



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Estudio y Comparación de los Diferentes Tipos
de Toxinas Encontradas en Clostridium
Botulinum.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA LUISA SANCHEZ MATEOS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CLAS Tesis 362
ADO 1977
FECHA
PROC. 24 58 **3**



A mis queridos padres:

Con respeto y veneración quiero dedicarles muy especialmente esta tesis, como un pequeño agradecimiento por los sacrificios y desvelos que pasaron para hacer de mi un alguien en la vida.

A mis hermanos:

Estela, José Platón, Carlota
Silvia, Rosario Lucila.

A la maestra Elda Peniche.

Maestra Elda, quiero agradecerle a usted, tanto la ayuda desinteresada que me prestó en la realización de esta tesis como los conocimientos - que de usted adquirí, durante este tiempo.

A la Maestra Leonor:

A usted le agradezco el apoyo que me brindó como maestra, así como los conocimientos que me impartió durante el período de mi vida profesional.

Al maestro Amor:

Maestro, a usted quiero agradecerle los conocimientos que nos supo dar en nuestra formación profesional, - conocimientos que siempre valoraré - y trataré de aplicar durante mi vida profesional.

Al Presbitero José I. David.

Los caminos de la vida tienen muchos tropiezos, pero cuando en estos largos caminos encontramos una mano amiga, resulta más fácil el andar.

A Felipe:

Quiero agradecerte el apoyo que siem
pre supiste brindarme, así como los-
consejos que sabias darme en el mo-
mento oportuno.

A Mayte:

Que me brindó, durante ciertos
momentos, su ayuda desinteres
da y sincera, así como su amis
tad y los valores de esta.

A Juanita:

A una gran amiga, que me ten
dió su mano en forma sincera
y desinteresada.

A mis amigos:

Con los que compartí momentos agradables e ilusiones de la vida.

A toda aquellas persona que de una u otra forma contribuyó en mi formación profesional.

PRESIDENTE: OSCAR AMOR DODERO
VOCAL : LEONOR MARTINEZ SOTO
SECRETARIO: ELDA PENICHE QUINTANA
1er. SUPLENTE: NOEMI MONROY DE AMOR
2do. SUPLENTE: MARIA DEL CARMEN CORTES D.

Sitio donde se
desarrolló el-
tema

: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Sustentante

: MARIA LUISA SANCHEZ MATEOS

Aesor

: ELDA PENICHE QUINTANA

ESTUDIO Y COMPARACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE TOXINAS ENCONTRADAS EN EL CLOSTRIDIUM BOTULINUM.

I.- INTRODUCCION

II.- GENERALIDADES

A).- Taxonomía

B).- Especies.

- 1) Clostridium causante del tétanos
- 2) Clostridia causante de la gangrena gaseosa.

C).- Clostridium botulinum.

- a) Habitat
- b) Morfología
- c) Requerimientos nutricionales, medios de cultivo y características del crecimiento
- d) Bioquímicas.
- e) Resistencia
- f) Tipos de Clostridium botulinum
- g) Toxinas.

D).- Botulismo

- 1.- Mecanismo de acción de la toxina
- 2.- Antitoxina.

III.- DIFERENTES TOXINAS PRESENTES EN EL BACILO

A).- Toxina A.

- 1) Obtención
- 2) Purificación.
- 3) Dosis letal.

B).- Toxina B

- 1) Obtención
- 2) Purificación
- 3) Dosis letal.

C).- Toxina C.

- 1) Obtención
- 2) Purificación
- 3) Dosis letal

D).- Toxina D

- 1) Obtención
- 2) Purificación
- 3) Dosis letal

E).- Toxina E.

- 1) Obtención
- 2) Purificación
- 3) Dosis letal.

F).- Toxina F.

- 1) Obtención
- 2) Purificación
- 3) Dosis letal.

IV.- **RESUMEN Y DISCUSION**

V.- **BIBLIOGRAFIA**

I.- INTRODUCCION.

El trabajo presentado en esta tesis, abarca breves generalidades sobre toxinas del género *Clostridium*, y en forma especial se tratará de *Clostridium botulinum* puntualizando: habitat, morfología, medios de cultivo, exotoxinas, resistencia y clasificación del mismo a partir de sus propiedades inmunológicas y bioquímicas.

Como se ha demostrado en diferentes experimentos, *Clostridium botulinum* no es, en sí, el causante del botulismo, sino que esta enfermedad se debe a las toxinas producidas y liberadas por este bacilo.

En vista de esto, el objetivo principal de esta tesis, fue el realizar una recopilación de los diferentes estudios hechos en base a las toxinas de *Clostridium botulinum*.

En este trabajo se tratarán las 6 diferentes toxinas obtenidas a partir de este bacilo, mencionando mecanismo de acción y especies a las que atacan, así como métodos de obtención y purificación y diferencias sobre bases inmunológicas.

La toxina butulínica, es la toxina neuroparalítica más potente conocida, pequeñas dosis de ésta, como 0.1 μ g

bastarán para causar la muerte, tanto al hombre como animales.

Esta toxina es resistente a las enzimas digestivas, es absorbida en el tracto digestivo y transportada por el torrente sanguíneo a todo el organismo.

La toxina botulínica, actúa sobre la placa neuromuscular, teniendo como consecuencia un fallo en la contracción muscular. Al actuar sobre los músculos de la respiración y del músculo cardíaco, ocurre la muerte por parálisis respiratoria o por paro cardíaco.

La toxina botulínica se forma fuera del organismo humano, especialmente en los alimentos enlatados y conservados y es relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de 80°C durante 30 min.

Debido a la toxicidad que presenta dicha toxina se ha visto la importancia que tiene su obtención y su purificación, ya que en base a esto, se procede a la obtención del toxoide, y a partir de éste, obtener la antitoxina, la cual se utiliza como único tratamiento contra la enfermedad o mejor aún de la intoxicación denominada botulismo.

Como las toxinas son antigénicamente diferentes, los anticuerpos son específicos por cada toxina.

II.- GENERALIDADES.

A).- Taxonomía.

División: Protophyta.
Clase : Schizomycetales.
Orden : Eubacteriales.
Familia : Bacillaceae.
Género : Clostridium.

B).- Especies patógenas del género Clostridium.

Las especies patógenas del género Clostridium son:

- a).- Clostridium tetani.
- b).- Clostridium perfringens.
- c).- Clostridium novyi.
- d).- Clostridium septicum.
- e).- Clostridium bifermentans.
- f).- Clostridium histolyticum.
- g).- Clostridium fallax.
- h).- Clostridium botulinum.

Las bacterias del género Clostridium, se encuentran establecidas en el suelo, donde viven participando en los procesos de putrefacción.

Casi todos los Clostridia son bacilos anaeróbicos estrictos, solo *Clostridium histolyticum* es microaerofílico, pero necesita condiciones anaeróbicas para esporular, son gram positivos. Las esporas son generalmente más dilatadas que el bacilo, y pueden ser ovales o redondas, situadas en el centro, subterminales o terminales.

1.- *Clostridium* causante del tétanos.

Clostridium tetani es el agente causal del tétanos. Las esporas de *Clostridium tetani* no pueden germinar, ni el bacilo multiplicarse en tejidos sanos, pueden llegar a invadir el cuerpo del animal solamente en presencia de tejido necrosado y sin suficiente irrigación sanguínea y en consecuencia por la falta de oxigenación, pasando a germinar y efectuando su acción por medio de la toxina.

La infección permanece estrictamente localizada en el área de tejido muerto. El volumen de tejido infectado es pequeño, siendo la enfermedad una toxemia.

Cuando las esporas alcanzan un área de tejido necrótico, donde el potencial de óxido-reducción es bajo, germinan y se forma suficiente toxina para causar los síntomas de la enfermedad.

La toxina tetánica es absorbida por las terminaciones nerviosas y conducida hasta la médula espinal, al impregnarse con dicha toxina, las células motoras de los cuerpos anteriores entran en estado de hiperexcitación y envían continuamente impulsos a los músculos que están bajo su influencia. Probablemente una pequeña cantidad es absorbida — por la linfa y transportada a la circulación sanguínea, en donde es tomada por las terminaciones nerviosas en distintas partes del cuerpo.

Los síntomas son: espasmos de los músculos máxilares, que le impiden al enfermo abrir la boca. Las convulsiones son precipitadas por el más pequeño estímulo exterior, cada vez son más frecuentes y mas largas, estas crisis son muy dolorosas. Las contracciones musculares y convulsiones se generalizan, llevando esto al desenlace funesto. La muerte es por asfixia, agotamiento físico o falla del corazón.

La exotoxina en solución, es destruida en 5 min. a 65°C, pero la toxina seca es destruida en 1 hr. a 120°C.

2.- Clostridia causantes de la gangrena gaseosa.

Los Clostridia que comunmente se encuentran causando la gangrena gaseosa son: *Cl. perfringens*, *Cl. novyi* y *Cl. septicum*. Además de estas especies se encuentran: *Cl. — bifermentans*, *Cl. histolyticum* y *Cl. fallax*.

Las toxinas que forma *Cl. perfringens* se designa con letras del alfabeto griego, desde la toxina-alfa hasta la toxina-teta; la toxina-alfa, es una lecitinasa que tiene un poderoso efecto necrótico en los tejidos; la toxina-teta, tiene efectos hemolíticos y necrotizantes, también producen colagenasa y hialuronidasa; las otras toxinas quedarán comprendidas con estas distintas propiedades enzimáticas.

Cl. histolyticum es fuertemente proteolítico, digiere tejidos vivos y de este modo contribuye a la diseminación de la gangrena gaseosa.

La gangrena gaseosa, se desarrolla en presencia de tejido necrótico, como consecuencia de la introducción, en una herida, de polvo o materia fecal que contengan esporas. En los tejidos necróticos donde el potencial de óxido-reducción es bajo, los Clostridia se multiplican y forman sus toxinas produciendo severas toxemias. A medida que los microorganismos se multiplican, fermentan los carbohidratos existentes en los tejidos y producen gas (H_2), que infiltran el tejido celular subcutáneo produciendo el enfisema. La reacción inflamatoria se manifiesta por edema. El tejido muerto por las toxinas, es digerido por las especies proteolíticas.

La toxina destruye el tejido vivo circundante y abre nuevas áreas, en las cuales los microorganismos pueden avanzar. Frecuentemente la corriente sanguínea es invadida -

al final.

Los síntomas generales son el resultado de la absorción de las toxinas solubles específicas o de la invasión bacteriana en el sistema circulatorio.

Los síntomas son: enfisema debido a la infiltración de gases en el tejido celular subcutáneo, edema, exudación fétida, necrosis progresiva, fiebre, toxemia grave, -- choque y muerte.

C).- Clostridium botulinum.

Clostridium botulinum es el agente causal del botulismo.

a).- Habitat: este microorganismo es de distribución mundial, su habitat natural es el suelo y ocasionalmente heces de animales.

b).- Morfología: Cl. botulinum es una bacilo grande, móvil, gram positivo, esporulado, mide de 4-6 μ de largo y 0.9-1.2 μ de ancho, es un bacilo pleomórfico. Las células se presentan aisladas, en pares o en cadenas cortas. Las células vegetativas son las que contienen las esporas, algunas producen esporas abundantes, otros producen esporas esparcidas. Las esporas son subterminales, ovales y dilata-

das, algunas son centrales en forma de huso, en los cultivos viejos son muchas las que se encuentran libres, las esporas son de diámetro mayor que el grueso del bacilo y a menudo lo deforman dándole el aspecto de lo que se ha comparado con un zapato para la nieve. Tienen de 4 a 8 flagelos peritricos, - los cuales le comunican movimientos lentos.

c).- Medios de cultivo y características del cre
cimiento.

1.- Agar glucosa: las colonias son globulares, - traslúcidas, de acuerdo a la consistencia del medio y se encuentran esparcidas. La superficie de la colonia es relativa
mente grande, de 5 a 10 mm de diámetro, brillantes, con los bordes filamentosos y un centro obscuro. Su tiempo de incuba
ción es de 4 días a 37°C.

2.- Gelosa profunda: las colonias son translúcidas, presentan en su borde un núcleo opaco, esférico o bi- - convexo y orillas claras, mas transparentes. Si la siembra - es abundante se forman gases. Los productos de toxinas tipos C, D y E forman colonias lanosas sin un núcleo central. Su - tiempo de incubación es de 4 días a 37°C.

3.- Caldo glucosado: desarrollo abundante, con - desprendimiento de gases y olor rancio, con una densa turbie
dad. Los productores de toxinas tipos C, D y E causan pequeña

turbiedad. Su tiempo de incubación es de 4 días a 37°C.

4.- Gelatina: es licuada completamente después— de permanecer el cultivo incubándose 7 días a temperatura — ambiente.

5.- Leche tornasolada: los productores de toxi— nas tipo A, B y F la fragmentan en peptidos, producen la pre cipitación, digestión, alcalinización y reducción.

6.- Clara de huevo coagulada: es digerida por los productores de toxina tipos A, B y F. Su tiempo de incubación es de 21 días a 37°C.

7.- Suero coagulado: lo digieren los productores de toxinas tipo A y B. Su tiempo de incubación es de 15 días a 37°C.

