la Unidad de -- Epidemiología, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, -- CNDR. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales -- ISET) dicho caso corresponde a una mujer residente en la Ciudad de México, D.F., de 29 años de edad; los síntomas se presentaron desde el día en que ella consu-

mió el producto que fue el 8 de marzo de 1975, el cuadro clínico de botulismo que presentó duró 8 días, y falleció el 15 del mismo mes; como se presentaron un paro respiratorio y pérdida de la conciencia 4 días antes de su muerte, durante los cuales no recuperó el automatismo respiratorio, se supuso que esto era originado -- por una hemorragia intracerebral, que condujo a la decerebración. El líquido raquídeo se encontró normal en dos ocasiones y no hubo fiebre.

Establecida la posibilidad de botulismo, el Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del ISET inició las pruebas biológicas que confirmaron dicho diagnóstico, encontrando botulismo tipo "A". El alimento consumido fue atún enlatado distribuido en el comercio después del 17 de noviembre de 1974, esto obligó a la DGAB y M al retiro del mercado de los lotes identificados como sospechosos; se estuvo en espera de que se reportaran otros brotes, dando el adecuado aviso a las autoridades de Salud Pública de los diferentes Estados de la República, pero desgraciadamente no se recibió ningún nuevo reporte de brotes. (18)

En América Latina se han reportado pocas incidencias de intoxicaciones botulínicas: Coballo (Escuela de Salud Pública, Universidad de Caracas), reportó un -

caso de botulismo para 1964 y tres para 1965. (22) En Uruguay, Cl. botulinum tipo "E" no ha sido aun detectado. Este es un pequeño dato en la bibliografía en medicina humana (Bertullo, Institute of Fishery Research, Montevideo).

En Costa Rica no hay investigaciones sobre las incidencias de Cl. botulinum que hayan sido reportadas (Chaveri Benavidez, Food Control, San José).

En Chile, no se tienen datos sobre recientes intoxicaciones por Cl. botulinum, a pesar de que se encuentran muchas esporas botulínicas en el suelo de Chile (B. Valladares, Concepción).

En Guatemala es al parecer donde se tienen estadísticas, tal como lo reporta B. Mendizábal en el siguiente cuadro de datos de casos en dicho país.

	Casos Reportados	Muertos
1961	2	--
1962	9	2
1963	2	--
1964	--	--
1965	3	--
1966	1	--
1967	1	--
B. Mendizábal, Guatemala, C.A.		1964

En Perú, Caletti y Paganin tienen estudios que - han sido reportados sobre comidas de pescado.

Mathyas (WHO/OMS), en Génova, reportó que no hay información sobre intoxicaciones botulínicas en 1966 en las siguientes ciudades y regiones: Argentina, Colombia, Cuba, República Dominicana, Perú, Trinidad Tobago, Bahamas, Guadalupe y Puerto Rico. (22)

Cl. botulinum tipo "E" ha causado el 46% de las infecciones en Japón, Canada y Escandinava durante este siglo. Esta incidencia está naturalmente conectada con los hábitos alimenticios en Argentina, con quizás una - de las más ricas plataformas marinas del mundo, la inci dencia es cero, porque el pescado es un componente míni mo de su dieta.

En Rusia, Popugailo y col (1972) (36) reportaron 9 casos de botulismo, teniendo resultados fatales 2 de ellos. En Japón el tipo "E" causó el 46% de la inciden cia, lo cual está, naturalmente, conectado con los hábi tos alimenticios.

Desde 1899, año en que se empezó a reportar la - morbilidad y mortalidad del botulismo, en los Estados - Unidos se han obtenido diferentes colecciones de datos- estadísticos que mostramos a continuación:

De 1899 a 1963, fueron reportados 1561 casos. Los procesos caseros son los más comunmente implicados como fuentes de infección en 3 de las pasadas 4 décadas. Cl. botulinum tipo "A" y "B" fueron los más frecuentemente-responsables en brotes que provienen de alimentos proccsados en forma no comercial. (34)

E S T A D O	1899 1909	1910 -19	1920 -29	1930 -39	1940 -49	1950 -59	1960 -63	Total
California	11	104	87	105	100	50	12	478
Washington	0	23	43	46	30	15	8	165
Colorado	0	17	27	31	23	25	5	125
New México	0	0	0	37	33	7	3	80
New York	0	18	21	19	12	0	2	72
Michigan	0	15	34	0	2	0	0	60
Oregon	0	3	18	20	12	3	0	56
Tennessee	0	0	7	15	6	5	15	18
Kentucky	0	0	0	11	11	11	10	43
Montana	0	7	5	17	9	2	0	31
Dakota Norte	0	0	0	21	9	0	0	30
Ohio	0	14	12	3	0	1	0	30
Wyoming	0	0	21	8	0	0	0	29
Nebraska	0	2	3	12	10	9	0	27
New Jersey	0	3	2	5	4	13	0	27
Idaho	0	4	2	8	0	6	3	23
Mississippi	0	0	0	0	4	17	0	21
Indiana	0	7	11	0	0	2	0	20
Pensylvania	0	0	9	1	3	2	3	18
Illinois	0	4	4	0	2	6	0	16

