BOTULISMO

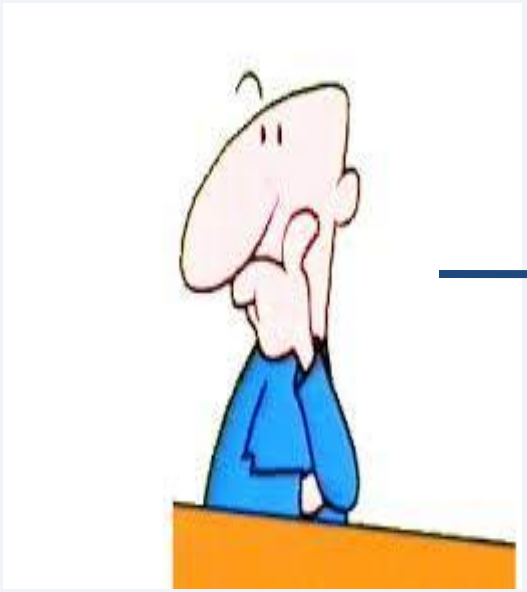
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO POR BIOENSAYO

Bioq. Caballero Patricia
Área Microbiología. Dto. Patología. FCM-UNCuyo
E-mail:patriciacaballero7764@gmail.com

BOTULISMO POR ALIMENTOS

Toxemia intestinal

Incidencia: **0,07/100.000**



BOTULISMO DEL LACTANTE

Toxiinfección

Incidencia: **2,2/100.000** NV

BOTULISMO POR HERIDA

Toxiinfección

1995 1º caso: niña 12 a
2003 2º y 3º caso
Confirmados Mendoza

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Detección de toxina

Identificación

Tipificación serológica por pruebas de neutralización

TIPOS A-G. MÁS FRECUENTES A, B ,E ,MENOS F

BIOENSAYO EN RATÓN

Método "*gold estándar*"

Único método para **confirmar** casos

Clostridium botulinum

Cultivos para toxinogénesis y aislamiento

Investigación de laboratorio

BOTULISMO POR ALIMENTOS

Casos clínicos y otros comensales

SANGRE

Si es posible 10 ml (5 ml de suero)

CONTENIDO INTESTINAL

Defecación espontánea o enema

CONTENIDO GÁSTRICO

Vómito o lavado gástrico

Investigación de laboratorio

BOTULISMO POR ALIMENTOS

Muestras de

ALIMENTOS

RESTOS

ENVASES VACÍOS SIN LAVAR

TODA LA PARTIDA

VAJILLA SIN LAVAR

RECIPIENTE DE RESIDUOS

Investigación de laboratorio

BOTULISMO DEL LACTANTE

SANGRE

Para recuperar al menos 2 ml de suero

CONTENIDO INTESTINAL

HASTA CONFIRMAR EL DIAGNÓSTICO

Defecación espontánea

RECOLECCIÓN DIARIA

Enema salina de recuperación

LO MÁS FRECUENTE POSIBLE

CONTROL DE PORTACIÓN

(AL MENOS UNOS 3 MESES)

CADA 10-15 DÍAS
HASTA NEGATIVIZACIÓN
DE 3 CULTIVOS CONSECUTIVOS

Investigación de laboratorio

BOTULISMO POR HERIDA

MATERIAL DE LA HERIDA

De elección

TEJIDO DE DEBRIDACIÓN

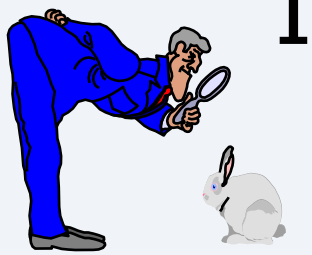
Alternativa

SUPURACIÓN

SANGRE

De ser posible

10 mL (5 mL DE SUERO)



Investigación de laboratorio

Toxina Botulínica

Muestra:

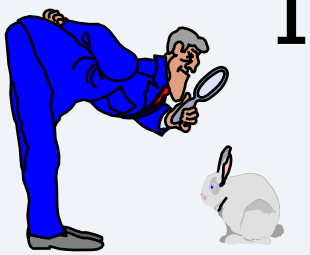
- Suero
- Sobrenadante de material centrifugado
  - SIN TRATAR
  - CALENTADA
  - TRIPSINIZADA

Inoculación IP ratón

- DUPLICADO (2 ratones)