8.- Agar sangre: son hemolíticos. Las colonias — son irregularmente de 2 a 3 mm de diámetro. Su tiempo de incubación es de 3 días a 37°C.

9.- Medios con carne cocida: la digieren los pro ductores de toxina tipos A, B y F, hay enegrecimiento y des— prendimiento de gases. Su tiempo de incubación es de 15 días a 37°C.

Para el crecimiento de *Clostridium botulinum* se presentan varias temperaturas, 10°C, 20°C y 37°C, siendo esta última la óptima.

d).- Bioquímica.

	Glucosa	Maltosa	Salicina	Sacarosa
Acido	+	+	+	+
Licuefacción de la gelatina				-
Reducción de Nitratos				-
Indol				-
Movilidad				-
Cápsula				-

e).- Resistencia.

Las esporas de *Clostridium botulinum*, son la forma más importante del microorganismo desde el punto de vista del enlatado o procesado de los alimentos.

Las esporas de *Clostridium botulinum* están distribuidas ampliamente en el suelo, en el polvo y en las aguas

costeras de muchas regiones. La principal contaminación viene del suelo. Por ello, tanto los vegetales y frutas que -- crecen en estas tierras, como los peces que se alimentan en estas aguas, pueden contaminarse con las esporas. La mayoría de los demás animales también pueden contaminarse.

Se ha encontrado que las esporas de *Cl. botulinum* pueden estar presentes frecuentemente en vegetales congelados, el cocimiento de dichos vegetales congelados, no mata todas las esporas presentes de *Cl. botulinum* y en estos alimentos ya cocidos, si se almacenan a temperatura ambiente por períodos largos, las esporas pueden germinar y por lo tanto producir la toxina.

Los factores que influyen en la germinación de las esporas, crecimiento y por lo tanto producción de la toxina, son de especial interés. Estos factores incluyen la -- composición del alimento o del medio, especialmente sus propiedades nutritivas, contenido de humedad, pH, potencial de óxido-reducción, contenido de sales, temperatura y tiempo -- de almacenaje del alimento. Es la combinación de estos factores los que determinan el crecimiento, la cantidad y prolongación de éste.

Las esporas de *Cl. botulinum* son más resistentes al calor, que las esporas de cualquier otro microorganismo. -- Esto permite al microorganismo sobrevivir a algunos procesos dados a los alimentos.

El calor necesario para destruir todas las esporas en un alimento, dependerá de la especie de alimento, el tipo de cepa de *Cl. botulinum*, el medio en el cual las esporas fueron producidas, la edad de las esporas y el número de esporas presentes. Las esporas formadas en altas temperaturas frecuentemente son más resistentes que las esporas formadas en bajas temperaturas.

Sugiyama (22) demostró que las esporas de *Cl. botulinum* producidas a 37°C, son de más alta resistencia al calor que las esporas formadas a 28°C o 24°C.

En general, las esporas de *Cl. botulinum* tipo C, D y E son menos resistentes que las de los tipos A y B.

Esty y Meyer (39) reportaron los siguientes datos acerca de la resistencia y muerte al calor en una solución de fosfatos a pH=7.

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

La concentración de NaCl necesaria para prevenir el crecimiento y producción de la toxina en los alimentos, depende de la composición del alimento y la temperatura.

La presencia de nitrato de sodio en alimentos — como salchichas o de fosfato disódico en queso, disminuye — el nivel de cloruro de sodio necesario para prevenir la producción de la toxina.

Yessir y Cameron (22) investigaron los efectos — de las sales en el crecimiento y resistencia al calor de Cl. botulinum en infusión de carne y encontraron una reducción — del 70% en la germinación, por la adición de 0.1% de nitrato de sodio, 0.005% de nitrato de sodio o 2% de NaCl.

Schmidt y Boltz (29) determinaron la tolerancia — a la sal, de un inóculo de esporas de cuatro cepas tipo E, — en relación a la temperatura de incubación. A 7.7°C y 10°C — hubo crecimiento, en 4.0% de sal, pero no en 4.5% de sal. — A 15.5°C, 21.5°C y 29.5°C hubo crecimiento, en una concentra — ción de 4.5% de sal, pero no en 5% de sal. A 36.6°C hubo — crecimiento, en 3.5% de sal, pero no en 4% de sal. Estos ex — perimentos fueron llevados a cabo en un medio con la siguien — te composición: tripticasa 5%, peptona 0.5%, glucosa 0.4%, — con un inóculo de 2,000,000 de esporas por tubo, calentadas — a 60°C durante 13 min.

Pivnick y Thatcher (29) reportaron un efecto -- significativo entre NaCl_2 , en la resistencia térmica de *Cl.*-*botulinum*. Un contenido de 10^6 esporas/g en carne, permanece no tóxico por 18 meses a 30°C si contiene 6.2% de salmuera, -- pero se vuelve tóxico si la adición de sal es menor.

En altas concentraciones de sal, la resistencia al calor disminuye. Diez porciento de sal es completamente -- inhibitoria para el crecimiento de las esporas de *Clostri-* *dium botulinum* tipo A y B.

Las esporas de *Cl.* *botulinum* son más resistentes a las radiaciones que la mayor parte de los microorganismos -- que pueden dañar un alimento.

Las esporas de *Cl.* *botulinum* tipo A y B difieren considerablemente en su resistencia a los rayos gamma. El va lor D (es la radiación requerida para destruir el 90% de los microorganismos) para la mayor parte de ellos en carne, es -- de 0.224 a 0.336 Megarad (10^6 radiaciones ionizantes). Las -- esporas del *Cl.* *botulinum* tipo E en carne, son menos resis -- tentes, su valor D es de 0.125 a 0.138 Mrad. La máxima resis -- tencia a la radiación de las esporas de *Cl.* *botulinum* tipo -- A y B, está representada por el valor D de 0.37 Mrad. En base a esto la dosis de radiación de esterilización es de 4.5 -- Mrad, para un nivel de inactivación de 10^{12} . Aunque la resis -- tencia a la radiación puede variar con la cepa, el sustrato -- y otras condiciones.

Las dosis prolongadas de las radiaciones requeridas para inactivar las esporas de *Cl. botulinum*, comunmente producen pérdida de sabor en los alimentos.

Varios investigadores han establecido, que microorganismos suspendidos en grasa o aceite son más difíciles de destruir por calor, que cuando están suspendidos en un medio acuoso.

Lang (22) estableció que la germinación de esporas atrapadas en aceite, constituye un problema en la esterilización de pescado enlatado.

Ito y colaboradores (22) estudiaron el efecto del cloro en las esporas de *Cl. botulinum* tipo A, B y E. La exposición de esporas de 4.5 p.p.m. de cloro en un buffer de fosfatos con un pH=6.5, causó un 99.99% de reducción, en 4 a 6 min. para las capas del tipo E y de 3 a 8 min. para los tipos A y B. Somers (22) concluyó que niveles de 5 p.p.m., son adecuados para condiciones normales de operación en los alimentos.

Los valores mínimos de pH reportados en caldo infusión carne de ternera son: para las células vegetativas 4.87 y para la germinación de esporas 5.01; en alimentos de 4.8 a 5.0; en pudín de arroz 4.8. Se han obtenido diferentes

resultados en varios alimentos y con diferentes capas.

El crecimiento de esporas de los tipos A y B es inhibido a $\text{pH}=4.6$. En base a esto, un pH de 4.5 o más bajo, es un nivel satisfactorio para la seguridad de la salud pública.

También ha sido reportado que pueden crecer microorganismos aerobios y usar el oxígeno creando condiciones anaeróbicas que son adecuadas para el crecimiento de Clostridium botulinum.

También en productos ácidos pueden crecer microorganismos utilizan el ácido, aumentando el pH y de esta manera puede crecer Clostridium botulinum, si está presente.

La temperatura es un factor importante en determinar si hay producción de la toxina y qué cantidad será producida.

Diferentes cepas de Cl. botulinum tipo A y B varían en la temperatura de crecimiento. Han sido reportadas cepas capaces de crecer a 10°C , 11°C , pero la temperatura máxima de crecimiento es de 48°C , la temperatura de 15°C es la más baja para la germinación de esporas. Para el tipo E, -

se han establecido temperaturas mínimas de crecimiento de -3.3°C y como temperatura máxima 45°C .

La temperatura óptima de crecimiento para el *Cl. botulinum* tipo A y B es de 37°C y para *Cl. botulinum* E es de 30°C .

El crecimiento de esporas tipo E a temperaturas inferiores a 10°C , es altamente dependiente del sustrato.

La producción de gas en los alimentos, no es siempre evidente y por esto no es una indicación exacta de daño al alimento por este microorganismo.

Las personas que llegan a ingerir un alimento en el que no ha sido destruido el microorganismo y no hay un daño aparente en el alimento, pueden no sospechar qué alimento fue el que les causó la enfermedad.

La forma vegetativa, se destruye fácilmente por el calor húmedo, a temperaturas menores de 100°C .

f).- Tipos de Clostridium botulinum.

1.- Inmunológicamente, están divididos en 6 - — grupos, de acuerdo a sus toxinas producidas y que son inmunológicamente diferentes.

- a).- Clostridium botulinum tipo A
- b).- Clostridium botulinum tipo B
- c).- Clostridium botulinum tipo C
- d).- Clostridium botulinum tipo D
- e).- Clostridium botulinum tipo E
- f).- Clostridium botulinum tipo F

2.- Bioquímicamente, están divididos en 2 grupos.

- a).- El grupo proteolítico, que incluye los tipos A, B y F; también son designados como Clostridium parabotulinum.
- b).- El grupo no proteolítico, que incluye los tipos C, D y E y algunos géneros del tipo B; también son designados como Clostridium botulinum.

3.- Principales caracteres de los diferentes tipos de Clostridium botulinum.

Tipos	Principales especies - afectadas.	Vías comunes	Alta incidencia geográfica.
A	hombres pollos	vegetales, - frutas enla- tadas en ca- sa, carnes y pescado.	Oeste de los Esta- dos Unidos, Unión Soviética.
B	hombres caballos ganado	Preparación- de carnes, - especialmen- te productos de carne de- puerco.	Francia, Norte y Este de Estados Unidos.
C _{ex}	pájaros silvestres	Larvas de mos- ca (Lucila - caesar), vege- tales en des- composición.	Oeste de Estados Unidos, Canada, - Sudamérica, Sud- áfrica, Australia.

C β	ganado caballos visión (veneno en forrajes)	Forraje con la <u>toxi</u> na, carroña de <u>higa</u> do de puerco.	Australia, Sudáfr <u>i</u> ca, Europa, Norte- de América.
D	ganado	carroña	Sudáfrica Australia
E	hombres	Productos de pesca- do y mamíferos <u>mari</u> nos.	Noreste de Japón, - Columbia Británica, Alaska, la región - de los Grandes La- gos, Isla de Labra dor, Dinamarca, - URSS, Suecia.
F	hombres	Hígado hecho en - casa, pescado.	Dinamarca

Leuchs en 1910, identificó por medio de reacciones serológicas al Clostridium botulinum tipo A y B.

Bengston en 1922, diferenció al Clostridium bo-
tulinum tipo C del cual hay dos subtipos C α y C β . Seddon
describió al C β , que da una reacción cruzada con la anti-
toxina tipo D.

Theiler y Robinson en 1927, describieron a Clos-
tridium botulinum tipo D.

Gunnison en 1936 y Kushnier en 1937, describie—
ron a *Clostridium botulinum* tipo E.

K.F. Meyer y Eddie en 1950, aislaron de comidas—
contaminadas las toxinas tipo A y B.

Moeller y Scheibel en 1960, Dolman y Murakami —
en 1961, diferenciaron a *Clostridium botulinum* tipo F.

La acción farmacológica de las toxinas produci—
das por *Clostridium botulinum*, es semejante. El hecho de que
sean diferentes tipos, radica en que inmunológicamente son —
diferentes.

g).- Toxinas.

Las toxinas bacterianas se pueden clasificar en:
exotoxinas y endotoxinas.

Cristerios para la diferenciación de exotoxinas—
y endotoxinas.

Exotoxinas

1.- Se hallan en el líquido en
que son cultivadas las bacte—

Endotoxinas

1.- Están íntimamente li—
gadas a la célula bacte—

rias. Aunque se forman en la célula, son excretadas rápidamente, en cultivos de 5 a 7 días alcanzan la concentración máxima.

2.- Son muy tóxicas, fatales para los animales de laboratorio en microgramos o menos.

3.- Producen efectos tóxicos altamente específicos en ciertos tejidos, como el miocardio, los nervios y las glándulas adrenales. Tales efectos son característicos de la toxina y sirven para identificarla.

4.- Son poco estables, pierden rápidamente su toxicidad por el calor a 60°C y se alteran pronto a la temperatura ordinaria o por exposición a la radiación ultravioleta.

5.- Son fuertemente antigénicas. Inyectadas en animales, estimulan la producción de grandes cantidades de antitoxinas neutralizantes.

6.- Tratadas con aldehído fórmico, se convierten en toxoides, que conser

rian, de la que solo pueden salir por destrucción mecánica de la bacteria o por autólisis de las células viejas.

2.- Son debilmente tóxicos fatales para los animales de laboratorio en miligramos o más.