Utah	0	1	0	1	12	0	0	14
Minnesota	0	0	0	5	0	3	5	13
Alaska 1	0	0	0	0	0	10	3	13
Texas	0	0	6	4	0	1	0	11
Arizona	0	0	5	0	1	2	0	11
Virginia	0	0	0	2	5	2	0	9
Florida	0	7	0	0	0	0	1	8
Massachusetts	0	6	0	2	0	0	0	8
Maryland	0	0	0	0	4	3	0	7
Alabama	0	0	3	0	1	0	3	7
Dakota Sur	0	0	0	5	2	0	0	7
Nevada	0	0	0	0	3	3	0	6
Wisconsin	0	3	2	1	0	0	0	6
Oklahoma	0	0	0	2	1	3	0	6
Connecticut	0	0	0	1	4	0	0	5
Iowa	0	5	0	0	0	0	0	5
Maine	0	0	4	0	0	0	0	4
Virginia Oeste	0	0	0	0	3	0	1	4
Louisiana	0	0	0	0	0	3	1	4
Washington, D.C.	0	0	0	0	3	0	0	3
Arkansas	0	0	0	2	0	0	1	3
Missouri	0	0	2	0	0	0	0	2
Carolina del Norte	0	0	0	0	0	2	0	2
Georgia	0	0	0	0	1	0	0	1
Hawaii 1	0	0	0	0	0	0	0	0
New Hampshire	0	0	0	0	0	0	0	0
Vermont	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhode Island	0	0	0	0	0	0	0	0
Kansas	0	0	0	0	0	0	0	0
Delaware	0	0	0	0	0	0	0	0
Carolina del Sur	0	0	0	0	0	0	0	0
T O T A L	11	243	328	384	316	197	82	1,561

1899 - 1949 Basado en datos colectados por K.F. Meyer y B. Eddie  
1950 - 63 De los datos reportados al estado por la Oficina Nacional de Estadísticas Vitales y el Centro de Comunicación de Desesos de EE.UU.

El siguiente cuadro resume datos correspondientes a brotes de botulismo causados por alimentos preparados comercialmente, en los cuales hubo 109 muertos en un total de 219 casos en el período de 1906 a 1963:

Año	Alimento	Núm. de brotes	Núm. de casos	Núm. de muertes	Tipo
1906	Cerdo y alubias	1	3	3	-
1910	Habichuelas verdes	1	4	4	-
1912	Jugo de almejas	1	2	1	-
1913	Jugo de almejas	1	3	2	-
1914	Jugo de almejas	1	2	2	-
	Salsa de tomate	1	2	0	-
1915	Salchicha	1	2	2	-
	Elote	1	1	0	-
1918	Aceituna picada	1	2	2	-
	Atún	1	1	1	-
	Aceitunas	3	28	17	A
1919	Salchicha veraniega	1	3	0	-
	Aceitunas maduras	1	7	7	A
	Aceitunas maduras	2	2	0	-
	Aceitunas picadas	1	5	1	A
	Aceitunas picadas	1	1	1	-
1920	Espinacas	1	6	3	A

Año	Alimento	Núm. de brotes	Núm. de casos	Núm. de muertes	Tipo
	Espinacas	1	2	2	-
	Jamón	1	4	4	-
	Leche	1	4	0	-
	Betabel	1	5	5	B
	Espinacas	3	32	4	A
1921	Aceitunas maduras	1	5	3	A
1922	Espinacas	2	11	6	-
	Aceitunas maduras	2	13	6	-
1924	Aceitunas maduras	1	9	2	A
	Sardina	1	2	2	A
	Sardina	1	2	2	A
1925	Espinacas	1	5	1	B
	Carne con papas	1	4	4	B
1929	Chalote (especie de - cebolla)	1	2	1	B
	Entremés	1	3	1	-
1931	Leche	1	1	0	A
	Sardinas	1	2	1	-
1934	Sardinetas	1	3	1	E
1936	Almejas (enlatadas - en Japón)	1	4	4	B
1938	Atún	1	2	2	-
1941	Salsa de champiñones	1	3	1	E
1951	Queso	1	1	1	-

Año	Alimento	Núm. de brotes	Núm. de casos	Núm. de muertes	Tipo
1960	Caracoles ahumados	1	2	2	E
	Atún	1	3	2	E
	Pescado blanco ahumado.	1	2	2	E
1963	Pescado blanco gordo ahumado	1	17	5	E
	Pastel de hígado	1	2	0	A
Total		51	219	109	-

1899-1949 Basado en datos colectados por K.F. Meyer y B. Eddie 1950-1963 reportados al Estado por la - National Office of Vital Statistics and the Communicable Disease Center. E.U.A.

Enlatados caseros que produjeron más de seis brotes de botulismo entre 1899 y 1947.

Alimento	Núm. de brotes
Habichuelas verdes	94
Elote	46
Betabel	22
Espárragos	21
Espinacas	12

Alimento	Núm. de brotes
Higos	10
Guisantes	10
Rábanos	9
Guindillas	9
Alubias	7
Tomates	7
Champiñones	6
Embutidos	9
Pescado	10

Foster, E.M. 1965

Los alimentos de procesamiento casero son los que mayor número de brotes han producido.

