

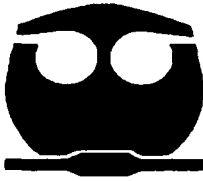


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PATOLOGIA Y PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A Clostridium botulinum Y Clostridium tetani

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: SOFIA REYES HUESCA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

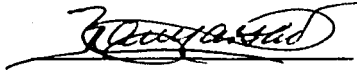
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Garza Velasco
Vocal	Prof. Enrique Ortega Soto
Secretario	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
1er. Suplente	Prof. Ma. Guadalupe Reyes García
2do. Suplente	Prof. Gonzalo Castillo Rojas

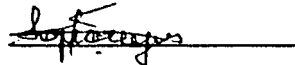
Sitio donde se desarrolló el tema:

Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector Salud.



QFB. Raúl Garza Velasco

Asesor



Sofía Reyes Huesca

Sustentante

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
contenido de mi trabajo recepción

NOMBRE: Sofía Reyes
Huesca

FECHA: 19 de Septiembre 2002

FIRMA: Sofía Reyes

DEDICATORIAS

A Dios principalmente:

Por darme la vida, porque gracias a ti he logrado mis metas, por ser la luz que me acompaña siempre en mi caminar, por mis padres, hermanos, familiares y amigos.

A mis Padres:

Por todo el cariño, la comprensión, los cuidados y enseñanzas que me han brindado, por su ejemplo. Los amo.

A mis hermanos Edith, Marco, Eduardo, Cristina y Adrián:

Por estar conmigo en los buenos y malos momentos. Espero que siempre nos mantengamos unidos.

A Mami y Rosi:

Por el amor y apoyo que siempre me han dado.

A mis familiares:

Gracias por el cariño y los momentos que hemos pasado; en especial sobrinos, sobrinas, cuñadas, Tío Fer, primas.

A mis amigos:

Por preocuparse por mi y por la amistad que me brindan, especialmente a mis amigas de la Facultad: Elideth, Irais, Tere y Oliva, donde encontré un bonito equipo de trabajo y sobre todo una amistad sincera.

AGRADECIMIENTOS:

De forma especial agradezco al QFB. Raúl Garza Velasco por toda la ayuda y tiempo dedicado para la realización de este trabajo y por ser un ejemplo a seguir.

A la UNAM por la educación y formación que me ha brindado; en especial a la Facultad de Química y a la Prepa 9, que han sido mi casa en estos últimos años.

A todas las personas que han contribuido en mi formación profesional.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. <i>Clostridium botulinum</i>	4
i) Taxonomía	4
ii) Características microbiológicas	7
↪ Morfología	7
↪ Características bioquímicas y del cultivo	8
↪ Técnicas de cultivo y medios empleados	13
iii) Importancia clínica	15
- Intoxicación alimentaria	17
- Botulismo Infantil	20
- Botulismo asociado a heridas	22
- Botulismo no determinado	23
iv) Factores de virulencia	23
- Toxinas C ₂ y C ₃	24
- BoNT	26
- Mecanismo de acción de la BoNT	31
v) Aplicaciones de la toxina botulínica	37
- Como agente terapéutico	37
- Como arma biológica	47

vi) Diagnóstico	50
- Diagnóstico diferencial	57
vi) Tratamiento	58
vii) Prevención	60
viii) Epidemiología	62
II. <i>Clostridium tetani</i>	64
i) Características microbiológicas	64
ii) Importancia clínica	66
iii) Patogenicidad	70
iv) Determinantes de patogenicidad de <i>C. tetani</i>	72
v) Mecanismo de acción de la tetanospasmina	75
vi) Diagnóstico del tétanos	79
vii) Tratamiento	81
viii) Prevención	88
ix) Epidemiología	99
x) Utilidad de la toxina tetánica	102
CONCLUSIONES	104
LISTA DE ABREVIATURAS	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

INTRODUCCIÓN

El género *Clostridium* comprende diversas especies patógenas, destacando entre ellas *Clostridium difficile*, causante de la colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos, *Clostridium perfringens*, agente etiológico de la gangrena gaseosa y de toda una variedad de afecciones, *Clostridium botulinum*, responsable del botulismo y *Clostridium tetani*, productora del tétanos.

Los clostridios forman parte de la flora habitual del hombre¹ y de los animales, y se les encuentra ampliamente distribuidos en la naturaleza, debido a la alta resistencia de sus propias esporas a los factores externos.

Por otra parte, dependiendo de los cuadros patológicos que desencadenan, estos microorganismos se pueden dividir en tres grupos (60):

- 1) Clostridios neurotóxicos, los que producen toxinas que afectan el sistema nervioso.
- 2) Clostridios enterotóxicos, que elaboran toxinas que afectan el tracto intestinal.

¹ En el humano, aparecen entre la flora habitual del tracto gastrointestinal y, ocasionalmente, en la vagina, la boca y la piel (75).

- 3) Clostridios citotóxicos, causantes de daño necrótico en los tejidos cercanos al sitio de infección, con base en la acción de una o más toxinas que afectan la integridad estructural y funcional de las células hospederas.

De acuerdo con dichas categorías, *C. botulinum* y *C. tetani* pertenecen al primer grupo, mientras que *C. difficile* y los tipos A y C de *C. perfringens* se adscriben al segundo, si bien esta última especie constituye –al mismo tiempo- el clostridio histotóxico de mayor relevancia.

Evidentemente, el botulismo y el tétanos representan enfermedades graves originadas por alteraciones nerviosas que impactan negativamente múltiples funciones orgánicas básicas, lo que puede conducir a la muerte de los pacientes implicados; adicionalmente, el conocimiento de los mecanismos de acción relacionados con sus respectivas toxinas abre interesantes expectativas, tanto para la terapéutica de dichos padecimientos, como para la de otros, ajenos y muy diversos, que también afectan al sistema nervioso.

En tal contexto, el presente trabajo aborda las actuales temáticas asociadas al botulismo y al tétanos, incluidas las que aluden a su patogenia, patología, diagnóstico, prevención y tratamiento.

OBJETIVOS:

- Describir las clasificaciones actuales de *C. botulinum* y *C. tetani*, así como las características microscópicas, culturales y bioquímicas que permiten su aislamiento y diferenciación en el laboratorio.
- Señalar los aspectos más relevantes de las diversas entidades clínicas relacionadas con *C. botulinum* y *C. tetani*, subrayando sus posibles orígenes, así como la evolución y gravedad de cada una.
- Mencionar los principales factores de virulencia de estos microorganismos, destacando los mecanismos de acción de las toxinas implicadas.
- Describir las medidas diagnósticas, preventivas y terapéuticas asociadas al tétanos y al botulismo.

I. *Clostridium botulinum*

i) Taxonomía

El género *Clostridium* pertenece al orden *Eubacteriales*, clase *Schizomycetales*, división *Protophyta*, familia *Bacillaceae*. *Clostridium botulinum* no es una especie bacteriana única, ya que se han agrupado dentro de esta otras especies del género *Clostridium* con propiedades culturales distintas, que tienen la característica de producir neurotoxina botulínica (BoNT), siendo capaces de causar botulismo en animales y humanos (22, 40, 98, 101).

Según su especificidad serológica, se han detectado siete tipos de toxinas: A, B, C, D, E, F y G, pudiendo subdividir al grupo C en C₁ ó C_α y C₂ ó C_β; así también se emplea la misma clasificación para denominar a las cepas, lo cual está relacionado con el serotipo de toxina producida. Es oportuno señalar que se presenta una ligera neutralización cruzada entre los tipos C y D, ya que las cepas pertenecientes al primero suelen producir pequeñas cantidades de toxina D y viceversa; análogamente, ocurre lo mismo entre los tipos E y F. Algunas cepas llegan a producir mezclas de dos toxinas, como es el caso de Af, Bf, Ab y Ba (designando con letra mayúscula a la que se produce más

abundantemente) (40, 54, 60); en estos casos, no se descarta la posibilidad de que ocurra un efecto sinérgico con cuadros más severos (32).

Inicialmente, las cepas de *C. botulinum* habían sido divididas en proteolíticas y no proteolíticas, con base en la capacidad de las primeras para digerir la caseína, la clara de huevo coagulada, las proteínas séricas, etc. Sin embargo, dicha clasificación no resultó útil, dado que las no proteolíticas eventualmente llevan a cabo la hidrólisis de la gelatina u otras proteínas. Por ello, posteriormente se establecieron cuatro grupos, de acuerdo con las propiedades fisiológicas, observándose que existe concordancia entre los integrantes de cada uno, en cuanto a sus características culturales y en la secuencia genética (26).

En tal contexto, el grupo I abarca a las cepas del tipo A, a las proteolíticas de los tipos B y F y a las que producen mezclas de toxinas Ab, Af, Ba y Bf (22, 26). El II incluye a las cepas del tipo E y a las no proteolíticas de los grupos B y F. El grupo III está integrado por las cepas de los tipos C y D, y el grupo IV se conforma por el tipo G, también citado como *C. argentinense*.

Las cepas del tipo A son proteolíticas, las del E no proteolíticas, el B y F se constituyen por ambas, el C y D son medianamente proteolíticos y el G es ligeramente proteolítico (25, 26, 34, 98).

Tabla 1. Relación entre los grupos y tipos de *Clostridium botulinum*.

GRUPO	TIPO DE CEPAS
I	Tipo A (proteolítica), tipos B y F proteolíticos. Tipos Ab, Af, Ba y Bf.
II	Tipo E (no proteolítica), tipos B y F no proteolíticos.
III	Tipos C y D.
IV	Tipo G.

Como se mencionó previamente, otras especies de *Clostridium* también llegan a producir neurotoxinas botulínicas; por ejemplo, *C. baratii* elabora la del tipo F y *C. butyricum* la del E. Es decir que, entre los cuatro grupos de *C. botulinum* mencionados en la tabla 1 y las especies indicadas, totalizan seis grupos genómicos diferentes capaces de liberar toxina botulínica, la cual actúa provocando parálisis flácida. Además, algunos reportes citan a *C. novyi* como productor de las neurotoxinas C₁ ó D (26).

C. botulinum se ha aislado de numerosas fuentes, incluyendo a los sedimentos de lagos y ríos, del suelo (principalmente el que contiene cieno), del intestino de algunos peces y del tracto gastrointestinal, hígado y bazo de otros animales.

En cuanto al ser humano, el botulismo se asocia fundamentalmente a los tipos A, B, E y rara vez al F; por último, los tipos C y D causan botulismo a los animales y aún no existen evidencias directas de que el tipo G ocasione enfermedad (34, 40, 57).

ii) Características microbiológicas

➤ Morfología

La especie *C. botulinum* se encuentra constituida por bacilos Gram positivos, rectos o ligeramente curvos, con extremos redondeados, cuyo tamaño varía según las condiciones de cultivo y el tipo serológico; generalmente miden entre 0.5 a 1.3 μm de ancho por 3.4 a 8.6 μm de largo (60). Se trata de bacterias esporuladas, no capsuladas, móviles mediante flagelos peritricos (98) y, en cuanto a su agrupación, llegan a evidenciarse filamentos o cadenas. Es importante considerar que, al iniciar la esporulación, este microorganismo suele teñirse como Gram negativo; sus esporas son ovales, subterminales y deforman al bacilo, debido a que su diámetro es mayor que al ancho de la célula, lo que le confiere a ésta una forma de raqueta o zapato para la nieve. Cabe mencionar que, por lo general, las cepas con mayor toxicidad tienden a esporular menos (26, 34, 98).

La pared celular de *C. botulinum* contiene ácido DL-diaminopimérico y la autolisina responsable de la liberación de la toxina. Además, la pared del grupo I presenta glucosa, el II glucosa y galactosa y el III no presenta azúcar alguno (98).

➤ **Características bioquímicas y del cultivo**

C. botulinum es un microorganismo anaerobio estricto, citocromo oxidasa, catalasa y peroxidasa negativas, que no reduce sulfatos a sulfitos. En general, los clostridios pueden fermentar varios azúcares, digerir proteínas y la leche, si bien algunos sólo acidifican a esta última; además, al crecer en ciertos medios producen ácidos grasos de cadena corta y, en cuanto a la forma en la que obtienen energía, lo hacen mediante fermentación y por fosforilación a nivel de sustrato (75).

Estos microorganismos se pueden cultivar en medios sencillos, siempre y cuando se incuben bajo condiciones de anaerobiosis; sin embargo, es conveniente considerar que las cepas no proteolíticas llegan a requerir de nutrientes más complejos. En agar sangre, una característica distintiva consiste en que todas las cepas son β -hemolíticas, excepto las del tipo G (60). A continuación se describen las principales características coloniales y las propiedades bioquímicas más trascendentales de los cuatro grupos de *C. botulinum*:

El grupo I produce colonias de 3 a 8 mm de diámetro, con centro elevado, opaco, a menudo amarillento, y con bordes irregulares adherentes al agar; en ocasiones, presentan forma rizoide, exceptuando a las cepas de mayor toxicidad, las cuales son lisas.

Dicho grupo I es auxótrofo para arginina, tirosina, fenilalanina (tres aminoácidos requeridos en mayores proporciones), isoleucina, leucina, metionina, treonina, triptófano y valina. Además, no fermenta galactosa, glicerina, glucógeno, celulosa, celobiosa, almidón, lactosa, manosa, manitol, adonitol, ribosa, sorbitol, sorbosa, xilosa, rafinosa, trehalosa, amigdalina, arabinosa, dulcitol, inositol, eritritol, esculina, inulina, melibiosa y melecitosa (98).

Entre los productos de su fermentación se cuentan los alcoholes butílico, isobutílico, propílico e isoamilico, además de algunos ácidos orgánicos; da positivas las pruebas para ácido sulfhídrico y lipasa, en tanto que las de ureasa e indol son negativas.

En cuanto a su resistencia al calor, las esporas de este grupo soportan exposiciones a 100°C durante 25 minutos. Por lo que respecta al crecimiento, su temperatura óptima es de 37°C, aunque este microorganismo puede desarrollar desde los 10 hasta los 48°C; así mismo, su reproducción se inhibe a pH menores de 4.6 y a concentraciones de cloruro de sodio mayores de 10% (57, 98).

Las colonias del grupo II suelen medir entre 1 y 3 mm de diámetro, y son un tanto irregulares, con bordes lobulados, translúcidas o semiopacas y con superficie mate.

Las sustancias que requieren para su desarrollo son alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina, nicotinamida, biotina, tiamina, piridoxina y ácido fólico. En este contexto, la glicocola es otro compuesto muy importante que, aunque al parecer no es necesario para el crecimiento, resulta fundamental para producir toxinas; análogamente, la colina es esencial para la síntesis de lipasa y para la conservación de la morfología (98).

Las cepas de este grupo no fermentan glicerina, glucógeno, celulosa, celobiosa, lactosa, manitol, adonitol, sorbitol, sorbosa, ramnosa, xilosa, rafinosa, trehalosa, dulcitol, rafinosa, inositol, salicilina, eritritol, esculina, inulina, melibiosa ni melecitosa. Sus pruebas bioquímicas son lipasa, H₂S, ureasa, lecitinasa y gelatinasa positivas, en tanto que la coagulación de la leche ocurre lentamente.

Su desarrollo requiere de pHs mayores de 5, de concentraciones de NaCl menores de 5 % y, referente a su temperatura óptima, ésta varía según las cepas: 37°C para los tipos B y F y 30°C para el E; sin embargo, todos crecen y producen toxinas desde los 3.3°C y, por otra parte, son mucho menos resistentes al calor que las del grupo I (34, 40, 57).

En el caso del grupo III, en realidad existen pocas posibilidades de distinguirlo culturalmente. Sus colonias son redondas, elevadas, translúcidas, blanco-

grisáceas, con superficie mate y lisa y bordes un tanto irregulares. En agar sangre originan una hemólisis débil alrededor de las colonias (98).

La mayoría de las cepas C y D fermentan glucosa, fructosa, maltosa, manosa y ribosa, pero no actúan sobre la celulosa, celobiosa, glucógeno, glicerol, lactosa, manitol, inulina, dulcitol, eritritol, amigdalina, esculina, trealosa, xilosa, sacarosa, melecitosa, ramnosa, rafinosa, ni degradan aminoácidos.

Sus principales productos de la fermentación incluyen a los ácidos acético, butírico y propiónico, el último de los cuales se genera en mayores proporciones –en comparación de los grupos restantes–; además reducen el lactato a propionato, reacción que no es llevada a cabo por los demás.

Estos microorganismos son ureasa, indol y ácido sulfhídrico negativos, gelatinasa y lipasa positivas, algunos llegan a digerir la caseína y otras proteínas, y sólo ciertas cepas del tipo C producen lecitinasa (40, 57, 98).

Su temperatura óptima es de 40°C y la mínima de 15°C (26), aunque las cepas del tipo C₁ suelen crecer bajo condiciones aún más frías. Por su lado, las esporas manifiestan una resistencia mediana al calor.

El grupo IV genera colonias de menores dimensiones que el resto de los grupos (aproximadamente de 0.5 a 1.5 mm de diámetro), con superficie lisa y brillante, elevadas, traslúcidas, grises y con bordes regulares.

Sus miembros utilizan citrato, oxalacetato, piruvato, lisina e histidina, pero no son capaces de emplear adonitol, amigdalina, arabinosa, celobiosa, celulosa, dulcitol, eritritol, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, glicerina, glucógeno, inositol, inulina, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melecitosa, melibiosa, rafinosa, trehalosa y xilosa (98).

Entre sus productos se cuentan los ácidos acético, isobutírico, butírico, isovalérico y láctico, así como los alcoholes butílico y propílico. En cuanto pruebas metabólicas, son lipasa, lecitinasa, indol y ureasa negativos, H₂S y gelatinasa positivos y, además, hidrolizan caseína y digieren lentamente la leche.

Su temperatura óptima es de 37°C y la mínima de 10°C. Por otra parte, este grupo casi no produce esporas y, cuando lo hacen, aquéllas muestran una baja resistencia al calor (26).

La tabla 2 resume algunas de las principales características de los grupos I al IV (26, 60, 98).

Tabla 2. Principales propiedades de los cuatro grupos de *C. botulinum*.

Característica	Grupo fisiológico			
	I	II	III	IV
Tipo de Neurotoxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Digestión de proteínas coaguladas	+	-	-*	+
Fermentación de glucosa	+	+	+	-
Fermentación de manosa	-	+	+	-
Hidrólisis de gelatina	+	+	+	+
Formación de lipasa	+	+	+	-
Formación de indol	-	-	-	-
Reducción de nitrato	-	-	-	-
Productos de fermentación	A, P, IB, B, IV	A, B	A, P, B	A, P, IB, B, IV
pH mínimo	4.6	5	desconocido	desconocido
Temperatura de crecimiento (°C)				
Óptima	35 - 40	18 - 25	40	37
Mínima	10	3.3	15	desconocida
% [NaCl] inhibidora	10	5	desconocida	desconocida

* Algunas cepas presentan hidrólisis débil.

A: Ácido acético, B: Ácido butírico, IB: Ácido isobutírico, IV: Ácido isovalérico, P: Ácido isopropiónico.

➤ Técnicas de cultivo y medios empleados

El enriquecimiento puede llevarse a cabo en medios artificiales o enriquecidos naturales; en este último caso, se coloca el alimento sospechoso en un sistema de envase al vacío y se incuba por 6 ó 7 días a 25-30°C, periodo durante el cual se obtienen algunas alícuotas destinadas a investigar el tipo de toxina. Es conveniente vigilar dicho sistema para prevenir que la eventual producción de grandes cantidades de gas pudiera causar el estallamiento o rompimiento del vacío; además, no se recomienda efectuar precalentamientos antes de la incubación –para eliminar los microorganismos comensales-, pues

también se afectaría a las cepas no proteolíticas de los tipos B, E y F presentes en las muestras; de hecho, son más útiles los tratamientos post-enriquecimiento con alcohol etílico, mezclando volúmenes iguales de etanol absoluto y del cultivo, y manteniéndolos 1 h a 25°C (101).

En la práctica, es más común el uso de medios no selectivos², de los cuales destacan el agar sangre de caballo (ASC) y el agar yema de huevo (AYH); una vez inoculados, se incuban 3 días a 30°C. Evidentemente, a ambos se les pueden agregar ciertos antibióticos, aunque en ocasiones esto llega a inhibir a las cepas no proteolíticas. Otros medios no selectivos empleados frecuentemente, son el caldo con carne cocinada de Robertson, caldo peptona glucosa, caldo infusión de pescado, medio clostridial reforzado, medio de extracto de elote, medio botulismo enriquecido y caldo TPGY (tripticasa-peptona-glucosa-extracto de levadura); en este último, la tripsina favorece el aislamiento, promueve la transformación de esporas en bacilos e inhibe el efecto de algunas sustancias. La adición de L-alanina, lactato y bicarbonato también fomenta la "germinación" de las esporas (98).

