



Universidad de Valladolid

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

FACULTAD DE MEDICINA UVa

(CURSO 2018-2019)

***“Clostridium botulinum: Metodología para la
detección de la toxina botulínica en
productos cárnicos.”***

Presentado por: **Pablo Romairone López-Villar**

Dirigido por: **Dra. Irma Caro Canales**

Resumen

El botulismo alimentario es una enfermedad grave que, en ocasiones puede ser mortal, y aunque los brotes no suelen ser comunes, se consideran situaciones de emergencia. En España, entre los años 2010 y 2016 se notificaron 59 casos de botulismo, 50 de los cuales se asociaron a botulismo de origen alimentario [1–7]. Es necesaria una rápida identificación de la fuente alimentaria con el fin de evitar nuevos casos. En este sentido, la metodología para la detección de la presencia de la toxina en alimentos, especialmente, en productos cárnicos, es esencial para establecer las directrices, tanto de la seguridad pública, como de la seguridad alimentaria.

Entonces, el objetivo del presente trabajo ha sido realizar un estudio bibliográfico sobre la metodología para la detección de *Clostridium botulinum* en productos cárnicos.

A continuación, para llevar a cabo este objetivo se realizó una revisión sistemática en las siguientes bases de datos: *PubMed*, *ScienceDirect*, *Google Scholar*, y la biblioteca virtual de la UVA. Esta búsqueda arrojó 51 artículos y 3 libros.

Después de la revisión de la información podríamos concluir que, el método de bioensayo en ratones es utilizado actualmente como método estándar de referencia para la detección de la toxina debido a su alta sensibilidad y especificidad. A pesar de lo anteriormente escrito, se destaca como desventaja la posibilidad de presentar falsos positivos por la presencia de compuestos en los alimentos que pueden interferir en el bioensayo. En la actualidad, existen métodos con la misma sensibilidad o incluso mayor, que se pueden utilizar para la detección de toxina en alimentos y en productos cárnicos, como son los métodos que combinan la espectrometría de masas y el ensayo de endopeptidasas.

PALABRAS CLAVE: botulismo, toxina botulínica, BoNT, metodología, *Clostridium botulinum*.

Tabla de abreviaturas

BoNT	<i>Botulinum neurotoxin</i>
PIB	Producto Interior Bruto
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
UV	Ultravioleta
BTx	<i>Botulinum toxin</i>
kDa	Kilodalton
LC	Cadena ligera
HC	Cadena pesada
NTNHA	<i>Non-toxic non-hemagglutinin</i>
CNE	Centro Nacional de Epidemiología
NaCl	Cloruro sódico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ECL	Electroquimioluminiscencia
BSL-3	Nivel de bioseguridad 3
UVa	Universidad de Valladolid
ELISA mAb	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas basado en anticuerpos monoclonales
ELISA pAb	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas basado en anticuerpos policlonales
iPCR	Inmuno-PCR
Q	Cuartil
ENDOPEP-MS	Ensayo de endopeptidasa combinado con espectrometría de masas
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> ; Desorción/ionización láser asistida por matriz
ESI	Ionización por Electrospray
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> ; polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> ; Proteínas de fusión de membranas
SNAP-25	Proteínas asociadas a sinaptosoma con una masa molecular de 25 kDa
VAMP	Proteínas de membrana asociadas a vesículas
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia Förster
TOF	Tiempo de vuelo
GE	Equivalentes de Genoma

Índice de contenidos

Resumen	1
Tabla de abreviaturas.....	2
Índice de contenidos	3
1. Introducción	4
1.1. El sector cárnico español	4
1.2. Descripción de <i>Clostridium</i>	5
1.3. <i>Clostridium botulinum</i>	6
1.3.1. Morfología e identificación.....	7
1.4. Esporas.....	8
1.4.1. Inactivación de esporas botulínicas.....	9
1.5. Toxinas y nomenclatura.....	9
1.6. Epidemiología del botulismo.....	11
1.7. Importancia actual en los alimentos de la toxina botulínica.....	12
1.7.1. Prevención del crecimiento de la toxina en alimentos.....	13
1.7.2. Inactivación de la toxina botulínica.....	13
1.8. Control de <i>C. botulinum</i> en alimentos.....	14
1.9. Metodología para el recuento de <i>C. botulinum</i> y la determinación de neurotoxinas..	15
1.10. Precauciones de seguridad al trabajar con <i>C. botulinum</i> o su toxina.....	15
2. Objetivos.....	16
3. Material y métodos	16
4. Resultados de la búsqueda bibliográfica	18
4.1. Ensayos de actividad <i>In Vivo/Ex Vivo</i>	20
Bioensayo en ratones.....	20
4.2. Ensayos inmunológicos.....	21
Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	22
Inmuno-PCR.....	22
Inmunoensayo de enzimas de electroquimioluminiscencia (ECL).....	23
4.3. Ensayos de endopeptidasa.....	24
4.4. Identificación de proteínas.....	27
Espectrometría de masas.....	27
4.5. Ensayos genéticos para detección de BoNT.....	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
5. Conclusiones.....	34
6. Bibliografía.....	35
7. Anexos.....	40

1. Introducción

1.1. El sector cárnico español

En España, la industria cárnica se encuentra en la cuarta posición del sector industrial, por detrás de la industria del automóvil, la industria del petróleo y la producción y distribución de energía eléctrica. Todas las empresas de este sector hacen que la industria cárnica ocupe el primer lugar de la industria española de alimentos y bebidas, representando una cifra de negocio de 26.207 millones de euros, el 22,1% de todo el sector alimentario español. Esta cifra de negocio supone aproximadamente el 2,2% del producto interior bruto español (PIB), el 13,8% del PIB de la rama industrial y el 4,2% de la facturación total de toda la industria española [8].

Tanto la carne como los productos cárnicos son ricos en proteínas de alto valor biológico, vitaminas y minerales. Estas proteínas son fácilmente asimilables por nuestro organismo y nos aportan todos los aminoácidos esenciales, aquellos que deben ser suministrados por la dieta, ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos. Es destacable su alto contenido en vitaminas del grupo B, especialmente la vitamina B₁₂ y B₆. También suponen un excelente aporte de hierro, mucho más fácilmente asimilable que el proporcionado por otros alimentos, además de fósforo y otros minerales como el zinc, magnesio, manganeso, entre otros [8].

La carne y sus derivados están sometidos a un estricto control por parte de las autoridades europeas y españolas, en cuanto al cumplimiento de requisitos de seguridad alimentaria, con el objetivo de producir carne de calidad y segura como se ve reflejado en el Real Decreto 474/2014 del Boletín Oficial del Estado [9]. En general, el fin de la seguridad alimentaria es que el alimento sea seguro desde el punto de vista físico, químico y microbiológico, libre de sustancias perjudiciales para la salud. Para ello, es indispensable que se asegure la correcta trazabilidad del producto. En la actualidad las empresas alimentarias están obligadas a establecer y cumplir estrictamente un plan de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC), como dicta el Reglamento (CE) N.º 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo [10].

En definitiva, la seguridad alimentaria constituye la pieza clave que garantiza la calidad e inocuidad de la carne y los derivados a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria en las granjas, hasta la mesa de los consumidores [11]. Se entiende por inocuidad alimentaria la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores [12].

1.2. Descripción de *Clostridium*.

Las especies que se encuentran dentro del género *Clostridium* spp. son microorganismos procariotas, grampositivos, anaerobios estrictos, con forma de bastón, móviles gracias a cilios peritricos y formadores de esporas. Basado en la secuenciación del gen *16s rRNA*, este género pertenece al Dominio *Bacteria*, Filo *Firmicutes*, Clase *Clostridia*, Orden *Clostridiales* y Familia *Clostridiaceae* como se muestra en la Figura 1 [13].

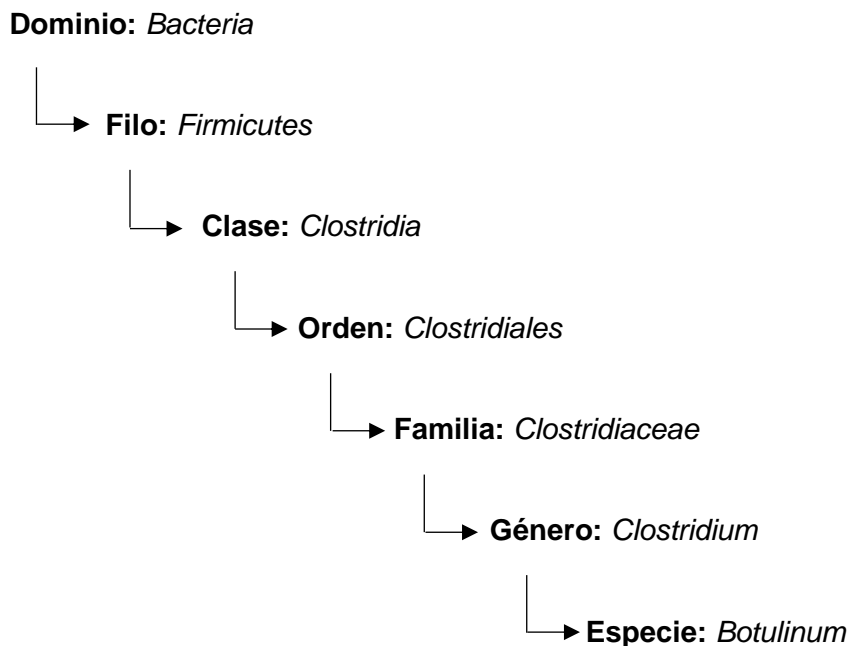


Figura 1. Esquema de la taxonomía del género *Clostridium* [14].

Algunas especies de este género, como *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium acetobutylicum* son capaces de producir diversos compuestos a partir de distintos tipos de polisacáridos, por ejemplo, hemicelulosa y celulosa. Entre los compuestos producidos por estas bacterias podemos encontrar algunos solventes como: la acetona, el butanol y el etanol. Además, otras especies también son capaces de degradar la celulosa como *Clostridium difficile* y *Clostridium phytofermentans*.

Desde el punto de vista de la salud pública, dentro de este género se encuentran especies patógenas como *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* y *Clostridium difficile*.

Una de las especies con mayor importancia desde este punto de vista es: *Clostridium botulinum*. De acuerdo con Peck et al [15], esta especie muestra líneas evolutivas

diversas como se puede observar en la Figura 2. Este hecho permite apreciar que la mencionada especie es muy heterogénea.

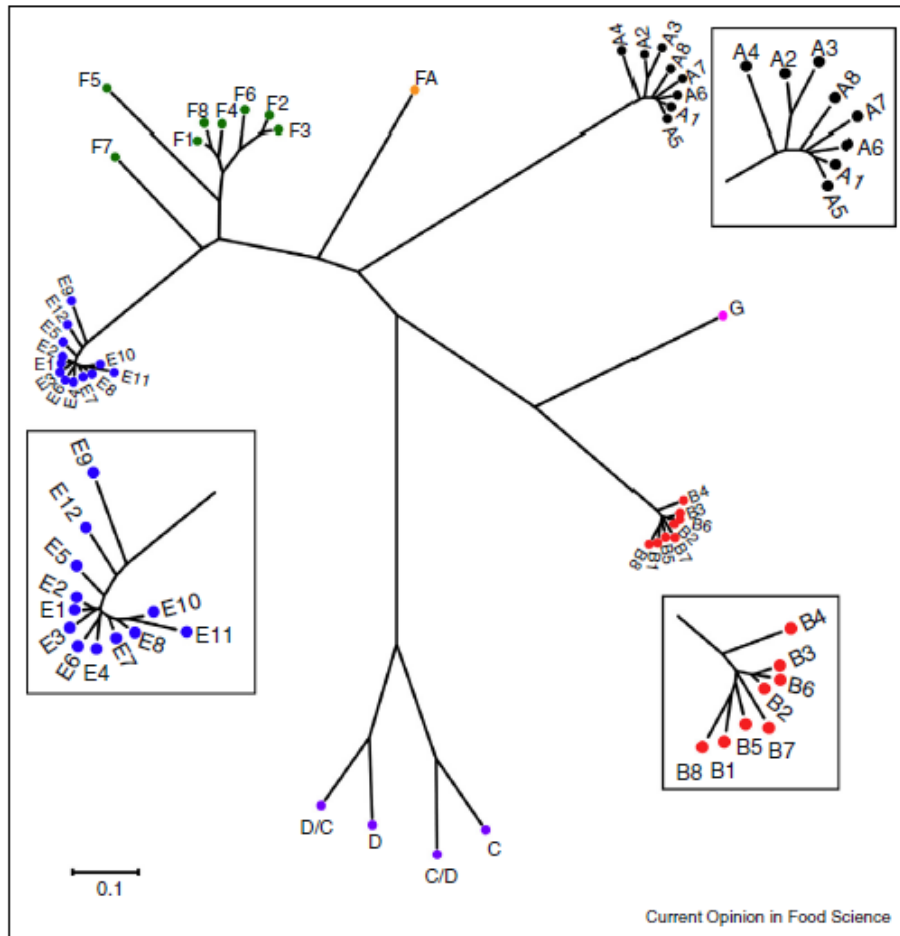


Figura 2. Filogenia de los subtipos de neurotoxinas botulínicas. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético [15].

