

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la evaluación del riesgo de botulismo derivado del consumo de alimentos envasados al vacío o en atmósfera modificada

Número de referencia: AESAN-2024-005

Informe aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 12 de diciembre de 2024

Grupo de trabajo

María Dolores Rodrigo Aliaga (Coordinadora), Rosa María Capita González, Baltasar Mayo Pérez, Gloria Sánchez Moragas y Antonio Valero Díaz

Comité Científico

Concepción María Aguilera García Universidad de Granada	María Pilar Guallar Castellón Universidad Autónoma de Madrid	Azucena del Carmen Mora Gutiérrez Universidad de Santiago de Compostela	María Dolores Rodrigo Aliaga Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Houda Berrada Ramdani Universitat de València	Ángel Gil Izquierdo Consejo Superior de Investigaciones Científicas	Gema Nieto Martínez Universidad de Murcia	María de Cortes Sánchez Mata Universidad Complutense de Madrid
Irene Bretón Lesmes Hospital Gregorio Marañón de Madrid	Ángel José Gutiérrez Fernández Universidad de La Laguna	Silvia Pichardo Sánchez Universidad de Sevilla	Gloria Sánchez Moragas Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Rosa María Capita González Universidad de León	Isabel Hernando Hernando Universitat Politècnica de València	María del Carmen Recio Iglesias Universitat de València	Antonio Valero Díaz Universidad de Córdoba
Araceli Díaz Perales Universidad Politécnica de Madrid	Baltasar Mayo Pérez Consejo Superior de Investigaciones Científicas	Ana María Rivas Velasco Universidad de Granada	María Roser Vila Casanovas Universitat de Barcelona

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Gestión técnica del informe AESAN: Paula Arrabal Durán

Resumen

El botulismo transmitido por alimentos es provocado tras la ingestión de una neurotoxina (BoNT) producida fundamentalmente por *Clostridium botulinum*. Esta bacteria presenta seis Grupos fenotípicos, siendo los Grupos I y II los relacionados con la enfermedad en humanos. Las BoNT se clasifican en siete tipos principales con diferente potencial antigénico, siendo los tipos A, B, E y F, los responsables del botulismo en humanos. Estas son producidas por *C. botulinum* I (mesófilo, temperatura de producción de toxinas entre 30 y 37 °C) y II (psicrotrofo y capaz de desarrollar la toxina hasta a 3-4 °C). La formulación del alimento (pH, actividad de agua (a_w), concentración de NaCl,

adición de conservadores) es clave para evaluar el riesgo de botulismo, y el tratamiento térmico (esterilización) es la principal medida de control. Por ello, tradicionalmente, el riesgo de botulismo se ha asociado con deficiencias en el tratamiento térmico de alimentos en conserva.

También son particularmente vulnerables los alimentos de V gama (cocinados, envasados, sometidos a un ligero tratamiento de pasteurización y listos para ser consumidos tras un proceso final de calentado previo al consumo) cuando, además, están refrigerados y envasados al vacío o en atmósferas modificadas (REPFED, *Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*), ya que dependiendo de su composición, pueden permitir el crecimiento de *C. botulinum* Grupo II a temperaturas superiores a 3,3 °C, con el consecuente desarrollo de la toxina botulínica que no va a ser inactivada durante el calentamiento previo al consumo del alimento.

Para mitigar los riesgos de botulismo en este tipo de alimentos es fundamental el seguimiento de unas buenas prácticas higiénicas a lo largo del proceso de elaboración. Del mismo modo es importante que su formulación sea tal que impida el desarrollo del patógeno (pH, a_w , concentración de NaCl o algún tipo de agente antimicrobiano). Asimismo, es crucial un control estricto de la temperatura de almacenamiento del alimento (por debajo de 4 °C, idealmente por debajo de 3,3 °C) y que el consumidor se adhiera a las instrucciones de conservación y consumo proporcionadas por el productor.

Palabras clave

Botulismo, *Clostridium botulinum*, toxina botulínica, alimentos de V gama refrigerados.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the risk assessment of botulism resulting from the consumption of vacuum-packed or modified atmosphere-packed foods

Abstract

Foodborne botulism is caused by the ingestion of a neurotoxin (BoNT) primarily produced by *Clostridium botulinum*. This bacterium is classified into six phenotypic groups, with groups I and II being associated with human disease. BoNT are divided into seven main types with different antigenic potentials, of which types A, B, E, and F are responsible for botulism in humans. These toxins are produced by *C. botulinum* group I (mesophilic, with toxin production temperatures between 30 and 37 °C) and group II (psychrotrophic, capable of producing toxins at temperatures as low as 3-4 °C). The formulation of food products (pH, water activity (a_w), NaCl concentration, addition of preservatives) is critical for assessing botulism risk, and thermal processing (sterilization) remains the primary control measure. For this reason, the risk of botulism has traditionally been associated with deficiencies in the thermal treatment of canned foods.

Additionally, V-range foods (cooked, packaged, lightly pasteurized, and ready-to-eat products that require reheating before consumption), especially those that are refrigerated and vacuum-packed or stored in modified atmospheres (known as Refrigerated Processed Foods of Extended Durability, REPFED), are particularly vulnerable. Depending on their composition, these products may permit

the growth of *C. botulinum* group II at temperatures above 3.3 °C, with subsequent toxin production that cannot be inactivated during reheating before consumption.

To mitigate risks in this type of food, adherence to good hygienic practices throughout the production process is essential. Similarly, the formulation of the product should be designed to prevent pathogen growth (e.g., through pH control, a_w reduction, NaCl concentration, or the use of antimicrobial agents). Strict control of storage temperatures (below 4 °C, ideally below 3.3 °C) is also crucial, as is ensuring that consumers follow the storage and consumption instructions provided by the manufacturer.

Key words

Botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, refrigerated V-range foods.

Cita sugerida

Comité Científico AESAN. (Grupo de Trabajo) Rodrigo, M.D., Capita, R.M., Mayo, B., Sánchez, G. y Valero, A. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la evaluación del riesgo de botulismo derivado del consumo de alimentos envasados al vacío o en atmósfera modificada. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 2024, 40, pp: 33-69.

1. Introducción

El botulismo es una enfermedad de origen alimentario grave, pero infrecuente, que se produce tras la ingestión de una neurotoxina (BoNT) desarrollada tras la germinación y multiplicación de esporas fundamentalmente de *Clostridium botulinum* y algunas otras especies de *Clostridium*, como *C. argentinense*, *C. baratii* o *C. butyricum*.

C. botulinum es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y esporulado. Las esporas de este microorganismo están ampliamente distribuidas en el suelo y en los sedimentos acuáticos, pudiendo contaminar distintos tipos de alimentos. En función de sus propiedades serológicas hay descritas siete BoNT principales producidas por *C. botulinum* (A, B, C, D, E, F y G). Los tipos A, B, E y F son, principalmente, los que se asocian con el botulismo en seres humanos. Las cepas de *C. botulinum* también se clasifican en cuatro Grupos (I-IV) en función de sus diferentes propiedades bioquímicas, especialmente en relación a su capacidad proteolítica. Las cepas de *C. botulinum* que producen el botulismo en humanos pertenecen al Grupo I (cepas proteolíticas y mesófilas que producen las toxinas A, B y F) y al Grupo II (cepas no proteolíticas y psicrotrofas que producen las toxinas B, F y E). Por ello, para evaluar el riesgo de botulismo derivado del consumo de alimentos, es de gran importancia considerar no solo los aspectos relacionados con *C. botulinum*, si no también conocer las condiciones que derivan en el desarrollo de la toxina.

Durante los meses de junio y julio de 2023, se detectó en España un incremento de casos de botulismo, que sugerían la asociación entre el consumo platos preparados envasados al vacío o en atmósfera modificada y el desarrollo de la enfermedad. Dicha asociación no fue confirmada microbiológicamente al no detectarse la presencia de *C. botulinum*, ni de toxina botulínica, en el análisis microbiológico realizado en los platos preparados de los lotes potencialmente vinculados al brote. Sin embargo, considerando la gravedad de la patología, así como el hecho de que no seguir las instrucciones de conservación y utilización indicadas en el etiquetado de ciertos alimentos o platos preparados, envasados al vacío o en atmósferas modificadas, puede suponer un riesgo grave, se requiere evaluar el riesgo de botulismo y su relación con el consumo de estos alimentos. Por tanto, se solicita al Comité Científico de la Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) un informe en el que se evalúe:

1. El crecimiento de *C. botulinum* en diferentes matrices alimentarias, teniendo en cuenta los factores que influyen en el mismo: contenido de oxígeno, pH, actividad de agua (a_w), conservadores, temperatura y tiempo de conservación, así como posibles indicaciones de tratamiento o cocinado en el etiquetado.
2. El riesgo de botulismo relacionado con el consumo de alimentos que se envasan al vacío o en atmósferas modificadas, sometidos o no a tratamientos de pasteurización post-ensado, y conservados a temperaturas de refrigeración.