3.- Producen efectos tóxicos no específicos, como lesiones en el lugar de la inyección y fiebre.

4.- Son relativamente estables. Conservan su toxicidad después del calentamiento a 60°C, no se alteran cuando se guardan a la temperatura ordinaria, ni por exposición a la radiación ultravioleta.

5.- Son débilmente antigénicas. Inyectadas en animales, no generan en cantidad apreciable antitoxinas neutralizantes específicas.

van el poder antigénico y no son tóxicos.

7.- Las que han sido purificadas, son de naturaleza proteíca.

8.- Generalmente son de bacterias gram positivas.

6.- No se convierten en toxoides por tratamiento con aldehído formico.

7.- Son de composición - lipopolisacárido.

8.- Son de bacterias gram negativas.

Las exotoxinas producidas por: Clostridium tetani, Clostridium botulinum, los Clostridia que causan la gangrena gaseosa, y el bacilo que causa la difteria Corynebacterium diphtheriae, son las de mayor importancia y requieren el tratamiento con las antitoxinas específicas.

Las exotoxinas son, en general, específicas en sus reacciones, afectando un substrato específico y produciendo síntomas característicos.

Dosis mínima letal (DML).- Es la mínima cantidad de toxinas, que cuando es inyectada subcutáneamente, matará a cuyos de 230 a 280 gr, en 4 días.

Dosis letal 50% (DL50).- Es la cantidad de toxina, que cuando es inyectada intraperitonealmente en ratones-

de 18 a 20 g, provoca la muerte en el 50% de los animales --
de experimentación en 4 días.

Determinación de la DML y DL₅₀: Las cepas de --
Clostridium botulinum se siembran en un medio semisólido de --
agar infusión de ternera y glucosa, en tubos de 150 x 19 mm,
conteniendo 15 ml de medio. Se hacen transferencias cada 3 --
meses.

Antes de la inoculación en el medio para la pro-
ducción de la toxina, se hacen transferencias diariamente, --
durante 3 días. En tubos de 175 x 22 mm conteniendo 30 ml de
medio de infusión de ternera, después de que los tubos calenu
tados y enfriados se les adiciona una solución de glucosa--
al 20% dando una concentración final de 2%, se incuban de --
35° a 36°C, durante toda la noche. Dos ml. del cultivo se --
transfieren a otro medio igual.

Para la producción de la toxina el contenido de-
un tubo de cultivo se transfiere en 900 ml de un medio de in-
fusión de ternera e incubar de 35° a 36°C, durante 14 días.

Después se administrarán diversas dosis de toxi-
na a varios lotes de animales de experimentación y se hacen-
una gráfica. En las abscisas se ponen las dosis de toxina y-
en las ordenadas el % de animales muertos.

1.- Propiedades de la toxina botulínica.

La toxina botulínica, es una neurotoxina, debido a que afecta el Sistema Nervioso. Es la toxina neuroparalítica más potente conocida hasta ahora.

Actualmente es conocido, que la excreción de la toxina botulínica al exterior de la célula no es inmediata, porque son proteínas formadas dentro de la célula.

El mecanismo por el cual, una toxina es excretada desde la célula al medio, no está bien establecido hasta ahora.

a.- Estructura química.

La toxina botulínica, es una proteína de alto peso molecular. El peso molecular de las toxinas A, B y E, varían entre 18,000 y 900,000.

La toxina botulínica ha sido purificada y cristalizada. Es soluble en agua y extremadamente letal para el hombre.

Los sitios activos de sus moléculas, comprenden esencialmente ciertos aminoácidos colocados de acuerdo a patrones particulares, cuya identidad y secuencia ni pueden — ser violados, sin alterar o destruir las propiedades biológicas básicas.

C.E. Dolman y Julia Gerwing (24) hicieron un estudio con los aminoácidos que están envueltos en los sitios-activos de estas toxinas.

Ellos llegaron a la conclusión, que el aminoácido cisteína, se encuentran en los sitios activos de estas — toxinas, demostraron la importante función de la cisteína, — en la actividad biológica de las toxinas botulínicas tipo A, B y E, por medio del p-cloromercuribenzoato (PCMB), que es— un reactivo que reacciona específicamente con los grupos— —SH de la cistenia y puede ser seguido espectrofotométrica— mente.

Se hicieron otros experimentos para identificar otros aminoácidos, en la vecindad inmediata de cisteína.

Los experimentos fueron los siguientes:

(a) El residuo de cisteína, fue marcado especifii

camente, con el reactivo N- (4-dimetil amino-3, 5-dinitro—
fenil) maleamida (DDPM).

(b) Esta proteína marcada, fue digerida con trip
sina y el péptido que contenía el residuo de cisteína, se —
aisló por cromatografía en columna, usando Sephadex G-25, —
seguido por cromatografía en papel.

(c) Se hizo un análisis de los aminoácidos de —
los 3 péptidos marcados con DDPM.

Los resultados fueron los siguientes: 6 restos —
de aminoácidos, estuvieron estrechamente asociados con cis—
teína en los 3 péptidos.

aminoácido	números probables de residuos		
	A	B	E
Lisina	1	1	1
ácido aspártico	1	1	1
serina	3	3	3
ácido glutámico	2	2	1
glicina	3	2	3
alanina	1	2	1
N- terminal	alanina	glicina	glicina

b.- Identificación de la toxina botulínica.

1.- Identificación de la toxina en alimentos --
sospechosos.

Una porción de la muestra del alimento sospechoso, se mezcla con un volumen igual o menor, de diluyente gelatin-fosfato estéril. Esta mezcla se macera en frío, en un mortero estéril con arena fría. El material así macerado, se deja reposar toda la noche a 4°C. Cuando el diagnóstico debe ser rápido, se omite este paso. El material macerado se centrifuga en frío y el sobrenadante es el que se ocupa para -- las reacciones de identificación de la toxina.

El sobrenadante es diluido 1:10 (1 parte del extracto, con 9 partes del diluyente).

Si la muestra es de pescaso y se sospecha de la toxina tipo E, una porción de la muestra se tripsiniza para activar la toxina, antes de ser emprendida la prueba de iden tificación. Se le adiciona tripsina estéril al 1.0% a la -- muestra, para obtener una concentración final de 0.1%. Esta mezcla se incuba a 37°C por 1 hr.

Una porción de la muestra será sin tripsinizar-- y se correrá junto con la muestra tripsinizada.

Después se hacen las pruebas de protección en el ratón.

(1) Se utilizan ratones de 20 g, se dividen en grupos de por lo menos 2 ratones cada grupo, más 2 grupos control. Tres a cuatro horas antes de la inyección del extracto tóxico, a cada grupo de ratones de experimentación, se les inyecta intraperitonealmente 0.1 ml de antitoxina (conteniendo 1 unidad de antitoxina), para las toxinas del *Cl. botulinum* tipo A, B, E y F. Los 2 grupos control, reciben el mismo volumen de solución salina isotónica estéril en lugar de antitoxina.

(2) Casi 3 a 4 horas después, los grupos de ratones que recibieron antitoxina, más un grupo control, reciben una inyección intraperitoneal con 0.5 ml de la dilución 1:10 del sobrenadante del extracto del alimento. El segundo grupo control recibe 0.5 ml del mismo sobrenadante diluido, el cual ha sido calentado previamente a 100°C por 10 min.

(3) Los animales son observados durante 96 hrs., después de la inyección. Síntomas de parálisis, dificultad respiratoria y finalmente muerte, indican toxicidad botulínica. Los síntomas pueden aparecer en horas.

(4) El tipo de la toxina se indica por la sobrevivencia de uno de los grupos protegidos con antitoxina.

2.- Técnica en tubo capilar con un gel de agar.

El medio de difusión es en agar al 1%, en un buffer salino de boratos a $\text{pH}=8.4$.

El buffer salino de boratos se prepara como sigue: 94 ml de NaCl al 0.85%, se adicionan a 5 ml de una solución acuosa conteniendo ácido bórico al 0.62%, tetraborato de sodio al 0.95% y NaCl al 0.44%, se adicionó 1 g de agar noble especial, disuelto por ebullición. Después se enfría y se le adiciona 1 ml de timerosal al 1%, como conservador.- Esta mezcla es distribuida en cantidades de 10 ml en tubos con tapón de rosca y almacenada a 4°C.

El agar antes de usarlo, se funde y enfría a 40°C. Tres ml de antitoxina, se mezclan con 2 ml de agar y 10 μl de esta mezcla se adicionan en un tubo capilar por medio de una jeringa de 50 μl . La parte final del tubo capilar es sellada, después con una jeringa limpia se adicionan cuidadosamente 10 μl de toxina, evitando la entrada de burbujas, por el otro lado del capilar.

Los tubos capilares son colocados horizontalmente en una caja Petri conteniendo un papel filtro húmedo, se colocan unos palillos para apoyar el tubo capilar sobre el papel.

Los tubos se observan, después de la incubación a 30°C, de 3 a 24 hrs.

3.- Identificación de la toxina en el suero del paciente.

La toxina botulínica puede demostrarse en el suero del paciente con botulismo. Si hay suficiente toxina para demostrarla, la prueba ofrece un medio de diagnóstico rápido y específico así como para determinar el tipo de toxina.

La sangre se deja coagular y se separa el suero en 2 o más porciones, dependiendo de las antitoxinas específicas disponibles. Si se tienen solamente antitoxinas polivalentes (tipos A, B y E), se añaden 0.3 ml de antitoxina polivalente a 1.2 ml de suero del paciente, mezclar bien, dejar en reposo por 30 min. e inyectar 0.5 ml intraperitonealmente a cada uno de los ratones. Inyectar 0.4 ml de suero del paciente intraperitonealmente a cada uno de 2 ratones control.

Observar los ratones para ver síntomas de parálisis flácida durante 2 días.

En las antitoxinas específicas para los tipos A, B y E, se añaden 1.2 ml de suero del paciente en porcio-

nes de 0.3 ml de cada antitoxina, se mezcla, se deja reposar y se inoculan 0.5 ml intraperitonealmente a cada uno de 2 — ratones. Observar durante 2 días. Si las antitoxinas específicas no protegen a los ratones, y todos ellos mueren en casi el mismo período de tiempo por parálisis, se debe dar — inmediato aviso a las autoridades sanitarias por teléfono — y por escrito.

Cuando el contenido gástrico o el contenido intestinal, son los que van a ser probados para determinar la presencia de la toxina botulínica, tratarlos de manera similar, después de ajustar el pH lo más cercano a la neutralidad.

D.- Botulismo.

El botulismo en el humano, es el resultado de la ingestión de varias clases de carnes preservadas, como salchichas, jamón, embutidos, pescado, proteínas de origen animal, vegetales y frutas contaminadas con una toxina preformada, los alimentos contaminados causan una severa toxemia — cuando son ingeridos.

El botulismo en sí, es una intoxicación, debido a que la toxina es formada fuera del organismo humano y del animal.

La toxina es resistente a las enzimas digestivas, entra al cuerpo por el tracto digestivo y se absorbe en los tejidos.

Las esporas de *Cl. botulinum*, están muy esparcidas en el suelo y frecuentemente contaminan vegetales y frutas.

Estas esporas son extremadamente resistentes al calor y cuando los alimentos no son procesados correctamente (métodos insuficientes de esterilización), sobreviven y después germinan en los alimentos, produciendo así su toxina, que se puede detectar, en un intervalo de 2 días a 2 semanas, según la temperatura de almacenaje y otros factores.

La enfermedad no es de origen reciente, dentro de las páginas de la Medicina, abarca varias centurias.

En 1793 en Wurtemberg, se vió un caso que afectó a 13 personas, de las cuales 6 murieron y se vió que la intoxicación se debía a la ingestión de salchichas.

En 1820 Justinus Kerner (32), publicó 2 monografías, en las que colectaba 230 casos de la toxina presente en salchichas.

En 1870 Müller (32), basado en los trabajos de Kerner, describió la toxina de la salchicha, el cual la nombró la enfermedad del botulismo.

Más tarde en la villa búlgara de Ellezelles, un miembro de una sociedad musical murió y se atribuyó a la ingestión de jamón. Van Ermengem en 1896 (32), interesado por esto, de los residuos del jamón y del hígado de una de las víctimas, aisló un bacilo anaeróbico, esporulado; después, el filtrado de un cultivo lo inyectó a animales de laboratorio, produciendo los síntomas de parálisis y muerte, típicamente observados en el humano. Van Ermengem de la Universidad de Ghent, fue el primero que propuso el aislamiento del *Bacillus botulinum* y posteriormente describió y reportó una potente toxina neuroparalítica.

Hombres, caballos, ganado, pollos y gansos padecen el botulismo en la naturaleza.

Los síntomas del botulismo son los siguientes: - cefalea, vómito, parálisis de los músculos oculares produciendo trastornos de la vista (parestecias oculares, diplopia), parálisis de la faringe, por lo tanto hay dificultad al deglutir y respirar, el paciente presente polidipsia y con frecuencia ni siquiera puede hablar la garganta se obstruye con moco espeso y viscoso, fotofobia, parálisis de las extremidades y debilidad muscular generalizada. Comunmente -

se observa hinchazón y dolor del vientre, frecuentemente — hay estreñimiento. La muerte se presenta por parálisis respiratoria o paro cardíaco.