Otro aspecto importante es que las cepas integrantes del género *Clostridium* se encuentran ampliamente distribuidas, ya sea como células vegetativas o en forma de esporas, en diversos ambientes como suelos, vegetales, el tracto intestinal de animales y humanos, diseminadas en polvo, vapores, agua, aguas residuales y en diversos organismos como insectos, así como en productos alimenticios, como por ejemplo la miel [13], pudiendo contaminar los alimentos, por diversas vías como aire, agua o por contacto directo con material contaminado, entre otros.

1.3. *Clostridium botulinum*.

Como era de esperar, *Clostridium botulinum* es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente, pudiéndose encontrar en suelo, polvo, sedimentos marinos y de agua dulce,

tractos intestinales de animales, aves y peces, vegetales, frutas y estiércol animal, entre otros.

Clostridium botulinum, sintetiza una toxina denominada toxina botulínica (BoNT, por sus siglas en inglés). Actualmente se conocen 7 serotipos de toxina botulínica y son designados con las letras A, B, C, D, E, F, G y más de 40 subtipos. Este compuesto causa un serio problema de salud, incluso puede llegar a provocar la muerte. Los serotipos de toxinas se pueden agrupar o clasificar según el tipo de hospedadores en los que causan enfermedades, o según el tipo de hospedador que actúa como reservorio (ver Tabla 1 ANEXO 1). Los serotipos se distinguen por inhibición de su toxicidad, a través del uso de antitoxinas específicas para cada toxina purificada [13].

De acuerdo con diversos estudios, *C. botulinum* puede ser separada en cuatro grupos fisiológicos distintos, identificados de I al IV. Así mismo, diversos estudios genéticos de estas bacterias, como la hibridación del DNA, la electroforesis en gel de campo pulsado, la secuenciación de genes que codifican *rRNA 16s*, han determinado que son genéticamente diferentes. Las principales características fisiológicas que diferencian a estos grupos son: temperatura de crecimiento, proteólisis y tipo toxina producido, entre otros [13].

El grupo I es proteolítico y puede producir toxinas A, B y F. El grupo II no es proteolítico y puede producir toxinas B, E y F. El grupo III no es proteolítico y produce toxinas C y D, finalmente el grupo IV puede ser débilmente proteolítico y produce solo toxina tipo G. Los dos primeros grupos representan el mayor riesgo para el hombre, porque están asociados al botulismo alimentario y otras formas de botulismo humano. Sin embargo, el tercer grupo, está asociado con el botulismo en animales y el cuarto grupo no se asocia con el botulismo propiamente dicho [13,15].

1.3.1. Morfología e identificación.

Dentro de la especie *Clostridium botulinum*, la principal característica que define a los clostridios toxigénicos es la producción de la toxina botulínica. Los clostridios son anaerobios estrictos y obtienen su energía por fermentación, un proceso por el que convierten el piruvato en ácido láctico o etanol. Por lo tanto, el crecimiento de esta bacteria y la producción de su toxina se llevan a cabo en productos que se encuentran en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno y bajas temperaturas, principalmente, aunque también crece bien a temperaturas altas. Los clostridios toxigénicos crecen en forma de grandes bastones y frecuentemente forman cadenas, también denominadas

filamentos. Las células vegetativas son a menudo curvadas y sus extremos son redondeados [13].

Como ya se mencionó anteriormente, esta bacteria es esporulada. Las esporas dentro de la célula vegetativa pueden tener una ubicación central, subterminal o terminal, como se observa en la Figura 3.



Figura 3. *Clostridium botulinum*. Célula esporulada. Fotografía electrónica (33.000 x) [16].

En cuanto a su fisiología, los clostridios botulínicos son muy heterogéneos, presentan diferencias significativas en varias características dependiendo de la clase a la que pertenezcan, incluyendo la estabilidad térmica de sus esporas, el rango en la temperatura de crecimiento, su tolerancia a sales y ácidos (como se puede ver en la Tabla 2 ANEXO 2), la actividad proteolítica y la utilización de sustratos [13].

1.4. Esporas.

Las esporas de *Clostridium botulinum* son resistentes a múltiples factores como el calor, la desecación, la luz UV, los alcoholes, y crecen en ambiente anaeróbico, por lo que los casos de botulismo alimentario guardan relación con alimentos listos para el consumo enlatados con poco oxígeno [17]. Las esporas son resistentes a las altas presiones, pero pueden destruirse por combinaciones de tratamientos de alta temperatura con alta presión. Estas esporas se eliminan fácilmente con desinfectantes a base de cloro y la exposición al formaldehído. Además, son sensibles a la mayoría de los desinfectantes autorizados en el sector de la industria alimentaria, siempre que se utilice combinaciones correctas en tiempo y concentración [18].

1.4.1. Inactivación de esporas botulínicas.

En la industria alimentaria, el procesamiento térmico y la esterilización son los procesos más eficientes para la inactivación de *Clostridium botulinum*. Las esporas de *C. botulinum* del grupo I (serotipo A y cepas proteolíticas de los serotipos B y F) presentan mayor resistencia al calor que las esporas del grupo II (tipo E y cepas no proteolíticas de los serotipos B y F) [13].

Además, se ha estudiado la inactivación de esporas con gases y otros compuestos químicos, especialmente usados en materiales que estarán en contacto con los alimentos tratados térmicamente. Entre los compuestos químicos que pueden hacer más vulnerables a las esporas se encuentran el cloro y sus derivados. Estos compuestos, hacen más sensibles a las esporas frente a otros mecanismos de inactivación, como puede ser el calor. La efectividad del cloro depende de la concentración y de la forma en que se utiliza, la presencia de algún material orgánico, el pH, la temperatura y el tiempo de exposición, entre otros factores. Por ejemplo, para la inactivación de esporas botulínicas en superficies utilizadas en la industria alimentaria se requiere una concentración de 200 mg de hipoclorito por litro de agua durante dos minutos. Otro compuesto, con el que también se ha observado que las esporas pueden ser inactivadas, es el peróxido de hidrógeno, sin embargo se requieren concentraciones elevadas de este compuesto, aproximadamente un 35% [13]. En la industria alimentaria el peróxido de hidrógeno es útil para ciertos sistemas de envasado y para la esterilización de materiales usados en el procesamiento aséptico.

1.5. Toxinas y nomenclatura.

Las toxinas producidas por *Clostridium botulinum* son unas de las sustancias más tóxicas que existen, cuya dosis intravenosa letal es muy baja, aproximadamente de 0.1 a 1 ng por kg de peso corporal y una dosis oral de 0.1 a 1 mg por kg [13,19]. La nomenclatura actual, utilizada para designar estas toxinas es: las letras BT indican que es una toxina procedente de *C. botulinum*, seguidas de la letra “x” y la letra mayúscula que expresa el serotipo. Otra nomenclatura de uso más común identifica a la toxina por las letras “BoNT”, seguidas de una barra inclinada y la letra en mayúscula representativa del serotipo al que pertenece, siguiendo el ejemplo anterior, “BoNT/A” [19].

- **BTx** (*Botulinum* Toxin):
 - A → **BTxA**
 - B → **BTxB**
 - C → **BTxC**
 - D → **BTxD**

- **BoNT** (*Botulinum Neurotoxin*):
 - A → **BoNT/A**
 - B → **BoNT/B**
 - C → **BoNT/C**
 - D → **BoNT/D**

Las toxinas botulínicas se forman en el interior de las bacterias que han crecido en condiciones óptimas: menos del 15% de sal, un pH superior a 4,6 y una temperatura entre 18 y 40°C, donde se liberan por autólisis [13,19]. La toxina está formada por tres dominios básicos como se muestra en la Figura 4. Estos dominios dan el nombre a cada una de las cadenas proteicas presentes en la toxina.

Las BoNT activas son polipéptidos de 150 kDa, compuestas por una cadena ligera N-terminal (LC) de 50 kDa que es responsable de la actividad enzimática y una cadena pesada terminal (HC) de 100 kDa que participa en la unión al receptor y la captación celular [20].

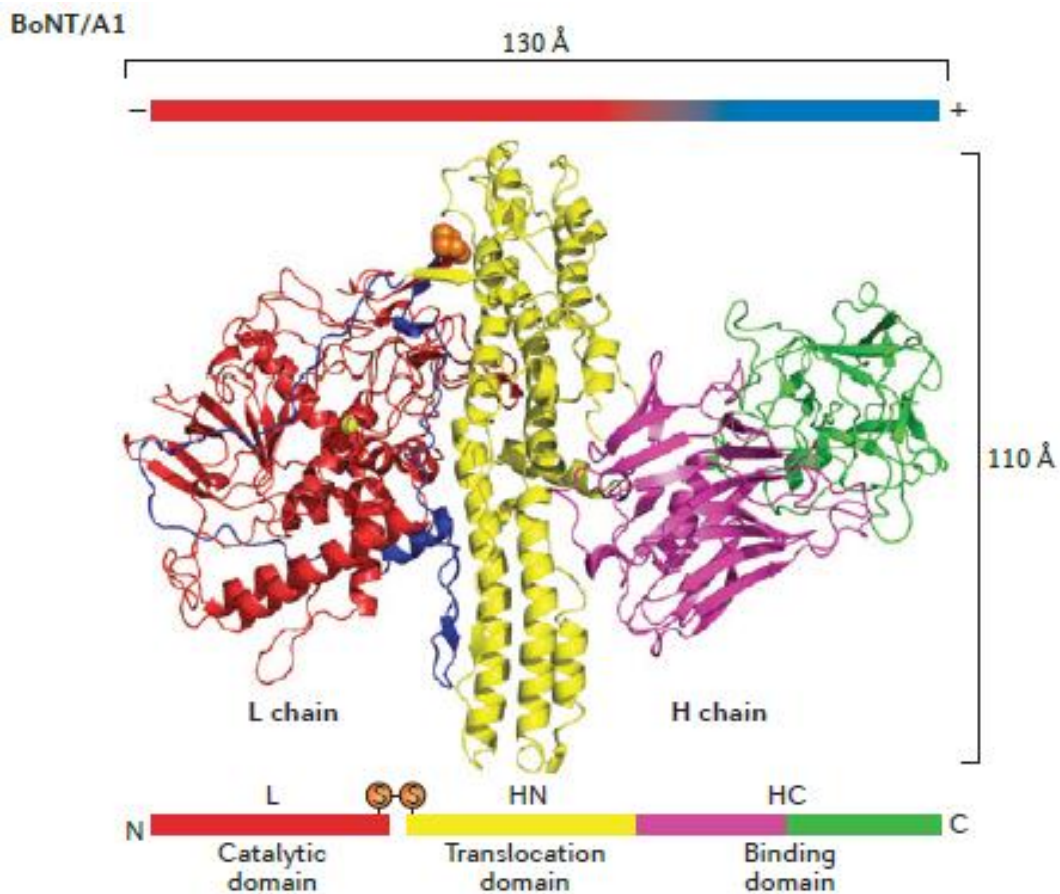


Figura 4. Representación de la toxina botulínica [21].

Los tres tipos de cadenas presentes en la neurotoxina son:

- 1.- Una cadena LC, dominio catalítico que tiene actividad endopeptidasa en sustratos neuronales.
- 2.- Una cadena HN, dominio N-terminal, que media la translocación de la cadena ligera a través de la membrana endosomal.
- 3.- La cadena HC, dominio C-terminal, dominio de unión al receptor de la superficie celular.

Después de la captación oral en el cuerpo, las moléculas de BoNT están protegidas de las duras condiciones gastrointestinales por una proteína clostridial llamada NTNHA (non-toxic non-hemagglutinin, por sus siglas en inglés) que protege la toxina de los cambios del pH, ya que sin ella la toxina podría cambiar su estructura. Este hecho ofrece resistencia parcial hasta un pH de 2,5 y por ello, resistencia a los jugos gástricos [20,21].

La toxina es una sustancia termolábil, ya que 80°C durante 30 minutos, o 100°C durante 10 minutos, produce la separación de sus cadenas HC y LC, con una pérdida total de su toxicidad; por lo que podemos deducir, que una cocción prolongada en un alimento que contiene la toxina, provoca su destrucción, evitando de esa forma la intoxicación. La toxina se conserva muy bien a temperaturas inferiores o iguales a los 0°C, o bien liofilizada [19].

El mecanismo de acción de las neurotoxinas botulínicas consiste en bloquear la liberación de acetilcolina en la sinapsis del sistema nervioso periférico, lo que produce parálisis y, en casos extremos, insuficiencia respiratoria de graves consecuencias [22].