Neutralización

- PRELIMINAR SEMICUANTITATIVA



Investigación de laboratorio

Toxina Botulínica

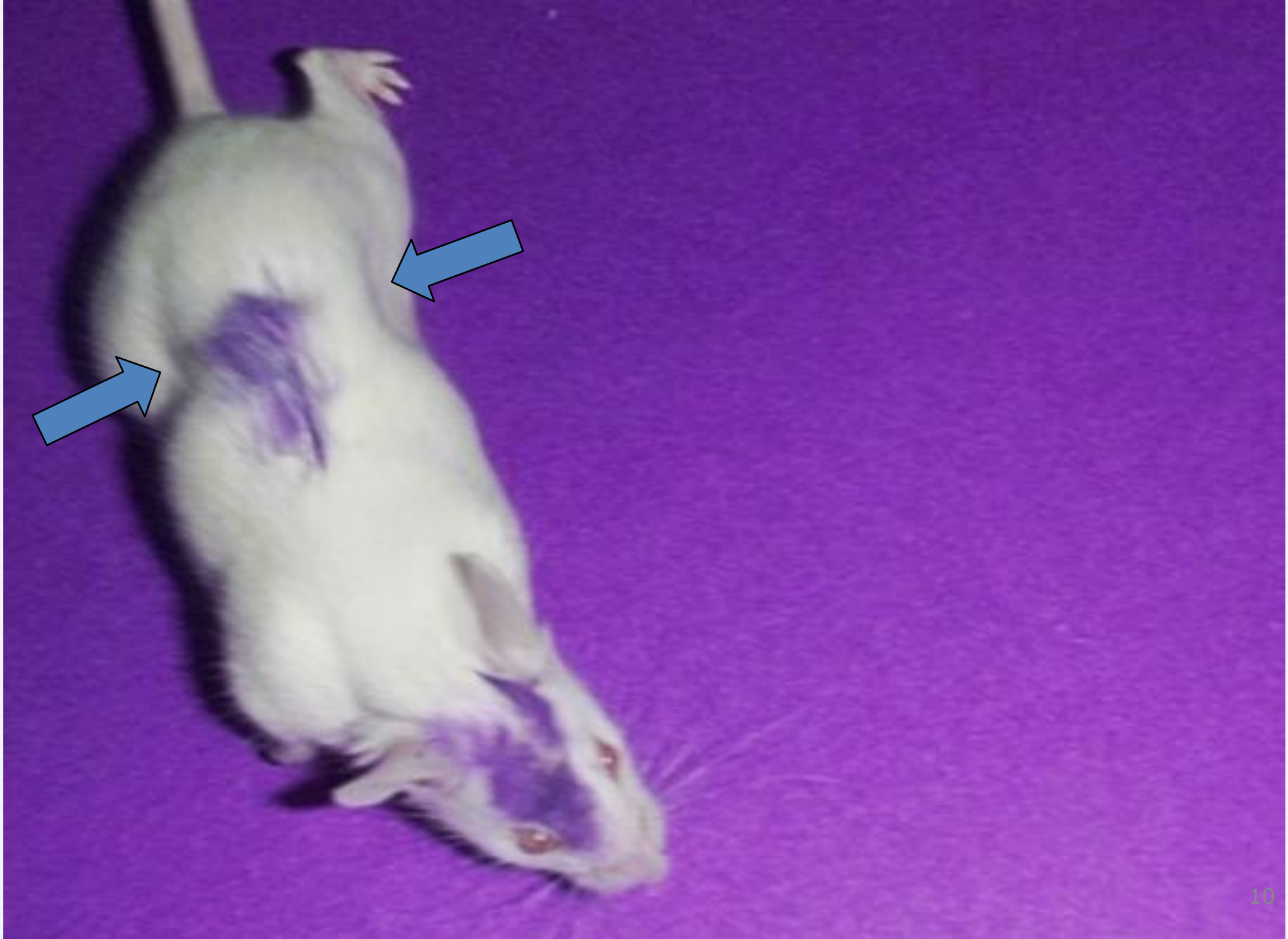
INOCULACIÓN IP EN RATÓN

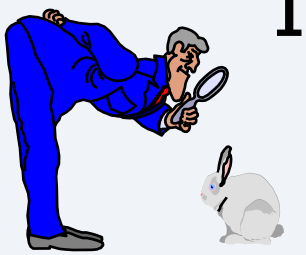
SIGNOLOGÍA

DISNEA

PARÁLISIS GENERALIZADA PROGRESIVA

MUERTE POR ASFIXIA





Investigación de laboratorio

Clostridium botulinum

Cultivo para enriquecimiento y toxinogénesis

Sedimento del centrifugado
- SIN TRATAR
- CHOQUE TÉRMICO (80ºC, 10 min)

