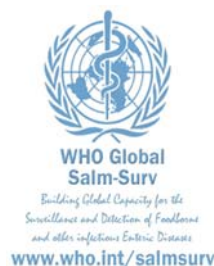


WHO Global Salm Surv



Manual de Procedimientos

Diagnóstico de Botulismo en muestras clínicas y de alimentos

2007

AUTORES

María Isabel Farace

Edgardo Castelli

Departamento Bacteriología
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”
Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv
para América del Sur

INDICE

INTRODUCCIÓN	Pag. 4
PRESENTACION CLÍNICA	Pag. 8
DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES	Pag. 10
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	Pag. 10
FLUJOGRAMA: DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	Pag. 19
CONSIDERACIONES UTILES	Pag. 20
TRATAMIENTO GENERAL Y ESPECÍFICO	Pag. 21
MEDIOS DE CULTIVO	Pag. 24
FICHA CLINICO-EPIDEMIOLOGICA	Pag. 26
REFERENCIAS	Pag. 27

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El botulismo es una enfermedad que produce parálisis flácida, causada por neurotoxinas de *Clostridium botulinum* y, en algunas ocasiones por *C. butyricum* y *C. baratti*.

El microorganismo fue descrito por primera vez en 1897 en una investigación de botulismo de origen alimentario en Bélgica.

La transmisión alimentaria es poco frecuente pero puede matar rápidamente, por lo que resulta una emergencia para los sistemas de salud y debe ser reportado en forma inmediata a las autoridades de Salud Pública.

Estos anaerobios gram-positivos, esporulados, se pueden encontrar en las muestras de la tierra y en los sedimentos marinos de todo el mundo.

Con una dosis letal para los humanos de menos de un microgramo, las toxinas botulínicas se consideran una de las sustancias más venenosas conocidas y constituyen una gran amenaza como agente de guerra biológica.

Clasificación

Se reconocen 3 formas clásicas de botulismo dependiendo de la forma de adquisición de la toxina:

El botulismo alimentario se produce por ingestión de toxina preformada presente en los alimentos que no hayan sido envasados o conservados apropiadamente.

El botulismo por heridas, causado por diseminación sistémica de la toxina producida por el microorganismo que se multiplica y la produce en las mismas, se asocia con traumatismos, cirugía, inoculación subcutánea de heroína, y sinusitis por abuso intranasal de cocaína.

El botulismo infantil es el resultado de la colonización intestinal del microorganismo en niños menores de un año de vida. En este grupo etario, la flora normal intestinal no se ha desarrollado al grado que prevenga la colonización por estas bacterias, como ocurre en los adultos sanos.

Más recientemente, se ha identificado una cuarta forma de botulismo, denominada botulismo por colonización intestinal en el adulto. De patogénesis similar al botulismo infantil, se produce en los niños mayores de un año y adultos en presencia de colitis, con una historia reciente de cirugía intestinal o en asociación con otras condiciones que puedan ocasionar un desequilibrio local o extendido en la flora intestinal normal.

Las diferencias en la antigenicidad de las toxinas producidas por *C. botulinum* permite clasificarlos en siete tipos diferentes (A-G).

Los tipos A, B, E y raramente el F son los que causan enfermedad en los humanos, mientras que los tipos C y D causan botulismo en animales, como los mamíferos, pájaros y peces. El tipo G identificado en el año 1970 no ha sido relacionado como causa de enfermedad en humanos y animales.

En algunos casos, un solo tipo de microorganismo puede producir dos toxinas.

Como se ha mencionado anteriormente, otras especies del género *Clostridium* han sido asociadas a casos de botulismo. Éstos incluyen los casos de botulismo alimentario y botulismo infantil por toxina tipo E producida por *C. butyricum*. Además, ha sido documentado el botulismo por colonización intestinal infantil y del adulto, asociado con *C. baratii* productor de toxina tipo F.

Asimismo, *C. botulinum* ha sido clasificado en cuatro grupos basados en sus características fenotípicas y homología de ADN:

Grupo I: microorganismos proteolíticos y productores de toxinas A, B o F.

Grupo II: microorganismos no-proteolíticos, que pueden producir toxinas B, E o F

Grupo III: microorganismos productores de toxinas C o D.

Grupo IV: microorganismos, ahora identificados como *C. argentinense*, productores de toxina tipo G, que no producen enfermedad neurológica, pero se han asociado con muerte súbita en Suiza.

Epidemiología

El botulismo alimentario es responsable de numerosos casos anuales a nivel mundial. Mientras los casos europeos se asocian principalmente con el tipo B, por consumo de carnes procesadas en forma casera, los brotes en Alaska, Canadá y Japón involucran al tipo E, especialmente por conservas de mariscos. Los casos de China al tipo A, frecuentemente debido a la ingesta de legumbres de elaboración casera.

La mayoría de los casos en Estados Unidos se han asociado a conservas caseras de verduras, como espárragos, arvejas y pimientos, siendo el Tipo A el de mayor prevalencia, siguiendo el tipo B y por último el tipo E como ocurre en Argentina.

En Brasil, entre 1982 y 2001 se registraron 11 brotes que involucraron 40 casos, todos ellos producidos por toxina tipo A. En el año 1985 se registró un caso por herida, por toxina tipo A en Minas Gerais

En Argentina, el primer brote de botulismo documentado se produce en el año 1922. El primer brote confirmado por el laboratorio ocurre durante el año 1957; el mismo ocurrió en la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, e involucró a 21 personas. Hasta 1981 sólo se describieron casos de botulismo tipo A; desde ese año, aparecen casos de botulismo tipo A, B, E y F.

Desde 1994 hasta 2007 se describen en Argentina 36 brotes de botulismo alimentario, los que involucraron 60 personas

Sobre 36 brotes, el 85,7 % fueron causados por toxina tipo A, el 8,7 % por toxina tipo B y el 2,8 % por toxina tipo E, solo en el 2,8 % no fue posible caracterizar el tipo toxigénico.

El botulismo infantil ocurre en niños de una semana a 11 meses de edad, con mayor incidencia entre los 2 y 4 meses de vida. Desde su identificación en 1976, se han reportado a nivel mundial los tipos A y B.

Aunque la ingestión de miel se ha identificado como un factor de riesgo para la enfermedad, se la ha asociado en menos del 20% de los casos, otro factor a considerar es la ingesta de infusión de hierbas (manzanilla, té de anís estrellado).

Un factor predisponente es la disminución de movimientos intestinales y el estreñimiento por un periodo prolongado (tres o más días).

Con respecto al botulismo infantil en Argentina, en el periodo 1994-2007 se diagnosticaron 390 casos mostrando un incremento progresivo, debido al aumento en la sospecha clínica y disponibilidad de laboratorios diagnósticos. Todos correspondieron a botulismo tipo A hasta el año 2006 en el cual se identificó el primer caso de tipo B. La mayoría de los pacientes provenían de áreas suburbanas o rurales, caracterizadas por sequedad, fuertes vientos y polvo ambiental que favorecen la dispersión de las esporas.