1.6. Epidemiología del botulismo.

El botulismo es una enfermedad neuromuscular aguda, grave y no contagiosa, producida por el bloqueo de la liberación de acetilcolina, desde las vesículas sinápticas, por la acción de toxinas botulínicas. Puede deberse a una infección intestinal en lactantes y adultos, produciéndose cuando la bacteria coloniza el intestino del lactante o de adultos con patologías que afectan a la flora gastrointestinal, favoreciendo la colonización de *C. botulinum*, y a partir de este hecho las bacterias comienzan a producir la toxina *in vivo*. Respecto al botulismo causado por heridas infectadas, se produce cuando las esporas de *C. botulinum* entran en la herida y pueden reproducirse en un medio anaeróbico, mientras que, el botulismo por inhalación, está asociado a sucesos intencionales o accidentales [17]. Mientras, el botulismo alimentario es causado por la ingesta de alimentos contaminados, en los que las esporas del *C. botulinum* sobreviven,

germinan y forman células vegetativas, las cuales producen las toxinas. Se considera una intoxicación grave ocasionada por el consumo de alimentos que contienen neurotoxinas preformadas. Esta intoxicación, la produce *Clostridium botulinum* de los grupos I y II (serotipo A, B, E y en raras ocasiones F) [15,23,24]. En general, los alimentos que contienen las esporas de estas bacterias están mal conservados, almacenados o cocinados, o han sido tratados sin el calor adecuado para inactivar las esporas y/o preparados de una manera que favorecen la proliferación de esporas y la producción de toxinas [25].

1.7. Importancia actual en los alimentos de la toxina botulínica.

Según el Centro Nacional de Epidemiología (CNE) el número de casos notificados de botulismo en España muestra una tendencia irregular entre los años 2010 y 2016. De los 59 casos notificados en este periodo de tiempo, 50 de ellos fueron de origen alimentario y 8 de estos casos fueron de origen intestinal en niños menores de un año. En uno de los casos no se identificó el origen de la enfermedad. Los años 2011, 2014 y 2016 fueron lo que presentaron mayor número de casos de botulismo alimentario en España, con más nueve casos por año. Finalmente, uno de los 12 casos notificados en el año 2011, derivó en una muerte ocasionada por botulismo alimentario.

Son numerosos los alimentos en los que se ha encontrado la toxina botulínica. Entre los alimentos más comunes se incluyen pescados, como el atún en lata y pescados fermentados, salados y ahumados; productos cárnicos, como el jamón y las salchichas y conservas vegetales con bajo grado de acidez o alto pH, tales como judías verdes, espinacas, setas y remolachas. Así mismo, se ha observado que las cepas proteolíticas han causado problemas después de la ingesta de verduras o carne conservadas en el hogar [23], mientras que las cepas no proteolíticas están asociadas con alimentos envasados con una larga vida útil, almacenados a bajas temperaturas [26]. En los últimos años en España, los casos notificados de botulismo alimentario tuvieron su origen principalmente en pescado desecado comercial y conservas caseras de setas, alubias y guindillas [6,7].

Harris et al [18], muestran la distribución geográfica de las cepas de *C. botulinum*; por ejemplo, las cepas de *C. botulinum* tipo A son prevalentes en Oeste de los EEUU, Brasil, Argentina y China mientras que las cepas de *C. botulinum* tipo B son prevalentes en el Este de los EEUU, Europa continental y Reino Unido. Las cepas de los tipos C y D se asocian a climas más cálidos como Indonesia, Sudáfrica y Australia. En España según los informes del CNE [7], las cepas de *C. botulinum* mayormente encontradas en los

alimentos fueron del tipo B y tipo E, aunque no en todos los casos de botulismo alimentario las cepas fueron identificadas.

1.7.1. Prevención del crecimiento de la toxina en alimentos.

El botulismo alimentario se puede prevenir con el procesamiento adecuado de los alimentos, la conservación y el control de la temperatura, entre otros. La temperatura de crecimiento de esta bacteria depende del grupo al que pertenezca. En el grupo I, esta temperatura oscila desde un mínimo de 10°C a un máximo de 48°C. En el grupo II, presenta un mínimo de 3°C a un máximo de 45°C. El valor de pH al que puede crecer *C. botulinum* depende del grupo del que se trate. En el grupo I, el pH mínimo es de 4,6 mientras que en el grupo II el valor de pH es de 5,0. Otros factores que influyen en el crecimiento de la bacteria es la concentración de cloruro sódico. Las cepas del grupo I pueden crecer en medios o matrices que contienen hasta un 10% de NaCl, sin embargo, las cepas del grupo II crecen con un valor máximo del 5% de NaCl. Finalmente, la actividad de agua mínima en el grupo I es de 0.94 mientras que en el grupo II es de 0.97 [18].

En resumen, se puede prevenir la formación de toxinas botulínicas en alimentos por diversas vías; evitando la contaminación de estos por medio de las esporas, inactivando las esporas si se encuentran presentes en los alimentos, previniendo la germinación y crecimiento de células vegetativas que resulta en la formación de neurotoxinas botulínicas y, por último, inactivando las neurotoxinas botulínicas en los alimentos. Como podemos observar, la inactivación de las esporas es un objetivo importante de la industria alimentaria.

1.7.2. Inactivación de la toxina botulínica.

Generalmente las toxinas botulínicas son sensibles al calor, el cloro, los álcalis y otros tratamientos físicos y químicos, pero se ha observado que estas toxinas son más estables a las altas temperaturas en ciertas condiciones, como pueden ser un pH 3,5-5 y en presencia de ácidos orgánicos, proteínas y ciertos iones como Mg^{2+} y Ca^{2+} [13]. Además de los factores anteriormente mencionados, la inactivación de neurotoxinas también depende del serotipo de *C. botulinum* al que pertenecen; por ejemplo se ha observado que las esporas del grupo I son considerablemente más resistentes al calor que las esporas del grupo II, aunque todavía, éstas muestran una moderada resistencia al calor [13].

Entre los tratamientos llevados a cabo para la inactivación de toxinas podemos encontrar el tratamiento a altas temperaturas, como el calentamiento a 70°C durante 60 minutos, o a 80°C durante 30 minutos, aunque una ebullición durante 5 minutos es suficiente para inactivar la toxina presente en alimentos [18]. Se ha observado numerosas fluctuaciones durante la inactivación con calor de la toxina botulínica, por ejemplo con la pasteurización, que podría afectar al grado de inactivación según las concentraciones de la toxina presentes en los alimentos [13]. Otro aspecto para considerar es la sensibilidad al cloro que presentan las toxinas botulínicas, ya que es conocido que las concentraciones de cloro utilizadas en agua potable son suficientes para la inactivación de estas. Este hecho permite que las superficies u objetos contaminados se puedan descontaminar con una solución de hipoclorito de 0,1 a 0,5% con 20 a 30 minutos de exposición, seguido con un enjuague de agua destilada. Finalmente, se ha observado que el ozono en una concentración de 5 a 6 mg/L, con tiempos de exposición de 32 minutos, también puede inactivar las esporas de *C. botulinum* [13].

1.8. Control de *C. botulinum* en alimentos.

El control de crecimiento de *C. botulinum* en los alimentos se lleva a cabo por distintos factores como el pH, la temperatura, el potencial de reducción, la actividad de agua, el nivel de oxígeno, la presencia de conservantes y la microflora de la competencia. Una vez elaborado los alimentos, el botulismo puede producirse por la exposición de los alimentos a temperaturas que permiten la formación de toxinas. En la mayoría de los alimentos, otros microorganismos crecen más rápido que el *C. botulinum*, como pueden ser las bacterias lácticas, por lo que modifican las condiciones de crecimiento del *C. botulinum*, disminuyendo el pH, produciendo metabolitos inhibidores e impidiendo su crecimiento [13]. Sin embargo, las esporas de *C. botulinum* son más resistentes al calor y a otros métodos de procesamiento como la exposición a cloro y derivados, peróxido de hidrógeno y modificación de los valores del pH, que son capaces de eliminar otras células vegetativas presentes en los alimentos. Por lo tanto, el mínimo procesamiento de los alimentos puede reducir o eliminar el número de microflora competidora y aumentar la probabilidad de que *C. botulinum* crezca y produzca toxinas [13].

En los alimentos contaminados, se puede prevenir el crecimiento de *C. botulinum* mediante el procesamiento térmico, en combinación con otros factores ya mencionados anteriormente para prevenir su crecimiento, como puede ser el pH en valores de 4,6 [13].

1.9. Metodología para el recuento de *C. botulinum* y la determinación de neurotoxinas.

Los métodos de detección difieren según el tipo de matriz en la que se realizará su determinación. Sin embargo, debido a la alta toxicidad de BoNT, sus métodos de detección deberían cumplir las condiciones siguientes [20]:

- a) Ser altamente sensibles, hasta el rango bajo de pg / mL.
- b) Capaz de detectar todos los serotipos y subtipos, incluidas las neurotoxinas libres y los complejos de alto peso molecular.
- c) Compatible con una amplia gama de matrices complejas.
- d) Otros puntos de interés son la simplicidad, el potencial de automatización y el rendimiento robusto del ensayo, que incluye una alta especificidad y precisión.

Existe una amplia variedad de métodos para la detección de las toxinas botulínicas. Entre estos métodos podemos encontrar el bioensayo en ratones, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, más conocido como ELISA, basado en la unión de anticuerpos específicos a las toxinas y aparición de fluorescencia. La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es el método por el cual, se detectan los genes de la bacteria de *C. botulinum*, pero no la toxina. Inmunoensayos de flujo lateral, donde se combina un sistema integral de análisis basado en anticuerpos capturados en un soporte inerte y electroquimioluminiscencia o ECL, está basado en una sustancia, que en presencia de potencial eléctrico se convierte en luminiscente, entre otros [16,18].

1.10. Precauciones de seguridad al trabajar con *C. botulinum* o su toxina.

La manipulación de cultivos que contienen *C. botulinum* o la toxina botulínica requiere procedimientos de seguridad específicos, debido a la toxicidad extrema de estas toxinas, ya que la ingestión o inhalación accidental puede causar graves consecuencias.

Los procedimientos que puedan generar formación de aerosol de esta toxina o que implique la manipulación de cantidades significativas de toxina botulínica, requiere instalaciones de Nivel de Bioseguridad 3 (BSL-3), también conocido como nivel de contención. Estos laboratorios de bioseguridad están diseñados para trabajar con microorganismos del grupo de riesgo 3, o grandes volúmenes de microorganismos del grupo de riesgo 2, por el mayor riesgo de formación de aerosoles. Este tipo de diseño no es el convencional, por lo que exige fortalecer las instalaciones del laboratorio, como el gradiente de presión negativa, que crea un flujo de aire dirigido al interior de la

instalación. Así mismo, se deben realizar operaciones de prevención de formación de estos aerosoles, como el uso de recipientes cerrados durante la centrifugación, evitar recipientes presurizados que contienen toxina activa y la aplicación de materiales absorbentes en derrames antes de la descontaminación. Todo el personal autorizado para manejar materiales tóxicos debe ser informado sobre los peligros de la toxina específica y todos los materiales que se emplearán en la manipulación de los microorganismos, así como los materiales utilizados en el análisis deben ser esterilizados antes de salir del laboratorio. En el laboratorio tienen que estar disponibles los antiseros terapéuticos en caso de intoxicación accidental. Los materiales tóxicos siempre deben estar contenidos en cajas o bandejas impermeables, irrompibles y debidamente señalizados con el símbolo de bioseguridad [27].

2. Objetivos

General:

Realizar un estudio bibliográfico sobre la metodología para la detección de *Clostridium botulinum* en productos cárnicos.

Específicos:

1. Reconocer los distintos tipos de toxinas botulínicas presentes actualmente en productos cárnicos.
2. Indicar los principales métodos utilizados para la determinación de la toxina botulínica en productos cárnicos.
3. Proponer metodologías alternativas a los métodos clásicos para la determinación de la toxina botulínica en productos cárnicos.

3. Material y métodos

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos como *ScienceDirect (Elsevier)* o *PubMed (MEDLINE)*, pero también se ha visitado la biblioteca virtual de la Facultad de Medicina (UVA), así como páginas oficiales de diversas organizaciones: Organización Mundial de la Salud y Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN).

La búsqueda se dividió en dos partes. La primera parte, centrada en la búsqueda sobre las características principales del microorganismo, de sus esporas y sus toxinas, así como la enfermedad que causa y las precauciones necesarias para trabajar con el

microorganismo y sus toxinas. La segunda parte se centró en la búsqueda de información sobre la metodología de detección de la toxina botulínica en distintas matrices complejas, en especial en productos cárnicos.

En la primera parte, se utilizaron palabras clave referentes al microorganismo, a las esporas y sus neurotoxinas. Las palabras utilizadas fueron *Clostridium botulinum*, *spores* and *neurotoxins*, realizando combinaciones entre ellas. La base de datos utilizada para realizar las búsquedas fue *ScienceDirect*.

En la segunda parte, se utilizaron las siguientes palabras clave: *Clostridium botulinum*, *meat products*, *detection*, *BoNT* y combinaciones entre ellas. En este apartado se emplearon bases de datos como *ScienceDirect* y *PubMed*. También se visitó la biblioteca virtual de la Facultad de Medicina (UVa), donde se accedió a libros de microbiología que trataban sobre el *Clostridium botulinum* y sus neurotoxinas.

Se aplicaron dos filtros de búsqueda, uno referente a los años de publicación, entre 2014 y 2019, aunque no siempre se siguió ese patrón de búsqueda debido a la falta de información actual sobre el microorganismo, por ello mucho de los artículos citados presentan mayor antigüedad que otros. El otro filtro aplicado fue “*review articles*”.