2. Antecedentes

2.1 *Clostridium botulinum*: aspectos taxonómicos

El género *Clostridium* es un miembro de la familia *Clostridiaceae*, en el orden *Clostridiales*, clase *Clostridia* y filo *Bacillota* (anteriormente *Firmicutes*) (Finegold et al., 2002). Este género consta

de, aproximadamente, unas 200 especies Gram-positivas, formadoras de esporas, entre las que se incluyen notables especies patógenas como *Clostridium difficile* (reclasificada de forma reciente como *Clostridiodes difficile*), *C. botulinum*, *C. tetani* y *C. perfringens*. La clasificación original se basaba en la caracterización fenotípica de los aislados como anaerobios estrictos, Gram-positivos y formadores de endosporas. La información genómica más reciente, sin embargo, demuestra que muchas de las especies clasificadas dentro del género *Clostridium* están lejanamente emparentadas según los principios taxonómicos más actuales (Lawson y Raney, 2016).

C. botulinum es una bacteria anaerobia estricta, Gram-positiva, esporulada, con forma de bacilo (mide, aproximadamente, 3-8 μm de largo por 0,4-1,2 μm de ancho) (Corsalini et al., 2021) y cuyas células se presentan individualmente o agrupadas (en parejas o cadenas cortas). *C. botulinum* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiendo estar presente en tierra, polvo, agua y sedimentos marinos y de aguas dulces (Long y Tauscher, 2006) (Espelund y Klaveness, 2014). Las esporas pueden persistir en suelos y sedimentos durante décadas, ya que presentan una elevada resistencia a diferentes factores ambientales, como desecación, agentes químicos, radiación o altas concentraciones de oxígeno (Liu, 2024). Además, el microorganismo está ocasionalmente presente en el contenido intestinal de animales asintomáticos (peces, aves y mamíferos) (Espelund y Klaveness, 2014).

En base a la combinación de análisis moleculares y perfiles metabólicos, se han establecido seis Grupos fenotípicos dentro de la especie *C. botulinum* (I-VI) (Liu, 2024), siendo las cepas de los Grupos I (proteolíticas) y II (no proteolíticas) las más comúnmente asociadas con casos de botulismo humano (Artin et al., 2008).

Las cepas del Grupo I tienen actividad proteolítica. Puesto que son mesófilas y su temperatura mínima de crecimiento es de 10 °C, tienen una importancia limitada en los alimentos refrigerados, salvo que se produzca una rotura de la cadena de frío (Parker et al., 2015). Estas cepas están principalmente asociadas a casos de botulismo humano por alimentos enlatados, dada la elevada termorresistencia de sus esporas, necesiéndose tratamientos de, al menos, 121 °C durante 3 minutos para inactivarlas (Carter y Peck, 2015) (Rawson et al., 2023). Las cepas del Grupo II son, generalmente, psicrotrofas (crecen a temperaturas menores de 7 °C), produciendo esporas de menor termorresistencia que las de los Grupos I y III. Son cepas no proteolíticas, que pueden crecer y producir toxinas a temperaturas de refrigeración, incluso algunas lo hacen a temperaturas inferiores a 4 °C, por lo que tienen gran importancia en los alimentos refrigerados o que han sido sometidos a un tratamiento térmico suave (principalmente pescados y mariscos) y envasados en anaerobiosis.

Por su parte, las cepas del Grupo III son mesófilas o ligeramente termófilas y productoras de esporas de termorresistencia moderada (Portinha et al., 2022). Las cepas del Grupo IV son proteolíticas y no glucolíticas, las del Grupo V son cepas no proteolíticas capaces de fermentar la glucosa y, finalmente, las del Grupo VI son cepas parcialmente proteolíticas que no fermentan la glucosa (Liu, 2024). En las Tablas 1, 2, 4, 5, 6 y 7 se muestran las principales características de cada uno de los Grupos de *C. botulinum* según diferentes autores consultados.

Tabla 1. Características de los diferentes Grupos fenotípicos de *Clostridium botulinum*

Propiedades	Grupos fenotípicos de <i>Clostridium botulinum</i>					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Tipos de toxina	A, B, F, AB, BF, FA	B4, E, F6	C, CD, DC	G	F7	E4/5
Proteólisis	+	-	+/-	+	-	+/-
Fermentación de la glucosa	+	+	-	-	+	-
Grupo de genes que codifican la toxina	<i>orfX</i> +, <i>ha</i> +	<i>orfX</i> +, <i>ha</i> +	<i>ha</i> +	<i>ha</i> +	<i>orfX</i> +	<i>orfX</i> +
Grupo afectado	Humanos	Humanos	Animales	n.d. ^a	Humanos	Humanos
Tipos próximos no toxigénicos	<i>C. sporogenes</i> serotipo B		<i>C. haemolyticum</i> <i>C. novyi</i> tipo A	Renombrado <i>C. argentinense</i>	Renombrado <i>C. barati</i> serotipo F	Renombrado <i>C. butyricum</i> serotipo E

^aNo disponible. **Fuente:** (Liu, 2024).

Las diferencias entre cepas de distintos Grupos fenotípicos de *C. botulinum* tiene una base genética, como se ha confirmado recientemente mediante estudios de genómica comparada (Smith et al., 2020). La localización de los genes que codifican las distintas toxinas es también diferente. Dependiendo de la cepa, los genes de los Grupos I y II están codificados en el cromosoma o en plásmidos, mientras que los genes de las cepas del Grupo III están localizados en un bacteriófago y, las del Grupo IV, en plásmidos (Moore y Lacey, 2019). Además, los genomas de las distintas cepas varían ampliamente en tamaño (entre 2,4 y 4,5 Mb), lo que indica grandes diferencias en su potencial genético.

2.2 Toxina botulínica

C. botulinum produce la toxina botulínica (BoNT). Esta es, probablemente, la toxina con mayor actividad biológica conocida; además, es el agente causal del botulismo (Rawson et al., 2023). Otras 15 especies de clostridios, incluyendo *C. baratii*, *C. argentinense* y *C. butyricum* son capaces también de producir BoNT (Poulain y Popoff, 2019). Las BoNT son metaloproteasas que escinden específicamente las proteínas solubles de las terminaciones postsinápticas, impidiendo la liberación del neurotransmisor y bloqueando la transmisión de la señal neuronal a los músculos efectores (Rossetto et al., 2021). Sin embargo, las BoNT no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y, por tanto, solo afectan a los nervios motores. Las BoNT comparten una estructura similar y se sintetizan como una protoxina de 150 kD (Meurens et al., 2023). La protoxina original se escinde en dos cadenas polipeptídicas asimétricas: una cadena pesada (100 kD) y una ligera (50 kD). Estas dos cadenas constituyen la toxina activa y están unidas de forma covalente por puentes disulfuro. En las cepas proteolíticas, la proteasa celular es responsable de la activación, mientras que, en las cepas no proteolíticas, la toxina se activa por la acción degradativa de otros microorganismos pro-

teolíticos presentes en el medio (Popoff y Brüggemann, 2022). Todas ellas tienen un modo de acción similar: la cadena pesada de la toxina activada se une a las células neuronales periféricas y permite la endocitosis de la cadena ligera (Rawson et al., 2023). En el interior de las células, la cadena ligera se une a las proteínas responsables de la exocitosis de acetilcolina, de forma que esta no se libera y se pierde la actividad nerviosa utilizada para controlar los músculos.

Las BoNT se clasifican en siete tipos con distinto potencial antigénico (A, B, C, D, E, F y G) (Peck et al., 2017). Las toxinas A, B, E y F son las responsables principales del botulismo en humanos (el 65 % debidos a la toxina tipo A, el 25 % a la toxina tipo E y el 7 % a la toxina tipo B). Son producidas por los genotipos de *C. botulinum* I (A, B y F) y II (B, F y E). Debido a las diferencias en temperaturas de crecimiento de los distintos genotipos (Tablas 2, 4, 5, 6 y 7), la temperatura óptima de formación de las BoNT A, producida por *C. botulinum* I (mesófilo) oscila entre 30 y 37 °C, pero las BoNT B, E y F, que pueden ser producidas por *C. botulinum* II (psicrotrofo), se pueden desarrollar a temperaturas tan bajas como 3-4 °C. Por ello, es posible que, en el caso de alimentos de baja acidez, no esterilizados, almacenados en condiciones de anaerobiosis y en refrigeración se pueda desarrollar la BoNT.