El primer caso de botulismo por herida, en Argentina, fue diagnosticado en el año 1992 cuyo origen fue una cirugía de quiste hidatídico, el segundo caso se registró en el año 1995 como resultado de una fractura expuesta, en ambos correspondió a la toxina tipo A. Un tercer caso del tipo B fue diagnosticado en el año 2001 como producto de una herida punzante. Se observó una letalidad del 66% (2/3)

Siete casos de botulismo por colonización en el adulto se han reportado en la literatura. En algunos de estos, se encontró *C. botulinum* pero no se halló toxina preformada en los alimentos ingeridos por los afectados. En un estudio, dos de cuatro pacientes tenían alteraciones quirúrgicas del tracto gastrointestinal que podría haber promovido la colonización.

El bypass yeyuno-ileal, la cirugía del intestino delgado, y la enfermedad de Crohn son otros factores reportados como predisponentes de esta forma de botulismo en pacientes adultos.

Patogénesis

C. botulinum está ampliamente distribuido en el medio-ambiente y puede encontrarse en la tierra, en sedimentos de agua dulce y salada, en el polvillo de los hogares y en la superficie de muchos alimentos. Las toxinas producidas son proteínas citoplasmáticas (150 kDa) que se liberan por lisis de las células. Mientras las esporas sobreviven 2 h a 100°C (pero se destruyen rápidamente a 120°C), la exotoxina es termolábil. Se inactiva luego de un minuto a 85°C o después de cinco minutos a 80°C.

Aunque el modo de entrada de la toxina puede diferir entre las diferentes formas de botulismo, una vez que la toxina ingresa en el torrente sanguíneo, actúa de una manera similar para producir los síntomas clínicos. La toxina llega a los receptores en las terminales presinápticas colinérgicas, es internalizada en vesículas y luego es translocada al citosol. En el citosol, la toxina promueve la proteólisis del sistema de exocitosis inducido por calcio para interferir con la liberación de acetilcolina. El bloqueo en la liberación del neurotransmisor en la terminal es permanente y la recuperación sólo ocurre cuando el axón produce una nueva terminal para reemplazar a la dañada por la toxina.

Los efectos de la toxina se limitan al bloqueo de las terminales nerviosas colinérgicas periféricas, incluyendo las uniones neuromusculares, terminales nerviosas parasimpáticas post-ganglionares y ganglios periféricos. Este bloqueo produce una parálisis bilateral descendente característica de los músculos inervados por los nervios autónomos colinérgicos craneales y espinales, pero no involucra los nervios adrenérgicos o sensoriales.

Morbi-mortalidad

Las muertes que ocurren dentro de las primeras 2 semanas son generalmente debidas a la incapacidad para reconocer la severidad de la enfermedad o infecciones pulmonares o sistémicas como complicaciones secundarias. La duración media de la asistencia respiratoria para aquellos que la requieren es de 6 a 8 semanas, pero puede prolongarse hasta 7 meses.

En el botulismo alimentario, la severidad de la enfermedad se asocia con el tipo de toxina. La intubación se requiere en el 67% de los pacientes con botulismo tipo A, 52% de los pacientes con el tipo B y 39% de los pacientes con el tipo E. Además del hecho de requerir con mayor frecuencia asistencia respiratoria, los pacientes con botulismo tipo A acuden a la consulta médica con mayor urgencia y la enfermedad es de duración más prolongada y agresividad que en aquellos con botulismo tipo B o E. La proporción de caso-mortalidad para el botulismo tipo A es del 10%, dos veces superior que para el tipo B.

- El botulismo Infantil progresa durante 1-2 semanas y se estabiliza por 2-3 semanas antes de que comience la recuperación. La permanencia media de los niños en el hospital es de aproximadamente un mes, aunque la excreción de toxina y microorganismos puede continuar por 3 meses más. La proporción de caso-mortalidad infantil (1.3%) es menor en comparación al botulismo alimentario, pero hay una proporción del 5% de recaídas asociadas con el botulismo infantil luego de la resolución de los síntomas clínicos.
- La proporción de caso-mortalidad para el botulismo de heridas es del 10% y los sobrevivientes pueden tener una morbilidad tan significativa que requiera cuidado médico prolongado.
La ocurrencia de un episodio de botulismo no necesariamente confiere inmunidad hacia los episodios subsiguientes. La inmunización con un toxoide pentavalente está disponible, pero sólo se utiliza en áreas de alto riesgo como personal de laboratorio y determinado personal militar.

PRESENTACION CLÍNICA

Historia:

- Aunque la confirmación del laboratorio es necesaria para un diagnóstico definitivo, la presentación clínica, la historia del paciente y el examen físico (particularmente el examen neurológico) pueden ser utilizados como fuertes indicadores de la presencia de botulismo.
- Se debe poner especial atención en la elaboración de una historia completa del paciente, que incluya
 - Alimentos consumidos
 - Abuso de drogas
 - Traumatismos o cirugías recientes
 - Problemas gastrointestinales

Fisiología:

- Botulismo Alimentario:
 - El CDC sugiere prestar atención a los siguientes factores:
 1. el paciente está afebril, excepto que presente otra infección
 2. el paciente presenta sintomatología neurológica simétrica
 3. el paciente permanece consciente
 4. el paciente tiene frecuencia cardíaca normal o disminuida en ausencia de hipotensión
 5. la signo-sintomatología no se acompaña por alteraciones sensoriales, con excepción de visión borrosa.
 - La sintomatología neurológica ha sido descrita como debilidad o parálisis progresiva, simétrica y descendente, que primero afecta los músculos inervados por los nervios craneales, y luego progresa para involucrar los músculos del cuello, brazos y piernas.
 - La dificultad respiratoria progresa desde la obstrucción de las vías aéreas y debilidad diafragmática. Diplopía, disartria, sequedad de boca y debilidad generalizada son los síntomas más frecuentemente presentados. Otros síntomas que se han asociado a botulismo incluyen ptosis palpebral, disfagia, disfonía, nistagmus, ataxia, parestesias, íleon paralítico, estreñimiento severo, retención urinaria e hipotensión ortostática.
 - Las pupilas están dilatadas o no reactivas (oftalmoplejía) en el 50% de casos, A menos que se produzcan complicaciones secundarias como falla respiratoria, los pacientes están alertas y tienen sus funciones mentales intactas.
 - Las alteraciones sensoriales sólo se han reportado en casos aislados. Los síntomas neurológicos pueden aparecer en cualquier momento, desde las 6 horas hasta 10 días después de la ingestión de toxina, con un periodo de la incubación medio de un día.