En la biblioteca virtual de la Facultad se utilizaron las mismas palabras clave, y se obtuvieron principalmente 3 libros que trataban sobre *Clostridium botulinum*, de los que se extrajeron varios capítulos que abordaban la metodología para la detección de su toxina.

En la base de datos *ScienceDirect*, aplicando los filtros y las palabras claves anteriores, se obtuvo un total de 1115 artículos científicos, de los que fueron utilizados 48. En la base de datos *PubMed*, aplicando los filtros y palabras clave anteriores, se obtuvieron 8 artículos, de los cuales se utilizaron 3.

De todos los artículos encontrados en las distintas bases de datos, han sido utilizados únicamente 51.

Finalmente, en la Tabla 3 y 4, se detallan los libros y las revistas consultadas para la realización del trabajo, así como el año de publicación en el caso de los libros y el cuartil al que pertenecieron los artículos consultados en el caso de las revistas.

Título del libro	Editorial	Año
1. <i>Botulinum Neurotoxins</i>	Springer	2012
2. Toxina Botulínica. Nuevas indicaciones terapéuticas.	Editorial medica Panamericana.	2011
3. <i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i>	Springer	2009

Tabla 3. Nombre del libro, editorial y año de publicación.

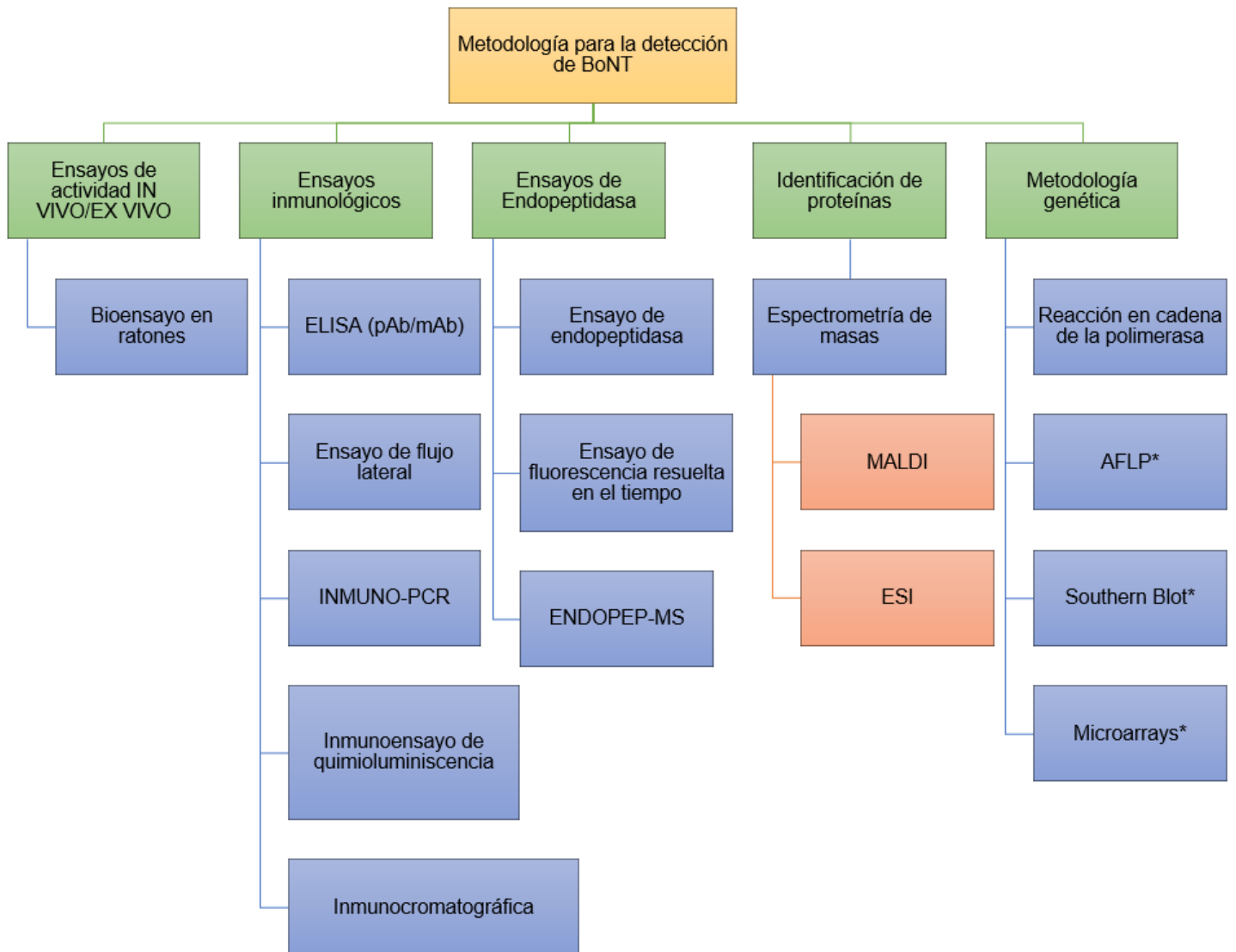
Nombre de la revista	Cuartil	Número de artículos
1. <i>Nature Reviews Microbiology</i>	Q ₁	1
2. <i>Infectious Disease Clinics of North America</i>	Q ₄	1
3. <i>Clinical Microbiology Reviews</i>	Q ₁	1
4. <i>Journal of Food Protection</i>	Q ₁	1
5. <i>Biologicals</i>	Q ₂	1
6. <i>Emerging Infectious Diseases</i>	Q ₁	1
7. <i>Applied and Environmental Microbiology</i>	Q ₁	7
8. <i>Journal of Immunological Methods</i>	Q ₂	5
9. <i>Analytical Biochemistry</i>	Q ₂	4
10. <i>International Journal of Mass Spectrometry</i>	Q ₂	1
11. <i>Veterinary Microbiology</i>	Q ₁	1
12. <i>International Journal of Food Microbiology</i>	Q ₁	2

Tabla 4. Nombre de revista, cuartil y número artículos revisado.

4. Resultados de la búsqueda bibliográfica

Tras realizar una búsqueda de artículos de revisión sobre metodología para la detección de la toxina botulínica, se encontraron desde métodos clásicos hasta métodos genéticos. Esta información se ha utilizado para realizar un esquema donde se resume la metodología desarrollada en los últimos años para la detección de la toxina. Las técnicas actuales se basan en dos grandes campos, la biología molecular y la proteómica, como se puede observar en la Figura 5. De esta manera se han perfeccionado métodos más rápidos y menos agresivos, que no implican el uso de organismos vivos y algunos de ellos son igual o más sensibles que el bioensayo en ratones, considerado el método de referencia. Entre los métodos que cabe destacar se encuentran los métodos inmunológicos como son; el ensayo ELISA mAb [28–31] o inmuno-PCR [32,33]; Los métodos basados en la actividad endopeptidasa, como los ensayos de endopeptidasas [34–36] y éstos combinados con espectrometría de masas [37,38]. Sin embargo, estos métodos presentan algunos inconvenientes, ya que no

todos determinan la toxina, si no el gen que la produce y además requiere de una validación posterior con el método del bioensayo en ratones, con el agravante de que algunos de esos métodos no son válidos para todas las matrices alimentarias. Actualmente, se están desarrollando métodos basados en la espectrometría de masas que, aunque no son tan sensibles como el bioensayo en ratones, permiten determinar el tipo de toxina que se encuentra en los alimentos. Finalmente, los métodos genéticos basados en la reacción en cadena de la polimerasa, PCR [39–42], hasta el momento no han tenido una aplicación importante en los alimentos, esto se debe posiblemente a que las matrices alimentarias pueden interferir en la replicación del DNA [43,44]. De todos los métodos observados en la Figura 5, se describirán aquellos que han sido más utilizados en la detección de la toxina botulínica en los alimentos.



*Estos métodos han sido utilizados para la detección de la bacteria, no de la toxina.

Figura 5. Esquema de las principales metodologías para la detección de la toxina botulínica. (Elaboración propia)

4.1. Ensayos de actividad *In Vivo/Ex Vivo*.

Bioensayo en ratones.

Los primeros estudios llevados a cabo con animales vivos, como cerdos, conejos y pollos, para la detección de la presencia de la toxina botulínica en los alimentos, se desarrollaron en el año 1921 [45]. En ese mismo año, Bengtson [46] demostró que la detección de la toxina botulínica es posible a concentraciones muy bajas usando ratones. Además, demostró que la mejor forma de poner en evidencia la presencia de la toxina botulínica procedente de los alimentos era la vía intraperitoneal. A partir de estas investigaciones se consideró este bioensayo como el método estándar y de referencia para la detección de la toxina botulínica ya que tenía múltiples ventajas, como la sensibilidad y el bajo límite de detección (hasta 10 pg/mL) [24].

En el bioensayo en ratones, es posible observar los pasos que produce la acción de la toxina botulínica y los resultados que provoca en los ratones. En este tipo de ensayos se pueden detectar todos los serotipos de toxinas. En primer lugar, se inyecta una solución que contiene la toxina, extraída del suero del paciente, sobrenadante de un cultivo bacteriano o de una matriz alimentaria por vía intraperitoneal. En segundo lugar, se observa la sintomatología durante las horas posteriores a la inyección, hasta 4 días después. En tercer lugar, se observan los síntomas característicos derivados de la presencia de BoNT, que son; cambio de pelaje en los ratones con apariencia arrugada, dificultad respiratoria, transformación de la apariencia del abdomen, estrechándose el radio de este generando dos porciones debido a un mayor esfuerzo respiratorio como consecuencia de la parálisis del diafragma. También se observa debilidad en las extremidades con una parálisis total posterior y jadeo, seguido de la muerte del animal por insuficiencia respiratoria [20].

La confirmación y tipificación de las neurotoxinas se realiza por pruebas de protección para el ratón que ha sido inyectado con el extracto. Este ratón posteriormente es inyectado con anticuerpos polivalentes y monovalentes. Se determina el tipo de toxinas observando a que animales se le ofrece protección con la inyección de la antitoxina o anticuerpo monovalente. Para calcular la cantidad de BoNT que produce la enfermedad, se inyectan distintas concentraciones de toxina a los ratones y se observa la aparición de los síntomas [20].

En la actualidad este bioensayo es el único método aceptado como estándar o de referencia para la detección de moléculas activas de BoNT [20]. Sin embargo, este

método de detección ha sido desplazado actualmente por múltiples razones, como los problemas éticos relacionados con el uso de animales vivos en los laboratorios, el tiempo de análisis y de interpretación de los resultados, sustancias presentes en los alimentos o heces que podrían causar también la muerte de los ratones y que no es por causa de BoNT, como por ejemplo la piridostigmina, entre otros [24,47]. Actualmente, los avances científicos favorecen la evolución de los métodos tradicionales, desarrollando nuevos ensayos, más rápidos y efectivos que el bioensayo en ratones.

Este método es interesante por su compatibilidad con el uso de matrices complejas, como son cultivos bacterianos, heces, contenido gástrico, suero, muestras ambientales, y alimentos como los productos cárnicos, aunque no todos los serotipos han sido detectados en estos productos [46,48–50].

4.2. Ensayos inmunológicos.

Debido a los inconvenientes de la metodología clásica, se produjo el desarrollo de una gran cantidad de ensayos *in vitro*, más conocidos como ensayos inmunológicos, basados en la reacción antígeno-anticuerpo, mostrando múltiples ventajas, como su alta especificidad, sensibilidad, rapidez y bajo costo, resultando útiles en el análisis microbiológico de los alimentos. En los ensayos inmunológicos se pueden observar tres etapas comunes [51]:

- a) En primer lugar, la preparación del antígeno.
- b) En segundo lugar, la obtención y evaluación del anticuerpo.
- c) Y, por último, el desarrollo de un ensayo inmunológico apropiado.

Se han desarrollado diversos métodos inmunológicos para la detección de BoNT, pero la mayoría no son tan sensibles como el bioensayo en ratones, y también tienen el inconveniente que detectan BoNT biológicamente inactivo, provocando la determinación de falsos positivos [24]. Una de las principales ventajas de estos métodos, es que son capaces de detectar los diferentes tipos de toxina botulínica en diferentes matrices complejas, entre las que destacamos los alimentos, aunque no en todos ha sido posible la detección de la toxina botulínica en productos cárnicos [20].

Los métodos inmunológicos más utilizados para la detección de BoNT en diferentes matrices complejas son: ELISA [28–31,52], Inmuno-PCR [32,33] y los ensayos de Electroquimioluminiscencia (ECL) [53,54].

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Los ensayos ELISA se desarrollaron por primera vez para BoNT a finales de los años 70 y fueron capaces de detectar aproximadamente 400 dosis letales de ratón (1 MLD es aproximadamente 10 pg de neurotoxina). Los ensayos basados en ELISA son los métodos *in vitro* más empleados para la detección de BoNT, debido a su alta sensibilidad, precisión y exactitud, a los tiempos de análisis cortos y a su fácil realización en laboratorios [47].