Ha habido un aumento en el número de casos de botulismo en el año de 1963, en el que se registraron doce brotes, con 46 casos y 14 muertes. Cuatro de estos brotes, con 24 casos y 9 muertes fueron debidos a alimentos tratados industrialmente. Tres brotes fueron de botulismo tipo "E" producido por pescados; uno por - - atún enlatado que se produjo en Detroit y dos por pescado ahumado.

"Brotos de botulismo producidos en 1963" (34)

Lugar	Alimento	Casos	Muertes	Tipo
California	Chile pimiento	2	0	A
Nuva York	Pastel de Hgado	2	0	A
El oeste de Virginia	Judfas verdes	1	1	B
Kentucky	Elote	5	1	B
Colorado	Judfas verdes	2	1	B
Pennsylvania	Judfas verdes	3	0	B
Michigan	Atún	3	2	E
Michigan	Pescado ahumado	2	2	E
Tennessee, Alabama y Kentucky	Pescado gordo	17	5	E
California	Champiñones	6	1	Desconocido
Minnesota	Pescado ahumado	1	0	"
California	Higos	2	1	"
Total		46	14	

Reportado al estado por el Centro de Comunicación de -  
 Desesos, Servicio de Salud Pública, Atlanta, Ga 1964.

Brotos de botulismo encontrado en pescado y productos -  
marinos de 1899 a junio de 1970.

Producto	Brotos	Casos	Muertes	Tipo			Procesado	
				A	B	E	Hogar	Industrial
Salmón								
Carne	8	19	7	1	1		6	2
Huevos	5	10	6			3	5	
Atún	10	31	16	2	1	1	7	3
Pescado blanco								
Ahumado	5	25	10			5		5
Ballena								
Delfin	6	14	6			4	6	
Aleta de ballena	1	7	1			1	1	
Almejas y jugo	5	12	10			1	1	4
Sardinias	4	7	6	1			1	3
Foca								
Delfín	1	1	0				1	
Arenque	1	1	0				1	
Sardinetas	1	3	1			1		1
Huevos de pescado	1	3	2			1	1	
	1	2	1			1	1	
Cangrejo	1	1	0					1
Langosta congelada	1	1	0					1
Pescado curado	1	1	0				1	
Pescado en esca- beche	1	1	1	1			1	
T O T A L	53	139	67	5	2	18	33	20

U.S. Dept. Health, Education, and Welfare, Public Health Service, (1970) "Botulism in the United States". National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia. (34)

Una revisión reciente de botulismo en los EE.UU. de 1899 a 1973, indicó que un total de 27 brotes se debía a frutas y 20 más a condimentos, incluyendo tomate que se veía bien; pimienta, chile y salsa de chile. -- Otros casos recientes han sido atribuidos a conservas caseras de tomate o jugo de tomate y fueron reportadas por Vartanyants (1972), Popugailo y col. (1972) y por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, 1974) de EE.UU.

Como se puede apreciar, los datos estadísticos -- que en mayor número se han encontrado corresponden a -- EE.UU., lo más seguro es que ésto se deba a que en ese país se ha dado un gran auge a la comercialización de -- productos alimenticios enlatados o procesados. (34)

#### V.6. Formas posibles de combatir el botulismo:

Para evitar el botulismo tiene gran importancia la tecnología correcta en la elaboración de los productos alimenticios por parte de las empresas de la industria de la alimentación y sobre todo, de las conservas de carne, pescados y verduras, así como del ahumado y de la salazón del pescado y de la preparación casera, ya que, generalmente se preparan sin observar las ordenanzas sanitarias. También se encuentra la posibilidad, en el caso de la preparaciones caseras, de que no se --

cuenta con el suficiente equipo como para regular bien el proceso.

*Pract  
Procedo*

Los peces capturados deben ser desprovistos inmediatamente de sus vísceras, siempre y cuando hayan cumplido con las condiciones necesarias como para poder usarlos de materia prima y deben colocarse en los frigoríficos. El transporte del pescado debe hacerse de acuerdo con el régimen térmico establecido, impidiendo su contaminación con tierra o contenido intestinal. Las verduras deben ser lavadas cuidadosamente. Para hervir la carne o el pescado se recomienda hacerlo en pedazos pequeños, no permitiendo la conservación de productos (jamón, lomo) de gran peso y en muchas capas, preparando las conservas en porciones no superiores a 1.5 kg. Las esporas del botulismo, que se conservan después de la esterilización, provocan el abombamiento de los envases, percibiéndose que el contenido de los mismos despiden olor a grasa rancia. No debe permitirse, de ninguna manera, la venta de tales conservas, debiendo ser retiradas y sometidas a una investigación minuciosa. La salazón del pescado debe hacerse en una solución salina fuerte, cuya concentración no sea menor al 10%.