El CBI (*C. botulinum* isolation agar) corresponde a un AYH con sulfametoxazol, cicloserina y trimetoprim, que permite el aislamiento de *C. botulinum* en 1 a 2 días; no obstante, algunas cepas del tipo E son inhibidas (101). En dicho medio, las colonias de los tipos A, B y F son elevadas y se

² Los medios selectivos pueden inhibir a las cepas no proteolíticas; empero, el caldo sulfito-polimixina proporciona buenos resultados.

rodean por una zona opaca, característica ausente en el tipo G y en otras especies de *Clostridium* que, además, presentan forma de punta de alfiler (4).

iii) Importancia clínica

C. botulinum produce la enfermedad neuromuscular, denominada botulismo, la cual puede ocurrir en las formas siguientes:

- Intoxicación alimentaria, cuando se ingieren alimentos contaminados con la toxina preformada.
- Contaminación de heridas: El microorganismo infecta alguna herida y produce la toxina *in vivo*.
- Botulismo infantil. Se observa en infantes menores de 12 meses y se debe a la ingestión de esporas de *C. botulinum* que colonizan el tracto intestinal y, posteriormente, se transforman en bacilos que producen la toxina.
- Botulismo no determinado. Afecta a niños y adultos en quienes no se detectan heridas o ingestas alimentarias sospechosas. También se denomina botulismo de los adultos.

Cabe señalar que algunos autores hacen alusión al botulismo inhalatorio creado por el ser humano: La toxina botulínica es aerosolizada, lo que permite que sea absorbida a través de las membranas mucosas. Esta entidad clínica

se ha demostrado en primates y puede ser provocada por terroristas, aunque se ha llegado a presentar accidentalmente en humanos (3, 30, 60). Así mismo, se ha citado al botulismo inadvertido (49), que surge por la administración de toxina botulínica como agente terapéutico para efectuar la curación de enfermedades relacionadas con desórdenes del movimiento.

Todas las formas de botulismo resultan de la absorción de la toxina hacia la circulación³, a partir del intestino, de alguna herida o a través de otras mucosas; en todo caso, aquélla se une posteriormente a las terminales nerviosas periféricas y actúa sobre el sistema autónomo y el sistema nervioso periférico, especialmente a nivel de la placa neuromuscular; sin embargo, no muestra efecto alguno a nivel del sistema nervioso central, debido a que su gran tamaño (150 kDa) le impide cruzar la barrera hemato-encefálica (3).

Los síntomas son similares en las cuatro formas de botulismo (30), destacando como más característicos la debilidad bilateral descendente y la parálisis de los músculos esqueléticos. Por lo general, primero se afectan los nervios craneales, principalmente los que inervan los ojos, lo que da lugar a la visión doble o borrosa, dilatación de las pupilas y fotofobia; posteriormente, ocurre la disfagia, disfonía, boca seca y el debilitamiento de las extremidades superiores, el cuello, el tronco, los músculos respiratorios (lo que puede conducir al paro respiratorio) y, finalmente, las extremidades inferiores. El

³ Cabe mencionar que la neurotoxina botulínica no puede penetrar la piel íntegra (sin daño) (3).

período de incubación depende del tipo de botulismo, del serotipo de la BoNT y de la cantidad de ésta que ingresa al torrente circulatorio (30).

Intoxicación alimentaria

Las esporas de *C. botulinum* son muy resistentes y se encuentran muy ampliamente distribuidas, pudiéndoseles detectar en el estiércol, fertilizantes orgánicos y aguas residuales; de acuerdo con ello, los productos alimenticios se llegan a contaminar fácilmente y su ingestión es frecuente pero, generalmente, esto no resulta suficiente para que aparezca el botulismo. Si bien las esporas se pueden transformar en bacilos a nivel del colon, el microorganismo suele ser incapaz de competir con la microflora intestinal, lo que se traduce en escasos crecimientos no asociados a la enfermedad (82).

Esta forma de botulismo sólo ocurre cuando se dan las condiciones adecuadas para que las esporas presentes en los alimentos se conviertan en bacterias y produzcan la toxina; por fortuna, *C. botulinum* no desarrolla con facilidad, pues la mayoría de los alimentos contiene suficiente cantidad de oxígeno disuelto para evitarlo. Los microorganismos suelen desarrollarse cuando el producto alimentario se calienta, se deja enfriar y permanece guardado a temperatura ambiente, ya que el calentamiento disminuye la solubilidad y el contenido de oxígeno; después, al bajar la temperatura, una pequeña parte del gas se redisuelve, pero algunas porciones del alimento

pueden quedar en las condiciones de anaerobiosis requeridas por *C. botulinum* (49).

La mayoría de los casos de botulismo se relaciona con el consumo de conservas caseras o de alimentos mal cocidos, debido a que la temperatura alcanzada en las ollas de presión no es lo suficientemente alta para matar las esporas; además, dado que la comida suele envasarse hasta el tope del frasco y éste se sella antes de que ocurra el enfriamiento correspondiente, en realidad el alimento contiene presiones muy reducidas de oxígeno, lo que promueve el desarrollo del microorganismo y la liberación de la toxina (49, 82).

Las conservas más asociadas a brotes de botulismo son las producidas con vegetales, ya que éstos provienen del suelo; en particular son más peligrosos los productos neutros o alcalinos, tales como los espárragos, ejotes, elotes y morrones. En cuanto a las carnes, las más inseguras son las de cerdo y el pescado, pero los tratamientos térmicos apropiados, el bajo pH y el agregado de NaCl o de nitritos suelen impedir la producción de la toxina (49).

Por lo regular, la presencia de toxina botulínica no se acompaña por alteraciones en el aspecto, olor o sabor de los alimentos, sin embargo, cuando existen altos niveles de contaminación con cepas proteolíticas, son evidentes el abombamiento de las latas, el gas y el mal sabor (49). Los comestibles empaquetados comercialmente rara vez son causa de botulismo, en virtud de

lo estricto de los sistemas de envasado, incluidos el enlatado, el empaque al vacío, etc.

Cabe señalar que, si bien los alimentos se llegan a contaminar, la intoxicación se previene cuando aquellos se calientan durante 10 a 15 minutos, dado que dichas condiciones resultan suficientes para desnaturalizar la toxina (34).

Al ingerirse alimentos con toxina botulínica, ésta se absorbe principalmente a través del tracto gastrointestinal (estómago e intestino delgado), se transporta por vía linfático-hemática y llega hasta las terminaciones nerviosas del sistema nervioso periférico en donde, previa internalización, impide la liberación de acetilcolina; de esta manera, los impulsos no pueden ser transmitidos y ocurre la parálisis flácida de los músculos implicados (26).

La forma más severa y prolongada de la intoxicación tiene lugar con la toxina del tipo A; su período de incubación es generalmente de 12 a 36 h, aunque existen casos de sólo 2 h -cuando se trata de grandes cantidades del tóxico- y hasta de días a semanas, en este último caso, cuando los serotipos involucrados son el B y E o la dosis ingerida fue muy baja (30).

También son posibles la tardía aparición o la larga duración de los síntomas, debido sobre todo a la lenta absorción colónica de la toxina (60). En este aspecto, es importante mencionar que los cuadros más graves suelen relacionarse a períodos de incubación menores de 24 horas (80, 101).

Las manifestaciones intestinales más comunes son: Náuseas, vómito, dolor de cabeza, constipación y diarrea, los cuales anteceden a los síntomas neuronales indicados anteriormente. La fiebre no tiene lugar, excepto cuando el cuadro cursa paralelamente a infecciones tales como estomatitis, faringitis, candidiasis oral, neumonía, infecciones del tracto urinario, etc. (80).

La recuperación del botulismo es muy prolongada, ya que llega a requerir desde semanas a varios meses.

Botulismo Infantil

Esta forma de botulismo fue reconocida desde 1976 y, a partir de ese año, su incidencia se ha venido incrementando gradualmente, sobre todo en EUA. Por lo regular, se presenta en niños menores de un año, ya que éstos son más susceptibles a la colonización del tracto intestinal por el agente causal, debido a que su microflora aún no se encuentra bien desarrollada; además, las condiciones de bajo potencial de óxido-reducción en el ambiente colónico permiten que *C. botulinum* pueda desarrollar -a partir de las esporas ingeridas- y alcanzar crecimientos suficientes para producir toxinas y ocasionar la enfermedad (40, 82). Lógicamente, la susceptibilidad del niño también se relaciona con su dieta, ya que ésta determina el tipo y variación de su flora intestinal.

La toxina es absorbida más lentamente en el colon que en el estómago, por lo que el botulismo infantil se va manifestando paulatinamente, aunque también puede ser causa de muerte. El primer indicio que aparece es el estreñimiento y, 1 a 30 días más tarde, se manifiestan los síntomas neurológicos, caracterizados por anorexia, llanto, debilitamiento y alteración del tono muscular. Los alimentos y secreciones se acumulan en la faringe posterior, disminuyendo el efecto del vómito y generalmente hay ptosis (caída del párpado superior), oftalmoplejía, expresión facial flácida, debilidad muscular generalizada e hipotonía, lo que se refleja en la pérdida del control de la cabeza. La muerte puede ser causada por parálisis de la lengua o de la faringe (ya que conducen a la obstrucción de las vías aéreas), o por parálisis del diafragma, de los músculos intercostales u otras complicaciones (34, 80).

Durante la fase aguda de la enfermedad se puede detectar una gran cantidad de esporas en las heces de los niños y la cifra disminuye conforme estos van mejorando. Una posible fuente de contaminación con esporas reside en la miel, pero aquéllas también se han encontrado en jarabes de maíz (75), por lo que el CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades) estadounidense recomienda no proporcionar esta clase de alimentos a los niños menores de un año (40).

Inicialmente, el botulismo infantil sólo se había asociado a las toxinas de los tipos A y B, pero se ha comprobado que también participan el E y F, además de las cepas toxigénicas de *Clostridium butyricum* y *Clostridium baratii*. En

1986 se reportaron dos casos ocasionados por el tipo E, producidos específicamente por *C. butyricum* (40).

Botulismo asociado a heridas

En 1943, se descubrió esta forma de botulismo; aparece después de ocurrida alguna herida, cortadura u otra clase de lesión contaminada con esporas, las cuales por lo general provienen del suelo. No obstante, la enfermedad también se asocia a individuos que se administran drogas intravenosamente (30).

C. botulinum es capaz de infectar heridas, ya que el ambiente que se crea en ellas puede resultar suficientemente anaeróbico: La destrucción tisular impide la irrigación sanguínea en el área, por lo que disminuye el aporte de oxígeno y la parte remanente es consumido por las células del tejido u otros microorganismos contaminantes. Sin embargo, esta variación es muy rara, ya que *C. botulinum* no es tan apto como *C. tetani* para colonizar heridas; empero, el número de casos se ha venido incrementando desde 1991, sobre todo en adictos a las drogas en California (30).

Una vez que la espora se transforma en bacilo, éste produce la toxina, la cual ingresa a la sangre y llega hasta las terminaciones nerviosas. En general, el periodo de incubación es largo, fluctuando entre 4 y 14 días.

Botulismo no determinado

Esta denominación se debe a que el cuadro afecta a niños mayores de un año y personas adultas, en quienes no se ha identificado alguno de los vehículos de transmisión.

La resistencia del adulto a la colonización intestinal reside en la flora bacteriana y en el cambio en la dieta; a este respecto, el botulismo puede fundamentarse en anormalidades del tracto intestinal provocadas por cirugía o enfermedades inflamatorias; algunos factores que pueden alterar la flora intestinal y promover la infección incluyen la aclorhidria, la administración de antibióticos de amplio espectro y el inmunocompromiso de la persona, sobre todo después de alguna intervención quirúrgica.

iv) Factores de virulencia

C. botulinum produce al menos cuatro clases de componentes inmunogénicos: El antígeno somático, las esporas, los flagelos y las toxinas (80), si bien estas últimas son las de mayor relevancia, ya que provocan el cuadro patológico; cabe señalar que las cepas de los serotipos A y B se dividen en seis subgrupos –tomando como base sus antígenos termolábiles– y que todas ellas comparten un antígeno termoestable con las especies *C. tetani*, *C. histolyticum* y *C. sporogenes* (60).

Por lo que se refiere al mecanismo de acción de sus toxinas, *C. botulinum* produce tres tipos: La neurotoxina botulínica, la C₂ y la C₃ (82); considerando a los serotipos mencionados con anterioridad: A, B, C₁, C₂, D, E, F y G, es oportuno mencionar que todos funcionan como neurotoxinas, exceptuando al C₂.

Toxinas C₂ y C₃

Las toxinas C₂ y C₃ únicamente son producidas por los serotipos C y D, y pertenecen a la clase de exotoxinas bacterianas ADP-ribosilantes; es decir, ambas son capaces de transferir el grupo ADP-ribosil desde la molécula de NAD⁺ hacia determinados "blancos" específicos, alterando la participación de éstos en el metabolismo del tejido hospedero correspondiente. Además, modifican a la actina y a las pequeñas proteínas Rho unidas a GTP (82).

La toxina C₂ es una proteína bicatenaria con estructura y tamaño semejantes a la de la neurotoxina botulínica (150 kDa) y está constituida por una cadena ligera "C2I" (componente enzimático, cuyo sitio catalítico se encuentra en la parte carboxilo terminal) y otra pesada "C2II", unidas no covalentemente mediante un fragmento amino terminal de la cadena C2I (7); ésta última es la que se une a la superficie celular⁴, posteriormente el complejo C2I-C2II se internaliza por endocitosis mediada por receptor y se lleva a cabo la

⁴ La estructura del receptor aún no ha sido completamente definida, pero Eckhardt, M y cols. proponen que tal vez se requiera de un sitio que contenga carbohidratos unidos a asparagina como el residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (27).

translocación de membrana⁵, en la que C2I es liberada en el citosol, para finalmente ADP-ribosilar a la actina G-monomérica en el sitio Arg - 177; con ello se interfiere la formación normal de los microfilamentos de actina, por lo que se altera la morfología celular. Adicionalmente, la toxina C₂ es capaz de incrementar la permeabilidad vascular, funge como enterotoxina clásica (promoviendo la pérdida de agua y electrolitos a través del intestino delgado), produce hipotensión, hemorragia en los pulmones (1), es letal para ratones, e inclusive, inhibe la proliferación de diversas líneas celulares, actuando sobre ciertas proteínas participantes en el ciclo celular (8); así mismo, induce la degranulación de los mastocitos y, dado que éstos liberan histamina durante las respuestas alérgicas, es posible que en el futuro se logre que la toxina C₂ pueda representar un agente terapéutico que module las alergias (58). Cabe subrayar que dicha toxina no causa parálisis y no es una neurotoxina, por lo que no es responsable de ninguno de los síntomas del botulismo, si bien se piensa que potencia la diseminación de la BoNT en el organismo dada su capacidad para incrementar la permeabilidad vascular.

Por su parte, la exoenzima C₃ presenta una sola subunidad (una cadena ligera), su peso molecular aproximado es de 25 kDa y, al igual que la cadena C2I, manifiesta actividad ADP-ribosilante⁶: Modifica covalentemente un residuo de asparagina en la posición 41 (1), localizado en el dominio efector

⁵ Para lo cual se requiere de oligomerización de la cadena C2II y acidificación de los endosomas (6).

⁶ Chavan A. y cols. encontraron que el péptido Fen⁹-Gli¹⁰ cerca del sitio amino terminal es el dominio de unión al anillo de adenina del NAD⁺, sobre el que la exoenzima C3 actúa (19).

de la proteína Rho; ésta corresponde a una pequeña proteína de unión a GTP, perteneciente a la superfamilia de las Ras (18), implicadas en la regulación, crecimiento y metabolismo celular, así como en la formación del citoesqueleto de actina (5, 63, 100), en la apoptosis (26, 87, 103), en la agregación plaquetaria (65) y en el desarrollo del timo (42).

El gen que codifica para la exoenzima C₃ suele localizarse en un bacteriófago que infecta a los serotipos C y D de *C. botulinum*; puesto que también se ha detectado en otras bacterias y en transposones, se infiere que su origen es ancestral aunque ha evolucionado (41).

C₃ ejerce su efecto tóxico interfiriendo las señales de traducción mediadas por alguna proteína de unión a GTP; sin embargo, su función específica aún no se ha logrado establecer, desconociéndose si presenta alguna relación con la sintomatología de la enfermedad (82). En concreto, la patogénesis asociada a *C. botulinum* no se atribuye a ninguna de ambas toxinas.

BoNT

Los siete serotipos de neurotoxinas presentan una estructura y fisiología muy parecidas, se sintetizan durante el crecimiento bacteriano, son intracelulares, se acumulan en el protoplasma y se liberan hasta que ocurre la lisis bacilar. Se producen como prototoxinas no tóxicas o como elementos con ligera toxicidad y son activadas por enzimas proteolíticas endógenas en los

serotipos A, B, F (y en algunas cepas C y D) o por proteasas exógenas tales como la tripsina digestiva, como en el caso de las cepas no proteolíticas de los tipos C, D, E y G (y algunas B y F) (26).

Aunque la BoNT está clasificada como exotoxina⁷, no es liberada hacia el exterior durante el crecimiento de la bacteria, sino hasta que ésta sufre autólisis. En relación con su estructura, es una proteína grande e hidrosoluble, se sintetiza como una molécula no tóxica de una sola cadena con una masa molecular aproximada de 150,000 Da, la cual posteriormente es escindida por proteasas (a cerca de un tercio de distancia del amino terminal) para dar lugar a la neurotoxina activa; ésta se encuentra constituida por una cadena pesada (H) de 100,000 Da y otra ligera (L) de 50,000 Da, unidas por un puente disulfuro. La cadena H puede ser dividida en la región amino terminal (H_N) y en el carboxilo terminal (H_C) a través de la acción de enzimas proteolíticas, con lo que la BoNT evidencia sus tres dominios funcionales básicos:

- 1) La cadena L, correspondiente al dominio catalítico, posee un átomo de zinc y presenta actividad de endopeptidasa respecto a los sustratos neuronales.
- 2) El dominio de translocación H_N, que forma un canal en la membrana neuronal, lo cual permite a la cadena L ingresar a la célula.

⁷ Cumple con la mayor parte de las características de las exotoxinas y se le considera una de las sustancias más venenosas: Su DL₅₀ es menor de 0.1 ng/Kg para ratones (26).

- 3) El dominio de unión al receptor H_C, que puede subdividirse a su vez en las regiones H_CN y H_CC.

La cadena L permanece unida a la cadena H por la región amino terminal, mediante un puente disulfuro y a través de uniones no covalentes (26).

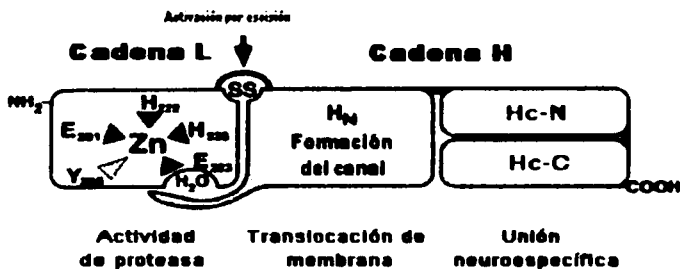


Figura 1. Estructura de la neurotoxina botulínica; el esquema muestra los tres dominios de la molécula (86).

Cabe subrayar que, a su vez, la BoNT forma parte de un complejo que contiene a otras proteínas no tóxicas⁸, y del cual se han distinguido tres formas: El complejo M (de tamaño medio), el L (grande –del inglés large–) y el LL (extra grande); el primero es producido por todas las cepas, exceptuando a las del tipo G, es cercano a los 300,000 Da y se constituye por la neurotoxina y una proteína no hemaglutinante y no tóxica (NTNH) cuyo tamaño es similar al de la neurotoxina. La forma L es de aproximadamente 500 kDa, se conforma por la neurotoxina, hemaglutininas y una NTNH, y la sintetizan las

⁸ A la neurotoxina sola se le denomina toxina derivada y a todo el conjunto se le conoce como toxina progenitora.

cepas de los tipos A, B, C, D y G; por último, la LL es de 900 kDa, está integrada del mismo modo que la forma L y sólo es generada por las cepas del tipo A (55).

Diversos trabajos demuestran que las proteínas no tóxicas son importantes para proteger a las neurotoxinas, tanto del bajo pH como de las proteasas presentes en el estómago (26, 30, 55); posteriormente, al llegar el complejo al intestino, el pH ligeramente alcalino provoca que aquél se disocie y es entonces cuando la toxina activa puede alcanzar la circulación, después de atravesar las células intestinales y las células M (86), aunque otros investigadores mencionan que tanto el estómago como el intestino delgado pueden ser sitios de absorción⁹ y que las proteínas hemaglutininas y las no hemaglutinantes no son esenciales para la absorción. Además se ha visto que la forma de 900 kDa tiene una toxicidad oral mucho mayor a la de la toxina derivada (68, 96).

La secuenciación ha permitido determinar el grado de similitud existente entre las diversas neurotoxinas de *Clostridium*, observándose que las del mismo tipo presentan una mayor homología, aunque sean producidas por especies diferentes; por ejemplo, las neurotoxinas del serotipo E de *C. botulinum* y *C. butyricum* muestran aminoácidos idénticos en un 97 %, lo que sugiere que es posible la transferencia de genes entre ambas especies; así mismo, las

⁹ Debido a que se ha visto que el complejo LL resiste las condiciones ácidas y alcalinas que se encuentran en estos sitios y llega a ser detectable el complejo en la circulación sanguínea (14).