Esta técnica se caracteriza por el uso de marcadores enzimáticos para la detección, amplificación y clasificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En este método, el antígeno o el anticuerpo están conjugados a una enzima que se fija a un soporte sólido. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos, la interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante una reacción colorimétrica producida por la actividad de una enzima, al degradar el sustrato correspondiente. Esta técnica puede ser usada tanto para medir el antígeno como el anticuerpo, y pueden ser clasificada como competitivos, indirectos y tipo sándwich.

En los métodos competitivos, los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de un analito no marcado en la muestra.

Los ensayos no competitivos pueden subdividirse de acuerdo con el reactante inmovilizado, serán ensayos de captura de anticuerpos o de antígenos. Entre los ensayos de captura de anticuerpos destaca el ensayo indirecto, en el que los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado antiinmunoglobulina-enzima o proteína A-enzima [55].

La presencia de la toxina se mide mediante espectrometría y el valor de la absorbancia está relacionada con la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en el ensayo. Aunque la técnica de ELISA no es compleja, se deben controlar muchas variables entre las que encontramos: el tipo de fase sólida, la consistencia del proceso de lavado, la selección y ejecución de las enzimas y los sustratos empleados y la velocidad de terminación de la reacción [56].

Inmuno-PCR.

Este método, fue descrito por primera vez por Sano et al [57]. Se trata de una técnica que combina la sensibilidad de la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR con la especificidad de los ensayos basados en anticuerpos, estos dos hechos incrementan la

sensibilidad de la detección [58]. La PCR es usada para la amplificación de un segmento del DNA de una molécula marcadora, por ejemplo parte del gen de la luciferasa, esta molécula se une al complejo antígeno-anticuerpo indicando la presencia de la neurotoxina [32].

Debido a la eficacia de la amplificación del ácido nucleico, este método conduce a un aumento de la sensibilidad de 10 a 1000 veces en comparación con un inmunoensayo amplificado con enzimas análogas. El ensayo inmuno-PCR (iPCR) permite la detección de biomarcadores extraños en muestras biológicas complejas que son poco accesibles mediante inmunoensayos convencionales [59]. Si bien la PCR en tiempo real proporciona una amplificación de señal exponencial, no se puede usar directamente para la detección de antígenos [60]. Dependiendo de la estrategia de acoplamiento, los ensayos de iPCR requieren de 4 a 7 horas, con solo 3 horas de tiempo de uso, esto podría ser su principal inconveniente ya que podría provocar problemas de contaminación y el incremento del tiempo de medida. Asimismo, este método puede presentar reacciones inespecíficas, aunque estas reacciones pueden evitarse incrementando la concentración de la molécula de DNA marcadora.

Inmunoensayo de enzimas de electroquimioluminiscencia (ECL).

Los ensayos de electroquimioluminiscencia (ECL) se pueden usar para detectar y cuantificar la presencia y la toxicidad de una neurotoxina específica, en este caso BoNT, basada en una señal de ECL, mostrando sensibilidad similar a la del bioensayo en ratones, en menor tiempo [61]. Los ensayos de ECL utilizan un formato de inmunoensayo, con perlas magnéticas marcadas que contienen el anticuerpo unido y que capturan la neurotoxina. Posteriormente, se utiliza un segundo anticuerpo marcado con un quelato. Cuando la toxina está presente, los anticuerpos de detección y captura forman un inmunocomplejo. Este inmunocomplejo forma un cordón magnético marcado con un quelato. Un imán en una superficie de electrodo dentro del instrumento recoge las perlas paramagnéticas. El quelato en la superficie del cordón produce una señal ECL que puede ser cuantificada por el instrumento [20].

La principal diferencia con el método de ELISA se halla en el anticuerpo revelador que se utiliza ya que se encuentra marcado con una sustancia que se torna luminiscente en presencia de potencial eléctrico. Su límite de detección depende de la matriz en la que se encuentra la toxina.

Otro tipo de métodos inmunológicos son las técnicas inmunocromatográficas. A este grupo también pertenecen los ensayos de flujo lateral, uno de los métodos de detección

de neurotoxinas más sencillos y rápidos. Se trata de una membrana de nitrocelulosa o nylon donde se encuentran absorbidos y bloqueados los anticuerpos con compuestos químicos (Ver Figura 6). La muestra se aplica en un extremo de la tira y migra por acción capilar al extremo opuesto. Mientras migran a lo largo de la tira, las moléculas de la muestra se unen a los anticuerpos de detección inmobilizados de la tira. El complejo antígeno-anticuerpo continúa migrando a lo largo de la tira y es capturado en la zona de detección por otro anticuerpo de captura, lo que da lugar a un cambio visible de color. [20,61]. Estas técnicas son rápidas y sencillas, obteniéndose resultados en 15-30 minutos, pero presentan otros inconvenientes, como la sensibilidad, ya que son menos sensibles que otros métodos mencionados anteriormente [62].

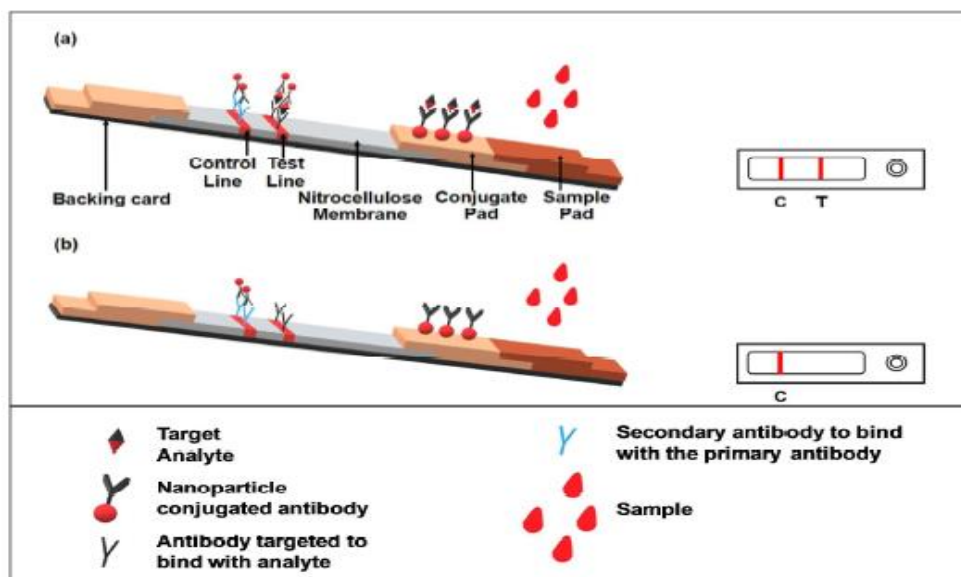


Figura 6. Representación esquemática de un dispositivo LFA (a) Resultado positivo mientras el analito de interés está presente en la muestra, (b) Resultado negativo mientras que el analito de interés no está presente en la muestra [63].

4.3. Ensayos de endopeptidasa.

El descubrimiento de que una parte de la toxina botulínica presenta actividad endopeptidasa dependiente de Zinc [24], altamente específica a proteínas presentes en la hendidura presináptica, ha conducido al desarrollo de varios ensayos *in vitro* para la detección de la toxina. Estos ensayos de endopeptidasa se basan en la proteólisis de las proteínas sinápticas en combinación con la detección inmunológica del péptido hidrolizado o una emisión de fluorescencia cuando el péptido marcado con un compuesto fluoróforo (componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente) es hidrolizado por la toxina botulínica. Esta actividad se lleva a cabo por la acción endopeptidasa de la cadena ligera [20,24]. Este ensayo se fundamenta en la

escisión específica del complejo de proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, por sus siglas en inglés), el cual incluye sinaptobrevina, SNAP-25 y syntaxina. Se trata de un complejo proteico esencial para la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica y acción fundamental en la exocitosis de la acetilcolina [64].

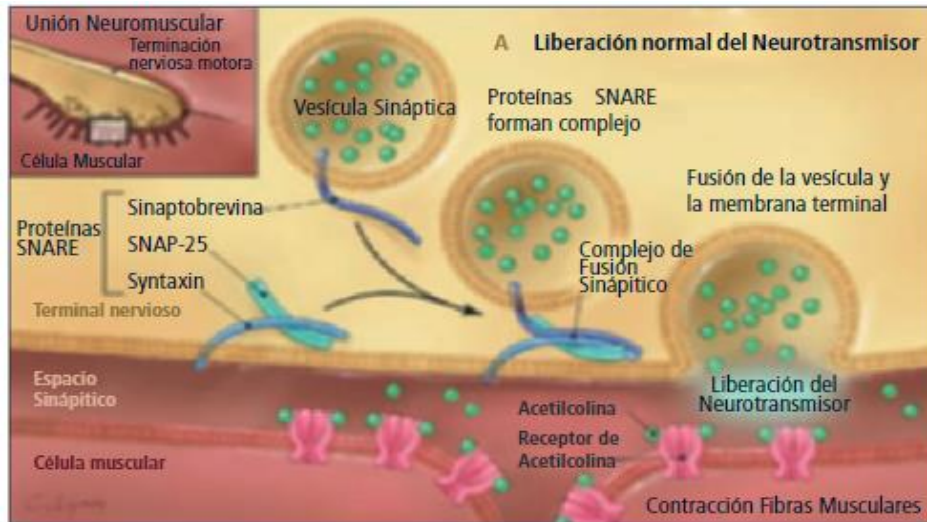


Figura 7. La liberación de la Acetilcolina en la unión neuromuscular es mediada por SNARE que permite que la membrana de la vesícula sináptica que contiene Acetilcolina se fusione con la membrana celular de la neurona. Después de la fusión con la membrana, la Acetilcolina es liberada en el espacio sináptico y a continuación ligada a los receptores de la célula muscular [64].

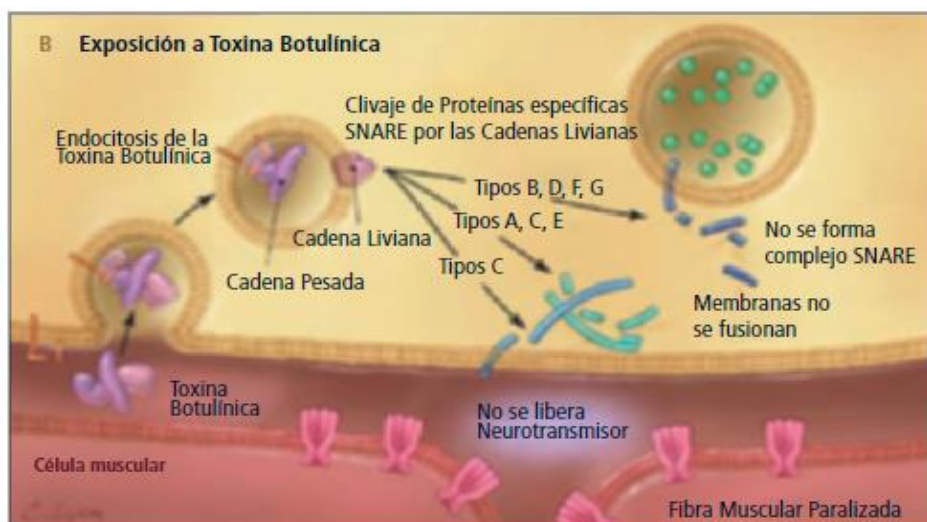


Figura 8. La BoNT se une a la membrana celular de la neurona en el terminal nervioso y entra por endocitosis. La cadena ligera de la toxina escinde los sitios específicos de las proteínas SNARE, evitando el completo montaje de la fusión del complejo en la sinapsis y así bloquea la liberación de Acetilcolina [64].

Según la forma de medir el péptido escindido podemos encontrar diversos tipos de ensayos:

- a) Las neurotoxinas A, E y C₁ hidrolizan el SNAP-25, proteína asociada a sinaptosoma con una masa molecular de 25 kDa. La hidrólisis de esta proteína produce una parálisis flácida. Las neurotoxinas B, D, F y G hidrolizan la VAMP, es una proteína asociada a la membrana de la vesícula [35]. La neurotoxina C₁ hidroliza la sintaxina responsable de la liberación de la acetilcolina al medio extracelular. Por lo tanto, la ruptura de la proteína SNAP-25, genera una señal bioluminiscente, cuando se encuentra unida a un fluoróforo [47].
- b) Otro ensayo utilizado aplica el uso de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Aquí, un péptido de SNARE que alberga el sitio específico de escisión de BoNT, es marcado con un donante y un aceptor de fluorescencia. Siempre que el par donante-aceptor de fluorescencia se encuentre cerca de la molécula de sustrato no escindido, la fluorescencia del donante excitado se absorbe por la molécula aceptora de fluorescencia. Tras la escisión del sustrato, los dos fluoróforos se separan, de modo que la fluorescencia del donante ya no se absorbe y se puede medir [20].