Tabla 2. Características de las cepas de *Clostridium* spp. productoras de neurotoxinas (BoNT)

Características	Grupo I (<i>C. botulinum proteolítico</i>)	Grupo II (<i>C. botulinum</i> no proteolítico)	Grupo III (<i>C. botulinum</i>)	Grupo IV (<i>C. argentinense</i>)	Grupo V (<i>C. butyricum</i>)	Grupo VI (<i>C. baratii</i>)
Tipos de neurotoxinas producidos	A B (cepas proteolíticas) F H	E B (cepas no proteolíticas) F	C D	G	E	F
Proteólisis	+	-	-	+	-	-
Temperatura óptima de crecimiento	35-40 °C	18-25 °C	40 °C	37 °C	30-37 °C	30-45 °C
Casos de botulismo asociados	Humanos (generalmente alimentos enlatados)	Humanos (generalmente alimentos refrigerados o sometidos a tratamiento térmico suave)	Animales (C-aves; D-vacuno)	Brotos no informados; aislamientos ambientales	Humanos	Humanos

Fuente: (Rawson et al., 2023)

Las BoNT se producen tras las fases de esporulación y germinación (Shen et al., 2019). Existen evidencias de que, en el caso de las toxinas producidas por cepas no proteolíticas, se necesita un tiempo de, al menos, 10 días a 8 °C para que se desarrollen (Peck et al., 2006). *In vitro*, los niveles más altos de neurotoxinas se producen al final de la fase exponencial de crecimiento y en las primeras fases de desarrollo estacionario (Popoff y Brüggemann, 2022). Los diferentes tipos de BoNT tienen diferente estabilidad al calor y a otras condiciones ambientales (Tablas 4 y 7). En general,

las BoNT se desnaturalizan tras 10 minutos a 100 °C o 30 minutos a 80 °C y se mantienen estables durante más de 3 ciclos de congelación y descongelación (Munir et al., 2023). Como característica común, todas ellas son muy estables en ambientes de extrema acidez.

2.3 Botulismo

El botulismo es una enfermedad paralizante, poco frecuente, pero grave, que llega a ser mortal si no se diagnostica rápidamente y se trata con la antitoxina botulínica (ANSES, 2019), siendo necesario, en algunos casos, un tratamiento de apoyo, especialmente ventilación mecánica.

Dependiendo de las características del hospedador y de la ruta de infección, existen cinco tipos principales de botulismo: botulismo transmitido por alimentos, botulismo por heridas, botulismo infantil, botulismo iatrogénico y toxemia intestinal en adultos (CDC, 2024), de los que el botulismo transmitido por alimentos es el más común. Como se ha comentado anteriormente, la causa de este último es la ingestión de alimentos contaminados con BoNT. En un estudio elaborado por el RIVM (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*), se estimó que valores por encima de 0,06 ng/kg peso corporal podrían ocasionar efectos adversos para la salud, mientras que valores de entre 0,004 y 0,008 ng/kg peso corporal se podrían considerar seguros (RIVM, 2000). El botulismo humano se caracteriza por una debilidad bilateral de los músculos descendentes, los síntomas generalmente comienzan en los nervios craneales y se presentan como visión borrosa o doble, sequedad de boca y dificultad para hablar (Johnson et al., 2008). La sintomatología temprana clásica del botulismo se puede recordar utilizando la mnemónica de las “cuatro D”: disartria, diplopía, disfonía y disfagia (Rawson et al., 2023). Los síntomas del botulismo duran de unos pocos días a 8 meses, aunque la recuperación total puede durar años.

2.4 Prevalencia de *C. botulinum* en alimentos

C. botulinum es un microorganismo que se puede encontrar en determinados alimentos, tanto de origen vegetal como animal. Rhodehamel et al. (1992), Dodds (1993) y Chai et al. (2013) mencionan presencia en espinacas, patatas, maíz, cáscaras de cebolla, setas, ajos, coles, miel y carnes tanto frescas como procesadas. *C. botulinum* también es común en ciertos pescados y productos pesqueros, como la trucha de piscifactoría (Hielm et al., 1998). La incidencia en las carnes es baja (Tom-pkin, 1980) (Hauschild, 1989), aunque se ha detectado en carne de cerdo (Abrahamsson y Riemann, 1971) (Roberts y Smart, 1976).

Sin embargo, no existen muchos datos sobre la prevalencia en alimentos de V gama, refrigerados y envasados al vacío o en atmósferas modificadas. Pernu et al. (2020) pusieron de manifiesto una alta prevalencia (32 %) de *C. botulinum* Grupo II en salchichas de origen vegetal (74 muestras de 7 productores diferentes en el mercado alemán y finlandés), con un tratamiento térmico suave y envasadas al vacío.

En el caso de la prevalencia en materias primas destinadas a ser utilizadas en alimentos REPFED (*Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*), esta es frecuentemente baja (datos dados como número más probable/kg): 2-3/kg (102 muestras); carne, 2-4/kg (143 muestras); productos lácteos, 2-5/kg (26 muestras); espesantes, 2-4/kg (143 muestras); aromas y salsas, 0,3-0,6/kg (25 muestras); especias y hierbas, <0,6/kg (65 muestras), solo detectándose BoNT tipos A y B (Carlin et al., 2004).

3. Alertas y brotes asociados a *C. botulinum* en alimentos envasados al vacío o en atmósferas modificadas

En Europa se notifican cada año alrededor de 100 casos confirmados de botulismo por los sistemas nacionales de vigilancia (ECDC, 2023). Este número se ha mantenido estable desde 2017 hasta 2021, con un promedio de 85 casos anuales (ECDC, 2023). En 2022, se notificaron 7 brotes de transmisión alimentaria en la Unión Europea, afectando en promedio a un total de 20 personas, principalmente en Italia (32), Rumania (11), Francia y España. En los Estados Unidos, se producen un promedio de 110 casos de botulismo al año, y el 25 % de ellos son casos confirmados de transmitido por alimentos (CDC, 2024). Los brotes recientes declarados en Europa se han relacionado con conservas de verduras caseras (Italia), conservas de carne de cerdo y productos de jamón (Polonia y Rumanía), conservas de pescado y productos derivados de pescado, y en alimentos enlatados y productos caseros (Francia) (ECDC, 2024).

Desde el año 2020, la Red de Alerta Alimentaria Europea (RASFF, *Rapid Alert System for Food and Feed*) ha notificado 7 alertas relacionadas con la presencia o sospecha de la BoNT en alimentos, principalmente en platos preparados (España en 2023 e Italia en 2024), setas en salmuera (Rusia en 2024), conservas (Francia en 2023), pescado y derivados (Turquía en 2022), y queso crema (Reino Unido en 2020).

Tabla 3. Brotes recientes de botulismo alimentario relacionados con cepas no proteolíticas

Año	País	Producto	Toxina	Casos (muertes)	Causa brote	Referencia
2001	Australia	Pollo recalentado	E	1	Fallo control temperatura	Mackle et al. (2001)
2001	Estados Unidos	Cola y patas de castor fermentado-casero	E	3	Fallo control temperatura	CDC (2001)
2001	Canadá	Huevas de salmón fermentadas caseras	E	4	n.d. ^a	Anon (2002)
2002	Estados Unidos	Piel y grasa de beluga casera	E	12	n.d.	McLaughlin et al. (2004)
2003	Alemania	Pescado salado casero	E	3	Fallo control temperatura	Eriksen et al. (2004)
2004	Alemania	Salmón ahumando comercial envasado al vacío	E	1	Consumido caducado	Dressler (2005)
2016	Alemania y España	Pescado seco y salado	E	5	n.d.	ECDC/EFSA (2016)
2023	Francia	Sardinias en conserva caseras	B	15 (1)	n.d.	Meurice et al. (2023)

^an.d.: no disponible.

Los brotes recientes de botulismo transmitido por alimentos asociados con *C. botulinum* proteolítico están, fundamentalmente, relacionados con conservas alimentarias procesadas o conservadas de manera inadecuada. En el caso de los brotes de botulismo transmitidos por *C. botulinum* no proteolítico, estos han estado, fundamentalmente, asociados a alimentos refrigerados en los que

previamente a su consumo no se ha respetado la vida útil comercial o su temperatura de almacenamiento (Tabla 3).