Las conservas se deben almacenar en lugar frío.(7)

Entre los métodos que se han mencionado para evitar el botulismo se encuentran los siguientes:

1. Rechazar todos los alimentos enlatados o presentados de otras formas que se encuentren deteriorados.

2. Ni siquiera probar un alimento sospechoso.

3. Evitar los alimentos que una vez cocidos se han mantenido durante algún tiempo a la temperatura ambiente y no se han sometido luego a un tratamiento térmico adecuado.

4. Hervir, no menos de 15 minutos, cualquier alimento sospechoso.

5. Es conveniente evitar, además, el consumo de alimentos crudos o precocidos que se han congelado, descongelado y mantenido a la temperatura ambiente.

6. Es muy importante evitar la contaminación del alimento después de cocido, pues cualquier organismo patógeno o causante de alteración que a él llegue, hallará muy reducida la competencia que otros organismos pudieran ejercer y el alimento cocinado posiblemente constituye un mejor medio de cultivo que el original si se permiten oportunidades de crecimiento.

7. De aquí que también sea importante realizar rápidamente el enfriamiento y congelación para que no se presenten dichas oportunidades.

Para prevenir el botulismo procedente de pescado-ahumado se han recomendado las siguientes precauciones:

1. Mantener unas condiciones higiénicas adecuadas durante la producción y manipulación.

2. Que el pescado se caliente durante el ahumado o después, de tal forma que en su punto más frío haya - por lo menos  $81^{\circ}\text{C}$  y esa calefacción dure 30 minutos

3. Que el pescado sea congelado inmediatamente - después de empaquetado y se mantenga congelado.

4. Que en todos los envases se indique: "Alterable, manténgase congelado".

Es muy importante tomar estrictas precauciones en el manejo de pescado, ya que si hay esporas adyacentes-al intestino o a pocos mm. de éste y no se tiene el debido cuidado, éstas pueden germinar y generar toxinas.

Jepsen (1969) reportó que el pescado ahumado tiene un sistema inhibitor, el cual afecta la germinación-de Clostridium y la producción de toxinas. Este sistema es atribuido al formaldehído generado por el ahumado y absorbido por la piel en una concentración de 35-40 - mg/g de músculo de pescado.

La presión de vapor en el cocido es uno de los mé

*Pescado*

todos mas seguros, pero las recomendaciones en muchos boletines son un tanto indefinidas, ya que, por ejemplo, la presión de vapor de sólo 4.536 kg. se recomienda para un frasco grande de cualquier alimento, mientras que otros recomiendan para el mismo proceso y el mismo tiempo, una presión de 4.536 a 6.804 kg. Si una presión de cocido no es adecuada para los vegetales, debe usarse algún método de preservación diferente al enlatado.

El éxito de cualquier método de tratamiento de enlatado de alimentos se determina fácil y rápidamente por el calor de penetración dentro del contenido y el tiempo de destrucción térmica para microorganismos de la descomposición. (14)

Se recomienda también tomar como medida, para evitar brotes de botulismo, el lavado de todo el equipo industrial usado al terminar cada día laboral; así como el lavado de las partes no desmontables del equipo con mangueras de vapor o agua caliente a presión, al igual que los pisos y paredes, para evitar posibles fuentes de infección.

Se debe cuidar también que el agua de enfriamiento para el producto procesado esté exenta de contamina-

ción de microorganismos, así como tener una buena recirculación en los tanques de lavado o escaldado, sin dejar estancar el agua.

En general el equipo utilizado en la fabricación debe estar en condiciones perfectas para poder rendir - un buen funcionamiento.

El departamento de vigilancia de la calidad es - primordial en la industria alimenticia, para poner en - evidencia e impedir los posibles brotes de botulismo o - de contaminación con otro tipo de microorganismos; ya - que de dicho departamento depende la aceptación de la - materia prima, el mantener estrictas condiciones duran - te el tratamiento en el aspecto aséptico y tecnológico - y la aprobación de los lotes de los alimentos ya indus - trializados, así como también verificar la presentación - adecuada del producto y su manejo hasta el momento mis - mo de ser recibido por el distribuidor. Estas son algu - nas de las muchas medidas que se pueden tomar para la - prevención de brotes botulínicos

#### V.7. Otras formas de contraer el botulismo:

Como ya se ha dicho anteriormente, las esporas - del agente del botulismo se encuentran distribuidas en-

diferentes partes, tanto en terrenos vírgenes como cultivados; en el agua de mar, además de los alimentos, - etc.

El proceso está condicionado por la exotoxina, - que se absorbe en el intestino, penetra en la sangre y afecta los núcleos de la médula oblonga, el sistema -- cardiovascular y los músculos. Actualmente también se ha demostrado la penetración de Clostridia a través de la superficie de las heridas.

Hace tiempo se consideraba al botulismo como una simple intoxicación. En la actualidad se ha demostrado que los Clostridia se encuentran en diferentes órganos de las personas fallecidas por botulismo. Por lo - tanto, esta es una tóxico - infección.

Ahora se ha registrado, sin embargo, la presen-- cia de botulismo tipo "A" en heridas laceradas, las cua les no tienen seria infección de otros tipos y el botu lismo tipo "B" como un severo componente de fracturas - en las cuales había una incipiente gangrena, que aparen temente se sostenía a pesar de aplicaciones locales de sulfonamida y sulfadiazina sistemáticamente, pero sur-- gió después en este caso el botulismo tipo "B" que per sistió por más de 34 días. En ninguno de los casos men

cionados se observaron síntomas de botulismo.