Cultivo en caldo de Tarozzi (MCP)
- INCUBACIÓN (32ºC, hasta 10 días)

Inoculación IP ratón
- DUPLICADO (2 ratones)

Neutralización
- PRELIMINAR (SEMICUANTITATIVA)

Investigación de laboratorio

Clostridium botulinum

Aislamiento a partir de Tarozzi tóxico

Tarozzi Erlenmeyer
Con y sin choque térmico
Tóxicos

↓

Aislamiento en agar
Agar 1,5% - Agar 4% - AYH

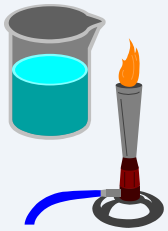
↓

Subcultivos
Tarozzi en tubos (10 a 15)

↙ ↘

Inoculación IP ratón
DUPLICADO (2 ratones)

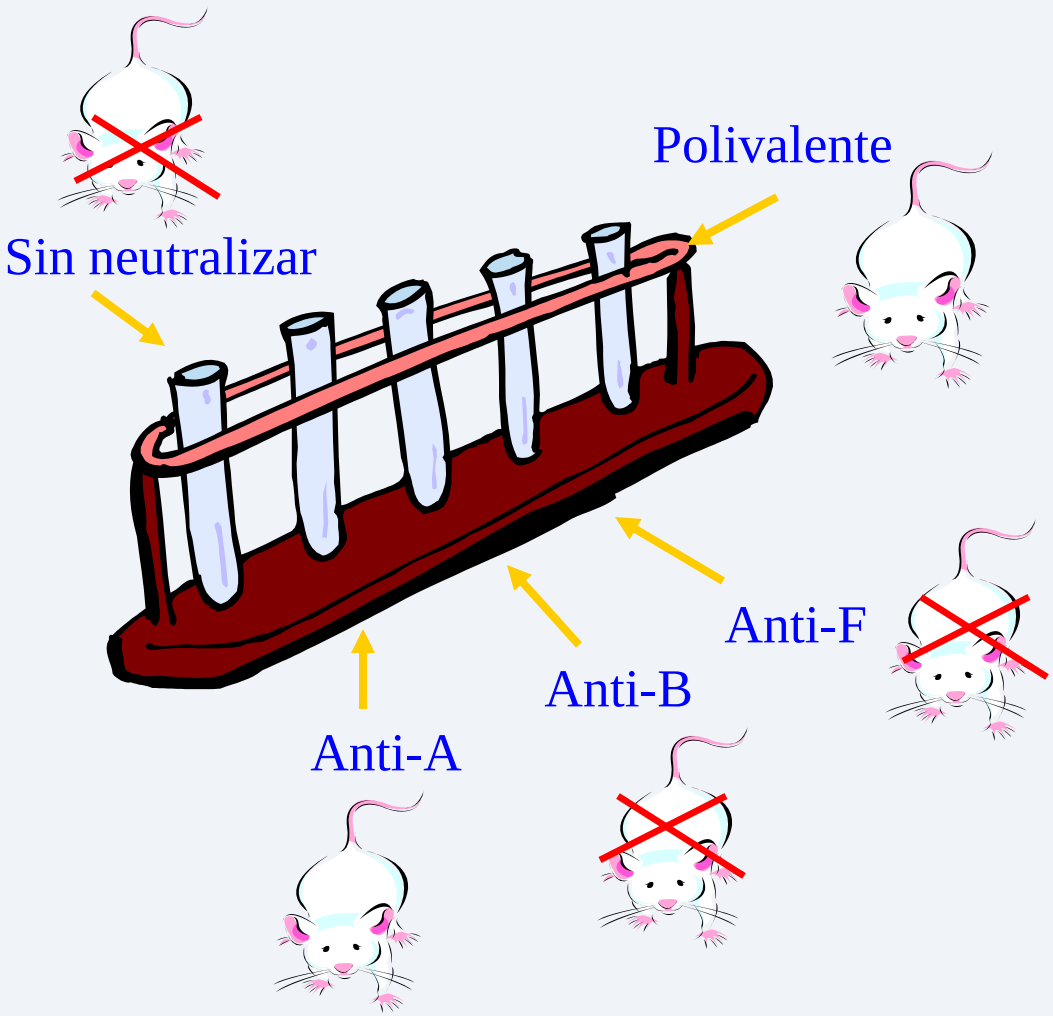
Neutralización
PRELIMINAR SEMICUANTITATIVA