- Náuseas, vómitos y diarrea pueden preceder o acompañar las manifestaciones neurológicas; la constipación aparece después de que los signos neurológicos han aparecido.
- Botulismo Infantil:
 - El grado de compromiso puede variar desde la forma asintomática a la parálisis y muerte súbita.
 - El signo principal y a menudo el primero que aparece es la constipación (definida como tres o más días sin defecación). Otros rasgos clínicos incluyen apatía, letargo, dificultad en la succión y en la deglución, hipotonía, llanto débil, dificultad para alimentarse, debilidad muscular generalizada y falla en el control de la cabeza, que dan un aspecto flácido al niño ("floppy babies")
 - Los hallazgos neurológicos incluyen ptosis, oftalmoplejía, reacción pupilar lenta a la luz, expresión flácida, disfagia, reflejo mordillo débil y tono pobre del esfínter anal.
 - La falla respiratoria ocurre en aproximadamente el 50% de los pacientes
 - El periodo de la incubación (entre el tiempo de ingestión de la espora y la aparición de los síntomas) varía desde los 3 a 30 días.
- Botulismo de heridas:
 - Los pacientes generalmente presentan similar sintomatología a la observada en el botulismo alimentario, incluyendo visión borrosa aguda, disfagia, disartria, debilidad generalizada, con o sin anormalidades de la pupila. Las manifestaciones gastrointestinales, sin embargo, están ausentes.
 - La herida infectada por *Clostridium botulinum* puede parecer benigna a menos que se infecte por otras bacterias, en cuyo caso puede aparecer fiebre.
 - El periodo medio de incubación es de 10 días.

DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES

Difteria
Encefalitis
Síndrome de Guillain-Barré
Hipermagnesemia
Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton
Miastenia Gravis

Otros problemas a considerar:

Neuropatía congénita o miopatía
Envenenamiento con vegetales, hongos - muscarina
Poliomielitis
Parálisis por picadura de garrapatas

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

EQUIPAMIENTO Y MATERIALES EN EL LABORATORIO

- a. Heladera
- b. Toallas de papel para limpieza
- c. Mechero de Bunsen
- d. Abridor de latas estéril
- e. Mortero estéril
- f. Pinzas estériles
- g. Pipetas estériles
- h. Propipetas mecánicas
- i. Tubos estériles para cultivo
- j. Jarras para anaerobiosis (generadores químicos de atmósfera o tubos de gas)
- k. Ansas
- l. Estufas de incubación (28 y 35°C)
- m. Gradillas para tubos de cultivo
- n. Portaobjetos
- o. Microscopio
- p. Placas de Petri estériles
- q. Tubos de centrífuga
- r. Centrífuga, refrigerada, de alta velocidad
- s. Tripsina (1:250; Difco)
- t. Jeringas, 1 y 3 ml, estériles, y agujas con aforo 25, 5/8 (1.6 cm) para inocular ratones
- u. Ratones, de 18-20 g
- v. Cajas para ratones, alimento, botellas para agua.
- w. Filtros de nitrocelulosa tipo Millipore: 0.45 µm de poro

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS DE LABORATORIO

- a. Alcohol yodado (4% de yodo en alcohol 70%)
- b. Caldo Tarozzi
- c. Agar yema de huevo
- d. Diluyente de gelatina-fosfato estéril
- e. Etanol absoluto
- f. Reactivos para tinción de Gram
- g. Solución fisiológica estéril
- h. Antitoxina monovalente, tipos A-F
- i. Solución de tripsina
- j. Hidróxido de sodio 1N
- k. Acido clorhídrico 1N

PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

Introducción

El botulismo es confirmado en el laboratorio cuando se identifica la neurotoxina botulínica en suero, heces, vómito o contenido gástrico del paciente, y/o en remanentes de un alimento consumido por el mismo. El único método actualmente aceptado para la detección e identificación de la neurotoxina botulínica es el bioensayo de toxicidad y neutralización en ratones. Los métodos *in vitro* (por ejemplo, ELISA) para la detección de la toxina se hallan bajo desarrollo, y son utilizados como métodos de tamizaje. El aislamiento de *C. botulinum* de las muestras de heces o contenido gástrico del paciente también brinda una buena evidencia confirmatoria, ya que esta bacteria se encuentra raramente en las muestras humanas en ausencia de botulismo. El aislamiento de *C. botulinum* de remanentes del alimento consumido no aporta evidencia confirmatoria de botulismo en ausencia de otros datos de laboratorio. Los microorganismos pueden recuperarse de cultivos enriquecidos o de medios de cultivo con agar inoculado directamente. La identidad de la bacteria se establece sobre la base de 1) reacción de la lipasa; 2) tinción de Gram, observación de las esporas; 3) determinación de los requerimientos de anaerobiosis para su desarrollo; 4) demostración de toxigenicidad; 5) identificación de la toxina por neutralización específica.

Bioseguridad

Las toxinas botulínicas son extremadamente tóxicas para los humanos. Pequeñas cantidades adquiridas por ingestión, inhalación, o por absorción a través de mucosas o abrasiones en la piel pueden causar una profunda intoxicación y muerte. Por consiguiente, todos los materiales sospechosos de contener toxina botulínica deben ser manipulados con precaución, y sólo por personal entrenado, preferentemente inmunizado con toxoide botulínico. Para manejar los materiales se debe contar con guardapolvos, guantes, máscara y propipetas, además de una campana de flujo laminar, especialmente para la apertura de envases o latas que pueden provocar salpicaduras o aerosoles.

Si ocurre una fuga de material, la toxina puede ser neutralizada por una solución salina fuerte, como hidróxido de sodio 0.1M. *C. botulinum* es inactivado con una dilución 1:10 de detergente casero. La solución desinfectante apropiada debe estar en contacto con la toxina o con la bacteria por 15 a 20 minutos para asegurar la efectiva inactivación. Si se sospecha que el material contiene toxina y microorganismos, se debe tratar la fuga con detergente e hidróxido de sodio.

Recolección de Muestras

Los materiales adecuados para la identificación de toxina y *C. botulinum* son

- a) en episodios de botulismo alimentario: suero, heces, vómito, contenido gástrico (si la ingestión fue reciente) y alimentos.
- b) en el botulismo de heridas: suero, exudado, tejido debridado, o muestras de hisopado de las heridas del paciente
- c) en niños con botulismo infantil, heces y muestras de suero. En algunos casos, el aislamiento de *C. botulinum* en muestras del ambiente puede ayudar a establecer la fuente probable del microorganismo en el botulismo infantil.