La enfermedad es difícil de diagnosticar, debido a que al atacar, las manifestaciones del botulismo son generalmente confundidas con síntomas de otras enfermedades.

Los síntomas pueden aparecer a las 12 hrs o hasta 3 días después de la ingestión de la toxina.

En los primeros periodos de la intoxicación, puede haber en la sangre del enfermo toxina suficiente para ser descubierta por inoculación en el cobayo. La inyección intraperitoneal al cobayo, es de 2.5 a 5 ml de sangre del paciente, produce salivación y parálisis características de 24 a 48 — hrs.

Tratamiento.— El único tratamiento, es la administración de la antitoxina botulínica por vía intravenosa — lo antes posible.

La antitoxina, no se debe inyectar a una velocidad mayor de 1 ml por min.

1.- Mecanismo de acción de la toxina.

Los síntomas neurológicos, observados invariablemente en la intoxicación botulínica, son los que hicieron prestar atención directa a varios disturbios funcionales en el Sistema Nervioso Periférico.

La parálisis motora observada en la intoxicación, no es propia de un bloqueo de impulsos a lo largo del tronco nervioso, es el resultado de la acción de la toxina en el — nervio.

Guyton y MacDonald (32), demostraron que la toxina botulínica produce una parálisis completa de las fibras nerviosas, cerca del punto de liberación de la acetilcolina. Hay dos puntos de transmisión colinérgica en el Sistema Autó nomo, el ganglio sensitivo y la rama final del nervio, ésta se encuentra localizada entre la unión del nervio y las fibras celulares (placa neuromuscular). Ambos sitios de transmisión son afectados por la toxina.

La toxina actúa sobre el mecanismo de liberación de la acetilcolina.

La acción presináptica de la toxina, fue estable

cida por la presencia de un abundante complemento de acetilcolina en la vesícula de la terminación nerviosa.

Se confirmó que la toxina no tiene efectos sobre la acetilcolina, debido a un estudio que se realizó con el *Lactobacillus plantarum*, este microorganismo produce una acetilcolina no neural, la cual se puso en presencia de la toxina, no observándose cambio alguno en la acetilcolina.

La toxina tampoco tiene efectos sobre la colinesterasa.

Zacks y colaboradores (32), adhicieron gránulos de ferritina a la toxina botulínica, demostrando por medio de un microscopio electrónico, los gránulos substituidos en las sinapsis de la terminación nerviosa y las células musculares.

No está todavía bien establecido si la toxina afecta otras partes del Sistema Nervioso u otros órganos.

La cantidad de acetilcolina liberada por el impulso nervioso, está en función de la concentración extracelular de iones calcio. Bajo agotamiento del ión calcio, la placa neuromuscular no libera acetilcolina y la fibra muscular falla en la contracción.

El mecanismo de la contracción muscular normal es el siguiente: al llegar un impulso nervioso a la placa terminal, origina la liberación de acetilcolina, ésta actúa disminuyendo la permeabilidad del sarcolema para los iones sodio, y esto a su vez, inicia una onda de despolarización.

Esta onda de despolarización, tiene como consecuencia, que los sacos del retículo sarcoplásmico liberan calcio, éste difunde a lo largo de los miofilamentos, actuando así a la miosina, que desintegra al ATP, de esta manera se tiene la energía necesaria para que los filamentos de actina se deslizen entre los filamentos de miosina y como consecuencia se lleva a cabo la contracción muscular.

Boroff y DasGupta (32), inyectaron serotonina por vía intravenosa a animales de laboratorio.

El experimento consistió en inyectar serotonina y toxina de la manera siguiente:

- 1o. Serotonina e inmediatamente después la toxina.
- 2o. Serotonina y 30 min. después la toxina.
- 3o. Serotonina y 60 min. después la toxina.
- 4o. Solamente toxina.

Los resultados obtenidos fueron:

En el primer caso, el tiempo de sobrevivencia — de los animales fue de 17 min.

En el segundo caso, el tiempo de sobrevivencia — de los animales fue de 35 min.

En el tercer caso, el tiempo de sobrevivencia de los animales fue de 42 min.

En el último caso, el tiempo de sobrevivencia de los animales fue de 25 min.

La toxina botulínica fue inyectada intravenosamente 0.1 ml/ratón.

La serotonina, fue inyectada intraperitonealmente 1.0 ml/ratón.

Según Wooley, la serotonina es un transportador del ión calcio. Basados en esto, Boroff y DasGupta, propusieron que posiblemente la toxina botulínica, en alguna vía, compite con la serotonina en el transporte del ion calcio.

2.- Antitoxina botulínica.

El suero antibotulínico, fue preparado por primera vez por Kepner en 1897, por medio de inmunizaciones en caballos, que es el animal usado todavía hasta ahora.

El caballo es inmunizado contra cada uno de los 6 tipos de *Clostridium botulinum*, todas las inoculaciones — son hechas intramuscularmente en el lomo del animal. Cuando se alcanza el título de antitoxina en un nivel de 10 unidades o más por mililitro, el caballo es desangrado bajo anestesia general. El suero es liofilizado.

Todas las antitoxinas son monoespecíficas y no — llega a ocurrir protección cruzada.

En los laboratorios productores de antitoxina, — se ha tratado de obtener el uso de donadores humanos, para — la preparación de antitoxina homologa. Aunque hay algunas — antitoxinas de origen humano comerciales, pero el costo es — alto y el suministro estrictamente limitado.

Minervin (24) estudió a 2 pacientes con botulismo, a los que les administró la antitoxina botulínica por — vía parenteral, 5-6 hrs. después hizo un análisis en sangre — y orina y la toxina desapareció, pero 48 hrs. después de la —

administración del suero, respereció la toxina.

También observó otros pacientes, de los cuales - a 3 les administró antitoxina por vía intramuscular e intra-duodenalmente y a las 24 hrs. mejoraron considerablemente. - Dos de los pacientes, rehusaron la administración del suero por medio del tubo duodenal y solo se les administró intramuscularmente, su salud no mejoró, por lo que se les administró el suero por medio del tubo duodenal.

El opina, que el suero administrado parenteralmente es capaz de neutralizar la toxina que se encuentra en órganos y tejidos irrigados, pero no la toxina que se encuentra en la luz del tracto digestivo. Esta es una razón, para administrar la antitoxina directamente en el tracto digestivo, por un tubo duodenal en el intestino delgado y en el intestino grueso por medio de una lavativa. La parálisis de la glotis puede prevenirse por administración oral.

El suero administrado por una sonda duodenal, — debe ser diluida en 2-2.5 vasos de agua hervida, para preparar el contacto entre la antitoxina y la toxina, en el intestino delgado. El suero debe ser diluido en bicarbonato de sodio 0.5%.

El uso de las antitoxinas es como diagnóstico en el examen de alimentos sospechosos de contener la toxina botulínica, en el diagnóstico en la sangre de los pacientes enfermos y como agente terapéutico.

III.- DIFERENTES TOXINAS PRESENTES EN EL BACILO.

A).- Toxina A.

1).- Obtención.

a).- Abrams y colaboradores (1), obtuvieron el crecimiento y producción de la toxina por el siguiente método:

Cl. botulinum tipo A se hizo crecer primero en un medio que contenía: peptona 1%, caldo infusión de corazón bovino, este medio contenía la carne picada de corazón bovino en el fondo de cada tubo. El período de crecimiento inicial fue de 24 hrs. a una temperatura de 34°C, este cultivo fue almacenado a 4°C para ser ocupado después.

Para la preparación de la semilla, el cultivo — se hizo crecer en un medio con carne picada de corazón bovino, de 18 a 24 hrs. Después fue transferido a un medio con pepticasa 2%, el crecimiento fue de 18 a 24 hrs. Dos ml de este cultivo se adicionaron a 100 ml del medio donde se cultivó para la producción de la toxina.

El medio utilizado para la producción de la toxina fue preparado de la siguiente manera:

pepticasa (digerido triptico de caseína.....)	2%
Agua de cocimiento de maíz.....	0.75%
Dextrosa.....	0.3%
Agua.....	16 lts.

El pH del medio fue ajustado a 7.5 antes de ser esterilizado, 16 litros del medio se dividieron en botellas-Pyrex de 5 galones.

Para mayor uniformidad en la producción de la -- toxina, la pepticasa fue tratada con carbón antes de ser -- adicionada al medio. Por cada 100 g de pepticasa se le adicio -- nó agua, hasta llegar a un volumen de 500 ml, esta mezcla se -- llevó a la autoclave a 15 lb de presión durante 5 min. Des-- -- pués de esto, se le adicionan 5 g de carbón, la mezcla se -- agita durante 30 min y el carbón es separado de la mezcla -- por filtración.

El agua de cocimiento de maíz fue tratado de la -- siguiente manera antes de ser adicionado al medio:

Por cada 100 ml de agua de cocimiento de maíz, -- se adicionan 200 ml de agua fría, después se adiciona NaOH -- para llevar la solución a un $\text{pH} \approx 9.0-9.5$. Se adiciona agua -- nuevamente para llevarlo a un volumen de 400 ml. Esta mezcla se filtra y se esteriliza en autoclave a 15 lb de presión -- durante 5 min. Este filtrado se almacena a 4°C hasta ocupar-- -- se.

Las botellas se esterilizaron en autoclave durante 1 hr 15 min a 15 lb de presión.

La dextrosa se esterilizó por separado, adicionándola al medio ya estéril a 40°C.

El medio ya sembrado se incubaba a una temperatura de 33-34°C, durante 4 días diariamente se toma una muestra y se ajusta el pH con HCl 5 N o NaOH 5 N para mantener el pH de 5.7 a 6.0.

b).- Duff y colaboradores (15), obtuvieron el crecimiento y producción de la toxina por el siguiente método:

C1. botulinum tipo A se hizo crecer en un volumen de 200 ml de un medio que contiene: peptona 1%, infusión de carne bovina picada, este medio se incubó a 35°C de 24 a 48 hrs. Después de este crecimiento, el sobrenadante se distribuyó en tubos pequeños, congelándolos rápidamente a -60°C y se guardaron a -20°C. Dos ml de cada tubo se transfirieron en 10 ml de medio de tioglicolato Brewer e incubándolos a 37°C de 18 a 24 hrs. De este cultivo se pasó al medio para la producción de la toxina.

El medio para la producción de la toxina tiene la siguiente composición:

digerido pancreático de caseína.....	2%
levadura autolisada.....	0.5%
glucosa.....	0.5%
agua.....	3 lts.

El medio fue ajustado a un pH de 7.2 antes de esterilizarlo.

La glucosa se esterilizó por separado, añadiéndola al medio ya estéril.

El medio ya sembrado se incubó a 35°C, durante 4 días.

2.- Purificación.

a).- Abrams y colaboradores (1) utilizaron el siguiente método para purificar la toxina.

1.- A 192 lts del cultivo íntegro, conteniendo las bacterias y la toxina, se le adiciona ácido para ajustarlo a un pH=3.5, formándose un precipitado. Este precipitado ácido se lava 3 veces con agua destilada, decantando. Después este precipitado se lleva a un volumen de 3 lts, ajustando el pH a 6.8 con K_2HPO_4 20% y NaOH 5 N, después se le -

adiciona solución saturada de Na_2SO_4 . El sobrenadante se --- decanta y se descarta.

2.- Al precipitado se le añade agua hasta un volumen de 5 lts se ajusta a un pH de 5.0 y se deja reposar -- 24 hrs. El sobrenadante se decanta, al residuo se le llama - Residuo 1.

3.- Al Residuo 1 se le añade buffer de fosfatos- 1%, se ajusta a un pH de 6.8 después se lleva hasta un volumen de 5 lts, se vuelve a ajustar el pH a 6.8, se mezcla bien y después se ajusta el pH a 5.0, el sobrenadante se decanta.

Al sobrenadante del paso 2, se le adiciona agua- hasta llevarlo a un volumen de 5 lts, se le llamó sobrenadante 1.

4.- Al residuo del paso 3 se le llamó Residuo II y se le trata igual que al residuo 1.

El sobrenadante del paso 3 se llamó Sobrenadante II y se llevó a un volumen de 5 lts.

5.- Al residuo del paso 4 se le llamó Residuo III y se descartó. El sobrenadante del paso 4 se lleva al mismo- volumen siendo éste el Sobrenadante III.

6.- Se hace una mezcla de los Sobrenadantes I, - II, III, ajustándolos a un pH de 3.5, formándose un precipitado, esta solución se centrifuga. El sobrenadante se descarta.

7.- El precipitado se disuelve en 1500 ml de --- buffer de fosfatos 1% a un pH de 6.8, después se hace una --- diálisis contra una solución saturada de Na_2SO_4 , formándose un precipitado, esta solución se centrifuga y el sobrenadante se descarta.

8.- El precipitado se disuelve en 500 ml de buffer de fosfatos 1% a un pH=6.8, después se ajusta el pH a - 4.7, la solución se centrifuga y el residuo se descarta.

9.- El sobrenadante se dializa contra una solución saturada de Na_2SO_4 , formándose un precipitado, la solución se centrifuga, el sobrenadante se descarta.

10.- El precipitado se disuelve en 300 ml de un buffer de fosfatos 1% a un pH=6.8.