Serotipificación por neutralización

- PRELIMINAR (Tiempo de muerte) /2 ratones dils.
- DEFINITIVA (Reed y Muench)
  - **Tanteo (2ratones dils.)**
    - 10 DL_{50}/ratón
    - 100 DL_{50}/ratón
    - 1000 DL_{50}/ratón
  - **Titulación 4 niveles (6 ratones dils.)**

Tipificación serológica de la toxina



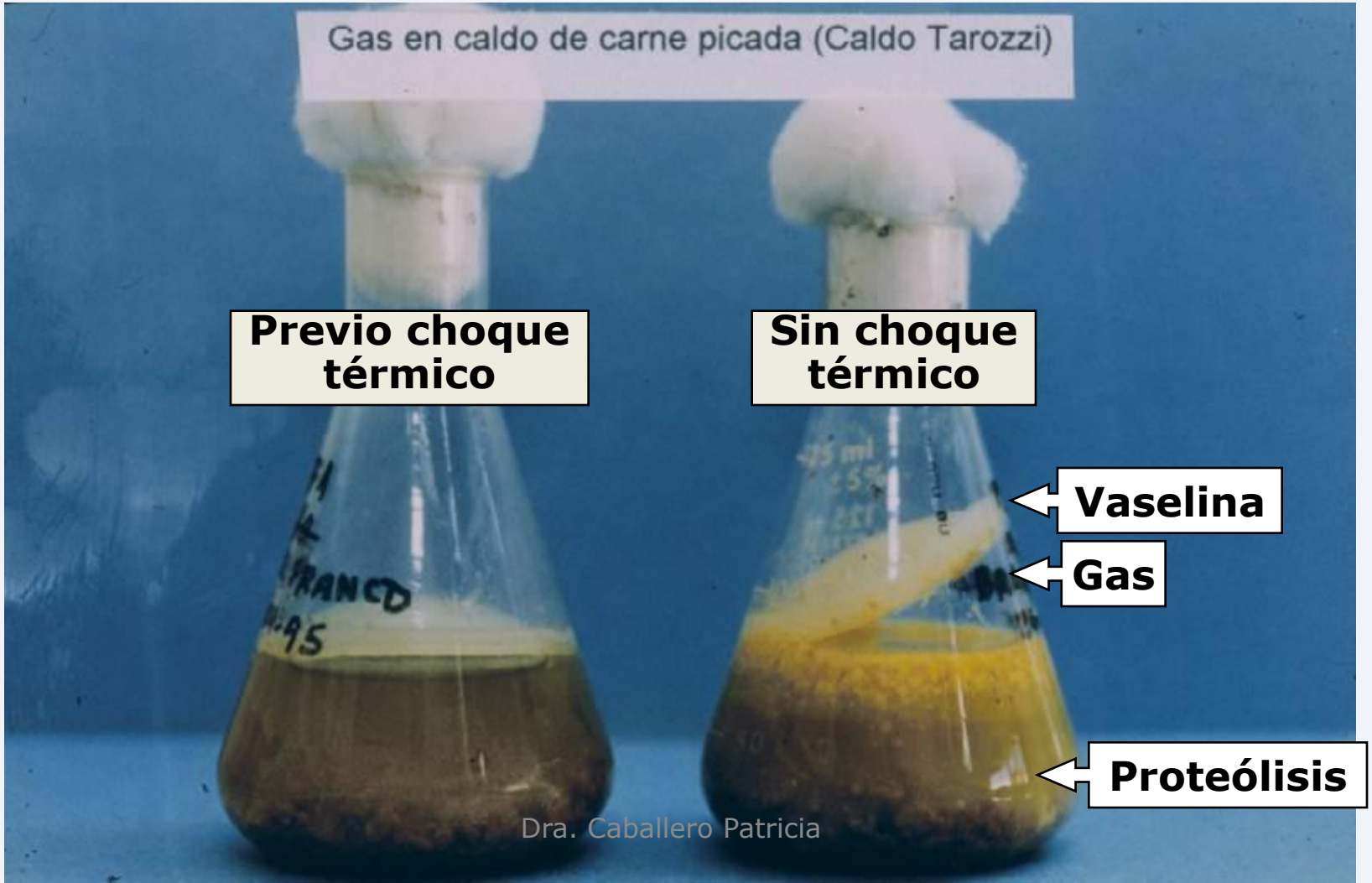
- Preparación del extracto
- Inoculación IP (duplicado):
  - No neutralizado
  - Neutralizado: antitoxina
    - Polivalente (ABF)
    - Especificas (A – B – F)
- Monitoreo: 96 horas