El botulismo tipo "B" fue repetidamente demostrado en algunas contaminaciones de heridas infectadas, seguidas de una fractura de pierna con una mezcla de infección anaeróbica y aeróbica y gangrena gaseosa en un período mayor de 34 días. Es probable que estos organismos estuvieran presentes, si no desde el comienzo, - al menos desde el tercer día hasta la mejoría.

Geiger (1924), demostró que la toxina botulínica tipo "A", puede ser absorbida a través de heridas frescas y de la superficie mucosa.

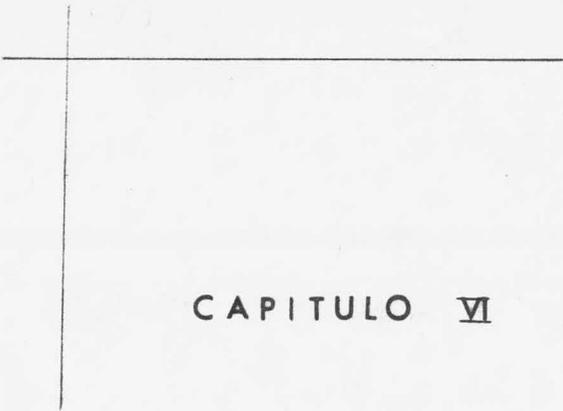
El hecho de que en unos casos se haya logrado -- mantener por más tiempo a C1. botulinum que en otros, - tal vez se deba a la observación que hicieron Hally y Paterson (1923) de que bajo ciertas condiciones, ciertas bacterias destruyen, a medida que se forma, la toxina de C1. botulinum en cultivos mezclados, pero ésto no pudo ser demostrado en todos los filtrados (21).

Un reporte hecho por Joseph B. Davis y col. - - (1951) informa sobre un caso de una herida con consecuencias fatales, en la cual fué aislado, C1. botulinum tipo "A". El reporte del caso informa que le sucedió a

una chica de 15 años, la cual se ocasionó una fractura al caer al pasto; desde su recámara situada en el segundo piso; después de ingresar en el hospital y ser operada, comenzó a presentar síntomas de elevada temperatura, pulso acelerado y respiración agitada; después de una segunda operación que se le practicó para amputarle la pierna por haber presentado gangrena gaseosa y a los 14 días de haberse presentado la fractura, se comenzaron a presentar síntomas de botulismo tales como disfagia, incapacidad para hablar, flaccidez muscular general, visión doble. Dos días más tarde murió.

Como se puede observar, el botulismo también se puede contraer por heridas o laceraciones en la piel al entrar la espora en contacto con el organismo, y si no se tienen las debidas precauciones. dicha espora puede llegar a desarrollarse a la temperatura del organismo y formar la toxina, misma que puede ser transportada a través del flujo sanguíneo a todo el organismo. (11)

Esta es, a grandes rasgos, otra de las formas en las que se ha encontrado que se puede adquirir el botulismo.



CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Dado el alto índice de brotes botulínicos que se registra actualmente en diferentes países como consecuencia de su desarrollo industrial, es necesario dar a los diferentes tipos de Cl. botulinum la importancia adecuada para evitar la alta mortandad registrada actualmente por éste, se deben incrementar los estudios científicos llevados a cabo sobre botulismo en sus diferentes aspectos, tanto desde la forma en que se pueden producir los brotes, hasta cuáles condiciones son aptas para el desarrollo y producción de toxinas, teniendo en cuenta la resistencia de cada tipo de toxina a los diferentes medios que pueden presentar los alimentos, así como a las condiciones de los procesos a los que van a ser sometidos; también se deben de investigar los métodos para revelar su presencia y lograr dicha identificación en el menor tiempo posible, dado el daño que causan en el organismo humano y las posibilidades tan escasas que tiene de ser combatido el botulismo en la actualidad; es importante realizar pruebas de estudios inmunológicos que permitan la adecuada prevención o inmunización de las personas contra este tipo de toxinas; son varios los investigadores que se han dedicado al estudio del Cl. botulinum y muchos los años dedica--

dos a éste desde que se descubrió; pero desgraciadamente aún falta mucho por lograr, sobre todo en los países en vías de desarrollo donde no se tiene suficiente conocimiento sobre el botulismo, debido a lo cual, cuando se llegan a presentar algunos brotes de botulismo, sus síntomas son confundidos con los de otro tipo de intoxicación o enfermedad y no son reportados como tales, lo cual origina un mal registro de datos y con ello evita el debido cuidado que se podría tener sobre tal o cual alimento en determinada región, por ello es imprescindible que las autoridades de Salud Pública correspondientes a cada región o país, efectúen inspecciones periódicas en las instalaciones de tecnología de alimentos, para verificar tanto el funcionamiento de la maquinaria o equipo, como las condiciones higiénicas, elaboración y demás y de ser posible establecer temperaturas, presiones, pH y otros parámetros mínimos para la elaboración de cada producto, tomando en cuenta el tipo de tratamiento y alimento que se va a procesar; aunque esto parezca un poco difícil, se sabe que en Rusia ya es un hecho y gracias a ello el índice de botulismo ha disminuido considerablemente en ese país.