La toxina se obtiene así en forma cristalina.

Esquema de la purificación de la toxina tipo A.

192 lts de cultivo íntegro; precipitado con ácido a pH=3.5; precipitado ácido lavado con agua 3 veces, decantar; precipitado ácido en 3 lts ajustado a pH=6.8 con K_2HPO_4 20% y NaOH 5N; adicionar solución saturada de Na_2SO_4 ; sobrenadante decentado y descartado.

↓

Añadir agua a un volumen de 5 lts, ajustar a pH=5.0; dejar reposar 24 hrs; decantar el sobrenadante.

Residuo I

Sobrenadante I

Añadir buffer de fosfatos 1%, pH=6.8, a un volumen de 5 lts; ajustar a pH 6.8; mezclar bien; ajustar pH 5.0; decantar el sobrenadante.

a un volumen de 5 lts.

Residuo II

Sobrenadante II

Tratar igual como el residuo I

a un volumen de 5 lts.

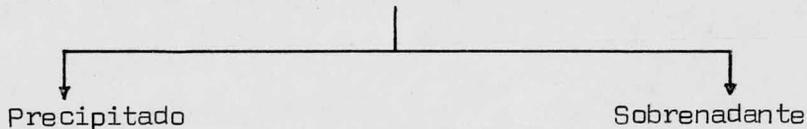
Residuo III

Sobrenadante III

Descartar

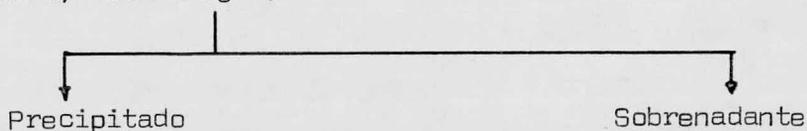
a un volumen de 5 lts.

Mezcla de sobrenadantes I, II, III; ajustar a pH de 3.5; centrifugar el precipitado formado.



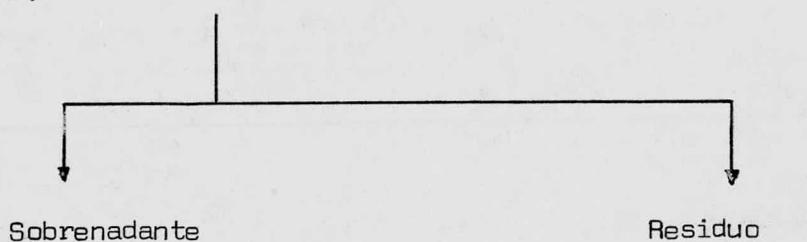
Disolver en 1500 ml de buffer de fosfatos 1%, pH 6.8; diálisis contra solución saturada de Na_2SO_4 ; precipitado formado; centrifugar.

Descartado



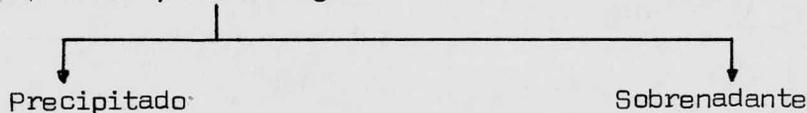
Disolver en 500 ml, buffer de fosfatos 1%, pH=6.8; ajustar a pH=4.7; centrifugar.

Descartado



Dializar contra Na_2SO_4 saturado; precipitado formado; centrifugar.

Descartado



Disolver en 300 ml de buffer de fosfatos 1%, pH=6.8.

Descartado.

b).- Duff y colaboradores (15) hicieron la purificación de la toxina por el siguiente método.

1.- El cultivo completo se ajusta a un $\text{pH}=3.5$ -- con H_2SO_4 3 N, formándose un precipitado. El sobrenadante se descarta y al precipitado se le llamó precipitado ácido.

2.- El precipitado se diluye con agua a 4 volúmenes, se ajusta el pH a 5.0, dando un precipitado a 4°C . El sobrenadante se descarta. El precipitado se centrifuga y se resuspende en agua en $1/40$ el volumen del cultivo, a este -- precipitado se le llamó precipitado ácido lavado.

3.- El precipitado ácido lavado, se diluye con agua a 4 volúmenes, después se le adiciona CaCl_2 1 M a una concentración final de CaCl_2 0.075 M, se ajusta el pH a 6.5-- se filtra con papel filtro a temperatura ambiente. El sobrenadante se llamó extracto de CaCl_2 y el precipitado se descarta.

4.- El extracto de CaCl_2 se ajusta a un $\text{pH}=3.7$ -- con HCl 1 N, se lleva a 4°C . El precipitado se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se descarta. El precipitado se centrifugó a 4°C , a este precipitado se le llamó precipitado ácido.

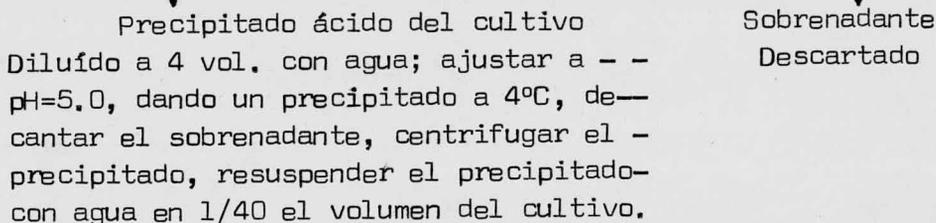
5.- El segundo precipitado ácido se disuelve en-

un buffer de fosfatos a $\text{pH}=6.8$, en un $1/80$ del volumen de -- cultivo, se centrifuga. Después se le adiciona etanol al 50% a una concentración final 15% , se deja reposar de 18 a 24 -- hrs a -5°C , después se centrifuga a -5°C . El sobrenadante se descarta.

6.- El precipitado se disuelve en un buffer de -- fosfatos 0.03 M a $\text{pH}=6.8$, en $1/160$ el volumen del cultivo, -- esta solución se centrifuga, después se le adiciona $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M . Dando unos cristales a 4°C , después se centrifuga. El -- sobrenadante se descarta.

7.- La toxina ya cristalizada se disuelve en un -- buffer de acetato 0.05 M a $\text{pH}=3.8$, en $1/160$ - $1/320$ del vo -- lumen del cultivo, después se hace una diálisis para remover el nitrógeno no proteico.

Esquema de la purificación de la toxina tipo A.-
Cultivo íntegro, ajustado a $\text{pH}=3.5$ con H_2SO_4 3 N .



Precipitado ácido lavado

Sobrenadante

Diluido a 4 vol. con agua y CaCl_2 1 M a una concentración final de CaCl_2 — 0.075 M, ajustar a pH=6.5, filtrar a temperatura ambiente.

Descartado

Extracto cloruro de calcio

Precipitado

Ajustar el pH=3.7 con HCl 1 N, colocarlo a 4°C, decantar el sobrenadante, centrifugar el precipitado a 4°C.

Descartado.

Segunda precipitación ácida

Sobrenadante

Disolver en un buffer de fosfato, — pH=6.8 en 1/80 el vol. del cultivo, — centrifugar. Adicionar etanol al 50% — a una conc. final de 18%, dejar reposar 18-24 hr a -5°C, centrifugar a — -5°C.

Descartado

Toxina precipitada con alcohol

Disolver en buffer de fosfatos 0.03 M, pH=6.8, en 1/160 el vol. del cultivo, centrifugar, adicionar $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 4 M. Dando cristales a 4°C, centrifugar.

Sobrenadante

Descartado

Toxina cristalina

Sobrenadante

Disolver en buffer de acetato 0.05 M, pH=3.8, en 1/160 - 1/320 el vol. del cultivo, dializar.

Descartado

3).- Dosis letal.

a).- Abrams y colaboradores obtuvieron los siguientes datos:

En el cultivo	D.M.L.	0.37×10^6	x mg de N
En la toxina cristalina	D.M.L.	220×10^6	x mg de N

b).- Düff y colaboradores obtuvieron los siguientes datos.

En el cultivo	DL ₅₀ /mg N	0.5×10^6
En la toxina cristalina	DL ₅₀ /mg N	269×10^6

B).- Toxina B

1).- Obtención.

Duff y colaboradores (16), obtuvieron el crecimiento y producción de la toxina por el siguiente método.

Cl. botulinum tipo B se hizo crecer en un volumen de 200 ml de un medio compuesto de: peptona 1%, infusión de carne bovina. Este medio se incubó a 33°C de 24 a 38 hrs. El sobrenadante de este cultivo se distribuyó en tubos pequeños, congelados rápidamente y guardados a -20°C.

Cuando el inóculo se requiere para la producción de la toxina, 2 ml del cultivo semilla se transfieren a 15 ml de medio de tioglicolato y se incuban a 37°C durante 18-24 hrs. Después de esta incubación, 7.5 ml se transfieren a 150 ml de medio para la producción de la toxina y se incuban a -25°C durante 18 hrs. Se hacen una serie de transferencias en grandes volúmenes de medio para la producción de la toxina, hasta obtener un volumen de inóculo igual a 1% del cultivo final.

El medio utilizado para la producción de la toxina, tiene la siguiente composición:

tripticasa,.....	1.5%
extracto de levadura,.....	0.5%
hidrocloruro de cisteína,.....	0.075%
glucosa,.....	0.5%
agua,.....	3 lts.

El pH del medio fue ajustado a 7.1 antes de ser esterilizado.

La glucosa se esteriliza por separado en la forma de una solución de 20%, después se adiciona al medio asepticamente.

El medio ya sembrado se incubó a 35°C durante -- 15 días.

La producción de la toxina se hizo usando 3 lts- de medio en botellas de 4 lts.

2).- Purificación.

La purificación se hizo por el siguiente método.

1.- El cultivo íntegro, se ajusta a un pH de -- 4.2 con H_2SO_4 3 N, dando un precipitado a 25°C, aproximada-- mente 1/30 el volumen del cultivo. Se deja reposar toda la -- noche. A este precipitado se le llamó precipitado ácido del- cultivo, el sobrenadante se descartó.

2.- El precipitado ácido del cultivo, se diluye en 4 volúmenes de agua, dando un precipitado a 4°C. El sobrenadante se descarta. El precipitado se centrifuga a 3,500 rpm durante 30 min, después se resuspende en agua, en 1/30 del volumen del cultivo, al precipitado se le llamó precipitado-ácido lavado.

3.- El precipitado ácido lavado se diluye en 4 volúmenes de agua y se le adiciona CaCl_2 1 M a una concentración final de CaCl_2 0.05 M, se ajusta el pH a 6.0, se agita durante 1 hr a una temperatura de 30-35°C, después se filtra en papel Eaton y Dikeman No. 193 a temperatura ambiente. El precipitado se descartó y el sobrenadante se llamó extracto de cloruro de calcio.

4.- El extracto de cloruro de calcio se ajusta a un pH=3.7 con HCl 1 N. El sobrenadante se decanta y se descarta. El precipitado se centrifugó a 4,000 rpm por 30 min a 4°C. Este precipitado se llamó precipitado ácido.

5.- El segundo precipitado ácido se disuelve en un buffer de fosfatos 0.1 M a un pH=6.8 en 1/30 el volumen del cultivo, después se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a 4°C, después se le adiciona etanol al 50% a una concentración final de 13%, se deja reposar de 18 a 24 hrs a -5°C, la solución se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a -5°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado formado se llamó toxina precipitada con alcohol.

6.- La toxina precipitada con alcohol se disuelve en un buffer succinato 0.2 M a un pH=5.5, después esta solución se centrifuga.

Esquema de la purificación de la toxina tipo B.

Cultivo integro, se ajusta a un pH=4.2 con H_2SO_4 3 N, dando un precipitado a 25°C, aproximadamente 1/30 el volumen del cultivo.

Precipitado ácido del cultivo

Sobrenadante

Diluir en 4 volúmenes de agua, dando un precipitado a 4°C, decantar el sobrenadante, centrifugar el precipitado a 3,500 rpm 30 min a 4°C.

Descartado

Resuspender el precipitado en agua, 1/30 el volumen del cultivo.

Precipitado ácido lavable

Sobrenadante

Diluir en 4 vol. de agua y $CaCl_2$ 1 M a una conc. final de $CaCl_2$ 0.05 M, ajustar a pH=6.0, agitar 1 hr a 30-35°C, filtrar a temperatura ambiente.

Descartado

Extracto cloruro de calcio

Ajustar a pH=3.7 con HCl 1N, dejar toda la noche a 4°C, decantar el sobrenadante, centrifugar el precipitado a 4,000-rpm, 30 min a 4°C.

Precipitado

Descartado

Segundo precipitado ácido

Disolver en buffer de fosfatos 0.1 M, pH=6.8 en 1/30 el vol. del cultivo, — centrifugar.

Adicionar etanol al 50% a una conc. — final de 15%, se deja de 18-24 hrs a -5°C, centrifugar a 4,000 rpm, 30 min a -5°C.

Sobrenadante

Descartado

Toxina precipitada con alcohol

Disolver en buffer en succionato 0.2 M, pH=5.5, en 1/60 el volumen del cultivo, centrifugar.

Sobrenadante

Descartado

3.- Dosis letal.

En el cultivo

DL₅₀/mg de N 1.2 x 10

En la toxina purificada

DL₅₀/mg de N 262 x 10

C).- Toxina C.