Barr y colaboradores [65], desarrollaron otro método para la detección de productos de escisión mediante espectrometría de masas. En esta técnica se determina la masa de los productos de escisión y, por lo tanto, la ubicación exacta de la escisión del sustrato. Dado que la ubicación de la escisión del sustrato es específica del serotipo, pueden diferenciarse las diferentes BoNT [66]. La combinación del ensayo de endopeptidasa y la espectrometría de masas, denominado ensayo Endopep-MS, permite detectar la acción enzimática de la cadena ligera en un sustrato peptídico de composición y estructura similar a la proteína a la toxina. Este método tiene una sensibilidad de detección comparable a la del bioensayo en ratones. En contraste con otros métodos *in vitro*, los ensayos de endopeptidasa en combinación con la espectrometría de masas detectan la actividad funcional de las moléculas de BoNT [20,38].

De acuerdo con Lindström y Korkeala [23], los métodos basados en la actividad endopeptidasa tienen dos ventajas principales respecto a otros métodos debido a que detectan únicamente las neurotoxinas activas, son generalmente más sensibles que el bioensayo en ratones (10 veces más) y son altamente específicas por lo que no producen reacciones cruzadas entre las distintas neurotoxinas botulínicas y las toxinas del tétanos. Estos métodos han sido utilizados con éxito en alimentos como el paté y

queso, entre otros. Uno de los inconvenientes de estos métodos es la posible interferencia entre alimentos con un alto contenido en grasa y los anticuerpos policlonales. Esta dificultad ha sido eliminada usando anticuerpos monoclonales [38]. Sin embargo, no todos los distintos tipos de BoNT/B que producen las diversas cepas de *C. botulinum* son reconocidos por los anticuerpos monoclonales [67]. Otro inconveniente, es que esta tecnología requiere un equipo costoso y una experiencia técnica altamente especializada, por lo que es menos común en los laboratorios de rutina clínica [38].

4.4. Identificación de proteínas.

Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una herramienta analítica para medir la masa molecular de los compuestos proteicos. Es la principal metodología en investigación proteómica y se utiliza para determinar la cuantificación, caracterización e información estructural de las proteínas. La espectrometría de masas implica la separación de mezclas de sustancias en componentes individuales mediante ionización de estos [68]. Los dos métodos más utilizados para la ionización de proteínas son la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización por Electrospray (ESI). La mayoría de los métodos de ionización dan como resultado la creación de iones de muestra con carga positiva y negativa y depende de la afinidad de protones de la muestra [68].

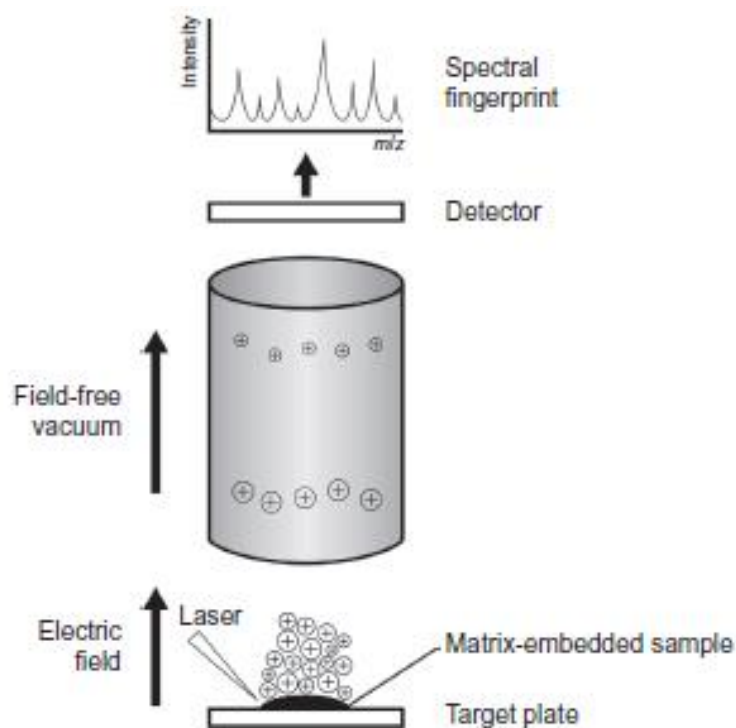


Figura 9. La ionización MALDI, acoplada a un analizador TOF, es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas y moléculas orgánicas grandes que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales [69].

En comparación con otros métodos *in vitro* descritos hasta ahora, la importancia de los datos obtenidos es mayor para los métodos basados en la espectrometría de masas, ya que permiten una identificación inequívoca de las toxinas por un patrón único de huella dactilar peptídica o una secuencia de proteínas [20]. Sin embargo, la espectrometría de masas tiene algunos problemas con la sensibilidad (49 – 375 ng/mL) mientras que produce datos de alta precisión y especificidad [20]. En este marco de trabajo, la combinación de espectrometría de masas con métodos de afinidad basados en anticuerpos es una estrategia en la cual una molécula de interés primero es capturada utilizando un enfoque basado en anticuerpos, y luego es analizada por espectrometría de masas incrementando tanto la especificidad como la sensibilidad [58].

Este método generalmente no es tan sensible como otros métodos *in vitro*, por varias razones como, por ejemplo, el medio de cultivo que se utiliza comúnmente en laboratorios de microbiología contiene componentes, como sales o indicadores de pH, que pueden interferir en la generación de espectros de masas. También influye el número y la intensidad de los picos generados por espectrometría de masas ya que decrece conforme avanza la edad del cultivo, siendo preferible cultivos de 24-48 horas para obtener una correcta identificación de microorganismos [70]. Por último, requiere pasos de pre-enriquecimiento o purificación para cumplir con matrices complejas [20].

4.5. Ensayos genéticos para detección de BoNT.

En el periodo comprendido entre 1975 a 1985, se produjo el desarrollo de las técnicas inmunológicas, a partir de 1985 a 1995 empezaron a surgir las técnicas genéticas [51].

A diferencia de los métodos citados anteriormente, los métodos genéticos se dirigen a la detección de características celulares mucho más estables contenidas en los ácidos nucleicos, es decir, sus genes.

En los últimos años es cada vez más frecuente en los laboratorios de microbiología de los alimentos el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el DNA de genes presentes en los microorganismos diana y disponer así de una cantidad suficiente que permita su detección. Se trata de una técnica específica, sensible y rápida, a lo que contribuye el desarrollo de metodologías alternativas de detección de los productos de PCR que evitan el procesamiento post-reacción. Dichas

metodologías están basadas en el empleo de sondas específicas con doble marcaje fluorescente que, además de posibilitar la visualización del progreso de la reacción, facilitan la automatización del proceso y permiten la cuantificación de la cantidad de DNA diana presente inicialmente en la muestra (PCR cuantitativo en tiempo real).

A pesar de tratarse de una técnica sofisticada, el empleo de la técnica de PCR en tiempo real en el laboratorio de microbiología de los alimentos se está viendo facilitado en los últimos años por el desarrollo de sistemas para la detección de patógenos de los alimentos, requieren una manipulación mínima y reducen la necesidad de interpretación de los resultados [71].

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de la década de 1980, esta técnica permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de DNA, basándose en mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del DNA durante la división celular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una técnica molecular líder en seguridad alimentaria [72].

Se trata de replicar una y otra vez un mismo fragmento de DNA y, para ello, debemos realizar *in vitro* lo que hacen las células *in vivo* para replicar su DNA. Puede usarse para detectar trazas de DNA de una muestra para ayudar en la identificación de aislamientos, determinación de patogenicidad y la presencia o ausencia de microorganismos diana. Esta técnica puede detectar el gen de la toxina, pero no puede determinar si el gen está expresado y si la proteína expresada es realmente tóxica [61].

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

- 1) Desnaturalización del DNA bicatenario presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90 °C.
- 2) Unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente, delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.
- 3) Extensión de la cadena de DNA a copiar a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima DNA polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de DNA de la muestra [51].

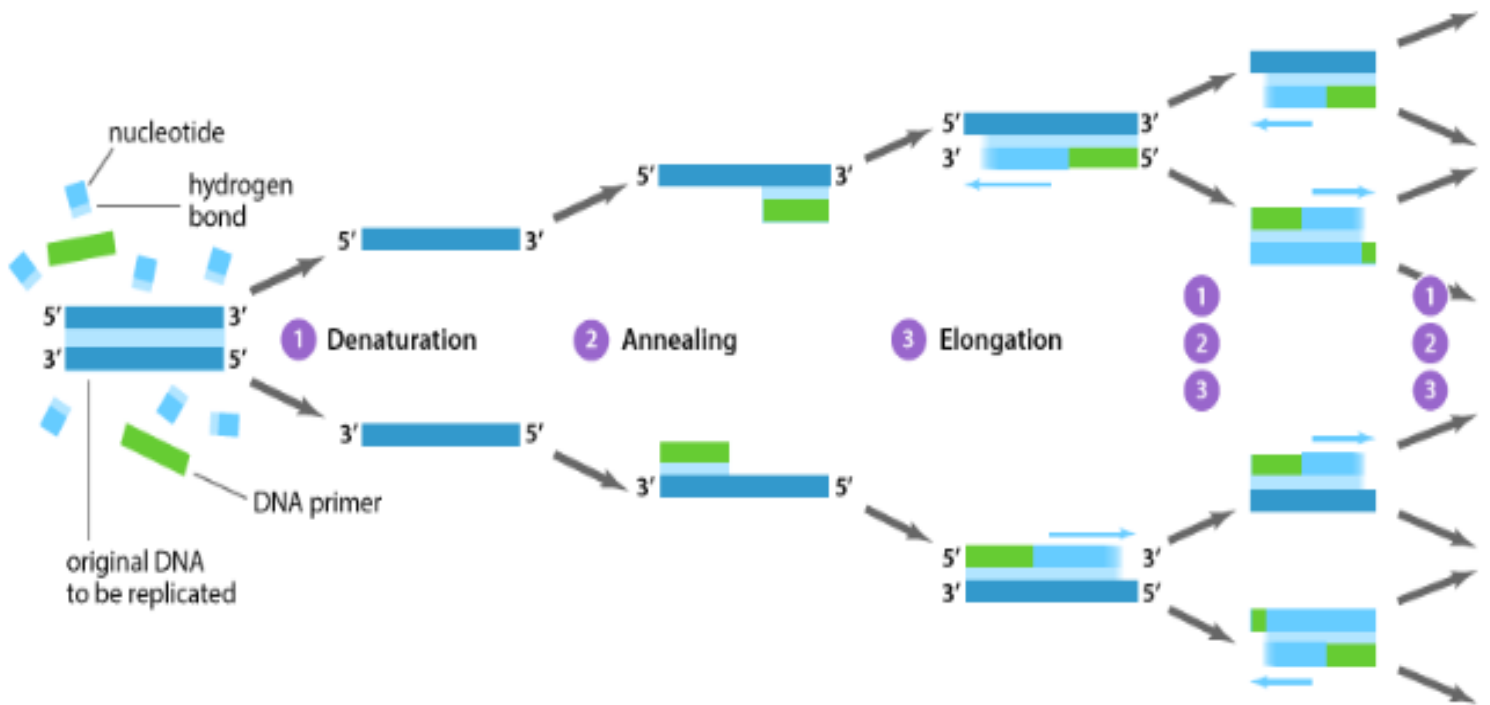


Figura 10. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [73].

Además de la técnica de PCR y sus variantes, existen numerosos métodos genéticos que han sido utilizados para la detección de los genes de los distintos tipos de toxina botulínica, como son los métodos basados en los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). Los AFLP consisten en la digestión completa del DNA genómico total con enzimas de restricción, seguida de la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debidos a mutaciones en la secuencia de DNA en, o cerca de, los sitios de restricción. Los polimorfismos se detectan por electroforesis como un patrón de fragmentos de DNA amplificados (bandas) que difieren en número y tamaño [74].

Otros métodos empleados para la detección de la toxina han sido los Microarrays. El origen de los Microarrays de DNA, también llamados chips de DNA, hay que buscarlo en la automatización y miniaturización de un grupo de técnicas clásicas de hibridación de DNA desarrolladas hace unas décadas: técnicas de Southern y Northern blotting [51].

Un microarray de DNA es una red muy precisa de alta densidad compuesta de moléculas de ácidos nucleicos de una sola cadena, denominadas “sondas”, unidas covalentemente a la superficie de un pequeño soporte sólido. La utilidad del DNA en este formato deriva de la propiedad que tienen las sondas para hibridar, con una elevada especificidad, a una secuencia complementaria. Por ello, los microarrays de DNA

pueden emplearse para examinar mezclas complejas de miles de ácidos nucleicos, permitiendo localizar una secuencia diana en una muestra problema [51].

Hasta ahora se han descrito las principales técnicas utilizadas a lo largo de los años para la detección de la toxina botulínica y de las células en distintas matrices complejas. En la Tabla 5 se muestran las distintas técnicas para la detección de la toxina, así como el tiempo de ensayo, su límite de detección y las principales matrices donde se han utilizado. El bioensayo en ratones, las técnicas de endopeptidasas combinadas con espectrometría de masas, el método de ELISA para anticuerpos policlonales (ELISA pAb), espectrometría de masas, la técnica de PCR y FRET han sido capaces de detectar todas las neurotoxinas que producen los cuatro grupos de *C. botulinum*, excepto FRET que sólo ha detectado BoNT/D que producen las cepas de *C. botulinum* del grupo III. De estos métodos, el más sensible es Endopep-MS cuya sensibilidad se encuentra 0.05-50 pg/ml y es una de las técnicas más versátiles, ya que ha sido utilizada en diversas matrices complejas como son el sobrenadante en cultivo, suero, heces y alimentos, pero no productos cárnicos.