4. Factores que influyen en la supervivencia de *C. botulinum* en alimentos

4.1 Efecto del contenido en oxígeno

Las principales características del microorganismo, así como las condiciones necesarias para su crecimiento y producción de toxinas, se incluyen en las Tablas 1, 2, 4, 5 y 6, basadas en los datos ofrecidos por diferentes autores consultados. *C. botulinum* es una bacteria anaerobia (en ausencia de oxígeno puede germinar y producir la toxina botulínica, por ejemplo, en conservas vegetales). Sin embargo, la presencia de altos niveles de oxígeno, por sí sola, no es una barrera suficiente para impedir el crecimiento o producción de toxinas (Camerini et al., 2019). Por un lado, se ha comprobado que el microorganismo puede tolerar trazas de oxígeno dada su producción de superóxido dismutasa (Liu, 2024). Adicionalmente, es posible que en el seno del alimento se den microambientes en los que la bacteria esté protegida del efecto del oxígeno y, por lo tanto, del estrés oxidativo (AC-MSF, 2024). En este sentido, en condiciones de laboratorio, se ha detectado crecimiento y producción de toxinas de *C. botulinum* proteolítico en productos de panadería de alta humedad (actividad de agua (a_w)= 0,990) envasados en atmósfera modificada (15 % oxígeno) a 25 °C (Daifas et al., 1999) y en champiñones envasados en una película plástica semipermeable (Whiting y Naftulin, 1992). Del mismo modo, Cai et al. (1997) y Erickson et al. (2015) describieron también la producción de BoNT tipo E en bagre y salmón, respectivamente, envasados en materiales permeables al oxígeno.

4.2 Efecto del pH

Por lo que respecta al pH, las cepas de *C. botulinum* pueden crecer con valores de pH de 4,6 o superiores, por lo que suponen un riesgo en alimentos de baja acidez (Peck, 2009). Si bien algunos brotes de botulismo se han atribuido a alimentos con pH inferior a 4,6, se ha comprobado que dichos productos estaban también contaminados con mohos, que habían incrementado el pH del alimento, permitiendo a *C. botulinum* crecer y producir toxinas (Peck, 2009).

Tabla 4. Condiciones necesarias para la supervivencia, el crecimiento y la producción de toxinas de *Clostridium botulinum* y otros clostridios neurotoxigénicos en condiciones de laboratorio

	<i>C. botulinum</i> Grupo I Proteolítico	<i>C. botulinum</i> Grupo II No proteolítico	<i>C. botulinum</i> Grupo III No proteolítico	<i>C. botulinum</i> Grupo IV Proteolítico	<i>C. butyricum</i> Grupo V	<i>C. baratii</i> Grupo VI
Tipos de neurotoxinas producidos	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Clostridios no productores de neurotoxinas estrechamente relacionados	<i>C. sporogenes</i>	Ninguno en ese momento	<i>C. novyii</i>	<i>C. argentinense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>

Tabla 4. Condiciones necesarias para la supervivencia, el crecimiento y la producción de toxinas de *Clostridium botulinum* y otros clostridios neurotoxigénicos en condiciones de laboratorio

	<i>C. botulinum</i> Grupo I Proteolítico			<i>C. botulinum</i> Grupo II No proteolítico			<i>C. botulinum</i> Grupo III No proteolítico			<i>C. botulinum</i> Grupo IV Proteolítico			<i>C. butyricum</i> Grupo V			<i>C. baratii</i> Grupo VI		
	Mín ^a	Ópt ^b	Máx ^c	Mín	Ópt	Máx	Mín	Ópt	Máx	Mín	Ópt	Máx	Mín	Ópt	Máx	Mín	Ópt	Máx
Temperatura (°C)	10	35-40	48	2,5	18-25	45	15	37-40	n.d. ^d	n.d.	37	n.d.	12	3-37	n.d.	10	30-45	n.d.
pH	4,6	n.d.	9	5	7	9	5,1	6,1-6,3	9	4,6	7	n.d.	4,8	7	n.d.	3,7	7	n.d.
Actividad de agua (a _w)	0,94	n.d.	n.d.	0,97	n.d.	n.d.	0,97	n.d.	n.d.	0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
% de NaCl que inhibe el crecimiento	10			5			5			10			n.d.			8,5		
Producción de toxinas																		
Temperatura mínima (°C)	10			3			15			n.d.			12			10		
Actividad de agua (a _w) mínima	0,94			0,97			0,97			0,94			n.d.			n.d.		

^aMín.: mínimo. ^bÓpt.: óptimo. ^cMáx.: máximo. ^dn.d.: no disponible. **Fuente:** (ANSES, 2019).

4.3 Efecto de la actividad de agua (a_w)

El valor mínimo de a_w que permite el crecimiento y la producción de toxinas de las cepas de *C. botulinum* se muestra en las Tablas 4, 5, 6 y 7. La a_w mínima para el crecimiento es de 0,94 en el caso de las cepas proteolíticas y de 0,97 para las no proteolíticas, si bien el valor puede verse afectado por el tipo de sustrato (menor con glicerol que con NaCl) o alimento.

Tabla 5. Condiciones marginales para el crecimiento de *Clostridium botulinum*

Condiciones	Cepas proteolíticas	Cepas no proteolíticas
Valor mínimo de actividad de agua (a _w)	0,935	0,970
Valor mínimo de pH	4,6	5,0
Valor máximo de pH	9,0	9,0
Concentración máxima de NaCl	10 %	5 %
Temperatura mínima	10-12 °C	3,3 °C
Temperatura máxima	50 °C	45 °C

Fuente: (Chaidoutis et al., 2022).

4.4 Efecto de los conservadores alimentarios

Para controlar el riesgo de botulismo, podría ser de interés recurrir al empleo de ciertos aditivos alimentarios cuyo uso, además de efectivo, debe encontrarse permitido por la legislación de aplicación, y estará condicionado, entre otros motivos, por el tipo de alimento de que se trate. Por ejem-

plo, en el caso de algunos productos cárnicos, como el jamón, la utilización de nitratos y nitritos ha demostrado ser una estrategia eficaz. Sin embargo, y a pesar de las ventajas de estos compuestos, su empleo plantea algunos inconvenientes, como el hecho de que pueden reaccionar con aminas secundarias, resultando en la formación de N-nitrosaminas, sustancias con potencial actividad carcinogénica (Chaidoutis et al., 2022) (Munir et al., 2023). Por ello, el empleo y la concentración de uso máxima para estos aditivos está limitado en la legislación.

Además de los nitratos y nitritos existen otros aditivos que, como se ha señalado anteriormente, dependiendo del alimento en cuestión, podrían utilizarse como conservadores, entendiéndose como tales aquellas sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos, protegiéndolos del deterioro causado por microorganismos o que protegen del crecimiento de microorganismos patógenos.

Los aditivos alimentarios autorizados y sus condiciones de uso en la elaboración de los alimentos se establecen en el Reglamento (CE) N° 1333/2008 sobre aditivos alimentarios (UE, 2008). Más concretamente, las condiciones de uso se identifican en la parte E del anexo II del dicho reglamento, que se organiza en categorías alimentarias, de tal manera, que para conocer los aditivos cuyo empleo se permite en un alimento en particular, es imprescindible conocer la categoría alimentaria en la que dicho alimento se clasifica.

4.5 Efecto de la temperatura

La temperatura de crecimiento óptima de *C. botulinum* Grupo I es de 35-40 °C (Liu, 2024). En el caso de las cepas de este Grupo, la temperatura mínima de crecimiento es de 10 °C (12 °C, según algunos autores) (Tablas 2, 4, 5, 6 y 7). Las cepas del Grupo II presentan una temperatura óptima de crecimiento de 26-28 °C, y la particularidad de que pueden crecer y producir toxina a 3 °C (incluso a temperaturas inferiores, Tabla 7). Por ello, estas cepas constituyen el principal riesgo en relación con *C. botulismo* en alimentos refrigerados almacenados en condiciones anaerobias.