1.- Obtención.

Cardella y colaboradores (7), obtuvieron el crecimiento y producción de la toxina por el siguiente método.

C1. botulinum tipo C se hizo crecer en un medio de infusión de carne de ternera, peptona y agar 1%; suplementado con extracto de levadura 2% y glucosa 1%.

El medio se incubó a 33°C de 18 a 24 hrs.

De este cultivo se hizo una serie de transferencias en volúmenes mayores del medio que se usó para la producción de la toxina, hasta obtener un volumen de inóculo -- igual al 10% del cultivo final.

El medio utilizado para la producción de la toxina es el siguiente:

peptona proteosa.....	4.0%
digerido pancreático de caseína.....	2.0%
extracto de levadura.....	2.0%
glucosa.....	1.0%
agua.....	3 lts.

El pH del medio fue ajustado a 7.6, antes de esterizarlo.

La adición de la glucosa, antes de esterilizar el medio, hace más rápida y consistente la iniciación del crecimiento.

El medio ya sembrado se incubó a 33°C por 5 días.

2.- Purificación.

La purificación se hizo por el siguiente método.

1.- Al cultivo íntegro se le adiciona etanol al 99% a una concentración final de 25%, a una temperatura de -5°C, se deja reposar de 18 a 24 hrs a -5°C. El sobrenadante se descarta y el precipitado se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a -5°C.

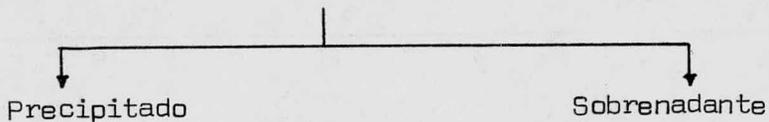
2.- El precipitado es resuspendido en 1/8 el volumen del cultivo con agua fría. Este precipitado se llamó primera fracción alcohólica. Después se le adiciona agua y CaCl_2 1 M a una concentración final de 0.05 M, en 1/4 el volumen del cultivo, se ajusta el pH a 5.0, después se agita 1 hr a temperatura ambiente, luego se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a 4°C. El precipitado se descartó y al sobrenadante se le llamó fracción extracto de CaCl_2 .

3.- El extracto de CaCl_2 se ajusta a $\text{pH}=6.0$ con NaOH 1 N, después se le adiciona etanol al 50% a una concentración final de 15% a -5°C , se deja de 18 a 24 hrs a -5°C , después se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a -5°C . El sobrenadante se descartó y el precipitado se llamó segunda fracción alcohol.

4.- El precipitado llamado segunda fracción -- alcohol, se disuelve en un buffer succinato 0.4 M, $\text{pH}=5.0$, en 1/16 el volumen del cultivo, esta solución se centrifuga a 4,000 rpm, durante 30 min a 4°C .

Esquema de la purificación de la toxina tipo C.

Cultivo íntegro, adicionar etanol al 99% a una conc. final de 28% a -5°C , dejar reposar de 18-24 hrs. a -5°C , centrifugar el precipitado a -5°C .

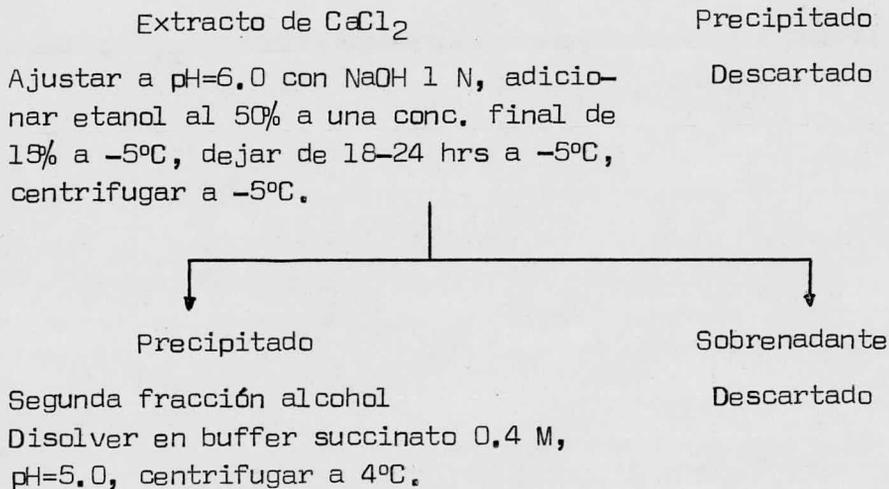


Diluir a 1/8 el vol. del cultivo con agua.

Primera fracción alcohol.

Adicionar H_2O y CaCl_2 1 M a una conc. final de CaCl_2 0.05 M en 1/4 el vol. del cultivo, ajustar a $\text{pH}=5.0$, agitar 1 hr a temperatura ambiente, centrifugar a 4°C .

Descartado



3.- Dosis letal.

En el cultivo	$\text{DL}_{50}/\text{mg de N}$	0.14×10^6
En la toxina purificada	DL_{50} mg de N	22×10^6

D).- Toxina D.

1).- Obtención.

Cardella y colaboradores (8), obtuvieron el crecimiento y producción de la toxina por el siguiente método.

Cl. botulinum tipo D, se hizo crecer primero en 200 ml de un medio que contenía: caldo infusión y extracto de agua de cocimiento de maíz. El período de crecimiento -- inicial fue de 48 hrs a una temperatura de 36°C. Después de este crecimiento, el sobrenadante se distribuyó en tubos pequeños, rápidamente congelados a -60°C y almacenados a -20°C.

Cuando se requiere el inóculo para la producción de la toxina, 2 ml de éste se transfieren a un medio de infusión de carne de bovino-peptona-extracto de agua de cocimiento de maíz, este medio se incuba a 36°C durante 48 hrs.- Después 5 ml de este cultivo se siembran en el medio que se usa para la producción de la toxina.

El medio utilizado para la producción de la toxina fué preparado de la siguiente manera:

Agua de cocimiento de maíz.....	25%
Glicerol.....	1.0%
Carbonato de sodio.....	0.1%

El pH del medio fue ajustado a 7.2 antes de ser esterilizado.

Diez litros del medio se introdujeron en bolsas para diálisis y colocados en botellas Pyrex de 20 lts, esterilizándolo a 121°C durante 3 hrs 30 min.

Una suspensión de agua de cocimiento de maíz — al 15-20%, se ajustó a un pH de 7,2 a 7,5 con NaOH 1 N. La — suspensión se esterilizó en autoclave a 121°C durante 1 hr.— Después se filtró por medio de un papel filtro estéril.

El medio de cultivo ya sembrado, se incubaba a — 36°C, el tiempo de crecimiento fue de 19 días.

2.- Purificación.

La purificación se hizo por el siguiente método.

1.- El cultivo dializado íntegro, se enfría a — -5°C y después se le adiciona etanol al 95% a una concentración final de 25% a -5°C. El sobrenadante se sifonea y se — descarta. El precipitado se colecta por centrifugación a — 4,000 rpm, durante 30 min a -5°C.

2.- El precipitado se resuspende en agua fría, — en 1/4 del volumen del cultivo. Esta suspensión se nombra — como la primera fracción alcohol.

A esta primera fracción alcohol, se le adiciona — agua y solución de CaCl_2 1 M a una concentración final de — CaCl_2 0,075 M en 1/2 del volumen del cultivo, se ajusta el — pH=6,5. Después la suspensión se agita intermitentemente por

1 hr a 33°C, después se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se nombra la fracción extracto CaCl_2 , El precipitado se descarta.

3.- Al extracto CaCl_2 , se le adiciona etanol al 50% a una concentración final de 10% a -5°C, se deja reposar de 18 a 24 hrs a -5°C, formándose un precipitado. El sobrenadante se descarta y el precipitado se colecta por centrifugación a 4,000 rpm, durante 30 min a -5°C.

4.- El precipitado se disuelve en un buffer de fosfatos 0.08 M, pH=6.7, en 1/4 el volumen del cultivo. La solución se centrifuga a 4,000 rpm, durante 30 min a 4°C. Esta suspensión se llama la segunda fracción alcohol. Después se le adiciona etanol al 50% a una concentración final de 10% a -5°C, se deja reposar de 18 a 24 hrs a -5°C, formándose un precipitado. El sobrenadante se descarta y el precipitado se colecta por centrifugación a 4,000 rpm, durante 30 min a -5°C.

5.- El precipitado se disuelve en buffer succinato 0.2 M, pH=5.5, en 1/16 el volumen del cultivo. La solución se llama tercera fracción alcohol.

Esquema de la purificación de la toxina tipo D.

Cultivo dializado integro, adicionar etanol al 99% a una conc. final de 25% a -5°C , dejar reposar 18-24 hrs, sobrenadante sofoneado, centrifugar el precipitado a -5°C .

Precipitado

Sobrenadante

Diluir en 1/4 el vol. del cultivo con agua.

Descartado

Primera fracción alcohol.

Adicional agua y CaCl_2 1 M a una conc. final de CaCl_2 0.075 M en 1/2 el vol. del cultivo, ajustar a $\text{pH}=6.5$, agitar 1 hr a 33°C , centrifugar a 4°C .

Sobrenadante

Precipitado

Fracción extracto CaCl_2

Descartado

Adicionar etanol al 50% a una conc. final de 10% a -5°C , dejar reposar 18-24 hrs a -5°C , centrifugar a -5°C .

Precipitado

Sobrenadante

Disolver en buffer de fosfatos 0.08 M $\text{pH}=6.7$, en 1/4 el vol. del cultivo, centrifugar a 4°C .

Descartado

Segunda fracción alcohol.

Adicionar etanol al 50% a una conc. final de 10% a -5°C , dejar reposar 18-24 hrs a -5°C , centrifugar a -5°C .

Precipitado

Precipitado

Sobrenadante

Descartado

Disolver en buffer succinato 0.2 M
pH=5.5 en 1/16 el vol. del cultivo
Tercera fracción alcohol.

3.- Dosis letal.

En el cultivo	DL ₅₀ /mg N	16 × 10 ⁶
En la toxina purificada	DL ₅₀ /mg N	476 × 10 ⁶

E).- Toxina E.

1).- Obtención.

El medio utilizado para la producción de la toxina se preparó de la siguiente manera:

peptona proteosa.....	2.0%
extracto de levadura.....	2.0%
dextrina.....	1.0%

El medio se ajustó a pH=7.0 antes de esterilizarlo.

El medio ya sembrado, se incubó a 30°C durante -

5 días.

2).- Purificación.

Gordon y colaboradores (19), hicieron la purificación de la toxina por el siguiente método.

1.- Se baja la temperatura del cultivo íntegro a 0°C , después se le adiciona lentamente, etanol al 99% a una concentración final de 29% a -7°C , se le adiciona 0.1% de bentonita, la mezcla se deja reposar 48 hrs a -7°C . El sobrenadante se sifonea y se descarta. El precipitado se centrifuga a -7°C a 4,000 rpm, durante 30 min.

2.- El precipitado se diluye con agua fría, en $1/6$ el volumen del cultivo se agita 1 hr a temperatura ambiente. Este material se llama la primera fracción alcohol. Después se diluye en $1/4$ el volumen del cultivo con agua y solución de CaCl_2 1 M a una concentración final de CaCl_2 0.075 M, el pH se ajusta a 6.0, la suspensión se agita 2 hrs a temperatura ambiente. Después se centrifuga a 4,000 rpm, durante 30 min a 20°C . El sobrenadante se llamó fracción extracto CaCl_2 . El precipitado se descarta.

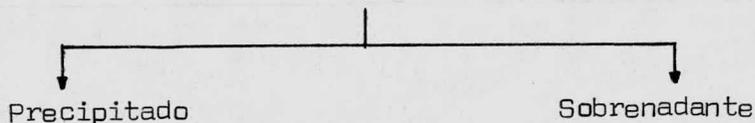
3.- El extracto CaCl_2 , se le adiciona etanol al 99% a una concentración final de 29% a -7°C , se deja reposar toda la noche a -7°C , después el precipitado se colecta por centrifugación a 4,000 rpm, durante 30 min a -70°C . El sobrenadante se descarta.

4.- El precipitado se disuelve en un buffer de fosfatos 0.08 M, pH=6.0. La solución se centrifuga a 4,000 rpm, durante 30 min a 20°C. Este material se llama la segunda fracción alcohol. Después se le adiciona etanol al 95% a una concentración final de 25% a -7°C; se deja reposar toda la noche. El sobrenadante se descarta. El precipitado se colecta por centrifugación a 4,000 rpm, durante 30 min a -7°C.

5.- El precipitado se disuelve en buffer succinato 0.2 M, pH 5.5. Esta solución se llama tercera fracción alcohol.

Esquema de la purificación de la toxina E.

Cultivo íntegro, adicionar etanol al 95% a una conc. final de 25%, adicionar 0.1% de bentonita, dejar reposar a -7°C, centrifugar el precipitado a -7°C.