Los ensayos de endopeptidasa, el ensayo de ELISA para anticuerpos monoclonales (ELISA mAb), ensayos de flujo lateral y pruebas inmunocromatográficas han sido capaces de detectar las diferentes toxinas producidas por las bacterias de los grupos I, II y III. Sin embargo, los ensayos de endopeptidasa y ensayos de flujo lateral únicamente han detectado BoNT/D del grupo III. Además, ELISA mAb y las pruebas inmunocromatográficas han detectado todos los tipos de neurotoxinas de los tres grupos. Finalmente, en los ensayos de flujo lateral sólo se han detectado la toxina tipo A y C del grupo I y las toxinas B y E del grupo II. Entre todos los métodos anteriores, el más sensible ha sido ELISA mAb, cuya sensibilidad se encuentra entre 1-1000 pg/mL. Esta técnica ha sido utilizada en diversas matrices complejas como son el sobrenadante de cultivo bacteriano, suero y alimentos, aunque no ha sido utilizada en productos cárnicos.

Respecto a la detección de las BoNT en productos cárnicos, únicamente los ensayos de endopeptidasa y electroquimioluminiscencia han sido capaces de detectar la toxina en estos productos, por ejemplo, el paté y extractos de carne.

Los ensayos basados en inmuno-PCR han sido desarrollados para detectar BoNT/A, mientras que los ensayos de ECL han detectado las toxinas A, B, E y F de los grupos I y II en diferentes matrices complejas como suero, alimentos y productos cárnicos, como extracto de carne. De estas dos técnicas la más sensible es el inmuno-PCR con un límite de detección de 1-5 pg/mL.

Las principales causas de botulismo alimentario están originadas por las toxinas tipo A, B, E y F, sin embargo, las más frecuentes son las toxinas del tipo A y B las cuales se han encontrado en alimentos como conservas vegetales de preparación casera y alimentos cárnicos en Europa [75]. En España, los principales problemas originados por *C. botulinum* entre los años 2010 y 2016 fueron ocasionados por conservas de preparación casera de setas, guindillas, alubias y pescado desecado comercial [6,7].

Comparando las ventajas de los distintos métodos, el bioensayo en ratones permite la detección de las moléculas de BoNT activas y la detección de todos los serotipos de toxina, además, tiene compatibilidad con múltiples matrices complejas, alta sensibilidad y bajo límite de detección (Ver Tabla 5). Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes, como los problemas éticos relacionados con el uso de animales vivos en la experimentación, un largo tiempo de análisis y una complicada interpretación de los resultados, entre otros. Por su parte los ensayos inmunológicos, son capaces de detectar los diferentes tipos de BoNT en diferentes matrices complejas, aunque muchos de ellos presentan algunos inconvenientes como la incapacidad de detectar BoNT biológicamente activo y una sensibilidad inferior al bioensayo en ratones. Debido a los inconvenientes de los métodos inmunológicos sobre la detección de neurotoxinas inactivas, surgieron varios métodos basados en la actividad endopeptidasa de la cadena ligera de la toxina. Estos métodos únicamente detectan BoNT activas, en general son más sensibles y específicos que otros métodos, por lo que no producen reacciones cruzadas entre las distintas moléculas de BoNT. Sin embargo, al tratarse de ensayos enzimáticos pueden ser muy sensibles a la interferencia con los componentes de la matriz, en particular con otras proteasas. Otro de los inconvenientes es que requiere de un equipo costoso y una experiencia técnica especializada, además los resultados obtenidos deben ser confirmados por bioensayo en ratones o por métodos basados en espectrometría de masas.

Respecto a los métodos basados en la identificación de proteínas, como la espectrometría de masas que permite identificar sin equivocación el tipo de toxina por un patrón único de huella dactilar peptídica o secuenciación de proteínas, sin embargo, presenta algunos inconvenientes relacionados con la sensibilidad, debido a las sustancias utilizadas en los medios de cultivo, especialmente en la fase previa de enriquecimiento, utilizada para la detección de toxinas en matrices complejas y el tiempo de cultivo que transcurre antes de realizar la prueba, ya que puede producir interferencia en los resultados.

Por último, se han desarrollado métodos genéticos, que no detectan la toxina, sino el gen que la produce, pero no pueden determinar si el gen se ha expresado o si la proteína expresada es realmente tóxica. Estas técnicas en comparación con las anteriores son técnicas más sensibles, rápidas y específicas que requieren una mínima manipulación.

	BoNT Tipo	Límite de detección	de	Tiempo de análisis	Aplicación	Referencias
Bioensayo en ratones	A, B, C, D, E, F, G	10– 100 pg/mL		0.5 – 4 días	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos, heces	[46,48–50]
Ensayo de endopeptidasa	A, B, D, E, F	0.1 – 100 pg/mL		5 – 24 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, toxina purificada, alimentos (productos cárnicos)	[34–36]
Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)	A, B, D, E, F, G	0.035 – 150 ng/mL		15 min – 20 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos.	[76–78]
Endopep-MS	A, B, C, D, E, F, G	0.05 – 50 pg/mL		4 – 17 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos, heces	[37,38,79]
ELISA (pAb)	A, B, C, D, E, F, G	0.1 – 100 ng/mL		5 horas – 2 días	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos, heces	[52,80]
ELISA (mAb)	A, B, C, D, E, F	1 – 1000 pg/mL		5 – 7 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos (leche)	[28–31]
Ensayos de flujo lateral	A, B, D, E	0.3 – 250 ng/mL		10 min – 4 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos, heces	[63]
Inmuno-PCR	A	1 – 5 pg/mL		3 – 10 horas	Toxina purificada	[32,33]
Electroquimioluminiscencia	A, B, E, F	0.45 – 5000 pg/mL		2 – 3 horas	Suero, alimentos (extracto de res)	[53,54]
Inmuncromatográfica	A, B, C, D, E, F	0.01 – 50 ng/mL		40 min	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos	[81–83]
Espectrometría de masas	A, B, C, D, E, F, G	49 – 375 ng/mL		8 – 14 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos, heces	[37,38]
PCR	A, B, C, D, E, F, G	10 ³ – 10 ⁵ GE/mL GE: equivalentes del genoma		0.5 – 4 horas	Sobrenadante de cultivo, suero, alimentos, heces	[39–42]

Tabla 5. Resumen de la metodología empleada para la detección de la toxina botulínica. (Elaboración propia a partir de información extraída del siguiente capítulo de libro) [20].

5. Conclusiones.

El botulismo alimentario es una intoxicación ocasionada por el consumo de alimentos que contiene neurotoxinas botulínicas preformadas. Se considera un grave problema de salud y una situación de emergencia, ya que en ciertas ocasiones puede causar la muerte, por ello es necesario obtener un diagnóstico rápido, para evitar complicaciones en la enfermedad.

Las principales toxinas botulínicas presentes en los alimentos son aquellas producidas por las cepas de *C. botulinum* de los grupos I y II (serotipos A, B, E y en raras ocasiones F) [15,23,24].

Del año 2010 al año 2016 en España, según el Centro Nacional de Epidemiología (CNE), se produjeron un total de 50 casos de botulismo alimentario, sin detectar casos producidos por el consumo de productos cárnicos ni derivados [1–7]. En el año 2016 en España, BoNT/E y BoNT/B fueron responsables de 5 casos de botulismo alimentario [7].

Tras la búsqueda de información se ha determinado que en los productos cárnicos se encuentra principalmente los siguientes tipos de toxina BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E y BoNT/F [54].

La metodología basada en la determinación de los genes, como los ensayos de PCR, presentan múltiples ventajas sobre el resto de los métodos, ya que son técnicas más sensibles, rápidas y específicas, que requieren una mínima manipulación. El principal inconveniente es que no detectan las toxinas activas, sino el gen que la produce [42].

Los métodos más utilizados para la detección de estos tipos de BoNT en alimentos son: el bioensayo en ratones [46], métodos basados en ELISA [52], PCR [39] y ensayos basados en la actividad endopeptidasa combinados con espectrometría de masas [38]. Este último método junto con el bioensayo en ratones, han sido utilizados para detectar los distintos tipos de BoNT en productos cárnicos, tales como el paté [67]. El método basado en ECL también ha sido capaz de detectar toxinas en extractos de carne [54].

En resumen, es necesaria una combinación adecuada de métodos de detección de BoNT basados en diferentes enfoques funcionales, inmunológicos o espectrométricos, pudiéndose obtener resultados fiables y con alta sensibilidad confirmados en un tiempo razonable.

6. Bibliografía.

- [1] Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2010. Madrid, 2012. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [2] Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2011. Madrid, 2013. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [3] Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2012. Madrid, 2014. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [4] Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2013. Madrid, 2015. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [5] Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2014. Madrid, 2016. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [6] Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2015. Madrid, 2017. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [7] Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles [Internet]. Informe anual 2016. Madrid, 2018. Available from: <https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>
- [8] ANICE. Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España 2019. (accessed May 27, 2019). Available from: https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico_171_1_ap.html
- [9] Ministerio de la Presidencia. Disposición 6435 del BOE núm. 147 de 2014. Boletín Oficial Del Estado 2014;147:46058–78. doi:10.1016/j.chb.2010.09.017.
- [10] UE. Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, 2004;L139/1:54.
- [11] SEMERGEN. Documento temático sobre "la carne y la salud en adultos". Available from: https://www.carneysalud.com/uploads/articulos/GUIA_CARNE_Y_SALUD.pdf
- [12] Inocuidad alimenticia | FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Available from: <http://www.fao.org/food-safety/es/> (accessed June 11, 2019).
- [13] Michael P. Doyle, Robert L. Buchanan, editors. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 4 th edition, ASM Press, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904, USA Send: n.d., p. 441–58. doi:10.1128/9781555818463.
- [14] Paul De Vos, George M. Garrity DJ, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig FAR, Whitman K-HS and WB, editors. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology. Second Edition. doi:10.1007/b92997.
- [15] Peck MW, Vliet AHM Van. Impact of Clostridium botulinum genomic diversity on food safety. Curr Opin Food Sci. 2016;10:52–9. doi:10.1016/j.cofs.2016.09.006.
- [16] Ministerio de Salud de la Nación. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia

epidemiológica del botulismo alimentario. Edición 2016. Programa nacional de prevención y control de las intoxicaciones-precotox departamento de salud ambiental serie: Temas de salud ambiental n° 26. 2016. Available from: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000783cnt-20160225_Guia_Botulismo_Alimentario_2016.pdf

- [17] Botulismo 2018. Organización Mundial de la Salud. (accessed March 23, 2019). Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism>
- [18] Harris A. Clostridium botulinum. *Encycl Food Heal* 2016;141–5. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00172-0.
- [19] Carmona MD, de la Calle MD. Botulismo 2002;243–309. doi:<http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.549>.
- [20] Dorner MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG. Complexity of Botulinum Neurotoxins: Challenges for Detection Technology, Springer, Berlin, Heidelberg; 2012, p. 219–55. doi:10.1007/978-3-642-33570-9_11.
- [21] Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: Genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:535–49. doi:10.1038/nrmicro3295.
- [22] Filipová M, Kubicová Z, Jurovčíková J, Cabanová L. Monitoring genes encoding botulinum neurotoxins type A B , E and F in selected samples of food and feed. 02/2016:99-102.
- [23] Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:298–314. doi:10.1128/CMR.19.2.298-314.2006.
- [24] Johnson EA, Montecucco C. Botulism. *Handb Clin Neurol* 2008;91:36.
- [25] Villar RG, Elliott SP, Davenport KM. Botulism: The Many Faces of Botulinum Toxin and its Potential for Bioterrorism. *Infect Dis Clin North Am* 2006;20:313–27. doi:10.1016/j.idc.2006.02.003.
- [26] Fernandez PS, Peck MW. Predictive Model Describing the Effect of Prolonged Heating at 70 to 80°C and Incubation at Refrigeration Temperatures on Growth and Toxigenesis by Nonproteolytic Clostridium botulinum. vol. 60. 1997;1064-71
- [27] UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID. BIOSLab Plataforma de Formación en Bioseguridad en Laboratorios 2019. (accessed April 2, 2019). Available from: <https://www.visavet.es/es/bioslab/>
- [28] Weingart OG, Schreiber T, Mascher C, Pauly D, Dorner MB, Berger TFH, et al. The case of botulinum toxin in milk: Experimental data. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:3293–300. doi:10.1128/AEM.02937-09.
- [29] Scotcher MC, Cheng LW, Stanker LH. Detection of botulinum neurotoxin serotype b at sub mouse LD50 levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. *PLoS One* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0011047.
- [30] Brooks CE, Clarke HJ, Finlay DA, McConnell W, Graham DA, Ball HJ. Culture enrichment assists the diagnosis of cattle botulism by a monoclonal antibody based sandwich ELISA. *Vet Microbiol* 2010;144:226–30. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.030.
- [31] Ferreira JL, Hamdy MK, McCay SG, Zapatka FA. Monoclonal antibody to type F Clostridium botulinum toxin. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:808–11.
- [32] Wu HC, Huang, Lai, Shaio. Detection of clostridium botulinum neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:321–5. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00909.x.
- [33] Chao HY, Wang YC, Tang SS, Liu HW. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for Clostridium botulinum neurotoxin type A. *Toxicon* 2004;43:27–34. doi:10.1016/j.toxicon.2003.10.013.
- [34] Sapsford KE, Taitt CR, Loo N, Ligler FS. Biosensor detection of botulinum toxoid a and