BoNTs no proteolíticas del tipo F y las elaboradas por *C. baratii* evidencian una identidad aproximada de 70 %, en tanto que la de las neurotoxinas E y F es de 63 % y, la de las G y B, es de 58 % (26).

Los genes estructurales para las neurotoxinas botulínicas pueden encontrarse localizados en el cromosoma, en bacteriófagos o en plásmidos (30), dependiendo del serotipo en cuestión (26); en los tipos A, B, E y F se les ubica en el cromosoma bacteriano, en el C₁ y el D en bacteriófagos –siendo muy inestable la producción- y en el tipo G¹⁰ se sitúan en un plásmido (26, 30).

En cuanto a los segmentos genómicos implicados en la síntesis de las neurotoxinas, los genes que codifican para la BoNT, para las NTNH y para las hemaglutininas se encuentran juntos, formando un agrupamiento (cluster) denominado complejo genético de la neurotoxina botulínica (26), que consiste en dos operones que se transcriben en direcciones opuestas; uno contiene a los genes relacionados con las NTNH y la neurotoxina botulínica y, el segundo, al que produce las hemaglutininas; entre ambos operones se encuentra un gen adicional (*botR/A*, *orf21* ó *orfX*) que codifica para una proteína de 21 kDa, la cual regula positivamente la expresión de la NTNH y la BoNT (30).

Por otra parte, se ha reportado que el gen de la neurotoxina B también se ha detectado en otras cepas supuestamente no productoras de esta toxina, como

¹⁰ Este serotipo de BoNT se produce en pequeñas cantidades.

algunas del serotipo A, pero en estas últimas el segmento nucleotídico presenta algunas faltantes e incluye una región que codifica para la detención de la síntesis, lo que explica la falta de expresión de la toxina B en dichas cepas (54). Además, es posible que la capacidad para elaborar mezclas de toxinas sea adquirida mediante la posterior transferencia de genes adicionales, probablemente por transducción de bacteriófagos o de transposones ya que, de hecho, se ha demostrado que los genes para la BoNT se asocian a vectores transmisibles capaces de conferir toxicidad a clostridios no toxigénicos tales como *C. butyricum* y *C. baratii* (59).

Finalmente, en cuanto a las diferencias cuantitativas en la producción de la BoNT; éstas pueden obedecer a que las posiciones de los genes en los clusters afecten la transcripción y/o traducción, o bien, a que la estructura y expresión de la proteína NTNH también intervenga en la expresión génica (54).

Mecanismo de acción de la BoNT

Una vez que la BoNT ingresa a la circulación sanguínea, se transporta hasta llegar a los gangliosidos de superficie de las células nerviosas, donde se une e hidroliza a ciertas proteínas que permiten la unión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática presináptica, para la liberación de neurotransmisores; de este modo bloquea la neurotransmisión por inhibir la descarga de acetilcolina en las terminales nerviosas periféricas (30).

El mecanismo de acción de la BoNT comprende cuatro pasos: a) Unión, b) internalización, c) translocación de membrana y d) acción intracelular (58, 72, 86).

A continuación se describen los principales aspectos de los pasos antes señalados:

a) Unión. La unión de la BoNT se realiza a través de la región H_C de su cadena pesada, la cual interactúa inicial o predominantemente con los gangliósidos neuronales, correspondientes a glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico; en especial y dependiendo de su serotipo, la neurotoxina botulínica muestra una gran afinidad por los polisialogangliósidos G_{D1a}, G_{T1b} y G_{Q1b} (86); sin embargo, es muy factible que éstos no constituyan los únicos receptores: Por un lado, los valores de afinidad no son lo suficientemente grandes como para que ocurra la intoxicación *in vivo* y, por el otro, ya se ha logrado comprobar la participación de receptores proteicos aún no identificados plenamente (30).

T. Nishiki y cols. proponen que, tanto la sinaptogamina como los gangliósidos G_{T1b} y G_{D1a}, representan los mejores receptores naturales para la BoNT tipo B (77), así como también se ha planteado que la primera lo es para los serotipos A y E (17). Diversos investigadores sugieren un modelo de doble receptor para explicar la alta afinidad de las neurotoxinas por las terminales nerviosas;

en éste, la toxina se une a la superficie de la membrana presináptica –que contiene grandes cantidades de ácidos lipídicos cargados negativamente– y, posteriormente, se desplaza a través de la membrana hasta lograr su acoplamiento a un receptor proteico (26).

b) Internalización. Una vez concretada su unión, la neurotoxina se internaliza a través de un proceso de endocitosis mediada por receptor.

Si bien el paso de unión no depende de la temperatura, la internalización de la BoNT requiere de más de 10°C (72).

c) Translocación membranar. En virtud de que el "blanco" de acción de la BoNT se encuentra en el citosol, es indispensable que su cadena L cruce la barrera hidrofóbica de la membrana vesicular para llegar a dicho lugar. Aún no está muy claro el proceso mediante el cual se lleva a cabo este paso, pero la hipótesis más probable es planteada por Montecucco y cols. (72, 86) que han encontrado que, para que tenga lugar la intoxicación por la BoNT, debe imperar un pH bajo capaz de inducir un cambio conformacional de la molécula, desde la forma neutra e hidrosoluble hacia otra ácida con segmentos hidrofóbicos expuestos (92), los cuales hacen posible la penetración de las cadenas H y L en el núcleo hidrocarbonado de la bicapa lipídica presente en la membrana endosómica; una vez dentro de dicho núcleo, la cadena H origina una hendidura hidrofílica transmembranar, que permite el paso de la cadena L parcialmente desdoblada, con su parte hidrofóbica orientada hacia el lado de los lípidos. A continuación, la subunidad

catalítica L cruza la membrana vesicular y el pH neutro del citosol provoca que se vuelva a plegar, recuperando su forma hidrosoluble inicial y, finalmente, la cadena L sale totalmente del canal iónico sin la cadena H, previa reducción del puente disulfuro que unía a ambas cadenas. Evidentemente, es probable que algunos chaperones citosólicos estén involucrados en el replegamiento de la cadena L y en su salida de la vesícula endosómica (58).

d) Acción intracelular. Por sí sola, la cadena L está capacitada para llevar a cabo su función tóxica, debido a que en su región central posee un motif de unión al zinc (Zn); es decir, se comporta como una endopeptidasa dependiente de Zn y sus sustratos incluyen a los componentes del complejo de fusión y acoplamiento de las vesículas sinápticas. En tal contexto, la BoNT de los serotipos B, D, F y G hidrolizan a la proteína de membrana asociada a la vesícula (VAMP, por *vesicle associated membrane protein*), también denominada sinaptobrevina; la del A y E hidrolizan a la proteína asociada al sinaptosoma (SNAP-25) y la del C₁ a la sintaxina o también llamada HPC-1 (9). La VAMP, la sintaxina y la SNAP-25 constituyen el núcleo de un complejo conocido como SNARE (del inglés: Soluble NSF-attachment protein receptor), que promueve la fusión de las vesículas transportadoras con la membrana.

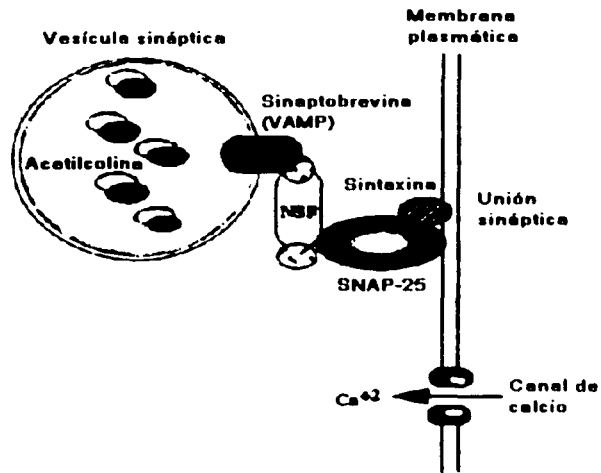


Figura 2. Organización del complejo SNARE. NSF = Factor sensible a N-etilmaleimida (58).

La actividad proteolítica dependiente de Zn de las neurotoxinas es muy específica: Los serotipos A y E actúan en la proteína SNAP-25 en los sitios Gln197-Arg198 y Arg180-Ile181, respectivamente, la B hidroliza el péptido Gln76-Fen77 en la VAMP-2 (una isoforma de la VAMP), la BoNT C se ha encontrado que deshace una unión cerca del carboxilo terminal de la sintaxina (9), el tipo D destruye el segmento Lis59-Leu60, el F escinde las uniones Gln58-Lis59 presentes tanto en VAMP-1 y VAMP-2, y la del G rompe a la VAMP en un enlace Ala81-Ala82 (93); no obstante, otros autores señalan que las tres proteínas SNARE poseen un diferente motif tridimensional específico y que la BoNT requiere sustratos con una longitud de 16 o más aminoácidos,

porque probablemente reconoce la forma del sustrato y no ciertas uniones peptídicas específicas (58).

El complejo SNARE, junto con el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF), actúa como una ATPasa. De cualquier manera, cuando todas esas proteínas están ensambladas -formando parte del complejo correspondiente-, son resistentes *in vitro* a la proteólisis por la BoNT; en contraparte, si se encuentran en forma libre son fácilmente degradadas por las neurotoxinas, lo que se traduce en la inhibición de la liberación de neurotransmisores.

La syntaxina es una proteína de 35 kDa, situada en la membrana plasmática unida a la sinaptogamina; ésta corresponde a una proteína de unión al calcio (9) y resulta muy importante para la sobrevivencia y desarrollo neuronal. Por su parte, la SNAP-25 se encuentra unida a la superficie citosólica de la membrana y se requiere para el crecimiento axonal durante el desarrollo neuronal, así como para la plasticidad de las terminales nerviosas, cuando el tejido ya ha alcanzado la madurez. Finalmente, la sinaptobrevina o VAMP es una proteína de 13 kDa localizada en las vesículas sinápticas, de la que se han detectado diez isoformas diferentes, todas ellas trascendentales para la exocitosis neuronal.

v) Aplicaciones de la toxina botulínica

Como agente terapéutico

Además de impedir la transmisión sináptica, la BoNT también origina atrofia y debilidad muscular; si bien las terminales nerviosas no se degeneran, el bloqueo de la neurotransmisión suele ser irreversible, excepto en algunas ocasiones, en las que desarrollan otras terminales nerviosas y se forman nuevos contactos sinápticos, lo cual ocurre en 2 a 3 meses (74). De acuerdo con dichos conocimientos y con diversos estudios clínicos que demostraron que la administración intramuscular de pequeñísimas cantidades de la BoNT disminuía la hiperactividad muscular y el dolor en individuos que padecían desórdenes musculares (contracciones involuntarias); en diciembre de 1989, la FDA (Food and Drug Administration) autorizó el uso del serotipo A para tratar a los mayores de 12 años que sufren de estrabismo¹¹, blefarospasmo¹² o espasmo hemifacial, mediante inyección directa en el músculo alterado (15, 58, 65, 85, 86).

En los años recientes, el uso terapéutico de la BoNT se ha extendido a enfermedades tales como torticolis¹³ espasmódica, distonía oromandibular y lingual, desórdenes en la voz (tartamudeo y temblor bucal), incontinencia

¹¹ Anormalidad de los ojos en la cual los ejes visuales no se centran en el punto objetivo deseado (24).

¹² Espasmo localizado en el músculo orbicular de los ojos (24).

¹³ Contracción o espasmo del músculo esternocleidomastoideo de manera unilateral, lo que provoca una posición anormal y movimientos limitados de la cabeza (24).

urinaria (debido a daños en la médula espinal), anismus (contracción incontrolable de los esfínteres anales), parálisis cerebral en pacientes pediátricos, espasticidad (parálisis espástica en adultos), contracciones relacionadas con el mal de Parkinson, desórdenes gastrointestinales, etc. Además, se ha observado que puede aliviar el dolor miofacial y la migraña (58, 84), e inclusive, se le ha logrado aplicar para el rejuvenecimiento y desvanecimiento de las arrugas en la piel (74).

Las cualidades terapéuticas de la BoNT se fundamentan en otras propiedades interesantes: a) Muestra una gran especificidad por las motoneuronas periféricas y evita la excesiva actividad muscular (al inhibir la liberación de acetilcolina); b) su gran potencia implica inyecciones minúsculas en el rango de nanogramos, lo que reduce al mínimo los eventuales efectos colaterales; c) ejerce una acción prolongada, promoviendo una actividad muscular normal durante varios meses (58).

A su vez, la específica elección de la BoNT tipo A obedece al hecho de que otros serotipos carecen de algunas características esenciales para uso médico. Por ejemplo, aunque el serotipo F resulta efectivo en pacientes que han mostrado resistencia al tipo A, su efecto es menos duradero, muy semejante al de la BoNT B; en este sentido, dado que es preferible aplicar la menor cantidad posible de inyecciones, se requieren toxinas con mayor actividad y duración, propiedades ampliamente comprobadas en la

neurotoxina A (10), si bien estudios recientes también reportan resultados exitosos con la BoNT C (86).

La toxina puede obtenerse por el método de Schantz y Johnson (84): A partir de cultivos de 24 a 36 h y una vez que la bacteria se ha autolisado, la toxina liberada es activada vía las proteasas contenidas en el medio de cultivo y posteriormente se precipita, se extrae, se acidifica y cristaliza en forma de agujas blancas, manifestando una toxicidad de 3 a 3.5×10^7 U/mg. La potencia se calcula mediante bioensayo en ratón, en unidades estándar (unidades ratón); es decir, se determina la DL_{50} en un lote de ratas femeninas Swiss- Webster de 18 a 20 g (15, 56, 74). En cuanto a la formulación, la toxina se ajusta a una concentración de 1000 U o aproximadamente a 33 ng/mL¹⁴, agregándose albúmina humana para una mejor solubilización.

Posteriormente, dicha mezcla se filtra y se coloca en los recipientes, a razón de 100 ± 30 U en cada uno, procediéndose a su liofilización y al sellado de los frascos viales. En tal contexto, para administrar el producto es necesario rehidratarlo con solución salina; cabe señalar que el proceso de liofilización ocasiona la pérdida de toxicidad de la BoNT, disminuyendo sus efectos terapéuticos, por lo que aún es preciso mejorar la metodología (84).

¹⁴ Desafortunadamente, la toxina es muy inestable, por lo que se detoxifica en lapsos relativamente cortos.

Actualmente, existen dos formulaciones comerciales de toxina botulínica A: La británica (Dysport) y la estadounidense (Botox), acerca de cuyas respectivas potencias aún persiste cierta polémica (15, 29, 56, 74).

Generalmente, la dosis efectiva depende de la masa muscular a inyectar: Si esta es muy grande, se requerirá mayor cantidad; por ejemplo, para el tratamiento del estrabismo, blefarospasmo y otros espasmos faciales, se recomiendan dosis menores a 30 U (cerca de 1 ng), en tanto que, para el de la torticolis, se sugieren más de 300 U (aproximadamente 10 mg) (84).

Evidentemente, durante la terapéutica es importante controlar diversos aspectos: La vía y el método de administración, el tamaño de la dosis y la precaución de evitar que se presenten reacciones sistémicas¹⁵. En ocasiones, es recomendable aplicar anticuerpos homólogos en el sitio de inyección, para evitar efectos secundarios tales como la ptosis (85).

Otro de los efectos indeseables consiste en la inducción de anticuerpos, los cuales reducirían la eficacia de las dosis posteriores (10, 85); ello puede prevenirse incrementando la actividad específica de la toxina y evitando su detoxificación durante el proceso de producción (10, 84).

¹⁵ Se tendría que administrar 10 veces la dosis de tratamiento, para que la toxina entrara a la circulación y causara botulismo (89).

Las contraindicaciones de la BoNT incluyen alergias a ella e infección o inflamación en el sitio de inyección; aún no se ha establecido su uso seguro durante la maternidad y lactancia.

A continuación se mencionan algunos aspectos asociados a la terapia y evolución de algunos padecimientos tratados con la BoNT.

Trastornos oculares. El estrabismo se debe a la descoordinación de los músculos externos del ojo (24); en un inicio, la toxina se empezó a utilizar como tratamiento alternativo a la cirugía destinada al alineamiento de los ojos, pero se ha comprobado que ambos se pueden emplear en forma conjunta. Las inyecciones se realizan con agujas cubiertas de teflón y el apoyo de la electromiografía (para localizar perfectamente el músculo extraocular), bajo anestesia local, aunque en los niños suele ser necesaria la sedación con ketamina.

La mayoría de los pacientes experimenta alivio después de seis meses de inyecciones repetidas y los efectos colaterales como ptosis parcial (caída del párpado), diplopía, desorientación espacial y desviaciones verticales secundarias, son transitorias y no ocasionan disminución de la agudeza visual (56, 74).

Las inyecciones con toxina botulínica también resultan de utilidad para el tratamiento de la oftalmopatía tiroidal, el nistagmus (movimiento oscilatorio de los globos oculares) y la diplopía (56).

Distonía muscular. La distonía es un síndrome que consiste en contracciones sostenidas de los músculos que provocan posturas anormales, torcimientos repetitivos (por ejemplo tortícolis), flexiones o extensiones (como en el calambre de el escritor) o movimientos con contracción como los del blefarospasmo. La distonía se clasifica como primaria o idiopática, cuando no se ha logrado establecer alguna etiología en específico, o bien, como secundaria, si se ha encontrado la causa; en éste último caso, se ha encontrado que las distonías pueden deberse a anomalías funcionales en la corriente cerebral cefálica, en los ganglios basales o en ambas, e inclusive, en algunos pacientes se ha encontrado alteración noradrenérgica de origen genético o desórdenes neurodegenerativos y metabólicos, lesiones cerebrales, etc. (15).

Dado que los individuos con distonía primaria sólo manifiestan cierto alivio con la medicina tradicional, las inyecciones de toxina botulínica representan el tratamiento de elección (15,56).

El blefarospasmo, una forma de distonía focal caracterizada por el intermitente pero sostenido cerramiento de los ojos (por lo regular debido a contracciones involuntarias del orbicular del ojo), a menudo se acompaña por espasmos de

los músculos oromandibulares, faciales, faríngeos, laríngeos y cervicales (disonía cérvico-craneal o Síndrome de Meige). La severidad de los síntomas fluctúa desde incremento del parpadeo hasta ceguera (como resultado del permanente impedimento para abrir los ojos).

Las medicaciones con clonazepam, lorazepam o baclofen aligeran la sintomatología en un tercio de los pacientes, pero a menudo son insatisfactorias; por tal motivo, la cirugía resulta más conveniente, aunque pueden presentarse complicaciones tales como queratitis, deterioro sensorial local, ptosis, necrosis del párpado, e inclusive, la enfermedad puede volver a presentarse después de algunos meses (56).

Diversos estudios han demostrado la eficacia de las inyecciones con toxina para tratar el blefarospasmo; la mejora empieza dos a cinco días después y el beneficio dura aproximadamente tres meses y medio. Los efectos adversos incluyen ptosis, visión borrosa, diplopía, hinchazón e incremento del lagrimeo, pero son raros.

Por su parte, la disonía cervical o tortícolis espasmódica es la más común de las disonías; se caracteriza por contracciones involuntarias de los músculos del cuello y espasmos o posición anormal de la cabeza (laterocolis). La terapéutica con anticolinérgicos, benzodiazepinas y derivados de la dopamina, aporta mejoría en la mitad de los casos, pero las reacciones adversas son frecuentes; por el contrario, la BoNT corrige la postura y el dolor después de

aplicarla durante una semana, el paciente se manifiesta sin problemas durante un promedio de cuatro meses y sólo la cuarta parte presenta efectos colaterales tales como disfagia¹⁶ (la cual puede deberse a la difusión de la toxina en el músculo faríngeo), debilidad del cuello, dolor en el sitio de inyección, fatiga, malestar, producción de anticuerpos anti-BoNT, etc. (15,56).

La distonía oromandibular es una distonía focal que comprende los músculos faciales bajos, los masticatorios y los de la lengua, por lo que ocasiona *trismus*, desviación abierta o lateral de la mandíbula y movimiento involuntario de la lengua. La mayoría de los afectados no responde a la farmacoterapia, aunque el baclofen, los anticolinérgicos y la tetrabenazina pueden ser útiles; en contraste, el 70 % de las personas tratadas con BoNT mejora en cuanto al movimiento de masticación y el habla (15).

La distonía de la laringe o disfonía espasmódica se caracteriza por aducción o abducción (desviaciones hacia adentro o hacia fuera) de las cuerdas vocales; la de tipo aductora es más común, con habla sofocante y forzada, la cual hasta se interrumpe por pausas involuntarias (56).

Los fármacos, la terapia del habla y la psicoterapia no alivian el padecimiento e inclusive, la cirugía destinada a seccionar el nervio laríngeo sólo origina mejoras después de 3 años en la mitad de los pacientes.

¹⁶ Dificultad o incapacidad para llevar a cabo la deglución (24).