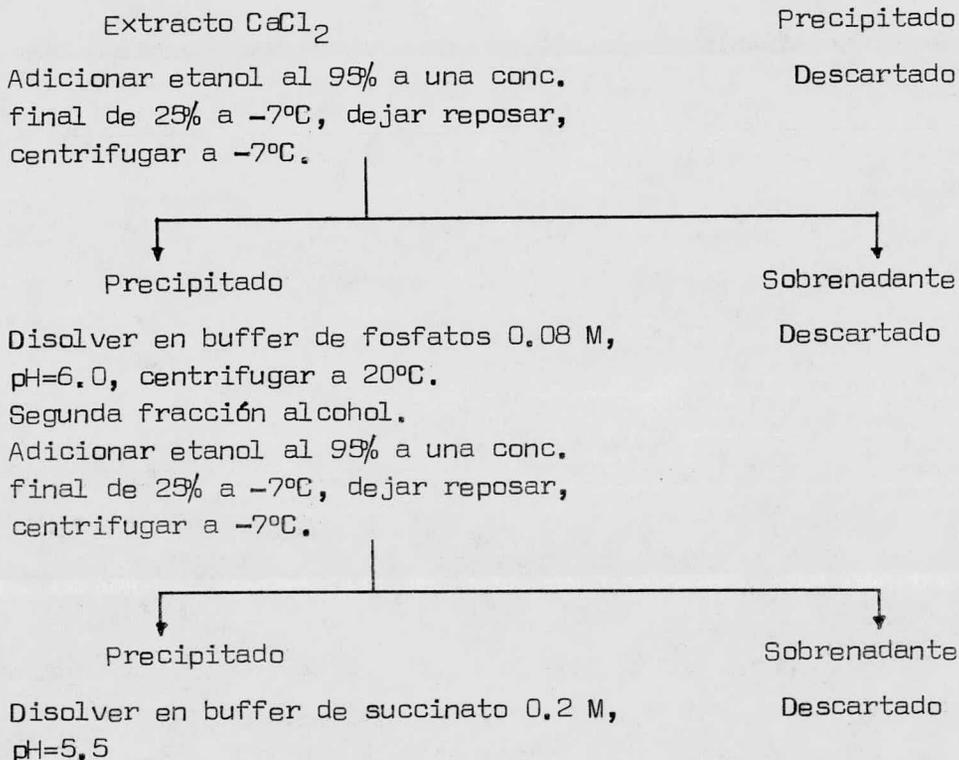


Diluir en 1/6 el vol. del cultivo con agua, agitar 1 hr a temperatura ambiente.

Primera fracción alcohol.

Diluir en 1/4 el vol. del cultivo con agua y solución de CaCl_2 1 M a una conc. final de CaCl_2 0.075 M, ajustar a pH=6.0, agitar 2 hrs a temperatura ambiente, centrifugar a 20°C.

Descartado



Gerwing y colaboradores (18), purificaron la — toxina por el siguiente método.

1.- Al cultivo íntegro se le adiciona solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se deja reposar toda la noche a 4°C , formándose un precipitado. El sobrenadante se descarta y el precipitado se colecta por centrifugación a 4,000 rpm, durante 30 min a 4°C .

2.- El precipitado se disuelve en un buffer de acetato 0.01 M a un pH=5.5. Después se dializa utilizando el mismo buffer, durante 24 hrs a 4°C. Después de la diálisis, se centrifuga y el residuo se descarta.

3.- En una columna de DEAE-celulosa ya preparada, se hace pasar el sobrenadante, regulando la velocidad de flujo a 1 ml en 2 min. a temperatura ambiente.

El eluido de la columna de DEAE-celulosa, se recibe en un buffer de acetato 0.01 M a un pH=4.5, en un colector V-10.

4.- El diluido se trata nuevamente con solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se deja reposar 2 hrs a 4°C, formándose un precipitado. El sobrenadante se descarta y el precipitado se colecta por centrifugación.

5.- El precipitado se disuelve en 5 ml de buffer de acetato 0.01 M a un pH=5.5. Después se dializa utilizando el mismo buffer, durante 24 hrs a 4°C. Centrifugar y el residuo se descarta.

6.- El sobrenadante se hace pasar por una columna de DEAE-celulosa, la cual tiene un pH=4.5. El eluido se recibe en un buffer de acetato 0.01 M a un pH=4.5.

Esquema de la purificación de la toxina tipo E.

Al cultivo íntegro, adicionar solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dejar reposar a 4°C , centrifugar el precipitado a 4°C .

Precipitado

Sobrenadante

Disolver en buffer de acetato 0.01 M, pH=5.5, dializar 24 hrs a 4°C , centrifugar el precipitado.

Descartado

Sobrenadante

Precipitado

Pasar por una columna de DEAE-celulosa, a temperatura ambiente.

Descartado

Al eluido adicionar solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dejar reposar 2 hrs a -4°C , centrifugar el precipitado.

Precipitado

Sobrenadante

Disolver en 5 ml de buffer de acetato 0.01 M, pH=5.5, dializar 24 hrs a 4°C , centrifugar.

Descartado

Sobrenadante

Precipitado

Pasar por una columna de DEAE-celulosa, pH=4.5, a temperatura ambiente.

Descartado

La DEAE-celulosa, se preparó de la siguiente manera:

La suspensión preparada de DEAE, se mezcló con NaCl 2 N durante 24 hrs a 4°C, después se empacó en columnas de 1 cm de grosor y 25 cm de altura.

La columna ya preparada se lavó previamente con HCL 1 N.

3.- Dosis letal.

En la toxina purificada DML/mg N 7.5×10^6

F).- Toxina F.

1).- Obtención.

C1. botulinum tipo F, se hizo crecer en un medio de carne cocida e incubado a 30°C durante 4 días. Después de este crecimiento, se almacenó a 4°C.

Cuando se necesitó el inóculo para la producción de la toxina, 9 ml del cultivo se transfirieron a 90 ml del medio para la producción de la toxina. Después se transfirieron a 900 ml del medio para la producción de la toxina y finalmente en los 15 lts, usando como inóculo todo el crecimiento obtenido en 16 hrs de incubación.

El medio utilizado para la producción de la toxina, tiene la siguiente composición:

digerido enzimático de caseína.....	1%
peptona proteosa.....	2%
extracto de levadura.....	1%
glucosa.....	1%
tioglicolato de sodio.....	0.05%
agua.....	15 lts

El pH del medio fue ajustado a 7.4 antes de ser esterilizado.

El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 80 min.

La glucosa se esterilizó por separado en forma de una solución acuosa al 50% y se adicionó después al medio asepticamente.

El medio ya sembrado se incubó a 30°C, el tiempo de crecimiento fue de 5 días.

2).- Purificación.

La purificación de la toxina se hizo por el siguiente método.

1.- Al cultivo íntegro, adicionar solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, después de 2 días a 4°C, se formó un precipitado. El sobrenadante se sifonea y el precipitado se colecta por centrifugación a 4,000 rpm, durante 30 min a 4°C.

2.- Al precipitado se le adiciona 1.5 lts de buffer de fosfato de sodio 0.07 M a pH=6.0. Esta solución se centrifuga. El precipitado se descarta.

3.- El sobrenadante se le adiciona solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, formándose un precipitado, centrifugar. El sobrenadante se descarta.

4.- Al precipitado se le adiciona 160 ml de buffer de fosfato de sodio 0.07 M a pH=6.0, esta solución se centrifuga. La solución ya centrifugada se dializa contra el

mismo buffer. Este material concentrado es el de partida para la cromatografía.

5.- El material obtenido en el paso anterior, se hace pasar por una columna de DEAE-celulosa, a temperatura ambiente.

6.- La muestra toxica obtenida de un paso cromatográfico se concentra para el siguiente paso, precipitandola con solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se deja reposar toda la noche a 4°C , este precipitado se colecta por centrifugación. El precipitado se disuelve en un pequeño volumen de buffer y se dializa contra ese mismo buffer.

Los pasos cromatográficos fueron en:

- a.- DEAE-celulosa a $\text{pH}=6.0$
- b.- O-(carboximetil)-celulosa a $\text{pH}=4.9$
- c.- Sephadex G-200 a $\text{pH}=8.1$
- d.- (QAE)-Sephadex A-50 a $\text{pH}=4.9$ y finalmente
- e.- DEAE-celulosa a $\text{pH}=8.1$

3.- Dosis letal.

En la toxina purificada $\text{DL}_{50}/\text{mg N } 9.6 \times 10^6$

IV.- RESUMEN Y DISCUSION.

Las bacterias del género Clostridium, están extensamente distribuidas en la naturaleza, su habitat es el suelo, son anaerobias estrictas, formadoras de esporas, gram positivas, pelomórficas. La mayoría son móviles, tienen flagelos peritricos.

Los cultivos jóvenes son Gram positivos, pero los cultivos viejos van perdiendo esta afinidad tintoreal y se vuelven Gram negativos.

Las especies del género Clostridium tienen propiedades proteolíticas y sacarolíticas.

Las especies patógenas del género Clostridium son las siguientes: Clostridium tetani, que es el agente causal del tétanos; Clostridium perfringens, Clostridium novyi, Clostridium septicum, que son los que comunmente se encuentran causando la gangrena gaseosa, además de estas especies también se llegan a encontrar Clostridium bifermentans, Clostridium histolyticum y Clostridium fallax; y el agente causal del botulismo, Clostridium botulinum.

La patogenicidad de estos bacilos, se debe a que forman toxinas muy potentes.

Las esporas de *Cl. tetani* no pueden germinar, — ni el bacilo multiplicarse en tejidos sanos, solamente cuando hay un área de tejido necrótico, donde el potencial de — óxido-reducción es bajo, es entonces cuando el bacilo llega a formar su toxina. La toxina tetánica es una neurotoxina. — La muerte es por asfixia, agotamiento físico o falla del corazón.

También, tanto las esporas como las células vegetativas de los *Clostridia* causantes de la gangrena gaseosa, se desarrollan solamente en presencia de tejido necrótico, en donde el potencial de óxido-reducción es bajo. Estos *Clostridia* al multiplicarse, van a formar sus toxinas, que — tienen efectos hemolíticos y necrosantes.

Clostridium tetani y los *Clostridia* causantes — de la gangrena gaseosa, se desarrollan en el organismo humano o del animal, siendo la enfermedad una infección.



Clostridium botulinum, a diferencia de las otras especies patógenas, no se desarrolla en el organismo humano o del animal. Este bacilo es el agente causal del botulismo.

La bacteria aislada por primera vez por Van Ermengem en 1896 y lo nombró *Bacillus botulinum*.

El *Clostridium botulinum*, es anaerobio, gram — positivo, móvil, esporulado, las esporas son subterminales — ovoides y dilatadas; son de diámetro mayor que el grueso del bacilo y a menudo lo deforman dándole el aspecto de lo que se ha comparado con un zapato para la nieve. Tiene de 4 a 8 flagelos peritricos, es un bacilo pleomórfico, no tiene capsula.

Las esporas llegan a germinar, y el bacilo se multiplica formando su tóxina, en una gran variedad de alimentos enlatados, en donde encuentran las condiciones de anaerobiosis necesarias para su desarrollo.

La toxina botulínica, es relativamente resistente a las enzimas digestivas y de este modo se comprende que al ser ingeridas, no sean destruidas. Esta toxina es absorbida en el intestino pasando al torrente circulatorio.

Es la toxina neuromparalítica más potente conocida hasta ahora.

Esta toxina actúa en la placa neuromuscular, en el mecanismo de liberación de la acetilcolina. Esta toxina no tiene efectos directos sobre la acetilcolina, ni sobre la colinesterasa.

La toxina del *Clostridium botulinum*, comparada con las de otros microorganismos, es la más resistente al calor y a los ácidos. Esta toxina requiere para su destrucción, una temperatura de 80°C durante 30 min.

La toxina es inestable a pH arriba de 6.8.

Se conocen 6 tipos de toxinas botulínicas, A, B, C, D, E y F, su acción farmacológica es la misma, pero antígenicamente son distintas.

Los tipos A, B, E y F, son patógenos para el hombre y los tipos C y D son patógenos para los animales.

En los estudios que hicieron Dolman y Gerwing, se llegó a la conclusión que los aminoácidos que tienen una función importante en los sitios activos de las toxinas botulínicas son los siguientes: cisteína, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina y alanina; así como los aminoácidos N-terminal son: alanina y glicina.

La secuencia y el número de estos aminoácidos, - en cada una de las toxinas, son los que les confieren la diferencia inmunológica.

Aunque estos experimentos, solo se hicieron con las toxinas tipo A, B y E.

En base a los criterios de clasificación de las toxinas, la toxina botulínica es considerada una exotoxina.

1o. Es una proteína de alto peso molecular.

2o. Es de una bacteria gram positiva.

3o. Es muy tóxica, pequeñísimas cantidades matan a animales de laboratorio.

4o. Produce efectos tóxicos altamente específicos en el Sistema Nervioso.

5o. Es fuertemente antigénica. Inyectadas en - - animales, estimulan la producción de grandes cantidades de - antitoxina neutralizantes.

6o. Tratadas con aldehído fórmico, se convierten en toxoide, conservando el poder antigénico y no el tóxico.

Aunque se llega a encontrar en el líquido extracelular, no se sabe exactamente el mecanismo de liberación - de esta toxina.

Es relativamente estable al calor, ya que se necesita una temperatura de 80°C durante 30 min para destruirla.

