

## Botulismo

Es una afección del hombre y los animales producida por la acción de la toxina de *Clostridium botulinum* la cual produce una parálisis flácida de la musculatura estriada.

El botulismo se puede originar como una intoxicación, por ingestión de la toxina preformada o como una toxiinfección, por ingestión de las esporas que germinan en el tubo digestivo produciendo la correspondiente toxina, hecho factible en niños menores de tres años. Son raros los casos de ingreso del microorganismo o de la toxina a través de una herida. El ingreso de toxinas o de esporas por inhalación se puede producir en forma accidental o como consecuencia de acciones de bioterrorismo.

Las conservas y embutidos caseros y los alimentos enlatados son la principal fuente de intoxicación en el hombre aunque también se citan cereales, legumbres e infusiones preparadas a partir de hierbas, sobre todo aquellas cultivadas y conservadas en forma doméstica. Los hábitos alimentarios de ciertos grupos étnicos pueden ser los responsables de la aparición de determinados tipos de botulismo en una región.

En los animales se puede originar por contaminación de heno ensilado o en zonas con suelos deficientes en minerales, mediante la ingestión a partir de esqueletos de animales muertos. En nuestro país se describió por primera vez el botulismo en los bovinos en la provincia de Corrientes, departamento de Santo Tomé, cercano al río Aguapey, de donde tomó la denominación de Mal del Aguapey, como se lo conoce localmente. Otra forma de afección, que ocurre principalmente en las aves acuáticas, resulta de la ingestión de toxina a partir de aguas estancadas, contaminadas con el microorganismo.

### *Clostridium botulinum*

Es un bacilo grueso de 0,9 a 1,2 por 4 a 6  $\mu\text{m}$ , que presenta esporas ovales de ubicación subterminal, móvil y muy exigente en cuanto a nutrientes y a la atmósfera anaerobia. Requiere un pH neutro para su desarrollo.

Posee amplia distribución en el suelo, vegetales en descomposición y ambientes acuáticos de escaso caudal y también suele estar presente en el intestino de rumiantes, sobre todo en el bovino. En condiciones óptimas (escasa concentración de oxígeno, bajo Eh y nutrientes adecuados) las esporas pueden germinar y las células vegetativas pueden producir las toxinas, contaminando peces, suelos, vegetales o granos ensilados y restos de animales muertos. Es un microorganismo de distribución mundial.

Las esporas son muy resistentes a los agentes ambientales. Requieren una temperatura de 121° C durante 20 minutos para su destrucción. Por el contrario las toxinas se inactivan con 80° C en 30 minutos ó con 100° C en 10 minutos.

La resistencia de las esporas a las radiaciones varía según la cepa, la temperatura y la concentración de oxígeno en el medio. En forma general resultan más sensibles en presencia de oxígeno y con una temperatura mayor de 20° C.

Se considera que *C. botulinum* no desarrolla por debajo de los 10° C. Sin embargo algunas cepas pueden crecer con una temperatura de hasta 3,3° C, aunque en estos casos, la producción de toxina requiere varias semanas.

*C. botulinum* puede desarrollar a un pH mínimo de 4,6, pero en productos acidificados este límite depende de otros factores como la concentración de agua ( $E_h$ ) o el desarrollo simultáneo de otros microorganismos que eleven dicho pH.

La germinación de las esporas de *C. botulinum* resulta óptima a una temperatura de 37° C, un pH de 7, con una actividad de agua (aW) superior a 0,89 y un potencial de óxido reducción ( $E_h$ ) entre 30 a 250 mV.

Se conocen 6 toxinotipos denominados con letras, *C. botulinum* tipos A hasta F, que producen todos una neurotoxina con idéntica actividad, pero diferente en su estructura antigénica, potencia y distribución. *C. botulinum* G se denomina actualmente *C. argentinense*. Se ha descrito cepas que no elaboran toxina y también, la producción de toxina botulínica a partir de cepas de *C. barattii* y de *C. butyricum*. El criterio actual es incluir a todas las cepas productoras de toxina dentro de *C. botulinum* y ubicar dentro de las otras especies a aquellas que no la producen.