Tabla 6. Características de los Grupos I y II de <i>Clostridium botulinum</i>		
Característica	<i>C. botulinum</i> tipo I (<i>C. botulinum</i> proteolítico)	<i>C. botulinum</i> tipo II (<i>C. botulinum</i> no proteolítico)
Neurotoxinas formadas	A, B, F, H ^a	B, E, F
Proteólisis ^b	+	-
Temperatura mínima de crecimiento	12 °C	3 °C
Temperatura óptima de crecimiento	37 °C	30 °C
Valor mínimo de pH para el crecimiento	4,6	5,0
Concentración de NaCl que previene el crecimiento	10 %	5 %
Actividad de agua (a _w) mínima (con NaCl) para el crecimiento	0,94	0,97
Actividad de agua (a _w) mínima (con glicerol) para el crecimiento	0,93	0,94
Termorresistencia de las esporas ^c	D ₁₂₁ = 0,21 minutos	D _{82,2} = 2,4/231 minutos ^d
<i>Clostridium</i> no neurotóxico equivalente	<i>Clostridium sporogenes</i>	

^aSe puede formar más de un tipo de toxina; tipo de neurotoxina H no verificada en el momento de la edición de la Tabla. ^bLa proteólisis denota la capacidad para degradar proteínas nativas (por ejemplo, clara de huevo

coagulada, carne cocida, caseína). Tanto *C. botulinum* Grupo I como *C. botulinum* Grupo II pueden degradar la gelatina. ^cTiempo de reducción decimal (valor D, es decir, el tiempo para lograr una reducción decimal en esporas viables) a una temperatura determinada especificada en tampón fosfato (pH 7,0). ^dValor D sin/con lisozima durante la recuperación. **Fuente:** (Carter y Peck, 2015).

Tabla 7. Condiciones para el crecimiento, supervivencia y producción de toxinas en cepas de *Clostridium botulinum* de interés en seguridad alimentaria

Característica	Condiciones ambientales	Cepas del Grupo I	Cepas del Grupo II
Crecimiento de las células vegetativas	Temperatura óptima (°C)	35-40	18-25
	Rango de temperaturas (°C)	10-48	1,5-45
	Valor de pH óptimo	7,0	7,0
	Rango de valores de pH	4,6-9,0	5,0-9,0
	Actividad de agua (a_w) mínima con NaCl	0,94	0,97
	Actividad de agua (a_w) mínima con glicerol	0,93	0,94
	% de NaCl que previene el crecimiento	≥10	≥5
Resistencia de las esporas	Calor	$D_{121} = 0,04-0,72$	$D_{80} = 0,23-2,63$
		$Z \sim 10 \text{ } ^\circ\text{C}$	
	Congelación	Sí	Sí
Estabilidad de las toxinas	Calor	Desnaturalización tras 10 minutos a 100 °C o 30 minutos a 80 °C	
	Congelación	Estable incluso tras 3 descongelaciones y congelaciones	
	pH	Más estable en condiciones fuertemente ácidas ^a	

^aEn general, las toxinas son más estables en alimentos ácidos, como salsa de tomate a pH 4,2, que en alimentos de baja acidez, como maíz enlatado a pH 6,2. **Fuente:** (Munir et al., 2023).

5. Valoración del riesgo de *C. botulinum* relacionado con el consumo de alimentos envasados al vacío o en atmósferas modificadas sometidos o no a tratamientos de pasteurización post-ensado

El botulismo transmitido por alimentos se produce tras la ingestión de una cierta cantidad de BoNT generada una vez que las esporas de *C. botulinum* germinan y comienzan a multiplicarse en el alimento. Debido a la gravedad de la enfermedad, en la práctica, no se contempla un nivel aceptable de toxina de *C. botulinum* en los alimentos. Y, aunque la producción de toxina está asociada con la proliferación de *C. botulinum*, es difícil determinar con precisión la concentración final en el alimento por lo que, generalmente, la gestión del riesgo se basa en establecer márgenes de seguridad en base a la probabilidad de supervivencia, germinación y crecimiento de esporas de *C. botulinum*. En este sentido, la formulación del alimento, así como las condiciones de distribución y almacenamiento, son factores clave para disminuir el riesgo de *C. botulinum*.

De forma general, los productos catalogados como V gama se comercializan tras la aplicación de un tratamiento térmico y suelen precisar de un calentamiento previo al consumo. Algunos de

estos platos preparados se pueden conservar a temperatura ambiente, por lo que se asocian a una vida útil más prolongada y, por tanto, y en función de las diferentes medidas de control aplicadas, podrían ser más susceptibles de presentar crecimiento de *C. botulinum* (Membré et al., 2015). En condiciones de refrigeración, la generación de toxina está causada solamente por cepas no proteolíticas, pudiendo constituir también un problema de seguridad alimentaria (Peck et al., 2006). A pesar de que la toxina botulínica tiene una termorresistencia moderada (80 °C, 30 minutos) en comparación con la spora, un calentamiento previo al consumo, con frecuencia resulta insuficiente para la inactivación de la toxina, con el consiguiente riesgo de intoxicación alimentaria en caso de ingestión de una cantidad suficientemente elevada. Esto hace que los tratamientos térmicos a nivel doméstico no constituyan una medida efectiva para la mitigación del riesgo asociado al botulismo.

Hauschild y Simonsen (1986) estimaron el margen de seguridad en niveles de probabilidad de germinación y crecimiento de esporas de *C. botulinum* proteolítico en productos cárnicos curados de entre $<10^{-7}$ y 10^{-8} . En su estudio, los citados autores se basaron en la utilización de datos procedentes de industrias con respecto al número de unidades contaminadas por lote a lo largo de los años, junto con la información epidemiológica de los casos de botulismo por alimentos. Esta información puede proporcionar una evaluación significativa de los riesgos reales de esos productos en el pasado y, en caso de que no se hayan reportado casos de botulismo, se podría demostrar que los controles utilizados fueron válidos y llevaron a un producto seguro. Así mismo, Pflug (1987) estimó una probabilidad de 10^{-9} en aquellos alimentos conservados a temperatura ambiente que pueden favorecer el crecimiento y producción de toxina por parte de *C. botulinum*.

Peck et al. (2006) utilizaron el mismo enfoque para *C. botulinum* no proteolítico en alimentos refrigerados, incluyendo carne fresca envasada en atmósfera modificada y al vacío, con una vida útil máxima de 10 días a ≤ 8 °C y sin otros controles específicos adicionales (pH, a_w , NaCl, etc.), aparte de la temperatura de almacenamiento y la vida útil. En el citado estudio, se estableció que entre 1986 y 2005 se habían comercializado un total de $8,3 \times 10^9$ unidades en esas condiciones (vida útil máxima de 10 días a ≤ 8 °C) sin haberse reportado casos de botulismo, por lo que se deduce que la probabilidad de aparición de una unidad con presencia de toxina era igual o inferior a $1,58 \times 10^{-10}$ para alimentos refrigerados con una vida útil máxima de 10 días a ≤ 8 °C. Estas condiciones han servido de base para el establecimiento de la vida útil bajo el principio de "10-day rule", ya que la formación de toxina por parte de cepas no proteolíticas de *C. botulinum* se origina en un tiempo de, al menos, 10 días y a una temperatura ≤ 8 °C (ACMSF, 2006). Este hecho fue posteriormente demostrado por Peck et al. (2020) en carne fresca envasada y almacenada a una temperatura de entre 3 y 8 °C. Sus resultados mostraron que la cantidad de toxina estuvo por debajo del límite de detección en aquellas muestras almacenadas durante más de 25 días.

Según la información disponible en los estudios de evaluación de riesgos, la proporción de unidades contaminadas de un lote es normalmente muy baja, lo que hace disminuir considerablemente el riesgo asociado a la producción de toxina por parte de *C. botulinum*. Por tanto, considerando un seguimiento de buenas prácticas de higiene, junto con el control de calidad de las materias primas, y unas condiciones adecuadas de conservación (tiempo y temperatura), el riesgo debería ser bajo o muy bajo. Sin embargo, es necesario considerar la probabilidad de supervivencia de *C. botulinum*

en función de factores ambientales asociados a la formulación del producto y condiciones de conservación.

Dada la existencia de múltiples factores asociados a la producción de toxina por parte de *C. botulinum*, hasta la fecha son escasos los estudios que abordan una evaluación de riesgos completa para este patógeno, siendo la mayoría de ellos relacionados con cepas no proteolíticas.