Cada país debería de contar con un centro de almacenamiento de antitoxinas, tanto monovalentes como --

polivalentes, de los tipos que se han encontrado que -- producen toxicidad en los humanos, para que en caso necesario ésta pueda administrarse en la forma mas rápida posible y con ello evitar las muertes que causa el botulismo.

Los investigadores han podido "establecer" características comunes como condicionantes para que aparezcan brotes de botulismo. Dichas características han sido el fruto de la observación y experimentación; de manera que el hombre se ve afectado por el botulismo debido a la presencia de esporas del tipo A, B o E de C. botulinum en los alimentos cuando éstas pueden germinar y crecer y en consecuencia producir toxinas mortales para quienes ingieren alimentos contaminados.

Frecuentemente, las esporas señaladas se encuentran en los alimentos enlatados que han sufrido un tratamiento térmico insuficiente durante su preparación -- culinaria o por un procedimiento de conservación inadecuado, cierre defectuoso o cuando las latas presentan características de abombamiento. También un alimento mal preservado o inadecuadamente almacenado puede ser causa de botulismo al ser ingerido. Esto incluye no sólo a los alimentos enlatados sino también a los caseros.

Es menester señalar que la técnica que se emplee - en la elaboración de los alimentos, así como la higiene, adquieren vital importancia para garantizar la buena ca lidad de los alimentos. Estudios experimentales han de mostrado que los envases de enlatados de estaño son -- inhibidores de la toxina de Cl. botulinum.

También se han producido brotes de botulismo por - la ingestión de alimentos en estado de descomposición.

Cabe mencionar, además, que la carencia de un buen control de calidad que abarque la vigilancia del agua - que se use en la elaboración del alimento, el descuido - de las normas sanitarias por parte del personal que la - bora en la industria alimenticia, el no efectuar una ve rificación periódica del equipo industrial usado, del - que depende la seguridad sanitaria del alimento, el no especificar en la etiqueta las condiciones en que el -- consumidor debe almacenar y mantener el alimento enlata do, así como omitir la fecha de vencimiento, y el trans porte inadecuado, pueden ser la causa de botulismo.

Aunque un alimento enlatado o de fabricación case - ra haya cumplido con todas las normas de seguridad, es prudente someterlo a un proceso de ebullición durante -

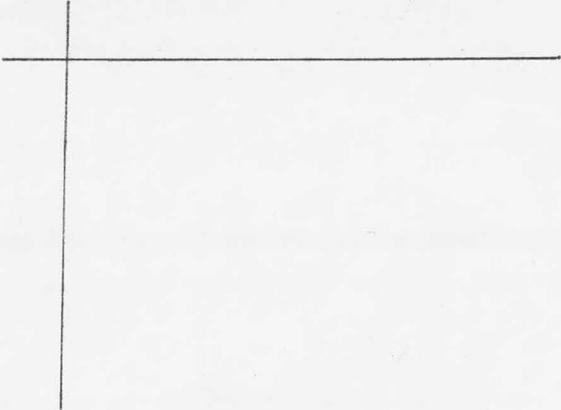
11 ó 15 minutos antes de ser ingerido ya que la ausencia de mal olor no indica necesariamente que un alimento enlatado no esté contaminado por toxina botulínica, pues la contaminación no sólo puede ocasionarse por el contacto con la tierra sino también por el mal manejo en la materia prima o defectos durante el proceso de enlatado, ya que las esporas de C1. botulinum pueden sobrevivir por periodos de tiempo largo en medio ácido, siendo capaces de germinar cuando el nivel del pH del medio se incrementa a valores por encima de 4.6

Por otra parte, como el microorganismo es un anaerobio estricto se desarrolla con relativa facilidad en los alimentos enlatados a causa de las condiciones que se presentan en ellos.

Es conveniente resaltar que los agentes usados comúnmente para "curar" carnes tienen poca influencia sobre la resistencia al calor de las esporas. Se ha reportado que el nitrato y el nitrito de sodio, en concentraciones de 0.17% en la carne, son inefectivos en la reducción de la resistencia al calor de las esporas. Sin embargo, los alimentos salados son menos susceptibles de contaminarse que los no salados, porque la sal común inhibe o dificulta la multiplicación del microorganismo.

Una vez ingerido el alimento contaminado con esporas de Ci. botulinum, el proceso infeccioso está condicionado por la exotoxina que absorbe el intestino, pudiendo afectar el sistema cardiovascular y/o los músculos. Los síntomas suelen consistir en trastornos digestivos agudos, seguidos por náuseas y vómitos, e incluso diarrea, al mismo tiempo que fatiga, dolores de cabeza y desvanecimiento. Posteriormente aparece estreñimiento. En los primeros momentos puede presentarse doble visión, dificultad para tragar saliva y resulta difícil el habla. Los pacientes se quejan de tener la boca seca y la garganta contraída, y la lengua se hincha.