Este microorganismo posee tres características - muy importantes, que se deben tomar en cuenta en el procesamiento de los alimentos:

1o. Forma una toxina muy potente, la cual es activa en muy pequeñas cantidades.

2o. Forman esporas muy resistentes, las cuales sobreviven en alimentos mal procesados.

3o. Es un anaerobio estricto, de este modo encuentra las condiciones para su desarrollo en los alimentos.

Las esporas de *Clostridium botulinum* son muy importantes desde el punto de vista del procesamiento de los alimentos enlatados.

Las esporas de este bacilo, se encuentran en el suelo contaminando vegetales y frutas. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Debido a que las esporas de *Clostridium botulinum* son muy resistentes, se han hecho muchos estudios sobre la resistencia de estas esporas.

Se ha podido observar que los factores que influyen en la germinación de las esporas y por lo tanto en el —

crecimiento y producción de la toxina son los siguientes: — la composición del alimento especialmente sus propiedades nutritivas, contenido de humedad, el pH, el potencial de óxido-reducción, contenido de sales, contenido de azúcar, la temperatura y el tiempo de almacenaje del alimento.

La concentración de sales necesaria para prevenir la germinación de esporas, depende del tipo de alimento y la temperatura a la que deberá ser esterilizado. En altas concentraciones de sal, la resistencia al calor de las esporas disminuye, la adición de 10% de sal, es completamente — inhibitoria.

También se pudo observar en algunos alimentos, — que combinaciones de NaCl y NaNO_2 en una concentración de — 6.2%, inhiben la germinación de esporas.

Las esporas de *Clostridium botulinum* son muy resistentes a las radiaciones gamma. En estudios hechos en varios alimentos, se llegó a la conclusión que 4.5 Mrad, son — suficientes para inactivar a las esporas, pero dosis mayores de radiaciones o radiaciones de 5 Mrad, producen pérdida de sabor en los alimentos.

En los estudios hechos sobre el efecto que tiene el cloro en los alimentos, se llegó a la conclusión que —

5 p.p.m. de cloro, son adecuadas para inhibir la germinación de esporas.

El pH de 4,5, es suficiente para inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum*.

La concentración de sales, las radiaciones, la temperatura y el tiempo necesario para destruir todas las esporas en un alimento, depende de la especie de alimento, del tipo de cepa de *Clostridium botulinum*, del medio en el cual ha sido producidas las esporas, de la edad de éstas y del número en el que se encuentren presentes.

Todos los tipos de *Clostridium botulinum*, pueden producir sus toxinas en diversos alimentos.

Las esporas de *Clostridium botulinum* tipo A y B son más resistentes al calor, que las del tipo E.

La temperatura mínima de germinación de las esporas de *Clostridium botulinum* tipo A y B es de 15°C y para el *Clostridium botulinum* tipo E es de 3,3°C.

Tanto las esporas como los microorganismos suspendidos en grasa o aceite son más resistentes al calor, que

cuando están suspendidas en un medio acuoso.

El comportamiento de *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo, no puede ser completamente predictivo de la conducta de este bacilo en un sustrato alimenticio.

Los experimentos con productos alimenticios, deben abarcar un gran número de muestras del producto tomado en consideración.

Los métodos de conservación de los alimentos, — deben destruir todas las esporas para impedir su germinación y la producción de la toxina.

En los tratamientos, el tiempo y la temperatura adecuadas para inactivar a *Clostridium botulinum* deben determinarse por personal competente y el procesador debe guardar un registro cuidadoso tiempo-temperatura.

La mayor parte del botulismo, es causado por procesos inadecuados de alimentos preparados en casa, se han encontrado reportes de alimentos que normalmente son ácidos, cuando otros microorganismos están presentes en los alimentos y ellos elevan el pH local o general, si el *Clostridium botulinum* está presente, crece y produce su toxina.

Clostridium botulinum tiene la propiedad de fermentar los carbohidratos con producción de gas, pero esto no siempre es evidente en un alimento, cualquier alimento sospechoso, debe ser mantenido en ebullición durante 15 min, — antes de ser ingerido. Aunque la toxina es destruida en 10 — min, se recomienda mantener el alimento en ebullición durante 15 min.

Un alimento sospechoso nunca debe ser probado, — ya que se tienen reportes de casos fatales, en los cuales se probó una pequeña cantidad del alimento.

En la obtención de cada una de las toxinas de — *Clostridium botulinum*, es muy importante la concentración de azúcar, el pH del medio, la temperatura y el tiempo de incubación.

Durante la purificación de las toxinas, el pH de — be ser mantenido abajo de 7.0.

En la purificación de la toxina A, Abrams trabajó con grandes volúmenes y se recuperaron pequeñas cantidades de la toxina.

En la purificación de las demás toxinas, se hacen

precipitaciones con ácido o alcohol, después se extraen con CaCl_2 y se vuelven a precipitar con alcohol.

En la purificación de la toxina E y F, se hace por medio de cromatografía.

Es muy importante la obtención de la toxina en un estado puro, ya que de esta se partirá para obtener el toxoide y por medio de inmunizaciones la obtención de la antitoxina.

En un caso de botulismo, la identificación de la toxina botulínica, tanto en el suero del paciente como en el alimento sospechoso, es muy importante en el diagnóstico de esta enfermedad, ya que en base a esto se dará el tratamiento adecuado, que es la administración de la antitoxina lo antes posible.

La elección del método, dependerá de la urgencia o tiempo disponible para el diagnóstico. El método elegido, puede necesitar alguna pequeña modificación, dependiendo de la cantidad de muestra disponible ya que a veces la muestra con que se cuenta, son residuos del alimento.

Como las toxinas de *Clostridium botulinum* son — antigénicamente distintas, las antitoxinas obtenidas son específicas contra cada una de las toxinas. Se han podido preparar antitoxinas polivalentes.

En base a los estudios que hizo Minervin, es muy importante el método de administración del suero en pacientes con botulismo.

V.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abrams A., G. Kegeles and G. A. Hottle.
The purification of toxin from *Clostridium botulinum*
type A.
Jornal Biology Chemistry 164: 63-78 1946
- 2.- Augustus B., M.D. Wadsworth.
Standar Methods.
The Williams & Wilkins Company (3a. ed).
Baltimore, 1947.
pags: 636-638
- 3.- Blair J. E., E. H. Lennette., J.P. Truant
Manual of Clinical Microbiology
American Society for Microbiology
Williams & Wilkins Company
Baltimore, Maryland, 1970
Pags: 280-283
- 4.- Boroff D. A., M. Raynaud and A. R. Prévot.
Studies of toxin of *Clostridium botulinum* type D.
Journal Immunology 68: 503-511 1952
- 5.- Burdon K. L. and R. P. Williams.
Microbiology
Mac Millan (6a. Ed)
New York, 1968
Págs: 595-616

- 6.- Burrows William
Microbiology
W. B. Saunders Company (17a. Ed).
Philadelphia and London, 1959
Pags: 586-587
- 7.- Cardella M. A., J. T. Duff., C. Gottfried and J. S. Begel. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum* IV.- Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid
Journal of Bacteriology 75: 360-365 1958
- 8.- Cardella M. A. m J. T. Duff., B.H. Wingfield and C. Gottfried
Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum* VI.- Purification and detoxification of type D toxin and the immunological response to toxoid.
Journal of Bacteriology 79: 372-378 1960
- 9.- Cervera Berron Ernesto.
Tratado de Microbiología
Ed. Porrúa. S. A. (4a. Ed).
México, D. F. 1959
Págs: 552-630
- 10.-Chichester C. O. and H.D. Graham.
Microbial Safety of Fishery Products
Academic Press
New York, 1973
Págs: 191-200

- 11.- Christiansen L. M., R. R. Tomphin., A. B. Shapiris.,
T. V. Kueper., R. W. Johnston., D. A. Kantter and O.J.*
Kolari.
Effect of sodium nitrite on toxin production by
Clostridium botulinum in bacon.
Applied Microbiology 27: 733-737 1974
- 12.- Davis Bernard., R. Dulbeco., H.N. Einsen and
H. S. Ginsberg.
Microbiology
Harper International Edition (2a. Ed.)
New York, 1973
Pags: 830-841
- 13.- Desroier, Norman W.
Conservación de los Alimentos
Compañía Editorial Continental, S. A. (2a. Ed.)
México, 1976
Pags: 222-223, 357
- 14.- Difco Manual
Difco Laboratorios (9a. Ed.)
Detroit 1, Michigan U. S. A.
- 15.- Duff J. T., G. G. Wright., J. Klerer., Dorothy E.
Moore. Studies on immunity to toxins of *Clostridium*
botulinum
1.- A simplified procedure for isolation of type-
A toxin.
Journal of Bacteriology 73: 42-47 1947

- 16.- Duff J. T., G.G. Wright., J. Klerer., Dorothy E. Morre.
Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*
11.- Production and purification of type B toxin for -
toxoid.
Journal of Bacteriology 73: 597-601 1957
- 17.- Frazier W. C.
Food Microbiology
MacGraw-Hill Book Company (3a. Ed.)
New York - London, 1967
Págs: 207, 362, 436-444
- 18.- Øerwing J., C.E. Dolman., M. E. Reichmann and H. S. Bains.
Purification and molecular weight determination of
Clostridium botulinum type E Toxin.
Journal of Bacteriology 88: 216-219 1964
- 19.- Gordon M., M.A. Fiock., A. Yarinsky and J. T. Duff.
Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*
III.- Preparation, purification and detoxification of
type E toxin.
Journal of Bacteriology 74: 533-538 1957
- 20.- Guyton Arthur.
Tratado de Fisiología Médica.
Ed. Interamericana (4a. Ed.)
México, 1971
Pags: 72-82

- 21.- Ham Arthur
Tratado de Histología
Ed. Interamericana (6a. Ed.)
México, 1970
Pags: 545-574
- 22.- Hersom A.C., and E.D. Hulland.
Canned Foods
J. & A. Churchill Ltd. (6a. Ed.)
London, 1969.
Págs; 130-137, 190-197
- 23.- Hynes Martin
Medical Bacteriology
J. & A. Churchill Ltd. (9a. Ed.)
London, 1968
Pags: 250-267
- 24.- Ingram M., and T.A. Roberts
Proceedings of the Fifth International Symposium on
Food Microbiology.
Chapman and Hall Limited
London, 1967
Págs: 147-174
- 25.- Jawetz Ernest.
Microbiología Médica
Ed. El Manual Moderno S. A. (5a. Ed.)
México, D. F. 1973.
Págs: 210-214

- 26.- Jay James M.
Modern Food Microbiology.
Van Nostrand Reinhold Company (1a. Ed.)
New York, 1970
Págs: 115, 155-161, 219-331
- 27.- Lamanna C., D. E. MacElroy., H.W. Eklund.
The purification and crystalization of Clostridium
botulinum type A toxin.
Science 103: 613-614 1946
- 28.- Lamanna C., and H.N. Glassman.
The isolation of type B botulinum toxin
Journal of Bacteriology 54: 575-584 1947
- 29.- Lewis Keith H., and K. Cassel, Jr.
Proceedings of a Symposium
Public Health Service
Cincinnati, Ohio, 1954
Págs: 278-289, 336-343
- 30.- Litter Manuel.
Farmacología.
El Ateneo (4a. Ed.)
Buenos Aires, 1972
Págs: 61, 167

- 31.- Mestrandrea Leonard W.
Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxin by
capillary tube diffusion.
Applied Microbiology 27: 1017-1022 1974
- 32.- Montie Thomas C., S. Kadies., S. J. AJL.
Microbial Toxins
Academic Press Tomo II
New York and London, 1971
Págs: 1-62
- 33.- Pelczar Michael J., and R.D. Rid.
Microbiology
MacGraw-Hill Book Company Inc.
New York Toronton London, 1958
Págs: 339-340
- 34.- Sacks H. S., and S. V. Covert.
Cl. botulinum type E: Effect of pH and method of
purification on molecular weinght.
Applied Microbiology 28: 374-382 1974
- 35.- Topley and Wilson's.
Principles of Bacteriology and Immunity
The Williams & Wilkins Company (3a. Ed.)
Baltimore, 1946
Págs: 858-893

- 36.- W.B. Hugo
Inhibition and destruction of the microbial cell
Academic Press
London, New York, 1971
Págs: 270, 483, 570-571
- 37.- Walter William G., and R.H. MacBee.
General Microbiology
D. Van Nostrand Company Inc. (1a. Ed.)
E.E. A.A. 1961
Págs: 137, 257-259
- 38.- Weiser Harry H., G.J. Mounney., W. A. Gould.
Practical Food Microbiology and Technology
The Avi Publishing Company Inc. (2a. Ed.)
United States of America, 1971
Pags: 186-187, 244-246
- 39.- Wilbur Tanner Fred.
Bacteriology
John Wiley & Soncs. Inc. (4a. Ed.)
London, 1948
Págs: 450-454
- 40.- Yang K. H. and H. Sugiyama.
Purification and properties of Clostridium botulinum
type F toxin.
Applied Microbiology 29: 598-603 1975

- 41.- Zinsser Hans.
Microbiología
Ed. Hispano Americana (4a. Ed.)
México, D. F. 1971
Pags: 861-897, 1235-1241