Las toxinas elaboradas son las responsables del cuadro de parálisis flácida característico del botulismo. Son las toxinas bacterianas más potentes que se conocen: la dosis letal para un humano adulto está estimada entre 0,1 a 1 mg para la toxina botulínica A. Un ejemplo teórico muestra que 1 gramo de toxina diseminado o inhalado puede ser mortal para más de un millón de personas. De hecho esta extrema toxicidad ha convertido a las toxinas botulínicas en una de las principales armas de guerra biológica que se conocen.

Por el contrario estas toxinas poseen una utilidad terapéutica ya que se pueden emplear en diluciones elevadas para el tratamiento específico de afecciones caracterizadas por una hiperactividad muscular o para disminuir la intensidad en los trastornos musculares espásticos.

Las cepas de *C. botulinum* son heterogéneas fenotípica y genéticamente y se han reunido en cuatro grupos (Tabla 6) de acuerdo al ó los tipos de toxina que elaboran.

El grupo I incluye cepas con actividad principalmente proteolítica, que desarrollan a una temperatura óptima entre 35 y 40° C, que presentan las esporas con mayor resistencia al calor, y que producen toxinas A, B, F ó una combinación de las toxinas A + B, A + F y B + F.

El grupo II comprende cepas sacarolíticas, sin actividad proteolítica, con una temperatura óptima de desarrollo entre 18 y 25° C, que presentan las esporas con menor resistencia al calor y que sintetizan toxinas B, E ó F.

El grupo III incluye cepas no proteolíticas que cultivan a 40° C como temperatura óptima, con esporas moderadamente resistentes al calor y que producen toxinas C ó D. La toxina C es binaria estando constituida por dos fracciones, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>. Los tipos toxigénicos C se denominan C *alfa* ó C *beta* según la fracción predominante. El tipo toxigénico D produce además, la fracción C<sub>2</sub> en pequeñas cantidades.

El grupo IV comprende cepas proteolíticas, que no producen lipasa, y que pueden ó no esporular. Desarrollan óptimamente a 37° C y elaboran la toxina G.

Tabla 6: Características de los grupos de *C. botulinum*

Grupo	Toxinas	Actividad proteolítica	Temperatura óptima de desarrollo (° C )	Producción de lipasa	Fermentación de glucosa
I	A, B, F	+	35- 40	+	+
II	B, E, F	-	18- 25	+	+
III	C, D	-	40	+	+
IV	G	+	37	-	-

Los genes codificantes para las toxinas de *C. botulinum* A, B, E y F se encuentran a nivel cromosómico, para la toxina G, en plásmidos y para las toxinas C y D se encuentran en bacteriófagos que funcionalmente se consideran plásmidos.

Los tipos productores de toxinas A, B y E ( y a veces F) son la principal causa de afección en humanos y los que elaboran toxinas C y D suelen afectar específicamente a animales, sobre todo a bovinos, ovinos y aves.

Todas las toxinas botulínicas se sintetizan como un precursor inactivo en una cadena polipeptídica de 150 kDa y es necesaria la lisis bacteriana para que se liberen. Una vez liberadas por acción de las proteasas bacterianas o de enzimas digestivas como la tripsina, se fragmentan a nivel del N terminal dando origen a dos cadenas, una pesada y una liviana, unidas por un puente disulfuro. Las mismas se asocian a proteínas no tóxicas para formar complejos de mayor tamaño, llegando a los 300 kDa. Esta asociación permite el pasaje a través del tracto intestinal eludiendo la degradación por la acidez gástrica y por la actividad de las enzimas digestivas.

La porción C terminal de la cadena pesada es la responsable de la unión a un receptor de la membrana celular de las neuronas, mientras que la

región N terminal regula la penetración y la cadena liviana es la responsable del bloqueo de la liberación del neurotransmisor.