Todas las muestras, excepto las de heridas, deben ser refrigeradas, no congeladas, y examinadas lo más rápidamente posible. Las muestras de heridas deben colocarse en medios de transporte con atmósfera anaerobia, y remitirse al laboratorio sin refrigeración. Los alimentos deben mantenerse en su envase original, o deben colocarse en contenedores estériles irrompibles. Es conveniente examinar los envases vacíos con remanentes de alimento sospechoso. Las muestras de suero deben tomarse antes del tratamiento con antitoxina. La muestra de suero post-tratamiento se obtiene para verificar la ausencia de toxina, para determinar la cantidad de antitoxina en circulación luego del tratamiento, o para determinar cuánto persiste la antitoxina, sin embargo no es una práctica de rutina.

Muestra de suero: Es deseable obtener 10 a 15 ml de suero; esta cantidad permite la identificación específica de la toxina botulínica involucrada a partir de la inoculación de suero neutralizado con todas las antitoxinas, y la repetición de los ensayos, si fuera necesario. Debido a que a veces es imposible obtener este volumen de suero en algunos pacientes, especialmente en niños, una cantidad de 0.5 -1 ml es suficiente para confirmar botulismo, a pesar de que en la mayoría de los casos un volumen menor de 3 ml puede brindar resultados no concluyentes.

Muestra de materia fecal: Es necesario coleccionar 25 a 50 g de heces, preferentemente antes del tratamiento con antitoxina. Sin embargo, la confirmación de botulismo ha sido obtenida con cantidades menores, y se ha aislado *C. botulinum* de materia fecal luego del tratamiento con antitoxina. Si se realiza un lavaje rectal debido a constipación, se debe usar una cantidad mínima de líquido (preferentemente agua estéril sin bacteriostático) para obtener una muestra donde la toxina no esté diluida. Si el paciente ha recibido una medicación que puede interferir con el ensayo para toxina o con el cultivo de materia fecal, el laboratorio debe ser notificado. Por ejemplo, se ha demostrado que drogas anticolinérgicas administradas en forma oral a pacientes con miastenia gravis pueden interferir con el ensayo de detección de toxina en muestras de materia fecal.

Muestras de alimentos: se debe especificar si se trata de alimentos de origen comercial o de elaboración casera o artesanal. En todos los casos se deben remitir refrigerados, acondicionados de manera de cumplir con las normas de bioseguridad.

Comercial: enviar en envase original, conservar el rótulo. En caso de resultar positivo se deberá hacer un muestreo del lote.

Casero o artesanal: especificar tipo de producto, composición, fecha de elaboración y modo de conservación. Remitir en envase original o en frasco limpio con cierre adecuado y rotulado.

Envío de Muestras

Las muestras deben ser colocadas en recipientes impermeables y herméticos, y éstos en un contenedor con refrigerantes (sistema de triple envase). Se deben rotular EMERGENCIA MÉDICA, PELIGRO BIOLÓGICO, REFRIGERAR, y se deben remitir por los medios más rápidos al alcance. El laboratorio de referencia debe ser avisado con anticipación sobre el momento y medio de envío de las muestras. Todas las muestras deben ser acompañadas por una ficha clínico-epidemiológica (se anexa la que se utiliza en Argentina) y se debe incluir el nombre del contacto y un número telefónico para el informe preliminar. Es necesario remitir el nombre del médico que atiende al paciente y la institución donde está internado.

Ensayo para Toxina Botulínica en las Muestras

1. Protocolo de bioensayo en ratones :

- a. Ratones: 18 a 20 g, ratones blancos
- b. Antitoxinas: Antitoxinas monovalentes (tipos A, B, C, D, E y F) de 10 UI/ml.
- c. Inoculación de ratones: Inocular los ratones por vía intraperitoneal ya sea con el suero del paciente o con los extractos del alimento o la materia fecal, en forma directa y los neutralizados con antitoxinas, utilizando una aguja de 5/8.
- d. Observación de los ratones: Observar los ratones a intervalos (4, 8, 12, 18 y 24 h) y luego diariamente por 4 días para detectar signos de enfermedad o muerte. A pesar de que la intoxicación botulínica generalmente mata a los ratones en 6 a 24 horas, ocasionalmente se observa demora en la mortalidad. Si la toxina se encuentra en cantidad suficiente, todos los ratones inoculados con las muestras morirán, excepto aquellos que han recibido muestra más antitoxina específica para la toxina involucrada, y aquellos inoculados con los extractos calentados (en baño de agua hirviendo por 10 minutos) debido a que las toxinas botulínicas son termolábiles. El procedimiento del extracto calentado se debe hacer siempre como control.

2. Detección de toxina en el suero :

- a. Colocar 1 ml de suero en cada uno de 6 tubos y agregar 0.25 ml de antitoxina según se indica en la siguiente tabla:

MÉTODO PARA DETECCIÓN DE TOXINA EN SUERO

Tubo N°	Volumen de suero (ml)	Volumen de antitoxina* (ml)	Tipo de antitoxina	Volumen en la jeringa (ml)	Volumen inoculado en cada ratón (ml)
1	1.0	0.0	-	1.0	0.5
2	1.0	0.25	A	1.0	0.5
3	1.0	0.25	B	1.0	0.5
4	1.0	0.25	E	1.0	0.5
5	1.0	0.25	F	1.0	0.5
6	1.0	0.25	ABCDEF**	1.0	0.5

*Mezclar la antitoxina con el suero, e incubar 30 minutos a 37°C

**Debido a que la toxina F es infrecuente, una antitoxina trivalente (A, B y E) puede ser suficiente para confirmar la mayoría de los casos de botulismo

- b. Mezclar la antitoxina con el suero. Evitar la formación de burbujas que pueden inactivar la toxina.
- c. Incubar las mezclas por 30 minutos a 37°C.
- d. Inocular por vía intraperitoneal 2 ratones con 0.5 ml de suero sin tratar y 2 ratones con 0.5 ml de las mezclas suero-antitoxina.
- e. Marcar cada grupo de ratones con un colorante diferente
- f. Observar los ratones para detectar signos de botulismo o muerte. Si se encuentra presente una concentración suficiente de toxina botulínica, todos los ratones morirán dentro de las 96 horas, excepto aquellos que recibieron las mezclas que contienen la antitoxina correspondiente al tipo de toxina involucrado.
- g. Un test para toxina que es negativo utilizando 0.5 ml de suero del paciente puede ser positivo cuando se inyectan 0.8 ml por ratón. Volúmenes mayores de 0.8 ml no se recomiendan ya que el suero normal puede matar al ratón cuando se inyectan volúmenes mayores a 1 ml. Se debe ensayar esta variante. Cuando ocurre la muerte del ratón al inyectar un volumen de 0.8 ml, la neutralización se lleva a cabo agregando 1/8 de volumen de antitoxina (Por ejemplo, 2 ml de suero más 0.25 de antitoxina), incubando 30 minutos a 37° C, e inyectando 0.8 ml en el ratón.
- h. Si no se cuenta con cantidad suficiente de suero para el test de neutralización, es prioritario demostrar la toxina por observación de signos típicos de botulismo en los ratones luego de la inoculación intraperitoneal del suero sin tratar (0.5 o 0.8 ml). Si se demuestra la presencia de toxina, el tipo de toxina debe ser determinado por el empleo de antitoxina.