- staphylococcal enterotoxin B in food. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5590–2. doi:10.1128/AEM.71.9.5590-5592.2005.
- [35] Jones RGA, Ochiai M, Liu Y, Ekong T, Sesardic D. Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *J Immunol Methods* 2008;329:92–101. doi:10.1016/j.jim.2007.09.014.
- [36] Jones RGA, Liu Y, Sesardic D. New highly specific botulinum type C1 endopeptidase immunoassays utilising SNAP25 or Syntaxin substrates. *J Immunol Methods* 2009;343:21–7. doi:10.1016/j.jim.2009.01.001.
- [37] Terilli RR, Moura H, Woolfitt AR, Rees J, Schieltz DM, Barr JR. A historical and proteomic analysis of botulinum neurotoxin type/G. *BMC Microbiol* 2011;11:232. doi:10.1186/1471-2180-11-232.
- [38] Kalb SR, Smith TJ, Moura H, Hill K, Lou J, Geren IN, et al. The use of Endopep-MS to detect multiple subtypes of botulinum neurotoxins A, B, E, and F. *Int J Mass Spectrom* 2008;278:101–8. doi:10.1016/j.ijms.2008.04.004.
- [39] De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, Lindström M, Messelhäusser U, Aldus CF, et al. Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:6457–61. doi:10.1128/AEM.00805-09.
- [40] Kirchner S, Melanie Krämer K, Schulze M, Pauly D, Jacob D, Gessler F, et al. Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:4387–95. doi:10.1128/AEM.02490-09.
- [41] Fach P, Fenicia L, Knutsson R, Wielinga PR, Anniballi F, Delibato E, et al. An innovative molecular detection tool for tracking and tracing *Clostridium botulinum* types A, B, E, F and other botulinum neurotoxin producing *Clostridia* based on the GeneDisc cyclor. *Int J Food Microbiol* 2011;145:S145–51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.006.
- [42] Fenicia L, Fach P, van Rotterdam BJ, Anniballi F, Segerman B, Auricchio B, et al. Towards an international standard for detection and typing botulinum neurotoxin-producing *Clostridia* types A, B, E and F in food, feed and environmental samples: A European ring trial study to evaluate a real-time PCR assay. *Int J Food Microbiol* 2011;145:S152–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.001.
- [43] Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012;113:1014–26. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- [44] Klančnik A, Kovac M, Toplak N, Piskernik S, Jersek B. PCR in Food Analysis. *Polym Chain React* 2012. doi:10.5772/38551.
- [45] Graham R, Schwarze H. Avian Botulism (Type A) or Limber Neck. *J Infect Dis* 1921;28:317–22.
- [46] Bengtson IA. Direct Inoculation Test for B. *Botulinus* Toxin: Determination of the Presence of B. *Botulinus* Toxin by Intraperitoneal Inoculation of Laboratory Animals with Suspected Foods. *Public Heal Reports* 1921;36:1665. doi:10.2307/4576062.
- [47] Austin JW. *Clostridium*: Occurrence and Detection of *Clostridium botulinum* and Botulinum Neurotoxin. *Encycl Food Heal* 2016:155–9. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00170-7.
- [48] BOWMER EJ. Preparation and Assay of the International Standards for *Clostridium Botulinum* Types a, B, C, D and E Antitoxins. *Bull World Health Organ* 1963;29:701–9.
- [49] Hatheway CL, McCroskey LM. Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients. *J Clin Microbiol* 1987;25:2334–8.
- [50] Sesardic D, Leung T, Das RG. Role for standards in assays of botulinum toxins: International collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. *Biologicals* 2003;31:265–76. doi:10.1016/j.biologicals.2003.08.001.

- [51] Martín de Santos R. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. *Monogr La Real Acad Nac Farm* 2010:67–98.
- [52] Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1231–8. doi:10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006.
- [53] Guglielmo-Viret V, Attrée O, Blanco-Gros V, Thullier P. Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. *J Immunol Methods* 2005;301:164–72. doi:10.1016/j.jim.2005.04.003.
- [54] Rivera VR, Gamez FJ, Keener WK, White JA, Poli MA. Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxins A, B, E, and F in clinical samples, selected food matrices, and buffer using paramagnetic bead-based electrochemiluminescence detection. *Anal Biochem* 2006;353:248–56. doi:10.1016/j.ab.2006.02.030.
- [55] Ochoa Azze RF. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS PARA ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS Y ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS. Available from: https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=casas-editoriales&alias=742-pubfinlay-librotecinmunoparaeclinvacunas2012&Itemid=226
- [56] de los A. Junco Díaz R. Inmunoserología en el Laboratorio de Microbiología Clínica 2016:2014–6.
- [57] Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992;258:120–2.
- [58] Oliver J. Aplicaciones de anticuerpos 2013. doi://dx.doi.org/10.13070/mm.es.3.182.
- [59] Niemeyer CM, Adler M, Wacker R. Detecting antigens by quantitative immuno-PCR 2007;2. doi:10.1038/nprot.2007.267.
- [60] Ryazantsev DY, Voronina D V., Zavriev SK. Immuno-PCR: achievements and perspectives. *Biochem* 2016;81:1754–70. doi:10.1134/S0006297916130113.
- [61] Notermans SHW, Stam CN, Behar AE. CLOSTRIDIUM | Detection of Neurotoxins of *Clostridium botulinum*. *Encycl Food Microbiol* 2014:481–4. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00073-2.
- [62] Domínguez J, Alonso C, Bartolomé R, Matas L, Rabella N. Procedimientos en Microbiología Clínica RECOMENDACIONES DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf>
- [63] Banerjee R, Jaiswal A. Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst* 2018;143:1970–96. doi:10.1039/c8an00307f.
- [64] Cecilia Cortés-Monroy H, Soledad Soza B. Usos prácticos de la toxina botulínica en adultos en medicina física y rehabilitación. *Rev Médica Clínica Las Condes* 2014;25:225–36. doi:10.1016/s0716-8640(14)70033-1.
- [65] John R. Barr, Hercules Moura, Anne E. Boyer, Adrian R. Woolfitt, Suzanne R. Kalb, Antonis Pavlopoulos, Lisa G. McWilliams, Jurgen G. Schmidt, Rodolfo A. Martinez and David L. Ashley. Botulinum Neurotoxin Detection and Differentiation by Mass Spectrometry 2005;11.
- [66] Kalb SR, Krilich JC, Dykes JK, Lúquez C, Maslanka SE, Barr JR. Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS. *J Agric Food Chem* 2015;63:1133–41. doi:10.1021/jf505482b.
- [67] Y MW, Newton KA, Jameson K, Dunnigan P, Clarke S, Gaze J, et al. Development of in

- vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods 1999;24:319–23.
- [68] Expedeon. Available from: <https://www.expedeon.com/resources/applications/mass-spectrometry/>.
- [69] Bourassa L, Butler-Wu SM. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. vol. 42. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2015. doi:10.1016/bs.mim.2015.07.003.
- [70] Oviaño García M, Rodríguez Sánchez B. Procedimiento de Microbiología Clínica Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia65.pdf>
- [71] Sorribes CH. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. VI Work Mrama 2008:87–109.
- [72] Carolina PC, Yuniesky GM. Identificación De Patógenos En Alimentos : Identification of Pathogens in Food : Advantages and Limitations. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2014;31:535–46.
- [73] PCR - Introduction | ABM Inc. n.d. Available from: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php (accessed June 11, 2019).
- [74] Díaz AS y SRO. fragmentos amplificados AFLP : Polimorfismos 1999:127–48.
- [75] IVAMI. Clostridium botulinum. Botulismo. Inst Valencia Microbiol 2016. Available from: <https://www.ivami.com/es/pruebas-con-clostridium-botulinum-pruebas-para-traslado-de-animales-sudafrica-australia-india-nueva-zelanda/2514-clostridium-botulinum-botulismo-pruebas-para-diagnostico-pruebas-recomendadas-deteccion-de-toxina-cultivo-de-c-botuli>.
- [76] Ruge DR, Dunning FM, Piazza TM, Molles BE, Adler M, Zeytin FN, et al. Detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using fluorogenic reporters. Anal Biochem 2011;411:200–9. doi:10.1016/j.ab.2011.01.002.
- [77] Gilmore MA, Williams D, Okawa Y, Holguin B, James NG, Ross JA, et al. Depolarization after resonance energy transfer (DARET): A sensitive fluorescence-based assay for botulinum neurotoxin protease activity. Anal Biochem 2011;413:36–42. doi:10.1016/j.ab.2011.01.043.
- [78] Poras H, Ouimet T, Orng SV, Fournié-Zaluski MC, Popoff MR, Roques BP. Detection and quantification of botulinum neurotoxin type A by a novel rapid in vitro fluorimetric assay. Appl Environ Microbiol 2009;75:4382–90. doi:10.1128/AEM.00091-09.
- [79] Wang D, Baudys J, Kalb SR, Barr JR. Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry. Anal Biochem 2011;412:67–73. doi:10.1016/j.ab.2011.01.025.
- [80] Ferreira JL, Maslanka S, Johnson E, Goodnough M. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J AOAC Int n.d.;86:314–31.
- [81] Brunt J, Webb MD, Peck MW. Rapid affinity immunochromatography column-based tests for sensitive detection of clostridium botulinum neurotoxins and escherichia coli O157. Appl Environ Microbiol 2010;76:4143–50. doi:10.1128/AEM.03059-09.
- [82] Attrée O, Guglielmo-Viret V, Gros V, Thullier P. Development and comparison of two immunoassay formats for rapid detection of botulinum neurotoxin type A. J Immunol Methods 2007;325:78–87. doi:10.1016/j.jim.2007.06.003.
- [83] Gessler F, Hampe K, Böhnelt H. Sensitive detection of botulinum neurotoxin types C and D with an immunoaffinity chromatographic column test. Appl Environ Microbiol 2005;71:7897–903. doi:10.1128/AEM.71.12.7897-7903.2005.

7. Anexos.

Serotipo	Especies susceptibles	Localización del gen de la neurotoxina
A	Caballos, humanos	Cromosoma, plásmidos grandes en algunas cepas
B	Caballos, humanos, cerdos, primates	Cromosoma, plásmidos grandes en algunas cepas
C	Pájaros, caballos, ganado, visón, zorros, perros, tortugas	Bacteriófago pseudolisogénico, plásmido
D	Ganado	Bacteriófago pseudolisogénico, plásmido
E	Peces, aves acuáticas	Cromosoma, plásmidos grandes en algunas cepas
F	Humanos (raro)	Cromosoma, plásmidos grandes en algunas cepas
G	Desconocido	Plásmidos grandes

Tabla 1 ANEXO 1. Resumen de la metodología empleada para la detección de la toxina botulínica [13].

	<i>C.botulinum (I)</i>	<i>C.botulinum (II)</i>	<i>C.botulinum (III)</i>	<i>C.argentinense (IV)</i>
Tipos de neurotoxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Temperatura mínima de crecimiento (°C)	10°C	3°C	15°C	12°C
Temperatura óptima de crecimiento (°C)	35-40°C	18-25°C	35-40°C	35-40°C
Temperatura máxima de crecimiento (°C)	48°C	45°C	Datos Insuficientes	45°C
Mínimo pH	4.6	5.0	Datos Insuficientes	Datos Insuficientes
Actividad de agua inhibitoria	0.94	0.97	Datos Insuficientes	Datos Insuficientes
Concentración de NaCl inhibitoria (%)	10%	5%	3%	>3
D_{100°C} de esporas (min)	~25 min	<0.1 min	Datos Insuficientes	Datos Insuficientes
D_{121°C} de esporas (min)	0.21 min	<0.005 min	Datos Insuficientes	Datos Insuficientes

Tabla 2 ANEXO 2. Resumen de la metodología empleada para la detección de la toxina botulínica [13].

**El valor D o el tiempo de reducción decimal, es el tiempo que tarda una temperatura determinada en reducir una población en un 90%.*

ANEXO 3. ¿Qué hacer en caso de derrames que contengan la toxina botulínica?

En caso de derrames, el personal debe tener conocimientos para poner solución al problema, con una inactivación de toxinas (0.1 a 0.5% de hipoclorito o 0.1 M NaOH). El personal estará provisto de protección adecuada, como protección de ojos y uso de guantes y batas de laboratorio, así como protección respiratoria adecuada. En el laboratorio ha de haber un manual de bioseguridad que debe contener números de teléfono de emergencia y procedimientos para la respuesta de emergencia, control de derrames y descontaminación [27].