Las inyecciones de BoNT en el músculo vocal tiroaritenoides representan el mejor método para curar la distonía espasmódica aductora y sólo una cuarta parte de los pacientes presenta dolor en el sitio de la inyección y disfagia transitoria (15, 56).

Adicionalmente, diversos estudios han demostrado la eficacia de la BoNT en la terapéutica del calambre de escritor y otros calambres ocupacionales, en desórdenes del movimiento de las manos como en la distonía de los miembros inferiores asociada a parkinsonismo, etc.

El espasmo hemifacial se caracteriza por tirones clónicos, involuntarios o contracciones tónicas de los músculos asociados al nervio facial, debido probablemente a alguna compresión del séptimo nervio craneal. Su tratamiento con fármacos anticonvulsivos tales como carbamazepina, fenitoína y clonazepam sólo causan una mejora parcial en los pacientes. La descompresión del nervio facial mediante cirugía generalmente cura el desorden del movimiento, pero la parálisis facial permanente, la sordera, la apoplejía y otras complicaciones llegan a ocurrir. Las inyecciones de BoNT en la musculatura afectada, completamente eliminan los movimientos involuntarios por cerca de cinco meses en casi todos los pacientes, por lo que debido a su alta eficacia y seguridad también ya ha sido aprobado su uso en este padecimiento por la FDA (56).

El temblor, un movimiento oscilatorio producido por contracciones alteradas o sincrónicas de los músculos antagonistas, es el desorden involuntario más común; generalmente, es suave y mejora con medicamentos en la mayoría de los pacientes, aunque en algunas personas, es muy intenso o no responde adecuadamente a los fármacos. En contrasentido, la toxina botulínica origina el mejoramiento funcional, lográndose en siete días un evidente alivio que dura 10.5 semanas –en promedio– (56).

Asimismo, la BoNT incrementa el tono muscular del síndrome de Stiff-Person, un desorden autoinmune asociado a anticuerpos (15) y, actualmente, se aplica con éxito para revertir las líneas del entrecejo y otras arrugas faciales.

Neoplasias. Mención aparte merecen otros beneficios que aportarían los clostridios: Dado que estos microorganismos pueden sobrevivir en regiones hipóxicas y provocan la lisis y degradación del tejido necrótico, algunos autores han propuesto que las esporas inoculadas por vía intravenosa pueden establecerse en los tumores, en donde la vascularización es baja, generando condiciones anaerobias. En tal contexto, las esporas manipuladas con ingeniería genética transportarían pre-fármacos, solucionando en buena parte el problema que representa la falta de especificidad de la quimioterapia (58).

Como arma biológica

Diversas bacterias, virus o toxinas de origen microbiano, vegetal o animal pueden emplearse como agentes en la guerra biológica; entre algunos de ellos destacan las esporas de *Bacillus anthracis* (causante del ántrax), la toxina botulínica, *Yersinia pestis* (agente etiológico de la peste), la enterotoxina B estafilocócica, el virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Aunque todos presentan características diferentes, tienen en común la capacidad de poder ser dispersados en aerosoles, como partículas de 1 a 10 μm , las cuales permanecen suspendidas durante varias horas bajo ciertas condiciones climáticas y, en caso de ser inhalados, pueden penetrar hasta los bronquiolos distales y los alveolos terminales (33).

Los aerosoles se pueden liberar mediante tecnología simple: Spray industrial con boquilla y fuentes de energía modificados para generar partículas muy pequeñas; se proyectan desde aeroplanos o barcos que viajan en dirección contraria al viento, o bien, en misiles que contengan al agente. Sin embargo, las condiciones meteorológicas en el área del "blanco" son trascendentales en los dos primeros casos, ya que la alta velocidad del viento y la turbulencia tienden a romper la nube de aerosol. Evidentemente, estos "productos" también se pueden diseminar por medio de algún spray que los libere dentro de los sitios de acción (autobuses, trenes, el metro, aeropuertos, sistemas de aire acondicionado en edificios u otros lugares concurridos) y, debido a que son invisibles y carentes de olor-sabor, su percepción y neutralización

resultarían muy tardías (33, 95). Su oportuna detección permitiría que las personas se protegieran, cubriéndose la boca y nariz con algún pañuelo o ropa (prendas que posteriormente se incinarían) y limpiando superficies y objetos con hipoclorito (3).

En referencia específica a la BoNT aerosolizada, su permanencia en el sitio de liberación depende de las condiciones atmosféricas y el tamaño de partícula del aerosol; las altas humedades y temperaturas la degradan y desintegran en la atmósfera (3).

Otras posibles rutas de exposición son la oral (por contaminación intencional de agua o comida) y la percutánea, aunque éstas se consideran menos factibles que la ruta respiratoria (33). A pesar de que, la toxina es más tóxica cuando se ingiere que inhalada (13), la contaminación del agua potable no representa un medio muy eficaz, puesto que se necesitaría una gran cantidad de BoNT aplicada después del tratamiento, y ésta tendría que resistir la acción del cloro. A tal respecto, la BoNT se inactiva en 1 a 3 h con la luz solar, en 12 h con el aire y, con cloro en un 100 % a concentración de 3 mg/L y en un 84 % con 0.4 mg/L (en 20 minutos); ésta última proporción de cloro es similar a la empleada por el procedimiento de desinfección municipal (13).

Sin embargo, la contaminación del agua y los alimentos no requiere de mecanismos más sofisticados, por lo que continúa significándose como una amenaza de ataques terroristas en pequeña escala (88).

Los terroristas prefieren el uso de agentes biológicos que las armas químicas, ya que de esta manera, no tienen que preocuparse por detectores de metales, equipos de rayos X u otras medidas de seguridad, e inclusive, porque sus efectos discapacitantes o letales son más prolongados, elevando los costos de la atención médica correspondiente (33, 95).

Por lo que toca a la toxina botulínica, ésta es relativamente fácil de producir y resulta letal en pequeñas cantidades (89): Un solo gramo de toxina cristalizada que se dispersa uniformemente (destinada a ser inhalada) es suficiente para provocar la muerte a más de un millón de personas. La aparición de los signos del botulismo adquirido por inhalación depende de la dosis; desde 1 ó 2, hasta varios días después de la exposición incluso, el fallo respiratorio puede tener lugar 24 horas posteriores al inicio de los síntomas. Algunos estudios sugieren que la toxina aerosolizada suele no identificarse en suero o heces, sino en la mucosa nasal, 24 h después de la inhalación y mediante la técnica de ELISA.

El desarrollo y uso de la BoNT como arma biológica inició hace más de 60 años; el programa de armas biológicas de EUA la empezó a elaborar durante la segunda guerra mundial, pero la producción se suspendió en 1969 por órdenes del Presidente Richard M. Nixon. Más tarde, en 1972, la Convención de Armas Biológicas y Tóxicas prohibió la investigación ofensiva y la síntesis de armas biológicas, aunque Irak y la Unión Soviética continuaron

produciendo toxina botulínica para uso bélico, práctica que se extendió a países tales como Irán, Corea del Norte y Siria (3, 84).

Por su parte, los terroristas ya la han utilizado como arma biológica: Entre 1990 y 1995, se dispersaron aerosoles con toxina botulínica en Tokio, Japón, pero afortunadamente, no tuvo resultados mayores, debido a errores y carencias en las técnicas microbiológicas y los equipos empleados.

Evidentemente, cuando se presenta un brote de botulismo no debe descartarse su posible origen bioterrorista, principalmente cuando aquél implica a un gran número de enfermos o se detecta a un serotipo de BoNT poco frecuente; por ejemplo, al C, D, F, G, o bien, a un E no relacionado con alimentos del mar. Otros elementos sospechosos incluyen casos que involucran a una misma zona geográfica, la improbable ingestión de algún alimento en común, e inclusive, una gran contaminación de alimentos (3).

vi) Diagnóstico

El diagnóstico del botulismo integra los componentes clínico, epidemiológico y microbiológico. En tal sentido, es conveniente obtener los datos personales del paciente, la información clínica y los alimentos relacionados con la intoxicación, considerando que se sospecha de la enfermedad principalmente cuando se observa debilidad bilateral descendente, parálisis de los músculos esqueléticos, diplopía, disfonía y disfagia; desafortunadamente, en un inicio

los síntomas son muy parecidos a los de otras afecciones, por lo que se puede incurrir en diagnósticos erróneos, sobre todo cuando se trata de un caso aislado; además, el médico suele no estar muy relacionado con la patología y, generalmente, cuando ésta se hace evidente ya es muy tarde para instituir el tratamiento adecuado (60).

La forma más efectiva para confirmar el diagnóstico consiste en demostrar la presencia de toxina, tanto en el suero, heces, vómito o contenido gástrico del paciente, como en los alimentos sospechosos, lo cual se realiza con el bioensayo en ratón. En el caso del botulismo infantil, la toxina raramente es detectable en el suero, por lo que es más apropiado identificarla en las heces; empero, cuando ello no es posible, pueden realizarse lavados gástricos (con un volumen limitado de agua estéril para no diluir la muestra), con la finalidad de obtener fluidos. Finalmente, con respecto al botulismo en heridas, es preciso probar la existencia de la toxina en el suero y/o en el microorganismo infectante (49).

Ante la sospecha de botulismo, se procede a tomar muestras de sangre del paciente, para extraer el suero, y posteriormente éste se refrigera y se examina lo más pronto posible; por lo que hace a las muestras de herida, éstas se colocan en medios de transporte anaeróbico y los alimentos deben permanecer en su envase original o en un contenedor estéril.

El aislamiento del microorganismo puede realizarse en el medio CBI, ya que *C. botulinum* es resistente a la cicloserina, sulfametoxazol y trimetoprima contenidos en él; la identificación de las colonias que producen la toxina se lleva a cabo mediante una prueba de neutralización en ratón, por ELISA u otras técnicas inmunoenzimáticas.

Cabe mencionar que varios autores han reportado diferentes metodologías para la identificación de la toxina, empleando para ello técnicas de inmunodifusión; como el Ochterlony y la difusión microcapilar en gel de agar, aglutinación con eritrocitos de camero, electroforesis, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, etc.

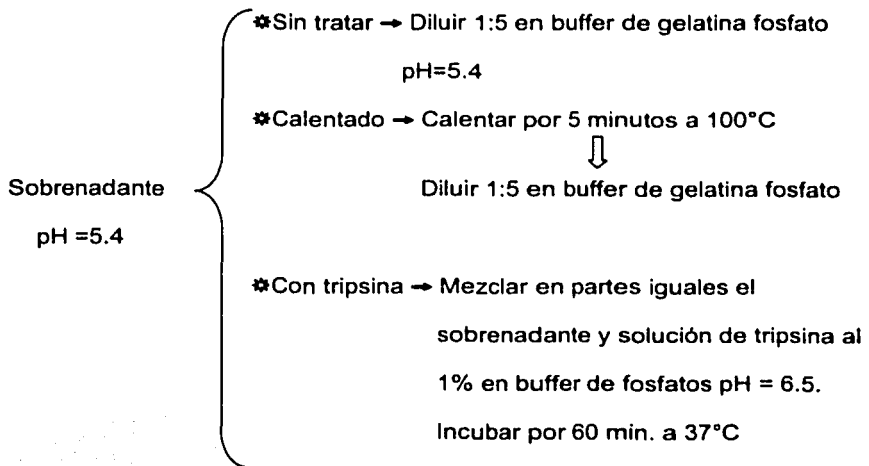
Sin embargo, la técnica de referencia para demostrar la presencia de toxina continúa siendo el bioensayo en ratón, en el cual se evalúan las propiedades de protección o neutralización (101).

A continuación se comentan los procedimientos seleccionados para analizar las muestras de heces y alimentos, así como los cultivos:

Preparación de la muestra. Los alimentos o las heces se homogenizan, primero en amortiguador de gelatina fosfato a pH de 6.5 (tratando de que la dilución de la muestra resulte lo más grande posible); por su parte, las

colonias puras obtenidas en el medio original se resiembran en caldo con carne cocida¹⁷ y se incuban a 30°C durante 3 días.

Los cultivos o los extractos de las muestras deben concentrarse o centrifugarse entre 5 y 25 minutos a 1,200 g; el sobrenadante se divide en tres porciones: Una de ellas permanece sin tratarse, la segunda se calienta para demostrar la desnaturalización de la toxina y, en cuanto a la tercera, se le agrega tripsina para probar la presencia de protoxina inactiva (21, 101).

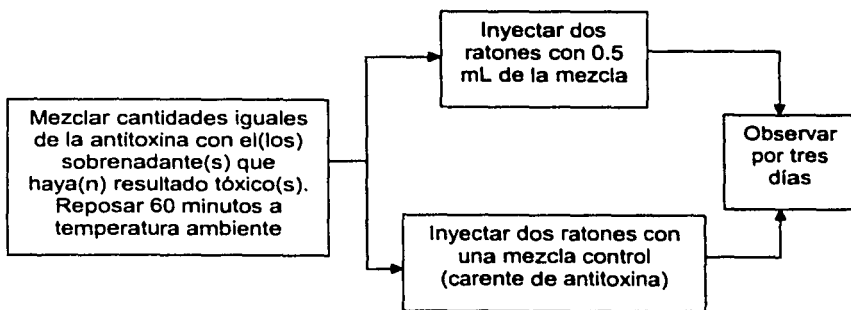


¹⁷ Es recomendable escoger un gran número de colonias, ya que algunas pueden no ser toxigénicas.

Desafío en el ratón. Esta prueba comprende dos etapas: a) Demostración de la presencia de una sustancia tóxica vía la observación de los síntomas; y b) identificación del tipo serológico de la toxina, mediante la protección con antitoxina específica.

a) Detección de la sustancia tóxica. Se inoculan intraperitonealmente 0.5 mL de cada una de las porciones sin tratar, calentada y tratada con tripsina en 2 ratones de 18 a 30 g de peso, y los animales se observan durante 3 días para establecer si manifiestan signos de botulismo y muerte.

b) Identificación del tipo serológico:



Interpretación de los resultados. En la etapa a), la sobrevivencia de todos los ratones inoculados indica la ausencia de BoNT en la muestra original; si alguno de los animales muere, se atribuye a la presencia de un agente tóxico

cuya naturaleza exacta debe ser determinada. Se sospecha de botulismo cuando se presenta erizamiento del pelo, seguido de movimientos respiratorios abdominales realizados con dificultad, debilidad de las extremidades y parálisis total; las muertes sin los previos síntomas clásicos no constituyen una clara evidencia de la existencia de neurotoxina, motivo por el cual es necesario observar cuidadosamente a los ratones durante las primeras 18 horas (16, 98).

La confirmación de la neurotoxina botulínica como agente letal se lleva a cabo durante las pruebas asociadas a la segunda etapa: Si se observa protección en el par de ratones tratados con antitoxina específica, se establece el tipo de toxina contenida en la muestra. Puesto que los tipos A, B y E representan la causa de la mayoría de casos de botulismo humano, esta prueba puede realizarse solamente con estas tres antitoxinas (ocasionalmente es necesario agregar la F); sin embargo, para verificar si los especímenes contienen más de un tipo de toxina, también es conveniente ensayar con una o más mezclas de antitoxinas (21).

Las desventajas de esta técnica incluyen la necesidad de trabajar con ratones y su prolongada duración ya que, inclusive, algunas veces existen problemas de interpretación por síntomas atípicos, o bien, cuando los niveles de toxina son bajos, los resultados se obtienen hasta en 3 días (101). A pesar de que se han diseñado algunos otros métodos alternativos, aún no se ha encontrado

alguno con mayor sensibilidad que el bioensayo en ratón, pues éste tiene una sensibilidad de 10 a 20 pg de neurotoxina/mL (102).

Por otra parte, las técnicas moleculares de PCR se han venido adaptando para establecer la secuencia genética de los principales serotipos de toxinas. Campbell y cols. (14) describieron un método para detectar las secuencias génicas asociadas a los tipos A, B, E, F y G; el procedimiento se basa en la amplificación específica de un fragmento del gen de la BoNT, utilizando *primers* complementarios a los nucleótidos que codifican para las regiones conservadas en la cadena pesada de la molécula; dichos segmentos son más específicos que los relacionados con la cadena ligera y la técnica general es más rápida que el bioensayo en ratón y representa una alternativa diagnóstica; empero, Franciosa y cols. (32) señalan que la presencia de genes tóxicos sin expresarse limita a la PCR para investigar el botulismo y para identificar cepas desconocidas, sin embargo, parecen obtenerse resultados confiables en la tipificación de los tipos A y E. De cualquier manera, también estos autores subrayan que los métodos moleculares deberán sustituir a los que se han venido empleando como referencia.

Wictome y cols. ajustaron un ensayo de ELISA con anticuerpos monoclonales (102) para detectar BoNT B en comestibles; aquellos reportan que dicha prueba posee una sensibilidad mayor que el bioensayo en ratón, por lo que reduciría los tiempos y requerimientos destinados a la validación de productos

alimenticios. Así mismo, en Japón se desarrolló una PCR para detectar la presencia de neurotoxina botulínica tipo E en productos del mar (61).

Diagnóstico diferencial

Comúnmente, el botulismo es confundido con otros padecimientos que causan parálisis, incluidos el síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis, aplopejía y diversas infecciones del sistema nervioso central (SNC); sin embargo, la epidemiología y algunos síntomas característicos permiten realizar la diferenciación; por ejemplo, en EUA, esta enfermedad es más frecuente que el síndrome de Guillain-Barré y que la poliomieltis, además difiere del resto en el hecho de que la parálisis craneal nerviosa es muy fuerte en comparación a la debilidad e hipotonía debajo del cuello, en su simetría y en la ausencia de daño nervioso sensorial (3).

En ocasiones, el electromiograma permite distinguir entre las diferentes causas de parálisis flácida aguda (52), además de que el líquido cefalorraquídeo (LCR) presenta un aspecto muy normal en el botulismo, pero no en las enfermedades del SNC (16).

En la prueba de cloruro de edrofonio, se administra dicha sustancia que impide la destrucción de la acetilcolina, lo que produce una rápida mejoría de los síntomas; cabe mencionar que éstos vuelven a aparecer posteriormente, ya que el reactivo implicado no elimina la toxina, sino impide

momentáneamente sus efectos (50, 52); además, es necesario considerar que la prueba también da positiva en pacientes con miastenia gravis (3).

vii) Tratamiento

Debido a que el botulismo corresponde a una intoxicación, los tratamientos basados en la administración de antibióticos no resultan efectivos; de hecho, ningún antídoto actual detiene la parálisis cuando ésta ya ha ocurrido. Lógicamente, la aplicación de antitoxinas puede disminuir el progreso y la gravedad de la enfermedad, a condición de que se proporcione al paciente en cuanto se sospecha de botulismo, ya que sólo puede neutralizar a la toxina que aún se encuentra en circulación (antes de que esta última se una a las terminales nerviosas). En EUA, el CDC posee antitoxina trivalente autorizada, preparada con anticuerpos dirigidos contra los tipos de mayor incidencia (A, B y E); en caso de que la intoxicación sea debida a algún otro serotipo, podría utilizarse una antitoxina heptavalente que aún tiene bajo investigación la armada de ese país (3).

En las personas adultas, la terapia se basa en antitoxina de origen equino, lo que implica posibles reacciones de hipersensibilidad; por tal motivo, antes de la administración se reta a los pacientes con pequeñas cantidades antes de aplicar la dosis completa; los pacientes que presenten una roncha, deben ser desensibilizados 3 a 4 h antes del suministro de la antitoxina restante; ésta se administra lentamente por vía intravenosa, observando cuidadosamente al

enfermo y teniendo difenidramina y epinefrina a la mano, para aplicarlas en caso de alguna reacción adversa (3). Por otro lado, el CDC señala que un vial de 10 mL de antitoxina trivalente puede ser suficiente para neutralizar la concentración de toxina en el suero y no requiere de refuerzos posteriores, debido a que su vida media es de 5 a 8 días (16).

Generalmente, la antitoxina de caballo no se utiliza en infantes, debido a que éstos corren mayores riesgos de experimentar una respuesta de hipersensibilidad; en EUA se emplea la antitoxina de origen humano, la cual también resulta adecuada para adultos alérgicos a las proteínas equinas (3, 30).

Otras medidas terapéuticas adicionales consisten en el apropiado cuidado del paciente con ventilación mecánica, alimentación parenteral, tratamiento oportuno de las infecciones secundarias; vigilancia constante por si ocurren fallas respiratorias, disminución en los reflejos asociados a la masticación, al estornudo y al toser, acceso tusígeno, así como controlar las secreciones orofaríngeas y revisar continuamente la función cardíaca (80).

En los casos de intoxicación alimentaria, cuando el alimento fue ingerido poco antes se provoca el vómito y se realiza un lavado de estómago previo a la administración de la antitoxina; en caso de que ya hayan transcurrido días, se proporciona algún purgante y se realizan lavativas. Por lo que respecta al botulismo asociado a contaminación de heridas, se practica un debridamiento

con irrigación y se administra penicilina, tetraciclina o cloranfenicol, con el objeto de evitar que continúe la producción de toxina¹⁸ (80); finalmente, en cuanto al botulismo infantil, los antibióticos sólo se emplean para tratar las infecciones secundarias, ya que la lisis de las bacterias botulínicas podría incrementar el nivel de toxina (16).

viii) Prevención

El control del botulismo se basa principalmente en la destrucción térmica de las esporas, para evitar la transformación de éstas en bacilos y, por lo tanto, el desarrollo bacteriano en los alimentos (26).