La temperatura del enfermo es normal o inferior a la normal; la muerte suele producirse por fallo respiratorio, y sobreviene de 3 a 6 días después de la ingestión del alimento contaminado.



**BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Bryan L. F. en  
Microbiological Safety of Fishery Products.  
Ed. Chischester H. D. Graham  
Academic Press  
New York and London  
pp. 281 - 287; 1973.
  
- 1'- Buchanan, R., E. Gibbons, N.E.  
Bergey's Manual of determinative Bacteriology.  
8 th Edition  
Williams and Wilkins  
Baltimore, 1974.
  
- 2.- Burrows, W.  
Tratado de Microbiología  
Décimo octava Edición  
Ed-Interamericana, S.A.  
México, D.F.  
pp. 149, 188, 265, 603-607; 1965.
  
-  3.- Cann, D.C. y col.  
"The growth and toxin production of Clostridium botulinum type E and certain vacuum packed fish"  
J. appl. Bacteriol; 28, 431-436; 1965.
  
- 4.- Chapman, M. H. y col.  
"Isolation of Clostridium botulinum Type E from-  
Cayuga Lake fish"  
Appl. Microbiol; 14, 301-302; 1966
  
- 5.- Christiansen, L.E. y col.  
"Survival and outgrowth of Clostridium botulinum  
Type E spores in smoked fish"  
Appl. Microbiol, 16, 133-137; 1968.

- 6.- Ciccarelli, S. A. y col.  
"Cultural and Physiological Characteristics of -  
Clostridium botulinum Type E,G and the susceptibi-  
lity of certain animals to its toxin".  
Appl. Environ. Microbiol., 34:6; 843-848; 1977.
  
- 7.- Clifford, F. E. y col.  
"The Freezing preservation of foods".  
Ed. Avi Publishing Co.  
Inc. Westport Conn  
Third Edition  
Vol. I ; pp. 59-65; 1957.
  
- 8.- Collins, C. H.  
Métodos Microbiológicos.  
Ed. Acribia  
Zaragoza (España)  
pp. 66, 241, 246, 252, 253, 260, 322, 358; 1969
  
- 9.- Craig, J. M. y Pilcher, K. S.  
"Clostridium botulinum Type F:., Isolation From -  
Salmon from Columbia River"  
Science., 153 : 311; 1966
  
- 10.- Dasgupta B. R., y Sugiyama H.  
"Inhibition of Clostridium botulinum Types A and  
B hemagglutinins by sugars".  
Can. J. Microbiol., 23:1257-1260; 1977.

11.- Davis., B. J. y col.  
"Clostridium botulinum in a fatal wound infection"  
J.Amer.Med.Assn., 146:7; 646-648; 1951.

medicina

12.- Desrosier W. N.  
Conservación de Alimentos.  
Ed.Continental, S. A., 1977  
México  
pp. 58-59; 214-217-219,221-223,233,357,401-404.

13.- Duff, J. T. y col.  
"Studies on immunity to toxins of Clostridium --  
botulinum".  
I. "-A Simplified Procedure for Isolation of Type  
A Toxin-".  
J.Bacteriol., 73: 42-47; 1957.

FR  
marcans

14.- Duff, J. T. y col.  
"Studies on immunity to toxins of Clostridium --  
botulinum".  
II.- "Production and Purification of Type B Toxin  
for Toxoid".  
J.Bacteriol., 73; 597-601; 1957.

15.- Frazier, W. C.  
Microbiología de los Alimentos.  
Ed. Acribia  
Zaragoza (España)  
pp. 45,48,63,65,72,134,175,178,279,317,327,340,354; 1972

- 16.- Gerwing, J. y col.  
"Purification and activation of Clostridium --  
botulinum Type E toxin"  
J.Bacteriol., 81; 819-822; 1961.
- 17.- Gibbs, B.M. y col.  
"Methods for the recovery of Clostridia from --  
foods".  
J.Appl.Bacteriol., 28, 95-111; 1965.
- 18.- González. C. A. y Gosset, O.G.  
"Caso confirmado de Botulismo en la Ciudad de Mé  
xico".  
S.S.A. Dirección Gral. de Investigación de Salu-  
bridad  
Boletín Informativo IV: 16  
Del 16 - 31 de Agosto de 1975.
- 19.- Gordon, M.F. y col.  
"Studies on inmunity to toxins of Clostridium -  
botulinum".  
III.- "Preparation, Purification and Detoxifica-  
tion of Type E Toxin".  
J.Bacteriol., 74; 533-538; 1957.
- 20.- Greez, N.A. y col.  
"Procedure for cleaning of Clostridium botulinum  
spores".  
J.Bacteriol. 84, 552-558; 1962.