Uno de los primeros enfoques fue establecido por Barker et al. (2002), quienes desarrollaron modelos para la estimación del crecimiento de *C. botulinum* en función de diversos factores tales como temperatura, pH, NaCl, fase de latencia, concentración de inóculo y tiempo de almacenamiento. Este enfoque se ejemplificó posteriormente en una evaluación de exposición de *C. botulinum* no proteolítico en un alimento pasteurizado a base de patata (80 °C, 1 minuto) (Barker et al., 2005). En base a ello, se establecieron distintos márgenes de seguridad. Se obtuvo una probabilidad de presencia de toxina de 10^{-9} en envases almacenados durante 75 días a 20 °C en presencia de ácido sórbico. En el caso de un almacenamiento a temperaturas de 8 y 12 °C, dicha probabilidad se reduce a valores inferiores a 10^{-11} .

Por otro lado, Peck et al. (2008) realizaron una revisión de los factores asociados al crecimiento y producción de toxina por parte de *C. botulinum* no proteolítico en alimentos refrigerados de vida útil corta. Los autores concluyeron que el riesgo de botulismo está relacionado con el control de factores difíciles de cuantificar, y que presentan una alta variabilidad en función de la cepa, tipo de alimento y condiciones de elaboración, tales como estado higiénico de las materias primas, inactivación o daño celular producido por el tratamiento térmico, o condiciones de almacenamiento.

Malakar et al. (2011) desarrollaron una evaluación cuantitativa del riesgo de *C. botulinum* no proteolítico en postres lácteos refrigerados. Entre otros factores, se consideró la variabilidad en la destrucción de esporas debida al tratamiento térmico. Los resultados mostraron que la probabilidad de obtener unidades con presencia de esporas fue muy baja ($9,4 \times 10^{-5}$ y $8,0 \times 10^{-6}$), considerando valores D de 0,03 y 0,24 minutos a 95 °C, respectivamente. Para aquellas unidades contaminadas, el tiempo de producción de toxina dependió de la temperatura de almacenamiento, oscilando entre 8 y 26 días a 4 °C, y entre 3 y 9 días a 7 °C. El tiempo de reducción decimal y la temperatura de almacenamiento por parte del consumidor fueron los factores más determinantes sobre el riesgo asociado a *C. botulinum* no proteolítico en este tipo de productos.

Otros estudios relacionados con cepas proteolíticas de *C. botulinum* fueron desarrollados por Membré et al. (2015), quienes realizaron una evaluación cuantitativa del riesgo en paté en conserva estable a temperatura ambiente. El modelo se construyó utilizando un tratamiento térmico suficientemente representativo para dicho producto (con un valor de letalidad o F_0 establecido en 0,5 minutos, con o sin adición de nitrito). Los resultados obtenidos mostraron que la probabilidad de enfermedad por habitante por año fue muy baja ($8,0 \times 10^{-10}$), corroborándose con el análisis de los datos epidemiológicos. Por lo tanto, la práctica industrial de producción de *foie gras* en conserva se consideró adecuada para controlar el riesgo de *C. botulinum* proteolítico, con tratamientos térmicos equivalentes a una temperatura de 105 °C.

Combinando la información obtenida de las evaluaciones de riesgos, junto con datos epidemiológicos, se pueden establecer los llamados Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO, *Food Safety*

Objectives), definidos como “la frecuencia máxima y la concentración máxima de un peligro en un alimento al momento del consumo, que provee o contribuye al nivel adecuado de protección (ALOP, *Appropriate Level Of Protection*)” (ICMSF, 2002). En este sentido, Anderson et al. (2011) consideraron que, teniendo en cuenta un nivel de contaminación medio de 10^9 esporas de *C. botulinum* por unidad de producto, y un tratamiento de inactivación que garantice la eliminación de 12 log, el FSO se puede establecer en -9,0 log/unidad de producto, es decir que, en un lote de 10^9 unidades, no existe ninguna espora capaz de sobrevivir, germinar y crecer para producir toxina. Utilizando este razonamiento, los autores establecieron una serie de métricas relacionadas con valores de FSO en determinados alimentos tratados térmicamente (legumbres en conserva, fiambre de carne, salsa pesto y queso de untar), en función de la intensidad del tratamiento térmico y formulación (Tabla 8). Para ello, aplicaron la inecuación propuesta por ICMSF (2002), donde H_0 es el término que refleja la contaminación inicial de cada una de las unidades del lote ($\log N_0/\text{unidad}$), ΣR es el sumatorio de las reducciones como consecuencia de los tratamientos de inactivación ($\log N_0/N_R$), y ΣI es el sumatorio de los incrementos de la concentración del patógeno ($\log N_f/N_0^*$):

$$H_0 - \Sigma R + \Sigma I \leq \text{FSO} \quad \text{Ecuación 1}$$

Mediante esta fórmula, se pueden proponer valores de FSO que se pueden traducir en la probabilidad de aparición de unidades en un lote que puedan estar relacionadas con casos de botulismo.

Producto	H_0	ΣR	ΣI	FSO	Medidas de control
Alubias en conserva	1,2	7,2	0,0	-6,0	$F_0^* = 1,3$ (minutos)
Alubias en conserva	1,2	10,2	0,0	-9,0	$F_0 = 1,9$ (minutos)
Fiambre de carne	-1,7	3,0	-3,3	-8,0	$F_0 = 0,6$ (minutos); pH= 7,0; NaCl= 4,5 %; Nitrito= 150 ppm
Fiambre de carne	-1,7	3,0	-4,3	-9,0	$F_0 = 0,6$ (minutos); pH= 6,5; NaCl= 5,5 %; Nitrito= 150 ppm
Salsa pesto	2,3	0,0	-7,0	>-4,7	pH= 4,6
Salsa pesto	2,3	0,0	-2,0	0,3	pH= 4,75
Queso de untar	-1,6	0,0	-4,4	-6,0	pH= 5,6; NaCl+Na ₂ PO ₄ = 4,5 %; humedad= 56 %
Queso de untar	-1,6	0,0	-4,4	-6,0	pH= 6,0; NaCl+Na ₂ PO ₄ = 5,0 %; humedad= 54 %

* F_0 = valor de letalidad (minutos) equivalente a un tratamiento de 121 °C. **Fuente:** (Anderson et al., 2011).

En cualquier caso, los valores obtenidos en las evaluaciones de riesgo de *C. botulinum* publicadas hasta la fecha indican una probabilidad baja o muy baja de aparición de unidades contaminadas, asumiendo que se siguen unas prácticas industriales adecuadas a nivel de control de materias primas, formulación, tratamientos de inactivación y condiciones de distribución y almacenamiento. No obstante, las características de las cepas de *C. botulinum* que pueden proliferar en alimentos sometidos a pasteurización y conservados en refrigeración, así como la variabilidad en los patrones de comporta-

miento de los consumidores, deben tenerse en cuenta de cara al establecimiento de medidas de prevención adecuadas frente al botulismo. El conocimiento de los factores que inducen la supervivencia, germinación, crecimiento y producción de toxina por parte de *C. botulinum* en cada tipo de alimento particular se antoja fundamental para poder desarrollar estrategias efectivas de mitigación del riesgo.

6. Medidas de control

6.1 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico es el método más efectivo para la inactivación de esporas de *C. botulinum*. Sin embargo, la termotolerancia de estas esporas varía tanto entre Grupos como dentro de ellos. En general, las esporas de *C. botulinum* se encuentran entre las más termorresistentes de aquellas producidas por microorganismos patógenos. De hecho, en los productos comercialmente estériles, el tratamiento se establece con el objetivo de conseguir 12 reducciones decimales (12D) de *C. botulinum* (ANSES, 2021).

De forma general, la resistencia de las células vegetativas y las esporas de las cepas proteolíticas (Grupo I) es mayor que las de las cepas no proteolíticas (Grupo II) (ANSES, 2010). Tradicionalmente, se ha establecido un tiempo de 0,21 minutos a 121,1 °C (Esty y Meyer, 1922) como el necesario para reducir la carga de *C. botulinum* en 1 ciclo logarítmico ($D_{121,1}$). Estudios más recientes han confirmado el valor. Un metaanálisis realizado utilizando 23 artículos científicos (394 valores D recogidos) determinó un valor medio $D_{121,1}$ de 0,20 minutos, con una desviación estándar de 0,11 minutos, y valores individuales de hasta 0,48 minutos (Diao et al., 2014). Adicionalmente, en base a este valor se establece el concepto de “cocción botulínica mínima”, que supone un tratamiento térmico en el punto más frío del alimento de 3 minutos a 121,1 °C, o cualquier combinación de letalidad (F) equivalente. Estas combinaciones tiempo-temperatura resultan en 12 reducciones logarítmicas de *C. botulinum* (Grupo I), siendo, actualmente, el baremo estándar establecido para la esterilización de conservas de baja acidez (concepto de 12D). En el caso de *C. botulinum* Grupo II, un tratamiento térmico de 90 °C durante 10 minutos (6D) es suficiente (ACMSF, 1992) para conseguir la esterilización comercial. Este tratamiento térmico es el recomendado para la conservación de alimentos de V gama refrigerados y envasados al vacío o en atmósferas modificadas (REPFED) (ACMSF, 1992).