Adicionalmente, en virtud de que muchos de los brotes de botulismo se deben a la ingestión de alimentos preparados, envasados y almacenados en casa, es necesario informar a la gente acerca de las precauciones correspondientes: El lavado correcto de manos, frutas y verduras, el tratamiento térmico con sistemas a presión adecuada y la conservación en vinagre (*C. botulinum* no crece a pH menor a 4.6) o mediante el agregado de sal (52).

Aunque la toxina botulínica es muy potente, se puede destruir fácilmente mediante calentamiento, por lo que es recomendable la completa cocción de las conservas caseras y de los alimentos empacados, antes de ser ingeridos;

¹⁸ Los antibióticos aminoglucósidos y la clindamicina están contraindicados debido a que pueden aumentar el bloqueo neuromuscular.

temperaturas de 85°C durante cinco minutos suelen ser suficientes para descontaminar alimentos o bebidas. Por otra parte, es preciso tomar en cuenta que el botulismo infantil se ha relacionado con la ingestión de miel, lo que sugiere no proporcionar ese alimento a los menores de un año de edad (40, 60).

Actualmente, los alimentos comercializados casi no se han asociado a brotes de botulismo, merced al estricto control en el envasado y en los procedimientos industriales; sin embargo, es importante observar las características de los productos y desechar los que no presenten el aspecto adecuado; además, por seguridad, es conveniente hervir o calentar los alimentos por varios minutos, después de haber abierto sus respectivos empaques. Cabe mencionar que la refrigeración de los alimentos no inhibe el crecimiento y la producción de toxinas en las cepas no proteolíticas de *C. botulinum*.

La cantidad de toxina ingerida en la intoxicación por alimentos es tan pequeña, que generalmente resulta insuficiente para inducir la producción de anticuerpos¹⁹. Se han reportado casos de botulismo E y B en una misma persona, lo que indica que la exposición repetitiva no induce una inmunidad de largo plazo y que, por lo tanto, para prevenir es necesario activar la inmunidad mediante toxoide (85).

¹⁹ No se conoce con exactitud la cantidad de toxina que se requiere para inducir la elaboración de anticuerpos en humanos (85).

En este contexto, existe una vacuna antibotulínica constituida por toxoide pentavalente adsorbido en sulfato de aluminio o en adyuvante de Freund, pero aquélla sólo se administra a personas relacionadas con el manejo del microorganismo o sus toxinas, así como a los militares, ya que no se trata de una enfermedad muy frecuente y el inmunógeno puede desencadenar reacciones secundarias. El producto se aplica en dos dosis separadas por 10 semanas y un refuerzo adicional doce meses más tarde (80); dicha vacuna únicamente brinda protección durante algunos meses, por lo que posteriormente es inefectiva y se pretende sustituirla en el corto plazo por un producto recombinante aún en proceso de prueba (3).

ix) Epidemiología

Las personas de cualquier edad y sexo son susceptibles al botulismo y los brotes generalmente dependen de la incidencia de cada tipo serológico en las diferentes zonas geográficas; por ejemplo, las esporas del tipo A predominan en el oeste de EUA, así como en Brasil, Argentina y China; las del B en la parte este de EUA, en Gran Bretaña, Polonia, Checoslovaquia, Hungría, Yugoslavia, Alemania, Bélgica, Francia, Italia, España y Portugal; las del E en las regiones frías, tales como Alaska, Canadá, Groenlandia, los países escandinavos, la ex-Unión Soviética, Irán y el norte de Japón, predominando como alimento más dañino el pescado y los mamíferos acuáticos (40).

Los tipos C y D se localizan en regiones más cálidas tales como Indonesia y, en cuanto al F, los brotes son realmente muy raros, debido a que casi no está presente en el medio ambiente.

Es importante hacer notar que la carne está muy relacionada con casos de botulismo; en Canadá y Groenlandia a menudo ocurren múltiples brotes ocasionados por carne de origen marino y, en Europa (exceptuando a Italia y España), la mayor frecuencia implica al jamón y a las carnes enlatadas. Los vegetales preparados y envasados en casa figuran como fuentes de la intoxicación en EUA, Argentina, España e Italia, en tanto que China es afectada por vegetales fermentados (40).

En EUA ocurrieron 135 brotes de botulismo entre 1980 y 1996, la mayoría de los cuales se debió al tipo A, seguido por el B, E, F y un 3 % de origen desconocido (3); con respecto al botulismo infantil, en 1996 se reportaron más de 80 casos en ese mismo país (40).

Con respecto a México, no hay información suficiente acerca de la epidemiología, se presume que son pocos los casos, sin embargo, la incidencia podría ser mayor, ya que muchos de los casos son mal diagnosticados o no se reportan, debido a que probablemente muchos de ellos ocurren en zonas rurales, en donde no se cuenta con la atención médica adecuada.

II. *Clostridium tetani*

i) Características microbiológicas

C. tetani es un bacilo largo y delgado que, por lo general, mide 0.3 a 0.6 μm de ancho por 3 a 12 μm de longitud (79); en los cultivos jóvenes es Gram positivo, no capsulado, presenta una gran movilidad por flagelos peritricos²⁰ aunque, posteriormente, éstos desaparecen y se desarrolla una espora redonda con localización terminal y con un diámetro mayor al del ancho del bacilo, lo que le confiere el aspecto de palillo de tambor. En cuanto su agrupación, el microorganismo tiende a formar cadenas largas enroscadas (38).

El bacilo del tétanos es anaerobio estricto, gelatinasa positiva, ureasa, lipasa y lecitinasa negativas, su actividad sobre la leche, el indol y el ácido sulfhídrico es variable y no fermenta carbohidratos (67); además, no es proteolítico ni sacarolítico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y crece bien a pH de 7 a 7.5; de hecho, su desarrollo se inhibe a pHs menores de 6.4 o mayores de 9.2.

Su índice de esporulación varía dependiendo de la cepa y de la composición del medio de cultivo; generalmente, el proceso inicia a las 24 h y continúa durante 4 a 12 días, sobre todo a pH de 7 o superior y a temperaturas

²⁰ Cabe mencionar que algunas cepas no son flageladas y, por lo tanto, carecen de movilidad.

aproximadas de 37°C, es decir, no se lleva a cabo a altas temperaturas y es muy pobre cuando el pH es menor de 6; las esporas pueden soportar moderadamente el calor: 75 – 80°C por 10 minutos pero, por lo regular, se destruyen a 100°C después de 1 h. Cabe señalar que también son resistentes a la desecación y a los desinfectantes (79).

Con relación al cultivo de esta especie, éste puede efectuarse en cualquier medio sintético, aunque requiere de vitaminas y ácido oleico, nutrientes que suelen encontrarse en agar sangre o caldo con carne cocinada; en el primero, las colonias son un tanto elevadas, semitranslúcidas, grisáceas, con bordes irregulares, que evidencian *swarming*, e inclusive, una débil β hemólisis. Por su parte, en caldo con carne cocida se detecta una escasa proliferación a las 48 h, sin que ocurra digestión de la carne (60).

En agar lactosa yema de huevo y leche, no se observa opalescencia, proteólisis o fermentación de la lactosa; así mismo, una de sus características distintivas en medios que contienen gelatina o agar, consiste en la generación de anhídrido y metilmercaptano, lo que ocasiona olor desagradable.

Produce en cantidad considerable acetato y butirato y, en menor proporción propionato (62).

Los medios adecuados para la síntesis de la toxina tetánica requieren de condiciones muy especiales; por ejemplo, es importante ajustar los niveles de sales de hierro y considerar que una abundante proporción de ciertos aminoácidos (glicina e histidina) y el exceso de nitrógeno llegan a reprimir la elaboración (85, 94). Al igual que la neurotoxina botulínica, la tetánica (TeNT) se produce en mayor cantidad en cultivos no esporulados (85).

ii) Importancia clínica

El bacilo del tétanos está ampliamente distribuido en la naturaleza; se localiza en el intestino de numerosos animales y puede permanecer durante mucho tiempo en el ambiente, por lo que la materia fecal y las muestras de suelo suelen contenerlo. Además, las esporas logran sobrevivir varios años en el polvo y otros materiales (64).

C. tetani produce la neurotoxina causante del tétanos, denominada tetanospasmina, la cual bloquea la inhibición de la transmisión muscular; es decir, las neuronas desinhibidas envían impulsos a todos los sectores de la médula espinal, lo que conduce a la aparición de convulsiones generalizadas, pero también puede interferir con la propagación de los impulsos nerviosos, produciéndose espasmos incontrolables y parálisis (64).

El tétanos se presenta principalmente a partir de heridas contaminadas por esporas, en las cuales se generan las condiciones adecuadas para la

reproducción de los bacilos y la elaboración de la toxina. Al parecer, ésta no causa intoxicación alimentaria, ya que no es estable en el tracto intestinal, debido a que no posee proteínas que la protejan (como en el caso de la neurotoxina botulínica (96)); no obstante, existen reportes en los que se indica que, cuando el microorganismo logra colonizarlo, pueden tener lugar graves consecuencias tales como incapacidad neurológica y del desarrollo, e inclusive, autismo (30, 58).

Rethy and Rethy estiman que la dosis letal de la tetanospasmina en humanos es aproximadamente de 500 pg/kg; que sería alrededor de 25 ng en un adulto de 70 kg (28).

El periodo de incubación de la enfermedad varía entre 3 y 21 días o hasta algunos meses, pero generalmente es de una semana; ello depende de la cantidad de toxina producida: Entre más pequeña sea la elaboración, mayores serán el periodo de incubación y la esperanza de sobrevivencia. El lapso que transcurre entre la aparición del *trismus* (la imposibilidad de abrir la boca a causa del espasmo de la musculatura masetera) y el inicio de los espasmos generalizados se conoce como periodo de comienzo y, cuando éste es breve, también tiene un mal pronóstico (75). Un tiempo de incubación menor a nueve días y un periodo de comienzo inferior a 48 h, se asocian a una enfermedad más severa (38).

El tétanos se ha clasificado en dos tipos clínicos: Local y generalizado.

Tétanos local. Esta forma es poco común, la enfermedad se limita al lugar en donde se localiza la lesión o la puerta de entrada y se caracteriza por dolor, hormigueo y rigidez en los músculos cercanos, debido a que la toxina se fija a la zona medular inervada; no obstante, cabe mencionar que el cuadro puede progresar hasta tétanos generalizado. Frecuentemente, esta variante se asocia a heridas de guerra en las que se ha administrado antitoxina profiláctica y en las personas que han recibido toxoide en cantidades insuficientes para generar inmunidad completa (64).

El tétanos cefálico entra dentro de esta categoría, pues se origina después de heridas situadas en la cabeza o relacionadas con infecciones óticas (cuando *C. tetani* está presente en la flora del oído medio) (51). El tiempo que precede a la aparición del *trismus* es usualmente corto –de 1 a 2 días–; los pares craneales sufren disfunción (comúnmente el séptimo nervio craneal), lo que ocasiona parálisis facial y disfagia, pero no suelen observarse espasmos generalizados. En estos casos, el pronóstico es muy malo.

Otra forma clínica posible es la toracoabdominal (80).

Tétanos generalizado. Es el tipo más común, habitualmente se produce 7 a 21 días después de ocasionada la herida y, por lo regular, ocurre de forma descendente, manifestándose inicialmente por *trismus*, disfagia y rigidez, con dolor de cuello, espalda y abdomen; posteriormente, se presentan los espasmos y, secuencialmente, la denominada "risa sardónica", en la que se contraen los músculos faciales, particularmente el risorio de Santorini. Así

mismo, puede tener lugar el opistótonos (posición rígida con el dorso arqueado sosteniendo el peso del cuerpo con la cabeza y los talones), que se debe a la afectación de los músculos del tronco y las extremidades; surgen convulsiones tónicas, intermitentes, repentinas (a veces aparecen espontáneamente o por estímulos externos como luz, ruido, etc.), muy intensas, generalizadas y sin coordinación, lo que llega a ocasionar dolor, agotamiento o hasta fracturas. Los músculos suelen quedar contraídos por bastante tiempo y, en caso de que se afecten los respiratorios, el paciente puede perder la vida por fallo respiratorio. En la etapa terminal llegan a registrarse temperaturas muy elevadas hasta de 44.5°C (38).

Algunas veces ocurren signos de disfunción simpática, tales como hipertensión arterial, taquicardia, diaforesis (transpiración abundante y perceptible), espasmo laríngeo, hipertermia y retención urinaria, sobreviniendo la muerte, principalmente por fallo cardíaco o alteraciones pulmonares.

El tétanos neonatal corresponde a una forma de tétanos generalizado, que se presenta en bebés no inmunizados pasivamente –debido a que la madre no es inmune–, por contaminación del ombligo al momento del nacimiento. El periodo de incubación es corto y los síntomas se presentan generalmente a tres días de la exposición, intensificándose a los seis o siete días; por tal motivo, se le conoce como "la enfermedad del séptimo día" (45), observándose dificultad para succionar, seguida por rigidez del cuerpo y espasmos generalizados; la risa sardónica persistente es muy característica y

el espasmo laríngeo ocurre con prontitud, por lo que el niño presenta incapacidad para deglutir; los espasmos en los músculos respiratorios pueden conducir a la apnea y el aumento de la presión intraabdominal causa vómito e incrementa la posibilidad de aspirar contenido gástrico. Otras complicaciones incluyen la neumonía por aspiración, sepsis, atelectasia (colapso de los alvéolos pulmonares) y falla renal, entre algunas otras (45).

iii) Patogenicidad

Clostridium tetani posee poca capacidad invasiva (por lo que rara vez aparece celulitis) y la infección suele permanecer localizada en el tejido desvitalizado, ya sea en alguna herida, quemadura, lesión, cordón umbilical, suturas quirúrgicas, etc., en donde se depositaron las esporas. La transformación de estas últimas en bacilos y la producción de la toxina, se favorece por la existencia de tejido necrosado, sales de calcio e infecciones piógenas acompañantes, lo que conlleva a un bajo potencial de óxido-reducción (60).

La toxina ingresa primariamente al sistema nervioso vía las terminales presinápticas de las neuronas motoras bajas, en donde puede provocar falla local de la transmisión neuromuscular, hidrolizando a la sinaptobrevina, proteína implicada en la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana postsináptica, para la liberación de los neurotransmisores. Posteriormente, se transporta retroaxonalmente (en dirección opuesta a los impulsos nerviosos), llega a los cuerpos celulares de las neuronas cerebrales y de la médula

espinal, y se difunde hacia las terminales de las células inhibitorias, en donde impide la liberación de neurotransmisores inhibidores tales como el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina (69).

En tal sentido, se puede establecer que la toxina ejerce su acción sobre varios sitios:

- 1) Sistema nervioso central. Además de actuar en las sinapsis de las neuronas inhibitorias, interfiere con la síntesis proteica en el cerebro y disminuye el umbral de reflejos, en el cual las neuronas inferiores están involucradas, induciendo la susceptibilidad a los espasmos reflejos y convulsivos; además, en la médula espinal altera la actividad de los reflejos polisinápticos, que generan contracciones de tipo tónico en los grupos musculares, e inhiben los músculos antagonistas.
- 2) Placas motoras terminales. La toxina bloquea la liberación de acetilcolina²¹, tanto en el músculo esquelético como en los músculos con nervios parasimpático-colinérgicos.
- 3) Sistema nervioso autónomo. Éste es afectado, manifestándose hipertensión arterial, taquicardia, diaforesis (transpiración abundante),

²¹ La transmisión excitatoria también resulta afectada pero, al parecer, la toxina muestra mayor afinidad por los sistemas inhibitorios (69).

aumento de catecolaminas en orina, vasoconstricción periódica y arritmias cardíacas.

iv) Determinantes de patogenicidad de *C. tetani*

C. tetani presenta cinco componentes con capacidad inmunogénica: El antígeno somático (O), que es único y se puede detectar por inmunofluorescencia directa; el antígeno flagelar (H), correspondiente a una proteína termolábil mediante la cual se divide a la especie en diez serotipos; el antígeno esporal, también exclusivo y lábil al calor; la tetanospasmina o neurotoxina, de la cual sólo se ha encontrado un serotipo (a diferencia de *C. botulinum*) y, por último, la tetanolisina, que manifiesta semejanza antigénica con las hemolisinas oxígeno-lábiles de estreptococos, neumococos, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sporogenes*, etc (60).

C. tetani produce tres toxinas: La tetanospasmina o toxina espasmogénica, la tetanolisina y la denominada "toxina no espasmogénica". En cuanto a la primera, se trata de la toxina responsable de todos los síntomas del tétanos. Por su parte, la tetanolisina es una hemolisina oxígeno-lábil reversible perteneciente a la familia de citolisinas activadas por tiol, que consiste de una sola cadena polipeptídica de 48 kDa y lisa una gran variedad de células tales como eritrocitos, leucocitos, macrófagos, fibroblastos y células HeLa; su actividad citolítica es inhibida por agentes oxidantes, colesterol y otros esteroides (79). Por último, la "toxina no espasmogénica" ejerce cierta acción

sobre las placas motoras periféricas, pero su papel aún no se ha establecido con claridad (60).

Es posible que *C. tetani* cuente con mayor capacidad que *C. botulinum* para colonizar heridas, debido a que la hemolisina le permite procurarse hierro y algunos otros nutrientes necesarios para su crecimiento; es decir, su papel podría resultar importante en la infección, aunque ello no soslaya la posibilidad de que otros factores de virulencia participen en el proceso (30).

El gen estructural que codifica para la toxina tetánica se localiza en un plásmido de 75 kb y su expresión es regulada positivamente por el gen *tetR*; el producto de este gen posee una masa molecular de aproximadamente 21,562 Da, consiste de 178 aminoácidos, se localiza corriente arriba del gen para la toxina tetánica, su sobreexpresión induce el incremento de la cantidad de tetanospasmina y está relacionado con otros genes reguladores del género *Clostridium*, tales como el *uviA* en *Clostridium perfringens* y el *txeR* de *Clostridium difficile*; además, presenta una secuencia muy similar a la del gen *botR*, sobre todo al del tipo A, por lo que se cree que los mecanismos de regulación son comunes en *C. botulinum* y *C. tetani* (70).

La tetanospasmina se sintetiza en el citosol bacteriano sin presentar alguna secuencia líder y se libera al medio externo después de la lisis celular. Su estructura y modo de acción son semejantes a los de la neurotoxina botulínica, se produce como una cadena individual que se activa vía la acción

de proteasas presentes en el medio, lo que da lugar a dos cadenas: L y H, unidas por un puente disulfuro y por enlaces no covalentes (66, 85). A diferencia de la BoNT, la toxina tetánica no se asocia a proteínas no tóxicas ni forma complejos (70, 85, 96). La longitud de las cadenas polipeptídicas es de aproximadamente 1,315 residuos de aminoácidos y su extensión exacta depende del sitio en el que ocurre la escisión proteolítica; la cadena L está integrada por alrededor de 449 residuos y, la H, por 857. Al igual que en la neurotoxina botulínica, la región amino terminal de la cadena L se encuentra unida a un átomo de zinc; por su parte, la principal diferencia entre la porción carboxilo terminal de la cadena H (dominio de unión) de la TeNT y de la BoNT tipo A reside en la estructura de las asas, lo que sugiere que estos extremos pueden ser los responsables de la unión a diferentes receptores proteicos. La diferencia en cuanto a los mecanismos de acción de ambas toxinas, consiste en que la botulínica bloquea la neuroexocitosis en las terminales periféricas y la tetánica lo hace a nivel de las sinapsis del SNC, situaciones que dependen de sus diferentes receptores, mismos que las dirige hacia rutas distintas (39).

Sin embargo, las dos toxinas presentan una gran homología en la región central del sitio catalítico que contiene el motif de unión a zinc²²: His-Glu-Xaa-Xaa-His (81), en el dominio de translocación (H_N) y en los dos residuos de cisteína que forman el puente disulfuro. Debido a la gran similitud de ambas

²² Es posible que uno o dos residuos laterales aromáticos adicionales, estén presentes alrededor del átomo de zinc (81).

toxinas, se ha sugerido que las dos proteasas dependientes de Zn, provienen de un gen ancestral común (9).

v) Mecanismo de acción de la tetanospasmina

Una vez elaborada y liberada la neurotoxina tetánica, la porción carboxilo terminal de su cadena H se une a los gangliósidos GD_{1b} y GT₁²³ de los nervios periféricos; al parecer, su capacidad para fijar a la tetanospasmina depende del número y posición de los residuos de ácido siálico que poseen. Además, todo indica que dichos gangliósidos influyen en el mecanismo de acción; por ejemplo, en la formación del poro, así como en la internalización y en la presentación de la toxina a su sustrato específico (104).