La toxina se detecta usualmente en 24 h si el nivel es suficiente

Resultado: Toxina botulínica tipo A

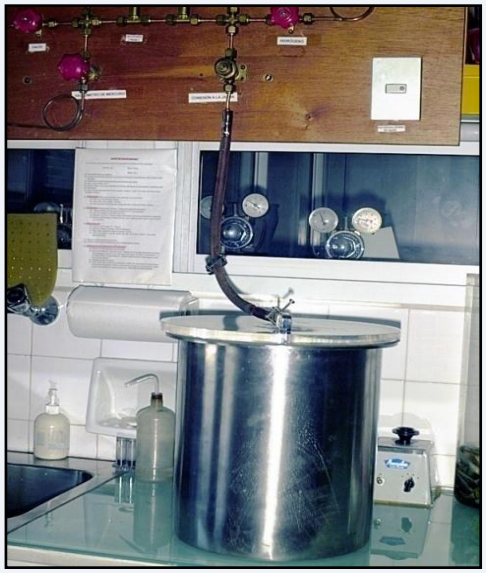
Investigación de laboratorio

Cultivo para enriquecimiento y toxinogénesis

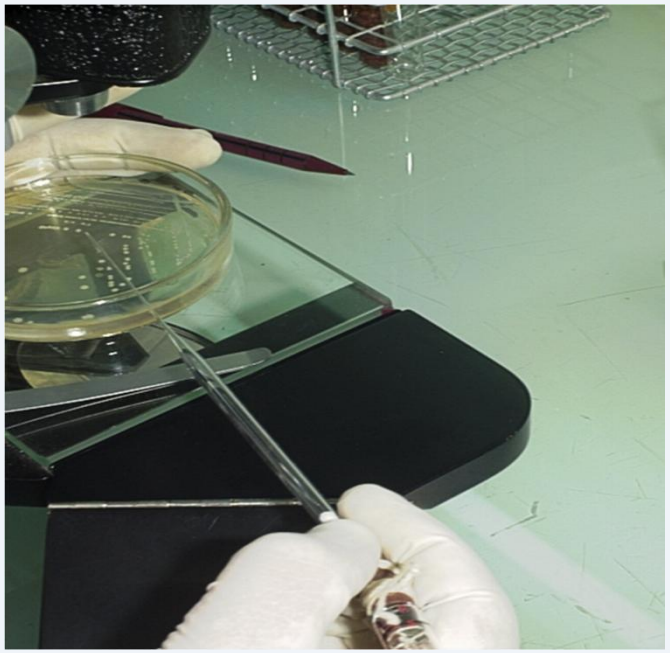


Aislamiento e identificación

Aislamiento en medios sólidos



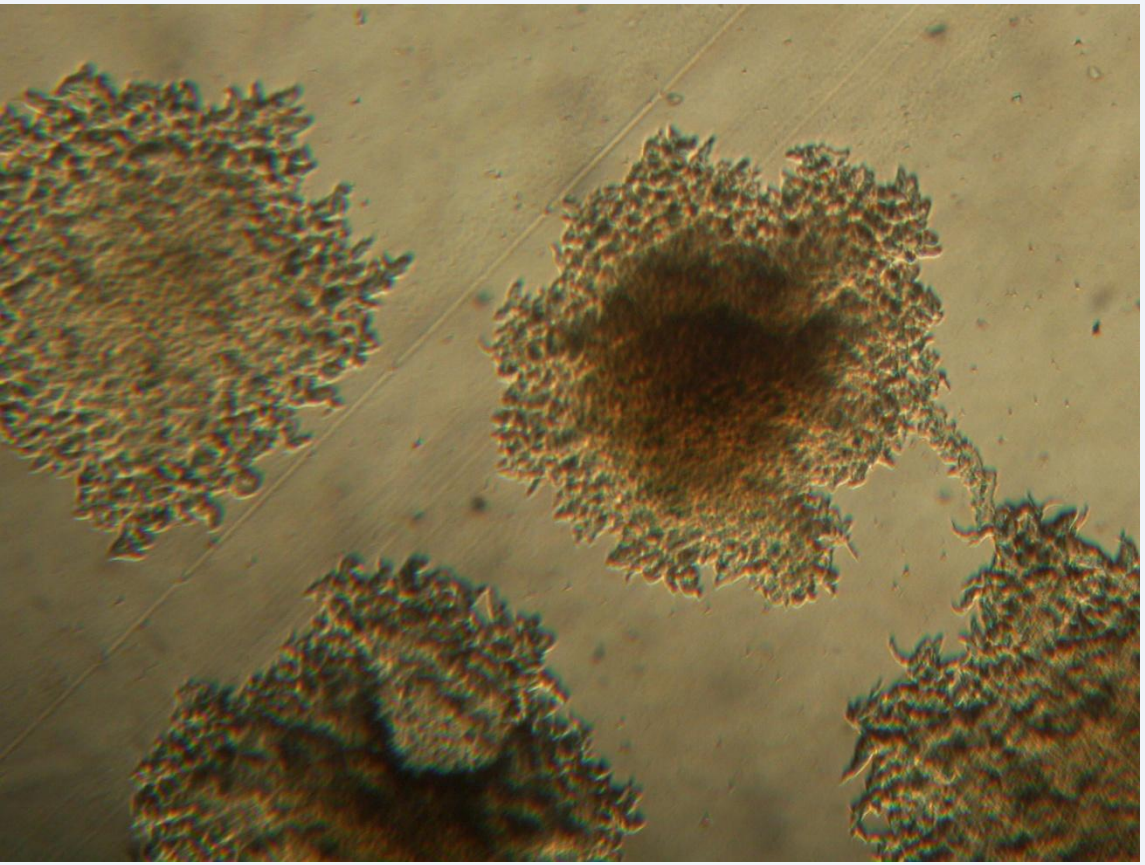
Incubación en anaerobiosis



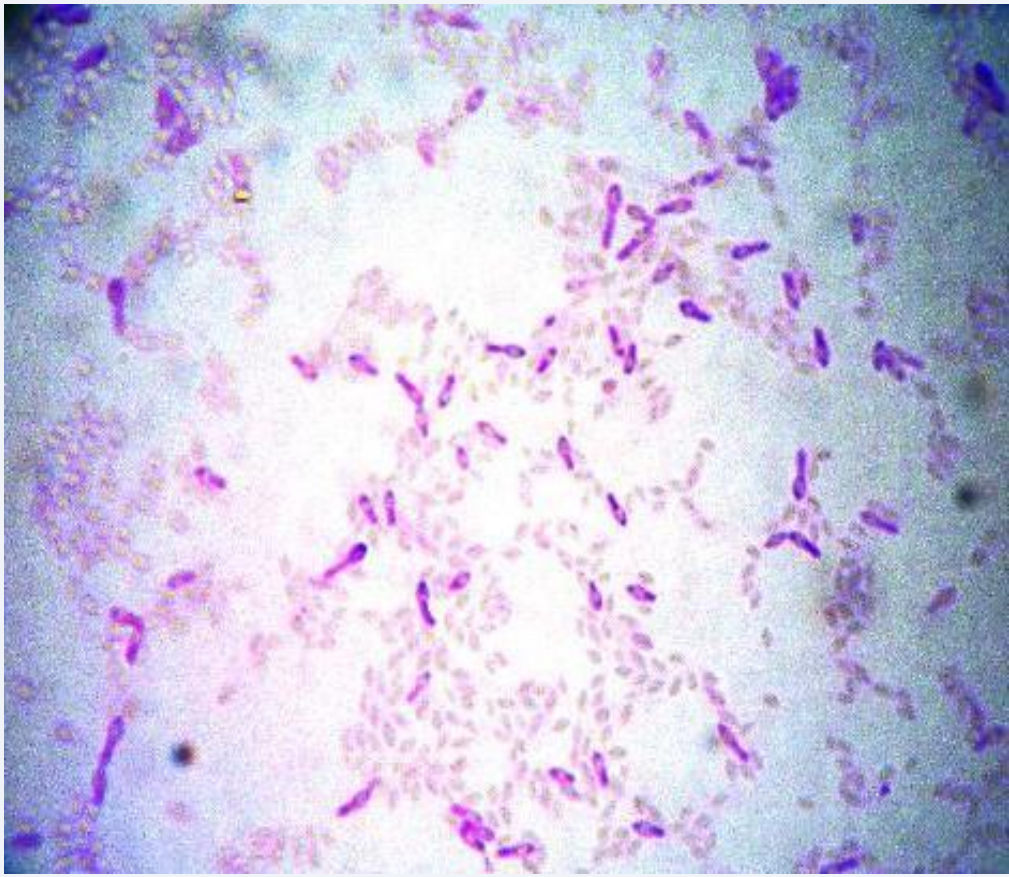
Observación y repique de colonias

Siembra en MCP

Aislamiento



Morfología colonial Agar 4%



Bacilo esporulado subterminal
Gram positivo

Confirmación de diagnóstico de botulismo

Toxina			