3. Detección de toxina en muestras de materia fecal y alimentos

- a. Preparación de los extractos.

- (i) Pesar las muestras en un recipiente estéril. En caso de materia fecal un mínimo de 0,5 gr y para alimentos al menos 5 gramos, si este tiene una fase líquida se puede procesar a partir de la misma donde se puede encontrar la toxina en suspensión. Si la cantidad remitida es menor, se debe procesar igual, registrando el dato para interpretar el resultado. **Nunca desechar una muestra**
 - (ii) Agregar 1 ml de diluyente de gelatina (0.2% de gelatina, 0.4% de PO₄Na₂; pH 6.4) frío (4°C) por gramo de heces o alimentos
 - (iii) Mezclar hasta lograr una suspensión uniforme
 - (iv) Colocar 30 minutos en heladera (4°C); la refrigeración puede extenderse por varias horas o días, ya que la toxina es estable bajo estas condiciones
 - (v) Centrifugar a 12.000 x g en centrífuga refrigerada (4°C) por 20 minutos, recuperar el sobrenadante, donde se ensayará la toxina.
- b. Procesar el extracto de igual manera que el suero (inoculación directa y neutralización con antitoxinas). Incluyendo además el calentamiento y activación con tripsina de los mismos
- (i) Para la muestra calentada, colocar 1 ml del extracto en un tubo, tapar con algodón y calentar por 10 minutos en baño de agua hirviendo.
 - (ii) Para las muestras tripsinadas, colocar 1 ml del extracto en un tubo, agregar 0.25 ml de tripsina 0.5% (Difco 1:250), y dejar a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos.
 - (iii) **En todos los casos: materia fecal, alimentos, y cultivos en caldo Tarozzi, el sobrenadante se pasa por filtro de nitrocelulosa tipo Millipore de 0.45 µm de poro antes de inocular**
- c. El esquema para procesar los extractos se observa en la siguiente tabla:

MÉTODO PARA DETECCIÓN DE TOXINA EN EXTRACTOS Y CULTIVOS

Tubo N°	Volumen de muestra (ml)	Tratamiento*	Tipo de toxina	Volumen en la jeringa (ml)	Volumen inoculado en cada ratón (ml)
1	1.0	Ninguno	-	0.5	0.5
2	1.0	100°C por 10 min.	-	1.0	0.5
3	1.0	0.25 ml tripsina	-	1.0	0.5
4	1.0	0.25 ml antitoxina	A	1.0	0.5
5	1.0	0.25 ml antitoxina	B	1.0	0.5
6	1.0	0.25 ml antitoxina	E	1.0	0.5
7	1.0	0.25 ml antitoxina	F	1.0	0.5
8	1.0	0.25 ml antitoxina	ABCDEF**	1.0	0.5

*Mezclar la antitoxina o la tripsina con la muestra, e incubar 30 minutos a 37°C

**Debido a que la toxina F es infrecuente, una antitoxina trivalente (A, B y E) puede ser suficiente para confirmar la mayoría de los casos de botulismo

- d. Si se demuestra la toxina sólo en la muestra tripsinada, repetir el test de neutralización usando extractos tripsinados. Mezclar 1.5 ml de tripsina al 0.5% con 6 ml del extracto, dejar actuar 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Distribuir 1.25 ml de ese extracto tripsinado a cada uno de 5 tubos, a los que se les agregará 0.25 ml de las diferentes antitoxinas, mezclar e incubar

durante 30 minutos a 37 °C. Inocular 2 ratones con cada mezcla extracto tripsinado-antitoxina (0.6 ml por ratón). La siguiente tabla muestra los detalles del test en dichos extractos

ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN EN EXTRACTOS TRIPSINIZADOS* Y CULTIVOS

Tubo N°	Volumen de material tripsinado* (ml)	Volumen de antitoxina* (ml)	Tipo de antitoxina**	Volumen en la jeringa (ml)	Volumen inoculado en cada ratón (ml)
1	1.25	0.25	A	1.2	0.6
2	1.25	0.25	B	1.2	0.6
3	1.25	0.25	E	1.2	0.6
4	1.25	0.25	F	1.2	0.6
5	1.25	0.25	ABCDEF	1.2	0.6

*Tripsinización: 6 ml del material + 1.5 ml tripsina 0.5%; dejar 30-60 minutos a temperatura ambiente

**Mezclar el material tripsinado con la antitoxina e incubar 30 minutos a 37°C

- e. Otras sustancias pueden estar presentes en heces. La dilución de la muestra puede eliminar las interferencias.

4. Detección de toxina en muestras de alimentos:

- a. Registrar toda la información que identifique la muestra
- b. Si se trata de alimentos enlatados, limpiar la tapa con jabón y agua, enjuagar, remover el exceso de agua, y limpiar con alcohol 70%. Abrir la lata en una cabina de seguridad, o en una bolsa plástica para evitar la formación de aerosoles.
- c. Registrar el estado del alimento (gas, color, putrefacción, etc.) y remover una pequeña cantidad para determinación del pH.
- d. Preparar el extracto de igual manera que las muestras de heces. Además, 1 a 2 g de arena estéril puede agregarse al material en un mortero para ayudar en la trituración, esto dependerá de las características del alimento.
- e. Probar el extracto de la misma manera que se describió en los extractos de materia fecal.

Aislamiento de *C. botulinum*

1. Preparación de las muestras de materia fecal, vómito, alimentos

- a. Homogeneizar las muestras por agitación o rotación suave
- b. Preparar extendidos para tinción de Gram. Observar y registrar color, morfología y cantidad de bacterias presentes. Registrar el tamaño de los bacilos y la ubicación de las esporas en las bacterias esporuladas.

2. Preparación de los cultivos de enriquecimiento:

- a. Poner a calentar 2 tubos de caldo Tarozzi en baño de agua hirviendo por 10 minutos para remover el oxígeno. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- b. Inocular con pipeta capilar 0.5-1.0 ml de la suspensión de las muestras en cada tubo con medio de cultivo cerca del fondo. Evitar introducir burbujas de aire dentro del medio.
- c. Poner uno de los tubos en baño de 80°C por 10 minutos, luego colocarlo en agua fría
- d. Luego de la inoculación y el tratamiento con calor, incubar ambos tubos a 30-37°C durante 5 días, manteniendo la anaerobiosis por medio de un tapón de parafina-vaselina previamente fundida, en la superficie del caldo a modo de sello
- e. Luego de la incubación, perforar el tapón, remover una porción del cultivo, centrifugar y recuperar el sobrenadante para probar toxina.
- f. Testear toxicidad en ratones **desde los cultivos, no tratados en baño de 80°C**, a partir de los extractos directos, calentados y tripsinados, en los tres casos pasar los caldos por filtros de nitrocelulosa tipo Millipore de 0.45 µm de poro antes de inocular.
- g. La demostración de toxina botulínica en cultivos enriquecidos de una muestra no tóxica es una evidencia presuntiva de la presencia de *C. botulinum* en la muestra; sin embargo, es deseable aislar el microorganismo para la identificación definitiva.