Es posible que los gangliósidos no constituyan los únicos receptores de la toxina, en virtud de que algunos experimentos han demostrado que las proteínas de la superficie celular pueden participar en la unión; especialmente, las moléculas proteicas de la membrana plasmática parecen establecer numerosas interacciones con los subdominios de unión de la cadena H_C (86).

Herreros y cols. observaron que el H_C de la TeNT interactúa con una glicoproteína de membrana de aproximadamente 15 kDa (p15), que se encuentra anclada a glicosilfosfatidilinositol en diferentes tipos de células

²³ Diversos estudios han demostrado que la tetanospasmina manifiesta una alta afinidad por los polisialogangliósidos G_{T1b} y G_{D1b} y, en menor grado, por los monosialogangliósidos G_{M1} y G_{D1a} (2, 39, 73, 104).

neuronales (43, 44); sin embargo, existen algunas evidencias de que la p15 no representa el receptor neuronal para la toxina, aunque muchos de esos lípidos son importantes para la unión; además, se señala que el colesterol se requiere para la internalización y el transporte intracelular de la toxina (44).

Posterior a la unión, la toxina es internalizada en vesículas endocíticas y se transporta por el interior de los axones de las fibras α (transporte intraaxonal retrógrado o centripeto), mediante un proceso dependiente de los microtúbulos²⁴, y hasta la médula espinal, donde se acumula en la materia gris. Al parecer, la dineína, una proteína también conocida como MAP 1C, está asociada a los microtúbulos y actúa como responsable del movimiento de las vesículas a lo largo de los axones; cabe mencionar que estos endosomas a su vez presentan varias vesículas, son muy heterogéneos y su diámetro es mayor de 150 nm (39).

Finalmente, la toxina se une a receptores aún no identificados, (en las neuronas espinales), se vuelve a internalizar adentro de las vesículas, su cadena L pasa al citosol (81) y provoca el bloqueo presináptico de las células inhibitoras de Renshaw y de las neuronas motoras aferentes del grupo 1a, que manejan la transmisión de GABA y glicina (38, 83).

²⁴ Se estima que la velocidad de transporte intraaxonal ascendente es 75 a 250 mm por día (38, 83).

Un estudio realizado por Najib y cols. demostró que la TeNT es capaz de inducir la inhibición de la salida de serotonina dependiente de sodio, lo que probablemente represente otro punto de afectación involucrado en el mecanismo de acción, en este caso, en un proceso independiente de la parte de la metaloproteasa (76).

Adicionalmente, la TeNT puede migrar transinápticamente, lo que implica su liberación de la primer neurona, su desplazamiento a través de la hendidura sináptica y su ingreso a la terminal presináptica de la segunda neurona, con base en un proceso de endocitosis mediada por receptor (39); de esta manera, pasa de las dendritas de las motoneuronas periféricas a las interneuronas inhibitorias, alterando la liberación de neurotransmisores inhibidores.

La transmisión excitatoria en la médula espinal también puede verse afectada, pero al parecer, ello ocurre en etapas posteriores (86), ya que la toxina muestra una mayor afinidad por las neuronas inhibitorias²⁵; en dicho caso, actúa de forma semejante a la neurotoxina botulínica y a la toxina diftérica: Se forma un canal iónico, gracias a un gradiente de pH (46), ocurre la translocación de membrana y la cadena L se libera hacia el citosol, en donde hidroliza a la sinaptobrevina o VAMP, en el péptido de unión Gln-76-Phe-77 (como ocurre con la BoNT B); ésta corresponde a un componente membranal

²⁵ La TeNT es aproximadamente 2,000 veces más tóxica en los centros nerviosos inhibitorios que en las sinapsis periféricas y es cerca de 1,000 veces menos tóxica que la toxina botulínica A en la unión mioneural (85).

de las vesículas sinápticas, esencial para que ocurra la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica, inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitatorios tales como la acetilcolina (23). Es probable que las neurotoxinas botulínica y tetánica no sólo hidrolicen péptidos cortos, sino que reconozcan los residuos que rodean al péptido o la estructura terciaria de sus "blancos" (81).

En los incisos a) y b) de la figura 3 se muestra el mecanismo normal de liberación de los neurotransmisores y su inhibición causada por las toxinas botulínica o tetánica:

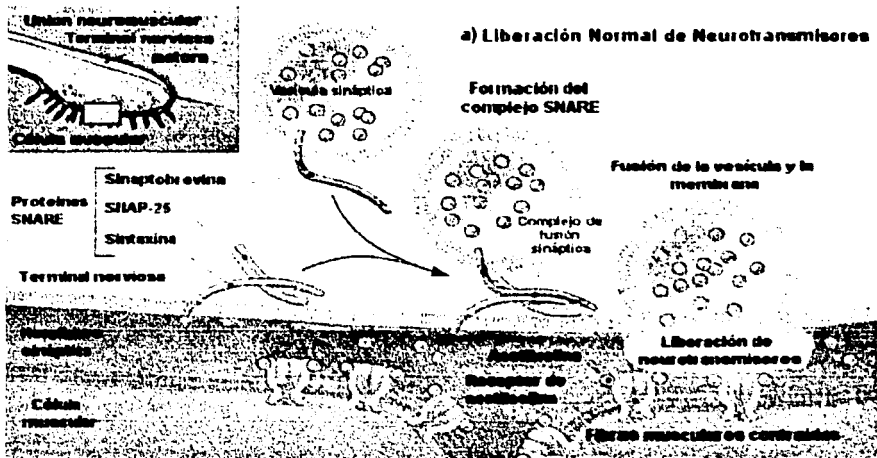


Figura 3a. La fusión del complejo sináptico permite que las vesículas sinápticas conteniendo acetilcolina se unan a la membrana celular neuronal, para llevar a cabo la liberación del neurotransmisor (3).

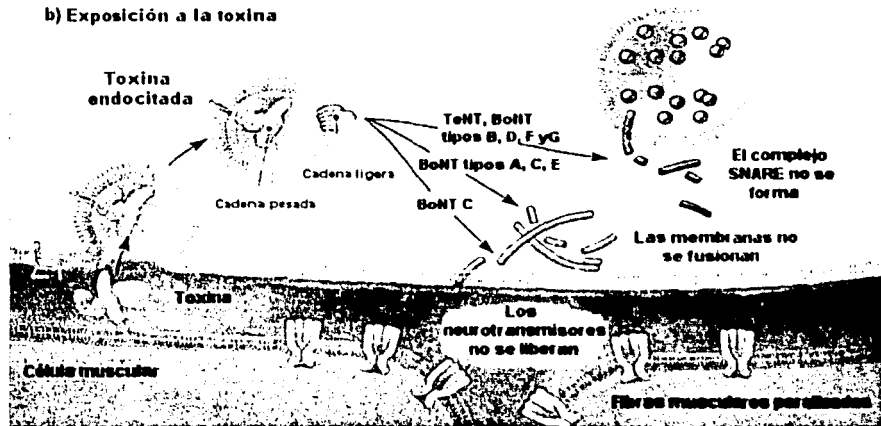


Figura 3b. La unión de la toxina botulínica o tetánica a la membrana celular neuronal de las terminales nerviosas, ocasiona la hidrólisis de los componentes del complejo SNARE, impidiendo la fusión de las membranas y la posterior liberación de neurotransmisores (3).

vi) Diagnóstico del tétanos

Tal como ocurre en el caso del botulismo, el diagnóstico del tétanos se basa principalmente en la aparición de signos clínicos tales como la rigidez y el espasmo de los músculos de la mandíbula (*trismus*), la parálisis del cuello y de otros músculos, seguido por disfagia, irritabilidad, hiperreflexia, así como por antecedentes de alguna herida contaminada (100); por lo tanto, las pruebas de laboratorio sólo se efectúan para confirmar el diagnóstico clínico o para diferenciar la enfermedad del envenenamiento por estricnina (83).

Para realizar el cultivo a partir de una muestra de tejido²⁶, la mitad de éste debe someterse a calentamiento (80°C durante 10 minutos) antes de llevar a cabo la siembra, con el fin de eliminar a la flora acompañante; sin embargo, el cultivo anaerobio de esta clase de especímenes es poco útil porque, aunque se lleve a cabo cuidadosamente, los resultados suelen ser negativos; además, en caso de ser positivos, ello no asegura que la cepa posea el plásmido responsable de la toxina, o incluso, puede tratarse de algún paciente que no presente tétanos debido a que cuenta con la inmunidad adecuada²⁷ (69). Por lo tanto, si se aísla a *C. tetani* es necesario verificar la producción de toxina y neutralización con antitoxina, lo cual aún continúa realizándose mediante la inoculación de ratones; de cualquier manera, no debe esperarse al resultado de estas pruebas para administrar la antitoxina al paciente. En ocasiones, la electromiografía llega a ser útil, sobre todo cuando no se ha localizado puerta de entrada alguna.

La enfermedad debe diferenciarse de otras infecciones agudas del SNC, de reacciones distónicas provocadas por medicamentos neurolépticos y de intoxicaciones por estrocnina; en este último caso, las convulsiones se distinguen por el hecho de que el paciente se mantiene flácido durante los

²⁶ Es necesario señalar que no siempre que se detecta a *C. tetani* en una lesión tiene lugar el tétanos clínico, ya que puede tratarse de una simple contaminación; además, en la mayoría de los casos de la enfermedad no se logra aislar al microorganismo de la puerta de entrada, sobre todo cuando la herida es muy pequeña y pasa desapercibida, o bien, porque ha pasado demasiado tiempo desde que se produjo la lesión y ésta no se llega a localizar (60).

²⁷ La mayoría de los pacientes con tétanos no posee un nivel detectable de anticuerpos, pero algunos reportes indican que aún personas con una concentración protectora (0.01 UI / L), llegan a presentar la enfermedad (38, 69).

intervalos entre ellas, mientras que, en el tétanos, aquél permanece con contractura. Por su parte, en la rabia se manifiestan espasmos localizados en la faringe y en el cuello, además de la característica aerohidrofobia. El *trismus* es un signo que también puede aparecer debido al uso de fenotiacidas, en los abscesos faríngeos, en la adenitis cervical, en procesos inflamatorios de la boca y encías, y en artritis temporomaxilar (la cual es muy rara).

La detección de niveles elevados de aldolasa, creatino-cinasa y otras enzimas musculares no es específica, pues también pueden evidenciarse en distrofias musculares o lesiones necróticas de otros órganos (64).

vii) Tratamiento

En primera instancia, debe ponerse atención en la ventilación y oxigenación de las vías aéreas y, enseguida, practicar la inmunización pasiva con inmunoglobulina tetánica. En ese sentido, se puede pasar un tubo oro-traquealmente y otro de alimentación, después de que la persona se encuentra sedada, aunque puede ser necesaria una traqueostomía para evitar causar espasmos (38); éstos últimos se controlan colocando al paciente en una habitación tranquila y oscura -para impedir los estímulos auditivos y visuales-, e inclusive, administrándole tranquilizantes y miorelajantes tales como el meprobamato, el fenobarbital y, sobre todo, el diazepam, el cual actúa como agonista del GABA (ácido gamma aminobutírico), pero además, antagoniza indirectamente a la toxina, lo que reduce la ansiedad, promueve la

relajación muscular y previene los ataques. La dosis usual es de 10 a 30 mg cada 8 h, aunque puede ser necesario elevarla hasta 40 mg/h (83). Si los espasmos musculares llegan a ser muy severos e interfieren con la ventilación se suministra una parálisis terapéutica usando bromuro de pancuronio o metocurina.

Por otra parte, la hiperactividad del sistema simpático se puede contrarrestar con bloqueadores β y α -adrenérgicos, mediante bloqueo epidural (sobre o por encima de la duramadre), o bien, con infusiones de sulfato de magnesio.

Otras medidas de soporte pueden incluir a los anticoagulantes para prevenir las embolias pulmonares, al sucralfato para el daño gastrointestinal, a los antibióticos para erradicar infecciones establecidas y a una diálisis si ocurre falla renal secundaria. Además, es conveniente que el paciente esté cobijado adecuadamente si hay hipotermia y, desde luego, es muy importante el debridamiento de la herida y la remoción de cualquier cuerpo extraño, para eliminar el tejido muerto y las bacterias, y para reestablecer la circulación e incrementar el potencial óxido-reducción. El tratamiento con penicilina G se emplea para prevenir complicaciones infecciosas, con dosis de 1 a 10 millones de unidades por día, sin embargo, algunos estudios indican que no es muy recomendable dicho antibiótico, ya que su estructura es muy similar al GABA y podría actuar como su antagonista competitivo; aunque no cruza la

barrera hemato-encefálica, pero en dosis muy altas acumuladas, puede causar hiperexcitabilidad del SNC (28).

El metronidazol representa una medida segura, en virtud de que su administración rectal se asocia a una rápida biodisponibilidad y origina menos espasmos que las repetidas inyecciones intravenosas o intramusculares; la dosis rectal recomendada es de 400 mg cada 6 h y la intravenosa es de 500 mg en los mismos lapsos, durante 7 a 10 días. Otras alternativas son la eritromicina, tetraciclina, vancomicina, clindamicina, doxiciclina y cloranfenicol (28).

La inmunoglobulina tetánica humana (ITH) puede disminuir la intensidad o la duración del tétanos, ya que neutraliza a las moléculas de toxina que aún no se han unido a su "blanco"; se recomiendan dosis totales de 3,000 a 10,000 unidades por vía intramuscular, repartidas en tres aplicaciones, aunque 500 unidades pueden resultar suficientes; el empleo intratecal (en el espacio subaracnoideo) de la ITH parece no ser efectivo (69).

En el caso de no contarse con inmunoglobulina humana es adecuado administrar una sola dosis de suero equino²⁸. En adultos son recomendables 100,000 a 200,000 unidades, repartidas por mitad, vías intramuscular e

²⁸ Las pruebas de sensibilidad se realizan previamente, inyectando intradérmicamente 0.2 mL de antitoxina diluida 1:100; la lectura se efectúa después de 30 minutos; en caso de sensibilidad, se aplican 0.2 mL de antitoxina 1:1000 y se duplica la dosis cada media hora hasta llegar a 1:125, 1:50 y 1:10.

intravenosa, pero es indispensable mantener en observación al paciente, previendo que lleguen a presentarse reacciones tardías de hipersensibilidad (64).

Actualmente, se ha diseñado ITH sintética *in vitro* que puede ser específica para los antígenos, lo que indica la posibilidad de producir anticuerpos seguros, libres de riesgos de infección, fáciles de manejar y de bajo costo. Debido a su pequeño tamaño, es posible que su dominio de unión al antígeno —el fragmento Fab— pueda mostrar un mayor acceso a la toxina y mejorar la eficacia de la neutralización. Si bien los fragmentos Fab se pueden obtener a partir de donadores, la bioingeniería facilitaría su elaboración (28).

Un protocolo adecuado para el tratamiento del tétanos es el siguiente (69):

1. Diagnóstico y estabilización (durante la primera hora posterior a la llegada del paciente).
 - a) Asegurar la ventilación de las vías aéreas; si es necesario, realizar una intubación endotraqueal, usando benzodiazepinas (por ejemplo: vecuronio 0.1 mg/kg) para lograr el bloqueo neuromuscular y la sedación.

- b) Obtener muestras de sangre para detectar el nivel de antitoxinas séricas, descartar la intoxicación por estricnina, determinar electrolitos, nitrógeno ureico, creatinina, creatina cinasa y mioglobina urinaria.

 - c) Señalar la ubicación de la lesión que fungió como puerta de entrada, los periodos de incubación y comienzo, así como la historia de inmunización.

 - d) Administrar, por vía intravenosa, 1 a 2 mg de benztropina o 50 mg de difenhidramina, para descartar alguna reacción distónica hacia alguna sustancia bloqueadora de dopamina.

 - e) Administrar alguna benzodiazepina intravenosamente (diazepam o lorazepam a dosis de 5 mg y 2 mg, respectivamente), para controlar los espasmos y disminuir la rigidez. Al inicio, emplear una dosis adecuada para sedar y minimizar los espasmos reflejos; si llegara a interferir con las vías aéreas, intubar y aplicar un agente bloqueador neuromuscular. Transferir al paciente a una área tranquila y oscura.
2. Fase de manejo temprano (durante las primeras 24 h).
- a) Aplicar intramuscularmente 500 U de inmunoglobulina tetánica humana; si sólo se cuenta con producto equino, hacerlo tomando en cuenta las precauciones necesarias.

- b) En un sitio diferente del anterior, inyectar intramuscularmente 0.5 mL de toxoide tetánico adsorbido o vacuna DPT.

- c) Iniciar el tratamiento con metronidazol, intravenosamente, a razón de 500 mg cada 6 h, durante 7 a 10 días.

- d) Practicar una traqueostomía (previa colocación del tubo endotraqueal y bajo bloqueo neuromuscular), si los espasmos afectan las vías aéreas.

- e) Debridar el tejido necrosado de cualquier herida que exista.

- f) Colocar un tubo nasal, suave y de diámetro pequeño, o bien, un catéter de alimentación, e iniciar esta última.

- g) Administrar benzodiazepinas tal como se haya efectuado para controlar los espasmos y sedar al paciente; si dichos propósitos no se lograron a satisfacción, proporcionar otro bloqueador de mayor duración (por ejemplo, 6 a 8 mg/h de vecuronio). Continuar la sedación con benzodiazepinas (el bloqueo neuromuscular debe suspenderse diariamente, para llevar a cabo el examen físico del paciente y para evitar la acumulación excesiva del medicamento).

3. Fase de manejo intermedio (durante las siguientes 2 a 3 semanas).

- a) Tratar la hiperactividad simpática con labetalol, 0.25 a 1.0 mg/min, (como sea necesario para controlar la presión). Considerar el bloqueo epidural con un anestésico local y evitar los diuréticos para controlar la presión (la disminución del volumen empeoraría la inestabilidad autonómica).
- b) Si existe hipotensión, iniciar la resucitación salina; colocar un catéter en la arteria pulmonar y administrar fluidos, dopamina o norepinefrina, según lo indicado.
- c) En caso de bradicardia sostenida, puede ser necesario colocar un marcapaso.
- d) Administrar heparina.
- e) Si es posible, utilizar una cama de flotación, para evitar daño en la piel y parálisis nerviosa del peroné, de lo contrario, asegurar los cambios continuos de posición.
- f) Si la severidad de los espasmos ha disminuido considerablemente, suspender la administración de benzodiazepinas.

g) Iniciar el plan de rehabilitación.

4. Etapa de convalecencia (durante dos a seis semanas).

a) Cuando casi ya no se presenten los espasmos, empezar la terapia física; en ocasiones llega a requerirse la psicoterapia²⁹.

b) Antes de dar de alta al paciente, aplicar otra dosis de toxoide tetánico o de vacuna DPT.

c) Programar una tercera dosis de toxoide, para 4 semanas después de haberse administrado la segunda.

viii) Prevención

El tétanos se puede prevenir mediante vacunación con toxoide tetánico, debido a que éste induce la formación de anticuerpos que neutralizan la toxina; el toxoide tetánico representa una de las vacunas más antiguas y más utilizadas en todo el mundo, ya que se le reconoce entre las de mayor seguridad y de menor costo.

²⁹ Los pacientes que se recuperan del tétanos, a menudo sufren de consecuencias psicológicas graves; inclusive, pueden desarrollar autismo (30, 69).

La inmunización debe iniciar en el segundo mes de vida, aplicando por vía intramuscular la vacuna triple DPT (los toxoides diftérico y tetánico, así como el extracto antigénico de *Bordetella pertussis*); se administran tres inyecciones con intervalos de por lo menos cuatro semanas (generalmente se aplica a los 2, 4 y 6 meses), después de un año se aplica un refuerzo, otro más antes de entrar a la escuela y, posteriormente, uno cada diez años. Para niños mayores y adultos se emplea un toxoide que contiene menor cantidad del diftérico, en tres dosis, la segunda de las cuales tiene lugar a cuatro o seis semanas de la primera y, la tercera, a seis meses de la segunda (64); en cuanto a las dosis complementarias por década, se recomienda realizarlas a los 15, 25, 35 años de edad, etc.³⁰

Al parecer, la primera serie de aplicaciones de la vacuna DPT aporta una inmunidad al tétanos durante 1 a 3 años, la cuarta dosis confiere una protección por otros cinco años y, con la quinta, el beneficio se extiende hasta por 10 años más (35).

La producción del toxoide constituye un proceso sencillo, en el cual una cepa certificada de *C. tetani* es cultivada en un fermentador, bajo condiciones anaerobias pre-establecidas; durante las últimas etapas de la fermentación y crecimiento, la propia bacteria sufre autólisis y libera la toxina al medio;

³⁰ No se recomiendan refuerzos más frecuentes, ya que puede ocurrir un aumento en la incidencia y severidad de las reacciones adversas locales (51). Además, se ha observado que los adultos que han recibido múltiples inyecciones con el toxoide tetánico llegan a presentar neuropatías en el plexo braquial (36).

cubierta esta etapa, se estandariza su potencia en animales de experimentación, de acuerdo con las regulaciones de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) y, posteriormente, se procede a la inactivación mediante tratamiento químico durante varias semanas de incubación con formaldehído al 0.5 %, la mayoría de los productores comerciales embotellan el toxoide después de adsorberlo con adyuvante de fosfato de aluminio (71).