Muestras	**Alimento**	**Lactante**	**Herida**
Sangre	+ ≈100%	+ ≈60%	+
Contenido intestinal	+ ≈100%	+ ≈100%	No
Contenido gástrico	+	No	No
Alimentos sospechosos	+ ≈100%	¿?	No
Material de herida			+
Investigación			
Toxina	Bioensayo en ratón		
C. botulinum	Cultivo[1]		

[1]: En todos los materiales menos en sangre

Botulismo
Criterios de confirmación

- Muestras clínicas
  - Test directo para toxina positivo
  - Cultivo positivo

- Otras muestras (alimentos, etc.)
  - Test directo para toxina positivo
  - Cultivo positivo sólo **NO** es confirmatorio

Bioensayo en ratón

Ventajas

- Detecta toxina activa (signos de botulismo)
- Sensibilidad (10^{-12} g)
- Detecta todos los tipos y subtipos conocidos
- Detecta tipos y subtipos desconocidos

Desventajas

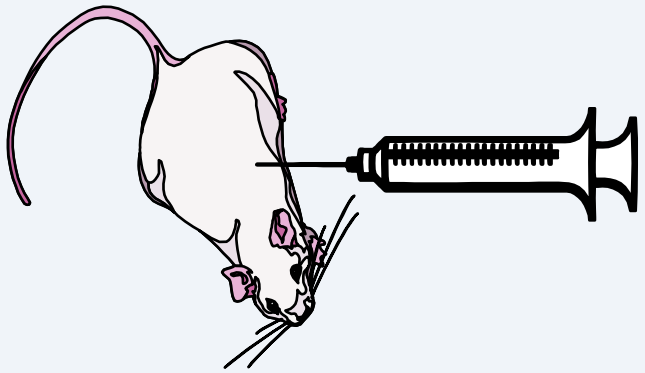
- Limitada capacidad nacional de diagnóstico
- Requiere bioterio y personal especializado en manejo de animales
- Profesionales experimentados
- Detectar bajos niveles de toxina puede tardar 2 a 4 días

Uso de Animales

BL		BA	
Total aproximado	92	Total aproximado	368
Stock mínimo de animales para BL y brote por BA			**460**

TOXINA BOTULÍNICA
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Tradicional



Inoculación IP en ratón

"Gold Standard"