3. Aislamiento y conservación de colonias:

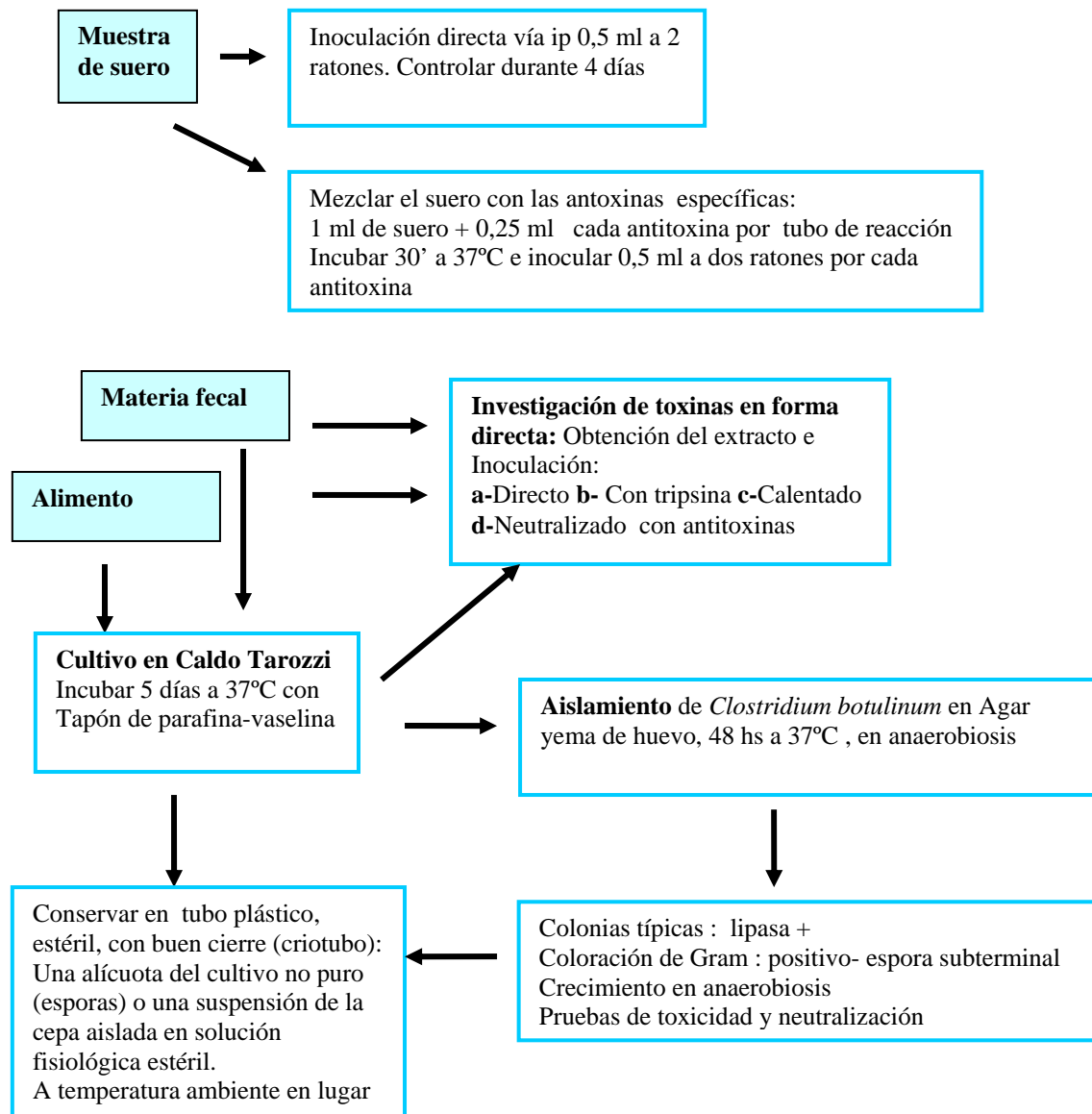
- a. Paralelamente a la realización del test de toxicidad, subcultivar de ambos tubos (calentado y no calentado) una ansada en agar yema de huevo para obtener colonias aisladas. Incubar las placas en anaerobiosis por 48 hs a 35°C.
- b. Examinar las placas, picar varias colonias típicas lipasa positiva
- c. Realizar ensayos de identificación, de toxicidad y neutralización en los cultivos puros
- d. Conservación: realizar una suspensión de la colonia pura en un tubo plástico, estéril, con cierre hermético y guardar a temperatura ambiente en lugar seguro.

NOTAS:

- La confirmación de laboratorio de la presencia de la toxina y/o del microorganismo y la tipificación de la toxina se obtiene en aproximadamente el 75% de los casos. Los casos detectados en forma temprana se confirman principalmente por ensayos para toxina, mientras que en los casos donde se demora la toma de muestras, la confirmación se realiza generalmente por cultivo. El diagnóstico definitivo de laboratorio para la presencia de toxina botulínica se realiza por bioensayo en ratones, y la identificación del tipo de toxina se obtiene por el método de neutralización de la toxina en ratones.

- Botulismo alimentario:
 - En el botulismo alimentario, la toxina se detecta en el 39% de las muestras de suero y en el 24% de las muestras de heces.
 - Los microorganismos se aislan por cultivo de heces en el 55% de los casos.
 - Los cultivos de materia fecal son más sensibles para la detección de la toxina que las muestras obtenidas más tarde (más de 3 días post-ingestión) en el curso de la enfermedad.
- Botulismo Infantil:
 - Para los casos sospechosos de botulismo infantil, las muestras de elección son las de materia fecal y contenido intestinal obtenido por enema (con un agregado mínimo de agua para limitar la dilución de la toxina), ya que en el suero, si su remisión es tardía, se detecta raramente la presencia de toxina.
 - También se puede realizar el cultivo de otras fuentes de *Clostridium botulinum*, tales como la miel o polvo de la casa.
- Botulismo de heridas:
 - Puede ser identificado por detección de toxina en suero o por cultivo de las muestras de herida.
- Botulismo por colonización en el adulto
 - Los microorganismos pueden ser aislados por cultivo de muestras de heces y la toxina puede ser detectada hasta varios días luego de la aparición de los síntomas.