El toxoide tetánico conserva fácilmente sus propiedades inmunogénicas; es estable y puede permanecer a temperatura ambiente por varios meses y a 37°C durante algunas semanas, sin que ocurran pérdidas significativas en su potencia (53).

Hasta ahora, se elaboran dos tipos de toxoides: El adsorbido a un precipitado de sales de aluminio y el soluble, simple o fluido; sin embargo, aunque ambos se asocian a muy similares índices de seroconversión, en general se prefiere el primero, ya que promueve mayores títulos de anticuerpos y su duración rebasa a la del segundo (51).

El toxoide tetánico también se encuentra disponible en su forma antigénica simple, combinada con el diftérico (Td), para empleo adulto y pediátrico; en realidad, todas las presentaciones muestran proporciones similares de toxoide tetánico, pero el Td para niños y la vacuna DPT contienen 3 ó 4 veces más del diftérico; los menores de 7 años deben recibir cualquiera de estas dos últimas

y, los mayores, el Td para adulto, aún cuando no hayan completado el esquema de vacunación con DPT (53).

Por lo regular, después de las cuatro dosis establecidas para niños menores de siete años o de las tres para las personas mayores, se obtienen niveles de antitoxina superiores a la dosis mínima protectora (0.01 U/mL) (51, 69, 91), para los próximos diez años. De esta manera, el desarrollo de tétanos casi es nulo, ya que se estima que la vacuna sólo falla en cuatro de cada 100 millones de personas, debido posiblemente a la variabilidad antigénica existente entre la toxina y el toxoide o a alguna inmunosupresión selectiva (91).

Algunas pruebas de ELISA y hemaglutinación pasiva resultan de gran utilidad para determinar la cantidad de anticuerpos séricos, pero ambas requieren de personal calificado y de ciertos equipos de laboratorio; en tal contexto, sería oportuno desarrollar ensayos más sencillos, rápidos y económicos, que pudieran estar disponibles en cualquier hospital, para estar en condiciones de evaluar el estado de inmunidad y decidir con mayor seguridad sobre la pertinencia de administrar inmunoglobulina a las personas heridas y asegurar la protección en personas inmunocomprometidas.

El tétanos puede ser eliminado incrementando la inmunización con toxoide tetánico de las mujeres embarazadas y mejorando las condiciones de cuidado neonatal, sobre todo, controlando los alumbramientos en condiciones sanitarias óptimas y con personal capacitado. Además, es conveniente

realizar campañas para que las personas mayores acudan a que se les apliquen refuerzos, debido a que los niveles de anticuerpos disminuyen con el paso del tiempo. En Estados Unidos se recomienda revisar su estado de inmunidad a las personas con 50 años (36).

Otras medidas incluyen la prevención de heridas o su oportuna atención, así como la educación para la salud, con el objeto de concientizar a la población sobre los riesgos del tétanos y la importancia de su prevención.

La OMS sugiere que las mujeres embarazadas, no inmunizadas, provenientes de los países en desarrollo, reciban cinco dosis de toxoide tetánico: La primera al inicio de la gestación, la segunda después de cuatro semanas y, la siguiente, transcurridos 6 a 12 meses de la anterior; esta tercera dosis proporciona una inmunidad de al menos 5 años, ya que se alcanzan niveles de entre 1 y 10 U/mL. Finalmente, el cuarto refuerzo prolonga la protección por 10 años y, con el quinto, la protección persiste durante más de 20 años (35).

Entre las reacciones adversas de la vacuna, destacan las clasificadas como locales: Eritema, induración y dolor en el sitio de inyección (las cuales son comunes y no requieren mayor atención médica); además, puede aparecer un nódulo -que puede durar por varias semanas y generalmente se asocia al toxoide adsorbido- y la fiebre no es muy frecuente. Ocasionalmente, también llega a producirse una hinchazón dolorosa, desde el hombro hasta el codo,

que se manifiesta 2 u 8 horas después de la inyección, principalmente en adultos que han recibido dosis frecuentes. Por último, raramente se observan reacciones sistémicas severas, tales como urticaria generalizada, anafilaxia o complicaciones neurológicas (51).

Evidentemente, cuando se presenta alguna reacción alérgica severa (falla respiratoria aguda o colapso), no es conveniente continuar con el esquema de inmunización; así mismo, cuando se sospeche de que podrán ocurrir respuestas alérgicas, es oportuno realizar una prueba cutánea antes de proceder a la aplicación.

En caso de heridas contaminadas o infectadas presentes en personas con contraindicaciones para el uso del toxoide tetánico, es pertinente efectuar la inmunización pasiva con inmunoglobulina tetánica (51).

Por lo que se refiere a reacciones adversas asociadas a la vacuna DPT, es posible que aquéllas se deban a que el producto contiene células completas inactivadas de *Bordetella pertussis*. A este respecto, algunos investigadores han elaborado proteínas híbridas, fusionando una forma soluble de la toxina pertussis con el fragmento H_C de la toxina de *C. tetani*; las observaciones correspondientes han mostrado que dicho inmunógeno es eficaz y carece de toxicidad (11).

Una nueva generación de vacunas comprende la producción de la parte carboxilo terminal de la toxina tetánica, ya que no es tóxica e induce anticuerpos neutralizantes; de hecho, Marvaud y cols. afirman que es posible realizar una transformación genética de *C. tetani* para producir grandes cantidades de dicho fragmento C (70).

La aplicación de la técnica de microencapsulación también resulta prometedora, ya que reduciría los costos -sólo se administraría una dosis-, mejoraría la cobertura de inmunización y evitaría el abandono del esquema de vacunación. En ese sentido, se ha demostrado que las micropartículas representan sistemas de vacunación efectivos para la liberación de antígenos y que pueden inducir una adecuada respuesta inmune (97). Sin embargo, esta clase de vacunas aún se encuentra bajo investigación (el toxoide tetánico encapsulado en polímeros biodegradables), ya que el procedimiento de preparación suele desnaturalizar al antígeno, además, todavía no se demuestra si el producto es estable ni se han establecido las normas reguladoras y de estandarización (28, 35).

Un estudio reciente comprobó la eficacia de la inmunización oral en animales, utilizando cepas atenuadas de *Salmonella* que expresan el dominio H_C (28). Así mismo, Shi y cols. comprobaron resultados exitosos de una vacuna consistente en un adenovirus recombinante que produce el fragmento H_C, y cuya aplicación es cutánea o intranasal (90).

Cabe mencionar que el tétanos no confiere inmunidad, debido a que la cantidad de toxina producida durante la enfermedad es relativamente pequeña, por lo que es necesario inmunizar activamente a los pacientes convalecientes.

En cuanto a la inmunización pasiva, ésta se lleva a cabo administrando antitoxina tetánica homóloga (humana) o heteróloga (generalmente de origen equino). La primera se produce del plasma de personas hiperinmunizadas con toxoide tetánico; aquél se fracciona y se purifica, lo cual elimina e inactiva a los virus (31), posteriormente se procede a titular con toxina tetánica, comparando con el estándar de antitoxina establecido en E.U.A. y se mide la capacidad de neutralización en unidades internacionales (71).

Debido a que la antitoxina heteróloga se produce en caballos, con cierta frecuencia se llegan a presentar reacciones alérgicas: Desde dolor en el sitio de aplicación, hasta enfermedad del suero o choque anafiláctico. Las dos variantes parecen ser igual de efectivas, pero se prefiere la de origen humano para evitar que ocurran reacciones de hipersensibilidad. La dosis más empleada de antitoxina humana es de 250 U, aplicada intramuscularmente, y su duración aproximada es de 30 días; no obstante, en heridas contaminadas o en personas con escasas inmunizaciones se requieren hasta 500 U. Por lo que respecta al producto equino, es necesaria una cantidad mayor, debido a que su vida media es de sólo 2 a 3 días, ya que se forman complejos inmunes que se excretan rápidamente (38).

Algunos autores afirman que, en respuesta a la vacunación, la formación de anticuerpos se lleva a cabo aproximadamente después del sexto día, por lo que resulta más conveniente administrar inmunoglobulina cuando las heridas están más propensas al tétanos (el periodo de incubación de éste puede ser de tan sólo 3 ó 4 días) (31). Además, el uso de antitoxina es indispensable en personas inmunodeficientes.

Por otra parte, para prevenir el tétanos neonatal, es conveniente que las embarazadas se vacunen durante el sexto mes de gestación, con dos dosis de toxoide, con intervalos de un mes, o bien, con una dosis de refuerzo, si se trata de mujeres previamente inmunizadas.

Cuando se prevé que el bebé podría nacer bajo condiciones inadecuadas a partir de una madre no inmunizada, aquél debe inmunizarse con antitoxina humana dentro de los días siguientes al nacimiento, pero además, también es preciso que la madre reciba el mismo cuidado, antes o durante el parto, ya que se trata de inmunoglobulinas IgG, las cuales pueden atravesar la placenta y conferir protección pasiva al producto. La transferencia de anticuerpos del tétanos depende de la cantidad y calidad de ellos, lo que puede diferir dependiendo del esquema de vacunación seleccionado. Los factores que influyen en el desplazamiento transplacentario de los anticuerpos y los mecanismos implicados en la transmisión de inmunidad desde la madre hasta el hijo aún no han sido investigados extensamente (35).

De cualquier manera, todo indica que la mujer embarazada debe ser vacunada en un sitio distinto del que se empleó para aplicarle la γ -globulina³¹. Al margen de ello, también es necesaria una atención adecuada e higiénica por parte del personal médico, con instrumentos y equipo previamente esterilizados (60).

Un estudio realizado por Parashar demostró que la administración tópica de antibióticos en el cordón umbilical representa una herramienta efectiva para prevenir el tétanos neonatal, sobre todo cuando el parto se lleva a cabo en condiciones no higiénicas (78).

Adicionalmente, es muy importante el cuidado apropiado de las heridas, tratándolas localmente y a tiempo, así como la eliminación de todo cuerpo extraño; en tal sentido, cuando se perciba alguna señal de infección es conveniente eliminar el tejido que presente necrosis, pues ésta promueve las condiciones necesarias para la conversión de las esporas en bacilos. El seguimiento profiláctico se establece con base en la inmunidad de la persona y el grado de avance de la herida. En relación con la primera, los individuos se clasifican como: a) Inmunes, si han recibido tres dosis de toxoide, cada una con intervalos de un mes; b) parcialmente inmunes, cuando se les han aplicado una o dos dosis del toxoide; y c) no inmunes, si nunca fueron inmunizados (45, 64).

³¹ Al parecer, la administración simultánea de antitoxina y toxoide no interfiere en la activación de la respuesta inmune; empero, es conveniente utilizar jeringas distintas y realizar la aplicación en sitios diferentes (38).

En cuanto a las heridas, éstas se dividen en tres categorías: a) Limpias, cuando curan a pesar de su extensión y profundidad, evidencian resequedad y se les ha eliminado el tejido necrosado; b) contaminadas, las que tienen lugar en carreteras, calles, jardines, son puntiformes y se atendieron 12 h después del accidente; y c) infectadas o con alto riesgo de infección, las que presentan signos de infección, las múltiples -tales como las quemaduras- y las asociadas a heridas expuestas.

En todo caso, la administración de antitoxina sólo se recomienda cuando se trata de heridas propensas al tétanos; aquélla no se aplica cuando son limpias, aunque el paciente sea no inmune o parcialmente inmune, ni cuando las heridas severas se presentan en individuos sometidos previamente a algún esquema completo de vacunación o en quienes recibieron un año atrás el último refuerzo (45).

En contraste, los antibióticos deben emplearse indistintamente, excepto cuando el paciente se encuentre inmunizado o la herida sea limpia. Generalmente, se administra penicilina G procaína, intramuscularmente, en dosis de 1,000,000 U diarias, o bien, 600,000 U de penicilina G sódica, cada 6 h, también por vía intramuscular; otras opciones adecuadas son la tetraciclina, a razón de 30 mg/kg/día, durante 4 ó 5 días (exceptuando a los niños menores de ocho años) y, la estreptomycinina, en dosis diarias de 0.5 g. La tabla 3 muestra las medidas profilácticas asociadas a los casos más comunes.

Tabla 3. Recomendaciones profilácticas contra el tétanos en el manejo de las heridas (45, 64).

Tipo de herida	Estado de inmunidad del paciente ^a		
	No inmune	Parcialmente inmune	Inmune
Limpia	<ul style="list-style-type: none"> • 3 dosis de toxoide^b 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 dosis de toxoide 	<ul style="list-style-type: none"> • Nada (si la última dosis de toxoide fue aplicada hace menos de 1 año)
Contaminada	<ul style="list-style-type: none"> • 3 dosis de toxoide • Antitoxina^c • Antibióticos^d 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 dosis de toxoide • Antitoxina • Antibióticos 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 dosis de toxoide
Infectada	<ul style="list-style-type: none"> • 3 dosis de toxoide • Antitoxina • Antibióticos 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 dosis de toxoide • Antitoxina • Antibióticos 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 dosis de toxoide • Antibióticos

CLAVES: a = En caso de desconocer el estado de inmunidad, proceder como si el paciente fuera no inmune; b = a intervalos de 3 a 4 semanas; c = 3,000 a 5,000 U de antitoxina equina ó 250 a 500 U de antitoxina humana; d = Penicilina G procaína, 1,000,000 U/día durante 4 a 5 días, o bien, tetraciclina, 30 mg/kg/día, por 4 ó 5 días.

ix) Epidemiología

Las esporas de *C. tetani* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza³²; por tal razón, aunque el tétanos es prevenible en la mayoría de los casos, dicho padecimiento continúa cobrando varias víctimas, sobre todo en países subdesarrollados en donde se carece de programas de vacunación eficaces y predominan las malas condiciones de higiene y sanidad.

³² Su prevalencia en muestras de tierra fluctúa entre 2 y 23 % (83).

Al margen de ello, la enfermedad es más frecuente en zonas con clima cálido y húmedo, que reúnen las condiciones necesarias para la cría del ganado, ya que en las excretas de este último abundan los bacilos tetánicos; además, algunas labores presentan más riesgo de contraer la afección, destacando en este rubro las de los agricultores, ganaderos, barrenderos, basureros, toreros, etc. (80) y predomina en los varones, quizás por razones ocupacionales. Cabe señalar que, recientemente, se observó que la adicción a la heroína también se asocia a numerosos casos (60).

Generalmente, la fuente de infección incide en alguna herida (cerca del 65 % de las veces) que, en menor proporción, tiene su origen en astillas de madera, piezas de metal o espinas; las ulceraciones crónicas en la piel sólo se encuentran en el 5 % de los casos y, en los restantes, por lo regular no se detectan fuentes específicas (83).

Evidentemente, las personas con tétanos que completaron su esquema de vacunación llegan a presentar cuadros menos severos (36) y, en su mayoría, el padecimiento ocurre en adultos no inmunizados o con historia de vacunación desconocida. De acuerdo con una encuesta epidemiológica realizada en U.S.A., la inmunidad contra el tétanos empieza a disminuir a la edad de 40 años; sin embargo, en la población Mexicana ello se presenta en edades anteriores (37).

Al parecer, la incidencia anual del tétanos es de un millón de casos por año y se presenta en 18 de cada 100,000 personas; el CDC estima que la mayor frecuencia tiene lugar en personas de 60 a 69 años: A esta edad la prevalencia de anticuerpos protectores es menor de 50 % y disminuye hasta 30 % a los 70 años (83), lo que sugiere que la disminución de la inmunidad representa uno de los principales factores de riesgo. Sin embargo, de 1995 a 1997 la distribución de edad entre los casos reportados mostró algunos cambios en E.U.A.: El 60 % de los registros se ubicó en adultos de 20 a 59 años y sólo el 35 % ocurrió en gente mayor de 60 años.

Aparentemente, la razón de dicho cambio se debió a la práctica más frecuente de las inyecciones con droga. Quienes consumen heroína parecen mostrar mayor susceptibilidad al tétanos, particularmente los que se inyectan subcutáneamente con quinina, ya que ésta se emplea para diluir la heroína y favorece el crecimiento de *C. tetani* (51).

En la República Mexicana ocurren cerca de 200 a 300 casos de tétanos al año, predominando la forma neonatal; la enfermedad se presenta más frecuentemente en los estados costeros: En Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco y en las entidades localizadas en el Golfo de México (45). México figura entre los países con tasa media y, afortunadamente, la frecuencia de la afección ha disminuido durante la última década, lo que suele atribuirse a una práctica más generalizada de la inmunización. En 1996 se registraron 165 casos de tétanos en adultos y 64 de tétanos neonatal (64).

El tétanos neonatal ocupa un lugar importante, sobre todo en países en desarrollo, en los cuales cerca de la mitad de las muertes por tétanos son debidas a esta forma (69). Cuando el periodo de incubación de esta forma es menor a tres días, la mortalidad es del 100% (45).

El índice de mortandad en el tétanos leve a moderado aproximadamente es de un 6%, sin embargo, en cuadros severos puede ser de hasta 60%, aún siendo atendidos en centros especializados (69).

x) Utilidad de la toxina tetánica

Debido a la capacidad del fragmento H_C no tóxico para llevar a cabo un transporte retrógrado axonal y transporte transináptico, se ha pensado que aquél puede representar un vehículo útil para conducir moléculas terapéuticas o de diagnóstico hacia el SNC (39, 81); empero, algunos experimentos realizados con la parte carboxilo terminal de la cadena pesada, han sugerido que su capacidad de transportación es muy pobre, lo que puede deberse a su menor afinidad de unión por las membranas neuronales *in vitro*, a su unión con receptores no tan eficientes para el transporte retrógrado o a la falta de contribución de la parte amino terminal o del puente disulfuro para la internalización (66).

Otros estudios revelaron que esta porción no dañina podría competir con el virus de la rabia por la unión a las células neuronales, lo que afectaría la

diseminación viral; en tal contexto, la clonación y expresión del fragmento C proporcionaría la posibilidad de liberar sustancias específicas en el SNC e incrementaría la probabilidad de controlar las infecciones virales (85).

Puesto que, como la BoNT, la toxina tetánica también actúa a nivel periférico, es posible que la combinación de las dos toxinas pudieran resultar útiles para tratar de controlar los desórdenes neurológicos (85).

CONCLUSIONES

- *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani* son clasificados como clostridios neurotóxicos, debido a su capacidad para producir exotoxinas que afectan el sistema nervioso.
- La especie *Clostridium botulinum* comprende a numerosas cepas que causan botulismo, algunas de las cuales presentan propiedades fisiológicas diferentes; con base en esta, la especie se divide en cuatro grupos y, junto con *C. baratii* y *C. butyricum*, tienen lugar seis grupos fenotípicamente distintos aunque capaces de elaborar la neurotoxina botulínica.
- De acuerdo con su especificidad serológica, existen siete tipos (A a la G) de la BoNT; sin embargo, los tipos A, B y E son los que se asocian con mayor frecuencia al botulismo humano, mientras que, el C y D lo hacen a animales; al parecer, el tipo G no ocasiona la enfermedad.
- Las formas más comunes del botulismo son la intoxicación alimentaria, la contaminación de heridas, el botulismo infantil y el botulismo no determinado.

- *C. botulinum* produce tres clases de toxinas: BoNT, C₂ y C₃; las dos últimas son exotoxinas ADP-ribosilantes que modifican a la actina y a las pequeñas proteínas Rho unidas a GTP, pero la patogénesis relacionada con el botulismo únicamente se atribuye a la primera.
- Al igual que en el botulismo, la TeNT es el principal factor de virulencia asociado al tétanos y actúa principalmente a nivel de sistema nervioso central, aunque también puede hacerlo sobre la placa neuromuscular y el sistema nervioso autónomo.
- Las neurotoxinas se sintetizan durante el crecimiento bacteriano, se acumulan intracelularmente (en el protoplasma) y son liberadas hasta que ocurre la lisis bacilar. Se producen como prototoxinas no tóxicas y están constituidas por tres dominios: El catalítico L con actividad de metaloproteasa, el de translocación H_N y el de unión al receptor H_C.
- Los genes estructurales que codifican para la neurotoxina botulínica, se localizan para los tipos A, B, E y F, en el cromosoma bacteriano, para el C₁ y el D en bacteriófagos y, para el G y la TeNT, en un plásmido.
- La BoNT y la TeNT se transportan por la circulación sanguínea y llegan a los gangliósidos de las células nerviosas, en donde se unen e hidrolizan a ciertas proteínas del complejo SNARE encargadas de la

fusión de las vesículas que contienen los neurotransmisores; de esta manera, bloquean la neurotransmisión al impedir la descarga de acetilcolina, sin embargo, la TeNT, también se puede desplazar retroaxonalmente y llegar hasta las neuronas cerebrales, en donde impide la liberación de neurotransmisores inhibidores tales como el GABA y la glicina.