La neurotoxina botulínica actúa sobre el sistema nervioso periférico a nivel de las motoneuronas. Se une a la membrana presináptica e impide la liberación de acetilcolina. Cuando se produce la endocitosis de la toxina, ésta ya no se puede neutralizar mediante la acción de los anticuerpos. Dentro del citosol la cadena liviana inhibe la liberación de acetilcolina. El músculo no se contrae dando como resultado una parálisis flácida, simétrica y descendente que puede llevar a la muerte por asfixia.

### Diagnóstico

El aislamiento y la identificación del agente a partir de las muestras sospechosas resultan complicados y requieren de varios días.

El cultivo se puede realizar en agar nutritivo con el agregado de sangre ovina desfibrinada, con incubación anaerobia, durante 2 a 5 días, entre 25 y 35° C. Si bien no existe un medio selectivo recomendado se pueden agregar cicloserina, sulfametoxazol o trimetoprima como inhibidores de la microbiota acompañante. Otra variante consiste en calentar una alícuota de la muestra a 80° C durante 10 minutos, permitiendo la supervivencia de las formas esporuladas.

También se pueden sembrar en agar yema de huevo buscando colonias productoras de lipasa.

Las colonias sospechosas se identifican mediante su actividad bioquímica y se siembran en medio líquido para confirmar la producción de toxina.

El diagnóstico rápido se realiza a través de la detección de la toxina en alimentos, suero o contenido intestinal mediante pruebas de neutralización. La seroneutralización en ratones constituye la técnica de referencia internacional y permite detectar cantidades de hasta 10 microgramos de toxina. Las muestras se diluyen en agua peptonada y se centrifugan para obtener un sobrenadante libre de células. Una parte se trata con tripsina y luego, ambas alícuotas se enfrentan por separado a las diferentes antitoxinas, para ser inoculadas posteriormente y por separado en ratones.

Las toxinas se pueden detectar en el suero de individuos afectados y en los alimentos involucrados. En los lactantes se investigan en el contenido intestinal o en la materia fecal, porque no se encuentran niveles detectables de toxina en el suero.

### Profilaxis

La profilaxis de esta afección se basa en medidas de higiene alimentaria y en la vacunación en aquellas zonas o poblaciones consideradas como de riesgo, como es el personal de laboratorios o algunas especies de animales en producción.

En el hombre la profilaxis más importante consiste en medidas de higiene alimentaria como el lavado exhaustivo de vegetales que se consumirán crudos, la cocción de carnes a más de 85° C por lo menos durante 5 minutos y el lavado y principalmente la correcta cocción de las conservas o semiconservas, sobre todo de las artesanales o domésticas.

Las toxinas botulínicas incubadas a 42° C, con formol entre el 0,6 y el 1% durante un mes, pierden su poder tóxico, pero conservan su inmunogenicidad y constituyen excelentes toxoides para uso vacunal. Esto se aplica de manera eficaz en la profilaxis del botulismo en el ganado bovino.

El empleo de suero antibotulínico o de gammaglobulina purificada puede neutralizar la toxina no fijada a los receptores neuronales, pero no, aquella que se ha internalizado en las células.

#### **Utilización terapéutica de las toxinas botulínicas**

Las neurotoxinas botulínicas bloquean la inervación motriz y por lo tanto se pueden emplear en el tratamiento sintomático de enfermedades caracterizadas por una hiperactividad muscular. La más utilizada es la toxina del tipo A y se aplica en el tratamiento de blefarospasmos, parálisis hemifaciales, miopatías oculares, migrañas, hiperhidrosis y arrugas faciales. El efecto dura entre semanas y meses y la aplicación repetida genera una respuesta de anticuerpos neutralizantes que a largo plazo disminuyen la efectividad del tratamiento.

#### **Bibliografía ampliatoria**

- Euzéby J.P. (2004) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr>
- Rood J, Mc Clane B, Glen Songer J, Titball R (1997) The Clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press, California, USA.

**Dra. Graciela Carloni**

**Comisión de Enfermedades Producidas por Bacterias Anaerobias**