FLUJOGRAMA DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DIAGNOSTICO DE BOTULISMO



Consideraciones útiles:

- ✓ En caso de que la muestra de suero resulte escasa, se puede realizar la neutralización con antitoxina polivalente o priorizar las antitoxinas correspondientes a las toxinas de mayor prevalencia en el país.
- ✓ Es conveniente realizar el diagnóstico a partir de las pruebas de toxicidad:
 - a) En forma directa, buscando toxina en la materia fecal y el alimento. Si la misma está presente, en cantidad suficiente, es posible ponerla en evidencia en un tiempo más corto que a través del cultivo, lo que redundará en la aplicación de medidas de control (tratamiento e investigación de brote) en forma inmediata. (importante en botulismo del adulto)
 - b) De todos modos, siempre es necesario confirmar a partir del cultivo, que si bien requiere más tiempo (5 días), la concentración de toxina será mucho mayor. Esto es posible, ya que en el Caldo Tarozzi, a partir de la esporas presentes en las muestras, desarrolla la forma vegetativa que producirá la toxina in Vitro.
- ✓ El diagnóstico a partir del aislamiento de *Clostridium botulinum*, requiere más tiempo, por lo que se recomienda, realizar este procedimiento cuando se trabajará con la cepa aislada con fines de investigación (Ej: Electroforesis en campo pulsado).
Se puede conservar una alícuota del cultivo en caldo Tarozzi, en un tubo plástico, estéril, con buen cierre, a temperatura ambiente, en un lugar seguro hasta proceder al aislamiento.

TRATAMIENTO GENERAL

Emergencia:

- Botulismo Alimentario:

Los individuos asintomáticos que han ingerido alimentos sospechosos de contaminación deben ser observados para detectar signos neurológicos y otros síntomas. No se recomienda ninguna terapia hasta conocer la confirmación definitiva de la contaminación en el alimento.

Pueden utilizarse enemas y catárticos para purgar el intestino de toxina. Si la ingestión del alimento es reciente, los eméticos y el lavado gástrico pueden ayudar a removerla.

Deben monitorearse con espirometrías, oximetrías y parámetros de gases en sangre

La intubación y la asistencia respiratoria mecánica deben ser consideradas cuando la capacidad vital es menor del 30%, particularmente cuando el valor absoluto o relativo de hipercapnia y la parálisis progresiva con hipoxemia es evidente. Esto también se debe considerar en casos de botulismo por herida.

- Botulismo Infantil

La mayoría de los casos progresa hacia una falla respiratoria completa. Se requiere intubación por un promedio de 16 a 23 días. La utilización de antibióticos, sin embargo, no está recomendada en el botulismo infantil porque la muerte bacteriana con lisis celular puede producir mayor liberación de toxina. Los antibióticos aminoglucósidos y tetraciclinas, en particular, pueden aumentar el grado de bloqueo neuromuscular, dañando la entrada de calcio a la neurona.

- Botulismo de heridas

Se debrida la herida, aún si presenta aspecto benigno. Además se debe inyectar peróxido de hidrógeno al 3% para producir condiciones aeróbicas. El peróxido de hidrógeno per se no es inocuo para los tejidos, y algunos casos se propone utilizar una terapia con cámara hiperbárica. La aplicación local de antibióticos, como Penicilina G o Metronidazol, puede ser útil para erradicar a *C. botulinum* de la herida.

TRATAMIENTO ESPECIFICO

Terapia con antitoxina:

Para los casos de botulismo en adultos, el CDC recomienda la administración de un vial de antitoxina trivalente equina en cuanto el diagnóstico clínico sea hecho, sin esperar la confirmación del laboratorio. Esta terapia consiste en aproximadamente 10,000 UI de anticuerpos contra cada uno de los tipos de toxina A, B y E. Antes de la administración de antitoxina, se debe realizar una

prueba cutánea para probar la sensibilidad al suero. Un vial de 10 ml de antitoxina trivalente por vía endovenosa brinda niveles séricos de anticuerpos A, B, y E, capaces de neutralizar las concentraciones de toxina en suero (la concentración de anticuerpos neutralizantes está en exceso con respecto a la concentración de toxina demostrada en los pacientes con botulismo). Por consiguiente, se recomienda la administración endovenosa de un vial de antitoxina, y no se requiere repetición, ya que las antitoxinas circulantes tienen una vida media de 5 a 8 días.

Algunas fuentes reportan que la antitoxina puede ser administrada nuevamente cada cuatro horas en los casos severos; otros sostienen que dos viales (aproximadamente 20 ml) de antitoxina son tan eficaces como cuatro. Las dosis más bajas se asocian con menores efectos colaterales.

Aunque la evidencia que apoya el uso de la antitoxina trivalente equina está limitada, se ha demostrado una menor tasa de mortalidad y un acortamiento de la enfermedad por botulismo alimentario tipo A. Esto es particularmente cierto cuando la antitoxina se administró en las primeras 24 h luego de la aparición de la enfermedad.

La antitoxina neutraliza la toxina que aún no se ha unido a las terminales nerviosas.

El frasco de antitoxina se diluye en 250 cm³ de Dextrosa en agua al 5% agregándosele 1cm³ de dexametasona más 1cm³ de difenhidramina y se gotea para pasar la totalidad en una hora, en forma IV.

Medidas de control

Individual:

ENTREGA DE ANTITOXINA: Se dispondrá en principio, la entrega de 1 frasco por paciente sospechoso. Se requerirá que se envíe el resumen de historia clínica y la ficha de denuncia obligatoria.

El envío deberá realizarse refrigerado con los datos del hospital al que va dirigido.

ADMINISTRACION DE ANTITOXINA: La antitoxina equina es recomendada para botulismo alimentario y por heridas, no para botulismo del lactante por peligro de sensibilización y anafilaxia.

No se recomienda administrar si transcurrieron 5 días o más de la exposición.

Antes de administrarse, deberán haberse recogido las muestras para el diagnóstico de laboratorio.

Comunitario:

Coordinar las acciones para iniciar la investigación de brote. Emitir un alerta con el fin de identificar casos adicionales y efectuar la encuesta para determinar el/los alimentos sospechosos, impidiendo su distribución en caso que se trate de productos de origen comercial, hasta tanto se realice el diagnóstico de laboratorio.

Asistencia complementaria del paciente internado

- Asistencia respiratoria
- Debridamiento quirúrgico de heridas
- Antitoxina o globulina inmune, si se ha indicado
- Asistencia nutricional pediátrica. La alimentación endovenosa (hiperalimentación) se descarta, debido a su potencial para la infección secundaria, y debido al éxito que se obtiene con la alimentación nasogástrica o nasoyeyunal. En el lactante son esenciales las medidas meticulosas de apoyo.