- La diferencia entre los mecanismos de acción de la BoNT —que bloquea la neuroexocitosis en las terminales periféricas— y la TeNT —que hace lo propio a nivel de las sinapsis del SNC—, se debe probablemente a sus diferentes receptores.
- El diagnóstico del botulismo y del tétanos se basa principalmente en las manifestaciones clínicas; las pruebas confirmativas que detectan a las toxinas, continúan dependiendo del bioensayo en ratón, pero el tratamiento debe iniciarse antes de que se obtengan los resultados.
- La principal medida terapéutica asociada al botulismo y al tétanos consiste en la inmediata administración de antitoxina; adicionalmente, es conveniente vigilar y oxigenar las vías aéreas, así como permanecer al cuidado del paciente.

- Debido a que la mayoría de los casos de botulismo se relaciona con el consumo de conservas caseras y alimentos mal cocidos, resulta necesario instruir a la población en relación con la observación de medidas preventivas, tales como el adecuado lavado de las frutas y verduras, la eliminación de las conservas, así como la completa cocción de los alimentos. Además, no es recomendable alimentar con miel a los infantes menores de un año.
- La prevención del tétanos se basa en la aplicación de la vacuna DPT y de los refuerzos con toxoide en las embarazadas y personas mayores, así como la oportuna atención de las heridas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ASC	Agar sangre de caballo
AYH	Agar yema de huevo
BoNT	Neurotoxina botulínica
CBI	Agar para aislamiento de <i>C. botulinum</i>
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
DL₅₀	Dosis letal media (cantidad de sustancia que mata la mitad de un lote de ratones).
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FDA	Administración de alimentos y drogas
Fen	Fenilalanina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
GTP	Guanosin trifosfato
H_C	Fragmento carboxilo terminal de la cadena pesada (dominio de unión al receptor)
His	Histidina
H_N	Fragmento amino terminal de la cadena pesada (dominio de translocación).
Ile	Isoleucina
ITH	Inmunoglobulina tetánica humana
LCR	Líquido cefaloraquídeo

Leu	Leucina
Lis	Lisina
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida
NTNH	Proteína no hemaglutinante y no tóxica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SNAP-25	Proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa
SNARE	Receptor proteico soluble de ataque al NSF
SNC	Sistema nervioso central
TeNT	Neurotoxina tetánica
TPGY	Agar tripticasa-peptona-glucosa-extracto de levadura
VAMP	Proteína de membrana asociada a vesícula

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Aktories K., Bärmann M., Ohishi I., Tsuyama S., Jakobs K. H. y Habermann E.: Botulinum C2 toxin ADP- ribosylates actin. *Nature*, 1986; 322:390-392.
- 2) Angström J., Teneberg S. y Karlsson K.: Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: Evidence for overlapping epitopes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91:11859-11863.
- 3) Aron S. S., Schechter R., Inglesby T. V., Henderson D. A., Bartlett J. G., Ascher M. S., Eitzen E., Fine A. D., Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M. T., O'Toole T., Parker G., Perl T. M., Russell P. K., Swerdlow D. L. y Tonat, K.: Botulinum toxin as a biological weapon, *JAMA*, 2001; 285(8):1059-1070.
- 4) Atlas R. M. y Parks L. C.
HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL MEDIA
2a edición. USA: CRC Press, 1997:321-322, 750, 825-826.
- 5) Aullo P., Giry M., Olsnes S., Popoff M. R., Kocks C. y Boquet P.: A chimeric toxin to study the role of the 21 kDa GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly, *EMBO J.*, 1993;12(3):921-931.
- 6) Barth H., Blöcker D., Behlke J., Bergsma-Schutter W., Brisson A., Benz R. y Aktories K.: Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification, *J. Biol. Chem.*, 2000; 275(25):18704-18711.
- 7) Barth H., Hofmann F., Olenik C., Just I. Y Aktories K.: The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin, *Infect. Immun.*, 1998; 66(4):1364-1369.
- 8) Barth H., Klingler M., Aktories K. y Kinzel V.: *Clostridium botulinum* C2 toxin delays entry into mitosis and activation of p34^{cdc2} kinase and

- cdc25-C phosphatase in HeLa cells, *Infect. Immun.*, 1999; 67(10):5083-5090.
- 9) Blasi J., Chapman E. R., Yamasaki S., Binz T., Niemann H. y Jahn R.: Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/ syntaxin, *EMBO J.*, 1993; 12(12):4821-4828.
 - 10) Borodic G., Johnson E., Goodnough M. y Schantz E.: Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials, *Neurology*, 1996; 46:26-29.
 - 11) Boucher P., Sato H., Sato Y. y Loch C.: Neutralizing antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein, *Infect. Immun.*, 1994; 62(2):449-456.
 - 12) Brooks, G. F., Morse S. A., Butel J. S.: **MICROBIOLOGÍA MÉDICA DE JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG.**
16ª edición. México: El Manual Moderno, 1999:171, 226-229.
 - 13) Burrows W. D. y Renner S. E.: Biological warfare agents as threats to potable water, *Environ. Health Perspect.*, 1999; 107(12):975-984.
 - 14) Campbell K. D., Collins M. D. y East A. K.: Gene probes for identification of the botulinum neurotoxin gene and specific identification of neurotoxin types B, E and F, *J. Clin. Microbiol.*, 1993; 31(9):2255-2262.
 - 15) Cardoso F. y Jankovic J.: Clinical use of botulinum neurotoxins, *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 1995; 195:123-135.
 - 16) Centers for disease control and prevention
HANDBOOK FOR EPIDEMIOLOGISTS, CLINICIANS, AND LABORATORY WORKERS. BOTULISM IN THE UNITED STATES, 1889-1996.
Atlanta: CDC, 1998:1-42.

- 17) Chaddock J. A., Purkiss J. R., Friis L. M., Broadbridge J. D., Duggan M. J., Fooks S. J., Shone C. C., Quinn C. P. y Foster K. A.: Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and nonneuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A, *Infect. Immun.*, 2000; 68(5):2587-2593.
- 18) Chardin P., Boquet P., Madaule P., Popoff M. R., Rubin E. J. y Gill D. M.: The mammalian G protein *rhoC* is ADP- ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells, *EMBO J.*, 1989; 8(4):1087-1092.
- 19) Chavan A., Nemoto Y., Narumiya S., Kozaki S. y Haley B. E.: NAD⁺ binding site of *Clostridium botulinum* C3 ADP- ribosyltransferase, *J. Biol. Chem.*, 1992; 267(21):14866-14870.
- 20) Chen F., Kuziemko G. M. y Stevens R. C.: Biophysical characterization of the stability of the 150- kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900- kilodalton botulinum toxin complex species, *Infect. Immun.*, 1998; 66(6):2420-2425.
- 21) Cliver D. O.
FOODBORNE DISEASES
USA: Academic Press, 1990:108-125.
- 22) Collins M. D. y East A. K.: Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins, *J. Appl. Microbiol.*, 1998; 84: 5-17.
- 23) De Filippis V., Vangelista L., Schiavo G., Tonello F. y Montecucco C.: Structural studies on the zinc-endopeptidase light chain of tetanus neurotoxin, *Eur. J. Biochem.*, 1995; 229:61-69.
- 24) DICCIONARIO BREVE DE MEDICINA DE BLAKISTON
México: La prensa médica mexicana, 1986:182, 387.
- 25) Doyle M.
FOODBORNE BACTERIAL PATHOGENS
USA: Marcel Dekker, 1989: 121-156.

- 26) Doyle, M. P., Beuchal L. R. y Montville, T. J.
FOOD MICROBIOLOGY FUNDAMENTALS AND FRONTIERS
 Washington: ASM Press, 1997:288- 304.

- 27) Eckhardt M., Barth H., Blöcker D. y Aktories K.: Binding of *Clostridium botulinum* C2 toxin to asparagine- linked complex and hybrid carbohydrates, *J. Biol. Chem.*, 2000; 275(4):2328-2334.

- 28) Farrar, J.J., Yen L. M., Cook T., Fairweather N., Binh N., Parry J. y Parry C. M.: Neurological aspects of tropical disease, *Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2000; 69:292-230.

- 29) First E. R., Pearce B. L. y Borodic G. E.: Dose standardisation of botulinum toxin, *Lancet*, 1994; 343:1035.

- 30) Fisehett V. A., Novick R. P., Ferretti J. J., Portnoy D. A., Rood J. I.
GRAM-POSITIVE PATHOGENS
 Washington: ASM Press, 2000:529-532, 540-550.

- 31) Forrat R., Dumas R., Seiberling M., Merz M., Lutsch C. y Lang J.: Evaluation of the safety and pharmacokinetic profile of a new, pasteurized, human tetanus immunoglobulin administered as sham, postexposure prophylaxis of tetanus, *Antimicrobial. Agents Chemother.*, 1998; 42(2):298-305.

- 32) Franciosa G., Ferreira J. L. y Hatheway C. L.: Detection of type A, B and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: Evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms, *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32(8):1911-1917.

- 33) Franz D. R., Jahrling P. B., Friedlander A. M., McClain D. J., Hoover D. L., Bryne W. R., Pavlin J. A., Christopher G. W. y Eitzen E. M.: Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents, *JAMA*, 1997; 278(5):399-411.

- 34) Frazier W. C., Westhoff D. C.
MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
 4ª edición. Zaragoza: Acribia, 1993: 533-547.

- 35) Galazka A. y Gasse F.: The present status of tetanus and tetanus vaccination, *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 1995; 195:44-50, 68-73.
- 36) Gardner P. y LaForce F. M.: Protection against tetanus, *N. Engl. J. Med.*, 1995; 333(9):599.
- 37) Gergen P. J., McQuillan G. M., Kiely M., Ezzati-Rice T. M., Sutter R. W. y Virella G.: A population-based serologic survey of immunity to tetanus in the United States, *N. Engl. J. Med.*, 1995; 332:761-766.
- 38) Gorbach S. L., Bartlett J. G. y Blacklow N. R.
INFECTIOUS DISEASES
USA: W.B. Saunders Company, 1992:1580-1583.
- 39) Halpern J. L. y Neale E. A.: Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport, *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 1995; 195:221-236.
- 40) Hauschild A. H. W. y Dodds K. L.
Clostridium botulinum. ECOLOGY AND CONTROL IN FOODS
USA: Marcel Dekker, 1993:3-20, 21-51, 69-104, 105-117.
- 41) Hauser D., Gibert M., Eklund M. W., Boquet P. y Popoff M. R.: Comparative analysis of C3 and botulinical neurotoxin genes and their environment in *Clostridium botulinum* types C and D, *J. Bacteriol*, 1993; 175(22):7260-7268.
- 42) Henning S. W., Galandrini R., Hall A., y Cantrell D. A.: The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development, *EMBO J.*, 1997; 16(9):2397-2407.
- 43) Herreros J., Lalli G., Montecuccio C. y Schiavo G.: Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons, *J. Neurochem*, 2000; 74:1941-1950.
- 44) Herreros J., Ng T. y Schiavo G.: Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons, *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 12: 2947-2960.

- 45) Higuera R. F., Hidalgo L. H., Sánchez C. J. y Romero Z. J.
INFECTOLOGÍA
1ª edición. México: Ed. Prado, 1996:135-151.
- 46) Hoch D. H., Romero-Mira M., Ehrlich B. E., Finkelstein A., Dasgupta B. R. y Simpson L. L.: Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: Relevance to translocation of proteins across membranes, Proc. Natl. Acad. Sci., 1985; 82:1692-1696.
- 47) Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Stanley J. T.
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATE BACTERIOLOGY
9a edición. USA: William y Wilkins, 1994:560-562.
- 48) <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmb/diseaseinfo/botulism.pdf>
- 49) <http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema17/botulismo.html>
- 50) <http://www.latinsalud.com/Temas/botulismo.htm>
- 51) <http://www.temas/chapter5/tetanus.html>
- 52) <http://www.tuotromedico.com/temas/botulismo.htm>
- 53) <http://www.who.int/vaccines-diseases/safety>
- 54) Hutson R. A., Zhou Y., Collins M. D., Johnson E. A., Hatheway C. L. and Sugiyama H.: Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequences, J. Biol. Chem, 1996; 271(18):10786-10792.
- 55) Inoue K., Fujinaga Y., Honke K., Arimitsu H., Mahmut N., Sakaguchi Y., Ohyama T., Watanabe T., Inoue K. y Oguma K.: *Clostridium botulinum* type A haemagglutinin-positive progenitor toxin (HA⁺-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal β 1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HA1), Microb., 2001; 147:811-819.
- 56) Jankovic J. y Brin M. F.: Therapeutic uses of botulinum toxin, N. Engl. J. Med., 1991; 324(17):1186-1193.

- 57) Jay J. M.
MICROBIOLOGÍA MODERNA DE LOS ALIMENTOS
3ª edición. Zaragoza: Acribia, 1994:576-590.
- 58) Johnson E. A.: Clostridial toxins as therapeutic agents: Benefits of nature's most toxic proteins, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999; 53:551-575.
- 59) Johnson E. A., Lin W., Zhou Y. y Bradshaw M.: Characterization of neurotoxin mutants in *Clostridium botulinum* type A, *Clin. Inf. Dis.*, 1997; 25(Suppl. 2):S168-S170.
- 60) Joklik W. K., Willett H. P., Amos B. D., Wilfert C. M.
ZINSSER MICROBIOLOGÍA
20ª edición. Argentina: Médica Panamericana, 1996:861-862, 874-889.
- 61) Kimura B., Kawasaki S., Nakano H. y Fujii T.: Rapid, Quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001; 67(1):206-216.
- 62) Koneman E. W., Allen S.D., Dowell V. R., Janda W. M., Schreckenberger P. C.
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO. TEXTO Y ATLAS A COLOR
5ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1999: 752-756.
- 63) Kozma R., Sarnar S., Ahmed S. y Lim Louis: Rho family GTPases and neuronal growth cone remodeling: Relationship between increased complexity induced by Cdc42 Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid, *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17(3):1201-1211.
- 64) Kumate J., Gutierrez G., Muñoz O. y Santol J. I.
MANUAL DE INFECTOLOGÍA CLÍNICA
15ª edición. México: Méndez Editores, 1998:199-208.
- 65) Lang P., Gesbert F., Delespine-Carmagnat M., Stancou R., Pouchalet M. y Bertoglio J.: Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes, *EMBO J.*, 1996; 15(3):510-519.

- 66) Li Y., Foran P., Lawrence G., Mohammed N., Chan-Kwo-Chion Ch., Lisk G., Aoki R. y Dolly O.: Recombinant forms of tetanus toxin engineered for examining and exploiting neuronal trafficking pathways, *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(33):31394-31401.
- 67) Mac Faddin J. F.
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA
México. Ed. Medica Panamericana, 1991:212-216.
- 68) Maksymowych A. B., Reinhard M., Malizio C. J., Goodnough M. C., Johnson E. A. y Simpson L. L.: Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade, *Infect. Immun.*, 1999; 67(9):4708-4712.
- 69) Mandell A., Douglas K. y Bennett's J.
PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES
4a edición. USA: Churchill Livingstone, 1995:2173-2182.
- 70) Marvaud J. C., Eisel U., Binz T., Niemann H y Popoff M. R.: TetR is a positive regulator of the tetanus toxin gene in *Clostridium tetani* and is homologous to BotR, *Infect. Immun.*, 1998; 66(12):5698-5702.
- 71) Middlebrook J. L. y Brown J. E.: Immunodiagnosis and Immunotherapy of Tetanus and botulinum neurotoxins, *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 1995; 195:89-99.
- 72) Montecucco C., Papini E. y Schiavo G.: Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism, *FEBS Letters*, 1994; 346:92-98.
- 73) Montecucco C., Schiavo G., Gao Z., Bauerlein E., Boquet P. y Dasgupta B. R.: Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface, *Biochem J.*, 1988; 251:379-383.
- 74) Münchau A. y Bhatia K. P.: Uses of botulinum toxin injection in medicine today, *BMJ*, 2000:320:161-165.

- 75) Murray P. P., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C. y Tenover F. C. y Tenover R. H. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 6a edición. Washington: ASM Press, 1995:574- 575, 578- 586.
- 76) Najib A., Pelliccioni P., Gil C. y Aguilera J.: Clostridium neurotoxins influence serotonin uptake and release differently in rat brain synaptosomes, J. Neurochem., 1999; 72:1991-1998.
- 77) Nishiki T., Kamata Y., Nemoto Y., Omori A., Ito T., Takahashi M. y Kozaki S.: Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, J. Biol. Chem., 1994; 269(14):10498-10503.
- 78) Parashar U. D., Bennett J. V., Boring J. R. y Hlady W. G.: Topical antimicrobials applied to the umbilical cord stump: A new intervention against neonatal tetanus, Int. J. Epid., 1998; 27:904-908.
- 79) Popoff M.R.: Ecology of neurotoxicogenic strains of clostridia, Curr. Top. Microb. Immunol., 1995; 195:2-6, 10.
- 80) Pumarola A., Rodríguez T. A., García R. J. A., y Piedrola A. G. MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA 2ª edición. España: Masson-Salvat, 1992:387-402.
- 81) Rossetto O., Deloye F., Poulain B., Pellizzari R., Schiavo G. y Montecucco C.: The metallo- proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins, J. Physiol., 1995; 89:43-50.
- 82) Salyers, A. A. y Whitt D. D. BACTERIAL PATOGENESIS A MOLECULAR APPROACH Washington: ASM Press, 1994:130 – 137.
- 83) Sanford J. P.: Tetanus- Forgotten but not gone, N. Engl. J. Med., 1995; 332(12):812-813.
- 84) Schantz E. J. y Johnson E. A.: Botulinum toxin: The story of its development for the treatment of human disease, Persp. Biol. Med., 1997; 40(4):317-327.

- 85) Schantz E. J. y Johnson E. A.: Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine, *Microb. Rev.*, 1992; 56(1):80-99.
- 86) Schiavo G., Matteoli M. y Montecucco C.: Neurotoxins affecting neuroexocytosis, *Physiol. Rev.*, 2000; 80(2):717-766.
- 87) Schürmann A., Mooney A. F., Sanders L. C., Sells M. A., Wang H. G., Reed J. C. y Bokoch G. M.: p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20(2):453-461.
- 88) Shapiro R. L., Hatheway C., Becher J. y Swerdlow D. L.: Botulism surveillance and emergency response, *JAMA*, 1997; 278(5):433-435.
- 89) Shapiro R. L., Hatheway C. y Swerdlow D. L.: Botulism in the United States: A clinical and epidemiologic review, *Ann. Intern. Med.*, 1998; 129(3):221-228.
- 90) Shi Z., Zeng M., Yang G., Siegel F., Cain L. J., Kampen K. R., Elmets C. A. y Tang D. C.: Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines, *J. Virol.*, 2001; 75(23):11474-11482.
- 91) Shimoni Z., Dobrousin A., Cohen J. y Pitlik S.: Tetanus in an immunised patient, *BMJ*, 1999;319:1049.
- 92) Shone C. C., Hambleton P. y Melling J.: A 50-kDa fragment from the NH₂-terminus of the heavy subunit of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin forms channels in lipid vesicles, *Eur. J. Biochem.*, 1987; 167:175-180.
- 93) Shone C. C. y Roberts A. K.: Peptide substrate specificity and properties of the zinc-endopeptidase activity of botulinum type B neurotoxin, *Eur. J. Biochem.*, 1994; 225:263-270.
- 94) Shone C. C., y Tranter H. S.: Growth of clostridia an their neurotoxins, *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 1995; 195:150-151.

- 95) Simon J. D.: Biological terrorism, JAMA, 1997; 278(5):428-430.
- 96) Singh B. R., Li B. y Read D.: Botulinum versus tetanus neurotoxins: Why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison?, Toxicon, 1995; 33(12):1541-1547.
- 97) Singh M., Li X., Wang H., McGee J. P., Zamb T., Koff W., Wang Ch. y O'Hagan D. T.: Immunogenicity and protection in small-animal models with controlled-release tetanus toxoid microparticles as a single-dose vaccine, Infect. Immun., 1997; 65(5):1716-1721.
- 98) Smith, L.D.
BOTULISMO. EL MICROORGANISMO, SUS TOXINAS, LA ENFERMEDAD
Zaragoza: Acribia, 1986:12-28, 66-78.
- 99) Takaishi K., Kikuchi A., Kuroda S., Kotani K., Sasaki T. y Takai Y.: Involvement of *rho* p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (*rho* GDI) in Cell Motility, Mol. Cell. Biol., 1993; 13(1):72-79.
- 100) Tierney L. M., Papadakis M. A. y Mcphee S. J.
DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y TRATAMIENTO
30ª edición. México: El Manual Moderno, 1995: 1208-1210.
- 101) Varnam, A. H. y Evans, M. G.
FOODBORNE PATHOGENS AN ILLUSTRATED TEXT
Londres: Wolfe Publishing, 1991:289- 311.
- 102) Wictome M., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K. y Shone C.: Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay, Appl. Env. Microb., 1999; 65(9):3787-3792.
- 103) Wilde C., Genth H., Aktories K. y Just I.: Recognition of RhoA by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme, J. Biol. Chem., 2000; 275(22):16478-16483.

- 104) Williamson L. C., Bateman K. E., Clifford J. C. y Neale E. A.: Neuronal sensitivity to tetanus toxin requires gangliosides, *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(35):25173-25180.