Las toxinas botulínicas, tienen una termoestabilidad menor, inactivándose tras tratamientos térmicos (temperaturas y tiempos) que varían según los autores, siendo los valores recogidos en la bibliografía de 85 °C durante 5 minutos (Chaidoutis et al., 2022) (Rawson et al., 2023), de 100 °C durante 10 minutos o de 80 °C durante 30 minutos (Poulain y Papoff, 2019). Hay que señalar que esta variabilidad puede deberse a varios factores, como la composición del medio o el tipo de cepa (Munir et al., 2023).

6.2 Efecto de los conservadores alimentarios

Durante siglos, la conservación de carne y pescado se ha basado en el uso de conservadores (nitritos y nitratos de sodio, fundamentalmente). Sin embargo, debido a preocupaciones sobre la posible formación de compuestos carcinógenos como las N-nitrosaminas a partir de derivados de estos compuestos, se han identificado alternativas a partir de sorbato de potasio, ciertos polifosfatos

(Nelson et al., 1983) y lactato de sodio (Meng y Genigeorgis, 1993) (Houtsma et al., 1994). Notermans et al. (1985) demostraron que una combinación de ácido ascórbico y ácido cítrico podría inhibir la formación de toxinas en patatas cocidas envasadas al vacío, mejorando la inocuidad incluso bajo condiciones de abuso de temperatura. En conjunto, estos estudios destacan el potencial de diversos aditivos para desarrollar efectos que contribuyen a controlar el crecimiento de *C. botulinum* y la producción de toxinas en diferentes alimentos. El empleo de aditivos alimentarios durante la elaboración de alimentos se encuentra estrictamente regulado en la Unión Europea mediante el ya previamente mencionado Reglamento (CE) N° 1333/2008 (UE, 2008).

6.3 Otros tratamientos

En los últimos 30 años, se ha llevado a cabo un esfuerzo importante en investigación sobre tecnologías alternativas al tratamiento térmico para la conservación de alimentos. Tal es el caso de las altas presiones hidrostáticas (HPP, *High Pressure Processing*), los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF, *Pulse Electric Field*), la radiación ionizante (IR, *Ionizing Radiation*) o recientemente el plasma frío (CP, *Cold Plasma*).

En la actualidad, el grado de desarrollo de cada una de ellas es variable. En el caso de las altas presiones hidrostáticas, la tecnología está completamente implantada a nivel industrial como proceso para la pasteurización de alimentos (eliminación de las células vegetativas de microorganismos patógenos). Sin embargo, la capacidad de esta tecnología para inactivar esporas bacterianas con los desarrollos industriales actuales, es limitada. Se requieren valores de presión por encima de los actualmente establecidos por la industria o en combinación con temperaturas de más de 80 °C para poder encontrar reducciones logarítmicas de esporas bacterianas considerables desde el punto de vista comercial (Munir et al., 2023).

En el caso de los pulsos eléctricos de alta intensidad, las investigaciones llevadas a cabo ponen de manifiesto la poca efectividad de esta tecnología para inactivar esporas microbianas (Soni et al., 2020) (Qiu et al., 2022).

La radiación ionizante sí que ha mostrado efectividad para la inactivación de las esporas bacterianas, y sus efectos pueden observarse en forma de daños estructurales, contenido citoplasmático derramado, reducción de la integridad de la membrana y fragmentación del ADN genómico (Fietser et al., 2012). Sin embargo, su aplicación como tecnología de conservación es un tema controvertido en la Unión Europea, debido a preocupaciones sobre su seguridad, los posibles efectos en la calidad nutricional y sensorial de los alimentos, y el impacto en la salud humana. Su uso está autorizado en España y en el resto de Estados miembros de la Unión Europea para hierbas aromáticas, especias y condimentos vegetales (secos), si bien algunos países de la Unión Europea permiten también la irradiación de otros productos.

La aplicación del plasma frío a la conservación de alimentos está actualmente en estudio. Los resultados descritos hasta el momento ponen de manifiesto el potencial de esta tecnología para la inactivación de esporas bacterianas (Liao et al., 2019) (Valdez-Narváez et al., 2024), sin embargo, no se han encontrado estudios centrados en la inactivación de esporas de *C. botulinum*, por lo que todavía no es posible establecer conclusiones específicas al respecto.

Conclusiones del Comité Científico

La gestión del riesgo de botulismo se basa en establecer márgenes de seguridad en función de la probabilidad de supervivencia, germinación y crecimiento de las esporas de *C. botulinum* formadoras de BoNT.

En el caso de alimentos esterilizados (conservas), el tratamiento térmico aplicado es suficiente para inactivar las esporas de *C. botulinum*. Por lo tanto, siempre que no haya fallos en el procesado ni en el envasado, son alimentos seguros independientemente de su formulación, temperatura y tiempo de almacenamiento.

En el caso de alimentos con tratamientos térmicos más suaves (cocinado y/o pasteurización térmica), como los de V gama refrigerados, envasados al vacío, listos para su consumo o que requieran solamente un ligero calentamiento previo, el riesgo de botulismo dependerá en gran medida del seguimiento de unas buenas prácticas higiénicas a lo largo del proceso de elaboración. Asimismo, es de especial importancia el establecimiento de medidas de control que impidan el desarrollo de *C. botulinum* tanto a nivel de la formulación del alimento (pH, a_w , concentración de NaCl o algún tipo de agente antimicrobiano), como del control estricto del tiempo y la temperatura de almacenamiento del alimento (por debajo de 4 °C, idealmente por debajo de 3,3 °C). Además, el consumidor debe adherirse a las instrucciones de conservación y consumo proporcionadas por el productor.

Referencias

- Abrahamsson, K. y Riemann, H. (1971). Prevalence of *Clostridium botulinum* in semi-preserved meat products. *Applied Microbiology*, 21, pp: 543-544.
- ACMSF (1992). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Food Standards Agency. Report on vacuum packaging and associated processes. Disponible en: https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/acmsfvacpackreport.pdf [acceso 8-08-24].
- ACMSF (2006). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Food Standards Agency. Report on Minimally Processed Infant Weaning Foods and the Risk of Infant Botulism. Disponible en: https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/committee/acmsfar2006.pdf [acceso: 3-08-24].
- ACMSF (2024). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Food Standards Agency. Report on Botulinum Neurotoxin-Producing Clostridia. Disponible en: <https://doi.org/10.46756/sci.fsa.ozk974> [acceso: 3-08-24].
- Anderson, N.M., Larkin, J.W., Cole, M.B., Skinner, G.E., Whiting, R.C., Gorris, L.G.M., Rodriguez, A., Buchanan, R., Stewart, C.M., Hanlin, J.H., Keener, L. y Hall, P.A. (2011). Food Safety Objective approach for controlling *Clostridium botulinum* growth and toxin production in commercially sterile foods. *Journal of Food Protection*, 74, pp: 1956-1989.
- Anon (2002). Two outbreaks of botulism associated with fermented salmon roe - British Columbia - August 2001. *Canada Communicable Disease Report*, 28, pp: 1-4.
- ANSES (2010). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. *Clostridium botulinum*, and Neurotoxicogenic Clostridia (Saisine n° 2016-SA-0074). Disponible en: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010sa0234FIEN.pdf> [acceso: 3-08-24].
- ANSES (2019). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments: *Clostridium botulinum*, *Clostridium neurotoxinogènes* (Saisine n° 2016-SA-0074). Disponible en: <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA-0074Fi.pdf> [acceso: 3-08-24].