Prevención:

- Informar a la población acerca de los riesgos de los alimentos inadecuadamente envasados o conservados
- Informar a las madres acerca de los riesgos de administrar miel a los niños menores de 1 año.

Pronóstico:

- Generalmente bueno cuando el diagnóstico es temprano y la terapia es intensiva y adecuada.

MEDIOS DE CULTIVO

Preparación de Caldo Tarozzi

Paso I: Preparación del caldo de carne

Materiales:

1 kilo de carne sin grasa, ni nervios, picada.
2 litros de agua destilada

Procedimiento:

Colocar el agua y la carne en un vaso de precipitado y dejarlo a 4-7°C durante 24 horas-
Luego hervir 40 minutos
Filtrar en caliente
Luego de 1 hora, volver a filtrar, las veces necesarias hasta clarificar (eliminar la grasa)

Paso II: Preparación del caldo Tarozzi

Materiales:

Caldo de carne 2 litros
Peptona 20 gr. por cada litro de caldo

Procedimiento:

Ajustar el pH del caldo a 7,2 con el agregado de peptona
Colocar 2 cm por tubo de carne que se usó en la preparación del caldo
Fraccionar en tubos a razón de:

30 ml de caldo Tarozzi en tubos gordos de 25x 150 o 10 ml de caldo en tubos de 16 x 150.

Esterilizar 15 minutos a 121°C. Guardar en heladera.

Agar yema de huevo- Lecitinas

Peptona	20,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Cloruro de sodio	1,0 g
Solución al 0,5% p/v de sulfato de magnesio	0,1 mL
Glucosa	1,0 g
Agar	12,5 g
Agua destilada	500 ml

Mezclar los ingredientes y caliente con agitación hasta disolución total.
Ajustar el pH a 7,3-7,4 y esterilizar en autoclave. Enfriar en baño de agua a 60°C.

Lavar un huevo y desinfectar la cáscara con alcohol (sumergirlo). Dejar secar, romper la cáscara y separar la yema de la albúmina. Añadir, en forma aséptica,

la yema al medio de cultivo fundido y atemperado a 60°C, y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea. Dispensar el medio en placas y dejar solidificar.

Resultados:

Una prueba de lecitinasa positiva, consiste en la aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano, como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo.

Mezcla de parafina-vaselina

Mezclar 2 partes de parafina por una parte de vaselina sólida

Disolver lentamente sobre hornalla (poner tela de amianto)

Fraccionar a razón de 20 ml por tubo

Esterilizar en autoclave 121° C 1 atmósfera durante 15 minutos

Modo uso: disolver la mezcla sobre la llama del mechero y volcar por la pared del tubo del caldo Tarozzi de manera de formar una capa de aproximadamente 0,5 ml. Dejar solidificar, llevar el tubo a incubación



Ministerio de Salud

Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias

BOTULISMO (todos los tipos)
Ficha de notificación al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) Argentina

Año..... Provincia..... Partido o Depto.....

Datos particulares

Apellido y nombre Relación con casos:.....

Fecha nacimiento /..... /..... Edad en años meses Sexo (F / M)

Domicilio..... Localidad.....

Establecimiento de internación:

Fecha inicio de síntomas...../...../..... Fecha consulta...../...../..... Fecha internación...../...../.....

Uso de ARM (marcar) Si / No Condición de alta (marcar): Curado, Derivado o Fallecido

Tipo Botulismo (marcar): Alimentario Lactante Herida Otros

Muestras remitidas para diagnóstico (colocar SI a las muestras remitidas):

Resto alimentario Material de herida Suero Heces Lav. Gástrico

Muestras positivas: (colocar SI a las muestras positivas)

Resto alimentario Material de herida Suero Heces Lav. Gástrico

Informe Laboratorio:

Tipo de toxina (A, B, E) Demora del informe (Sin Informe, <24 hs, 24y+):.....

Empleo de antitoxina (Si / No) Demora en administrarla (<24 hs, 24 a 48, 48y+):.....

a) Alimentario

Alimento sospechoso:

Industrial: Si / No Casero: Si / No Fecha ingestión alimento sospechoso: /..... /.....

b) Lactante

De 2 a 12 días antes de síntomas: 1.- Consumió? (marcar): miel infusiones

2.- Reparación o remodelación en domicilio? Si / No 3.- Limpieza de alfombras? Si / No

c) Heridas

De 4 a 14 días antes de síntomas: 1.- Ocurrió una herida? (marcar): Si / No

Tipo (marcar) Quirúrgica Accidental 2.- Drogadicción IV (marcar) (marcar): Si / No

d) Otros

Inhalación Si / No

Intestinal Si / No

Firma responsable

REFERENCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention: Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention, 1998.
- Dunbar EM: Botulism. J Infect 1990 Jan; 20(1): 1-3.
Freedman M, Armstrong RM, Killian JM, et al: Botulism in a patient with jejunioileal bypass. Annals of Neurology 1986; 20(5): 641
- Hatheway CL: Botulism: the present status of the disease. Curr Top Microbiol Immunol 1995; 195: 55-75
- Jagoda A, Renner G: Infant botulism: Case report and clinical update. Am J Emer Med 1990; 8: 318-320
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: Clostridium Botulinum. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. 1995; 2178.
- McCroskey LM, Hatheway CL: Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract. J Clin Microbiol 1988 May; 26(5): 1052-4
- Mechem CC, Walter FG: Wound botulism. Vet Hum Toxicol 1994 Jun; 36(3): 233-7
- Middlebrook JL, Brown JE: Immunodiagnosis and Immunotherapy of Tetanus and Botulinum Neurotoxins. Current Topics in Microbiology and Immunology 1995; 195: 89
- Midura TF: Update: infant botulism. Clin Microbiol Rev 1996 Apr; 9(2): 119-25
- Schmidt RD, Schmidt TW: Infant botulism: a case series and review of the literature. J Emerg Med 1992 Nov-Dec; 10(6): 713-8
- Spika JS, Shaffer N, Hargrett-Bean N: Risk factors for infant botulism in the United States. Am J Dis Child 1989 Jul; 143(7): 828-32
- Weber JT, Hoepfich PD, et al: Botulism. In: Jordan MC, et al. eds. Infectious Diseases 5th ed. 1994; 1185.
- San Juan J.,Farace MI. Brote de botulismo alimentario-Junio 1999. Reseñas de Infectología y Vacunas. Volumen I Nº 6. 1999
- Loutfy M, Austin J, Blanchfield B. An outbreak of foodborne botulism in Ontario. Can J Infect Dis vol14 No 4 July/August.2003
- Villar R, Shapiro R, Bustos S et al. Outbreak of Type A botulism and development of a botulism surveillance and antitoxin release system in Argentina. JAMA April vol 281 No 14. 1999