- 21.- Hagan, R. y col.  
"Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos".  
3a. Edición, 1966.  
Ed. Prensa Médica Española,  
México.  
pp. 41,42, 338-341.
- 22.- Halbinged. E. R. en  
"Microbiological Safety of Fishery Products".  
Ed. Chischester H. D. Graham  
Academic Press  
New York and London  
pp. 191-201; 1973.
- 23.- Hall, I. C.,  
"The Ocurrance of C1. botulinum Types A and  
B in Accidental Wounds".  
J.Bacteriol, 50; 213-217; 1945.
- 24.- Huhtanen, C. C. y col.  
"Growth and Toxin Production by Clostridium --  
botulinum in Moldy Tomato Juice".  
Appl.Environ.Microbiol., 32:5; 711-715; 1976.
- 25.- Iida H:  
"Bacteriophage and Toxigenicity in Clostridium --

botulinum"

Hokkaido University School of Medicine.

Sapporo, Japan.

Folleto pp. 1-6

- 26.- Johanssen, A.  
"Clostridium botulinum Type E in foods and the -  
environment generally"  
J.Appl.Bacteriol.28; 90-94; 1965.
- 27.- Johnson H. M. y col.  
"Serological studies on Types A, B and E botulinal  
toxins by passive hemagglutination and bentonite -  
flocculation".  
J.Bacteriol.,91:967-974; 1967.
- 28.- Johnston, B. y col.  
"Method to facilitate the isolation of Clostridium  
botulinum Type E".  
J.Bacteriol., 88: 1521-1522; 1964.
- 29.- Kautter, D. A. y col.  
"Antagonistic effect of Clostridium botulinum Ty-  
pe E by organisms resembling it".  
Appl.Microbiol.,16: 611-622; 1966.

- 30.- Lamanna, C.  
"The Most Poisonous Poison. What do we know about  
the toxin of botulism? What are the problems to -  
be solved?"  
Science., 130; 3378; 763-772; 1959.
- 31.- Leandro Montes, A.,  
Saneamiento de la Industria Alimentaria.  
Ed.Universitaria de Buenos Aires  
pp. 52; 1969.
- 32.- Lehninger A.  
Bioquímica,  
Ediciones Omega, S. A.  
Barcelona España.  
pp. 145; 1974.
- 33.- Mestradea, W.L. BIOMÉDICOS  
"Rapid Detection of Clostridium botulinum Toxin -  
by Capillary Tube Diffusion".  
Appl.Microbiol.,27:6; 1017-1022; 1974.
- 34.- Osherooff, B. J. y col.  
Status of Botulism in the United States.  
Public Health Reports., 79:10; 871-878; 1964.

- 35.- Piackin, K.  
Microbiología  
Ed. Mir  
Moscú  
pp. 238-241; 1968.
- 36.- Popugailo, V. M. y col.  
"Cases of botulism caused by preserved tomato --  
juice".  
Gig. Sanit.,37(Feb):97-99; 1972.
- 37.- Potler, N. N.  
Ciencia de los Alimentos.  
1a. Edición  
Ed.Edutex, S. A.  
México.  
pp.10,11,171-176; 1973.
- 38.- Ralph, W. J. y col.  
"Botulism From Canned Tuna Fish".  
Public Health Reports., 78:7; 561-564; 1963.
- 39.- Sakaguchi, G. and Sakaguchi, S.  
"Studies on toxin production of Clostridium --  
botulinum Type E."  
III.- "Characterization of toxin precursor"  
J.Bacteriol.,78; 1-9; 1959.

- 40.- Sánchez Marroquín, A.  
Principios de Microbiología Industrial.  
Ed. Química, S. A.  
México, D. F.  
pp.64-65; 1961.
- 41.- Schonfield, F. D.; Tucker, V. M.  
Manual of Determinative Bacteriology  
Ed. Avi Publishing  
pp. 785-789; 1961.
- 42.- Shank, J. L.  
"Application of the plastic film technique in -  
the isolation and study of anaerobic bacteria".  
J.Bacteriol., 86: 95-100; 1963.
- 43.- Tanner, W. F.  
The Microbiology of Foods.  
Second Edition  
Illinois, Garrard Press  
pp. 31-78; 1944.
- 44.- Vermilgea, B. L. y col.  
"Detection of botulinal toxins by inmunodiffusion"  
Appl.Microbiol.,16: 21-24; 1968

- 45.- Walter, G. W. y Mcbee. H. R.  
Microbiología General  
Segunda Edición  
Ed.Continental, S. A.  
México  
pp. 50-53, 186-189; 1971.
- 46.- Weiser, H. H.  
Practical Food Microbiology and Technology.  
Ed. The Avi Publishing Company  
Inc. Connecticut  
pp. 305-307; 1962.
- 47.- Windsor, C. y Cutting, M. D.  
Manual de Farmacología  
Ed. Montaner y Simón, S. A.  
Barcelona, España.  
pp. 179, 490; 1960
- 48.- Wright, G. G. y col.  
"Studies on immunity to toxins of Clostridium --  
botulinum".  
V.- "Detoxification of Purified Type A and Type-  
B Toxins, and the Antigenicity of Univalent and-  
Bivalent Aluminum Phosphate Adsorbed Toxoids".  
J. Immunol.,84:384; 1960.

49.- Zinsser, R. Q.

Microbiología de Zinsser

Cuarta Edición Española

Ed. U.T.E.H.A.

pp. 27,30,39,45,47,55; 1971.