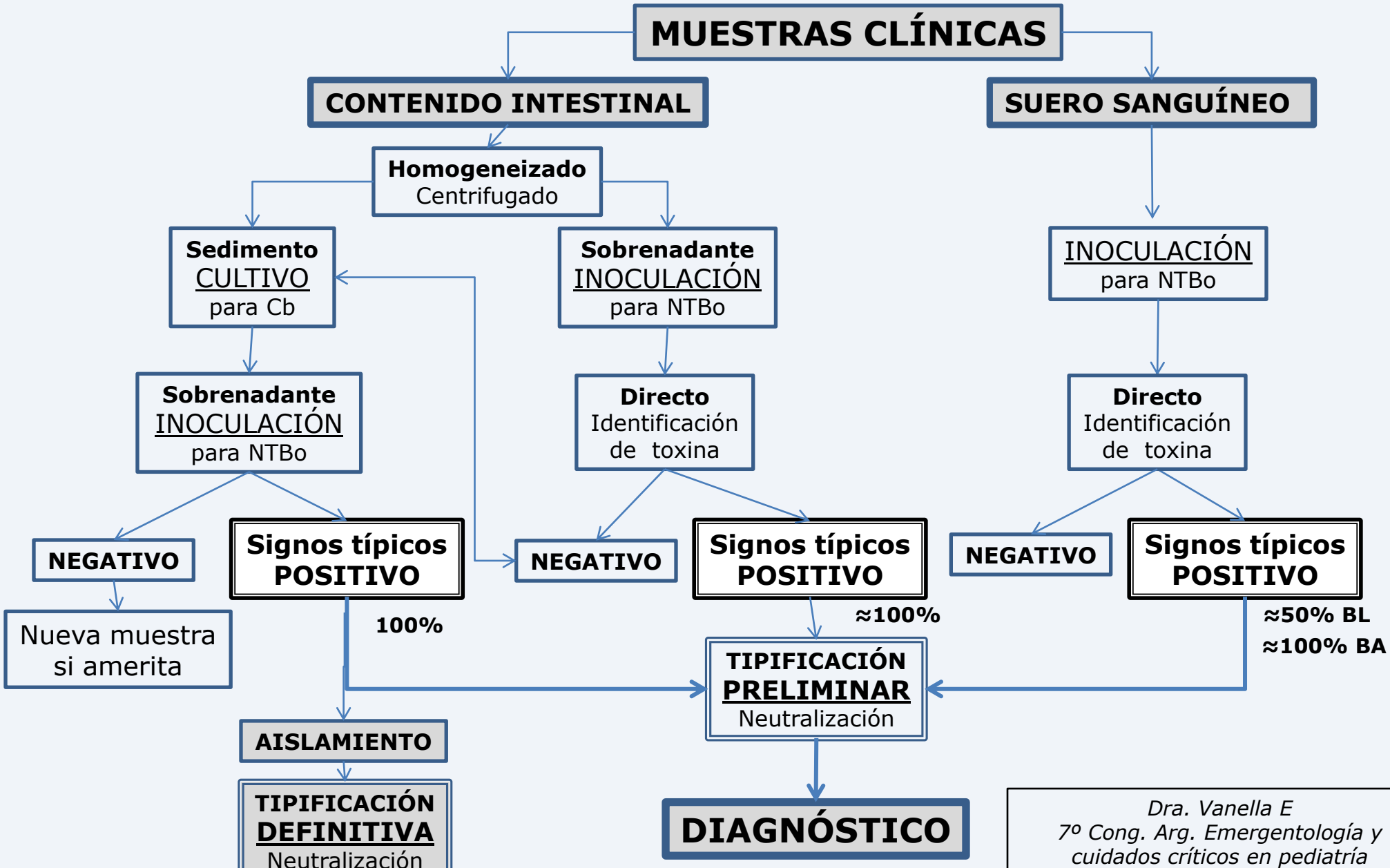
Modernos

- **SONDAS**
- **PCR**

- **ELISA**

Última generación
Toxina activa

Algoritmo diagnóstico de laboratorio para BL y BA



Dra. Vanella E
7º Cong. Arg. Emergentología y cuidados críticos en pediatría
Tucumán Setiembre 2014

- **Guardia pasiva permanente** (24 h/día, 365 d/año)
- Materiales clínicos **procesados a la brevedad** (incluido días no laborables)
- **INVESTIGACIÓN DIRECTA de NTBo**
  - ✓ **Suero sanguíneo**: resultado NEG no definitorio en BL (**POS ≈50-60%),** en el BA **≈100%**
  - ✓ **Contenido intestinal**: **POS en ≈100%** BL y BA. Generalmente toxina suficiente para **resultado entre 4 a 12-48 h**, incluyendo **TIPIFICACIÓN PRELIMINAR**
- **CULTIVOS para *C. botulinum* POS en 100%** de casos. Generalmente **resultado entre 72 h y 4-5 días**, incluyendo **TIPIFICACIÓN PRELIMINAR**
- **TIPIFICACIÓN DEFINITIVA**: cepa aislada y alto nivel de toxina. Generalmente **resultado entre 10 a 12 días**
- Comunicar resultado POSITIVO en cualquiera de las etapas de inmediato por TE y luego adjunto a un e-mail
- **NUEVA MUESTRA**. Sólo cuando el caso lo amerita:
  - 1ra muestra escasa (no representativa)
  - 1ra muestra NEG con alta sospecha clínica

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Dónde se realiza:

- **ANLIS/ Instituto de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán".**
  Av Vélez Sarfield 563, Buenos Aires.

- **Área Microbiología. Dto. Patología.**
  Fac. Ciencias Médicas, UNCuyo. Mendoza

Estimados aún somos indispensables en el laboratorio de botulismo

Pero esperamos se reemplace el método en las próximas décadas y nos regalen un pasaje a

ARUBA !!!!

GRACIAS!!!