- ANSES (2021). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. *Clostridium botulinum*: Mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E (Saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115) Disponible en: <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA-2019SA0114Ra.pdf> [acceso: 3-08-24].
- Artin, I., Carter, A.T., Holst, E., Lövenklev, M., Mason, D.R., Peck, M.W. y Rådström, P. (2008). Effects of carbon dioxide on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp: 2391-2397.
- Barker, G.C., Talbot, N.L.C. y Peck, M.W. (2002). Risk assessment for *Clostridium botulinum*: a network approach. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50, pp: 167-175.
- Barker, G.C., Malakar, P.K., Del Torre, M., Stecchini, M.L. y Peck, M.W. (2005). Probabilistic representation of the exposure of consumers to *Clostridium botulinum* neurotoxin in a minimally processed potato product. *International Journal of Food Microbiology*, 100, pp: 345-357.
- Cai, P., Harrison, M.A., Huang, Y.W. y Silva, J.L. (1997). Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type E in Packaged Channel Catfish. *Journal of Food Protection*, 60 (11), pp: 1358-1363.
- Camerini, S., Marcocci, L., Picarazzi, L., Iorio, E., Ruspantini, I., Pietrangeli, P., Crescenzi, M. y Franciosa, G. (2019). Type E Botulinum Neurotoxin-Producing *Clostridium butyricum* Strains Are Aerotolerant during Vegetative Growth. *mSystems*, 4 (2): e00299-18, pp: 1-16.
- Carlin, F., Broussolle, V., Perelle, S., Litman, S. y Fach, P. (2004). Prevalence of *Clostridium botulinum* in food raw materials used in REPFEDs manufactured in France. *International Journal of Food Microbiology*, 91, pp: 141-145.
- Carter, A.T. y Peck, M.W. (2015). Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. *Research in Microbiology*, 166, pp: 303-317.
- CDC (2001). U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism. Disponible en: <https://www.cdc.gov/botulism/index.html> [acceso: 13-06-24].
- CDC (2024). U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism; Epidemiological Overview for Clinicians. Disponible en: <https://www.emergency.cdc.gov/agent/botulism/clinicians/epidemiology.asp> [acceso: 23-06-24].
- Chai, E., Choi, E., Guitierrez, C., Melvin Hochman, M. y Johnkutty, S. (2013). Botulism associated with home-fermented tofu in two Chinese immigrants - New York City, March-April 2012y. *MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62, pp: 529-532.
- Chaidoutis, E., Keramydas, D., Papalexis, P., Migdanis, A., Migdanis, I., Lazaris, A.C. y Kavantzias, N. (2022). Foodborne botulism: A brief review of cases transmitted by cheese products (Review). *Biomededical Reports*, 16, pp: 41.
- Corsalini, M., Inchingolo, F., Dipalma, G., Wegierska, A., Charitos, I.A., Potenza, M.A., Scarano, A., Lorusso, F., Inchingolo, A.D., Montagnani, M. y Santacroce, L. (2021). Botulinum neurotoxins (BoNTs) and their biological, pharmacological, and toxicological issues: A scoping review. *Applied Sciences*, 11: 8849, pp: 1-14.
- Daifas, D.P., Smith, J.P., Blanchfield, B. y Austin, J.W. (1999). Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in English-style Crumpets Packaged Under Modified Atmospheres. *Journal of Food Protection*, 62 (4), pp: 349-355.
- Diao, M.M., André, S. y Membré, J.M. (2014). Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International Journal of Food Microbiology*, 174, pp: 23-30.
- Dodds, K.L. (1993). *Clostridium botulinum* in foods. En libro: *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. Nueva York. CRC Press, pp: 53-68.
- Dressler, D. (2005). Botulismus durch Raucherlachsverzehr. *Der Nervenarzt*, 76, pp: 763-766.
- ECDC (2023). Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Botulism. Annual Epidemiologi-

- cal Report for 2020. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/botulism-annual-epidemiological-report-2020.pdf> [acceso: 23-06-24].
- ECDC (2024). Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Botulism. Annual Epidemiological Report for 2021. Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/BOTU_AER_2021_Report_FINAL.pdf [acceso: 23-06-24].
- ECDC/EFSA (2016). Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades/Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Type E botulism associated with fish product consumption - Germany and Spain. *EFSA Supporting publication*, EN-1157, pp: 1-9.
- Eriksen, T., Brantsaeter, A.B., Kiehl, W. y Steffens, I. (2004). Botulism infection after eating fish in Norway and Germany: two outbreak report. *Eurosurveillance Weekly*, 8, pp: 1-2.
- Erickson, M.C., Ma, L.M. y Doyle, M.P. (2015). *Clostridium botulinum* Toxin Production in Relation to Spoilage of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Packaged in Films of Varying Oxygen Permeabilities and with Different Atmospheres. *Journal of Food Protection*, 78 (11), pp: 2006-2018.
- Espelund, M. y Klaveness, D. (2014). Botulism outbreaks in natural environments - an update. *Frontiers in Microbiology*, 5: 287, pp: 1-7.
- Esty, J.R. y Meyer, K.F. (1922). The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. *The Journal of Infectious Diseases*, 31, pp: 650-663.
- Fiester, S.E., Helfinstine, S.L., Redfearn, J.C., Uribe, R.M. y Woolverton, C.J. (2012). Electron Beam Irradiation Dose Dependently Damages the *Bacillus* Spore Coat and Spore Membrane. *International Journal of Microbiology*, 2012: 579593, pp: 1-9.
- Finegold, S.M., Song, Y. y Liu, C. (2002). Taxonomy-General comments and update on taxonomy of Clostridia and Anaerobic cocci. *Anaerobe*, 8 (5), pp: 283-285.
- Hauschild, A.H.W. y Simonsen, B. (1986). Safety assessment for shelf-stable canned cured meats - an unconventional approach. *Food Technology*, 40, pp: 155-158.
- Hauschild, A.H.W. (1989). *Clostridium botulinum*. En libro: *Foodborne Bacterial Pathogens*. Nueva York. M. Dekker, pp: 111-189.
- Hielm, S., Björkroth, J., Hyytiä, E. y Korkeala, H. (1998). Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11), pp: 4161-4167.
- Houtsmá, P.C., Heuvelink, A., Dufrenne, J. y Notermans, S. (1994). Effect of sodium lactate on toxin production, spore germination and heat resistance of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. *Journal of Food Protection*, 57 (4), pp: 327-330.
- ICMSF (2002). Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. En libro: *Microorganisms in food 7. Microbiological testing in food safety management*. Nueva York. Kluwer Academic/Plenum.
- Johnson, E.A. y Montecucco, C. (2008). Botulism. En libro: *Handbook of Clinical Neurology*, Volumen 91. Amsterdam. Elsevier, pp: 333-368.
- Lawson, P.A. y Rainey, F.A. (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* (Prazmowski) to *Clostridium butyricum* and related species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, pp: 1009-1016.
- Liao, X., Muhammad, A.I., Chen, S., Hu, Y., Ye, X., Liu, D. y Ding, T. (2019). Bacterial Spore Inactivation Induced by Cold Plasma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, pp: 2562-2572.
- Liu, D. (2024). Chapter 45 - *Clostridium botulinum* and associated neurotoxins. En libro: *Molecular Medical Microbiology*. 3ª edición. Londres. Academic Press, pp: 933-944.
- Long, S.C. y Tauscher, T. (2006). Watershed issues associated with *Clostridium botulinum*: a literature review. *Journal of Water and Health*, 4, pp: 277-288.
- Mackie, I.J., Halcomb, E. y Parr, M.J.A. (2001). Severe Adult Botulism. *Anaesthesia and Intensive Care*, 29 (3), pp: 297-300.

- Malakar, P.K., Barker, G.C. y Peck, M.W. (2011). Quantitative risk assessment for hazards that arise from non-proteolytic *Clostridium botulinum* in minimally processed chilled dairy-based foods. *Food Microbiology*, 28, pp: 321-330.
- McLaughlin, J.B. (2004). Botulism type E outbreak associated with eating a beached whale, Alaska. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (9), pp: 1685-1687.
- Membré, J.M., Diao, M., Thorin, C., Cordier, G., Zuber, F. y André, S. (2015). Risk assessment of proteolytic *Clostridium botulinum* in canned foie gras. *International Journal of Food Microbiology*, 210, pp: 62-72.
- Meng, J. y Genigeorgis, C.A. (1993). Modeling lag phase of nonproteolytic *Clostridium botulinum* toxigenesis in cooked turkey and chicken breast as affected by temperature, sodium lactate, sodium chloride and spore inoculum. *International Journal of Food Microbiology*, 19 (2), pp: 109-122.
- Meurens, F., Carlin, F., Federighi, M., Filippitzi, M.E., Fournier, M., Fravallo, P., Ganière, J.P., Grisot, L., Guillier, L., Hilaire, D., Kooh, P., Le Bouquin-Leneveu, S., Le Maréchal, C., Mazuet, C., Morvan, H., Petit, K., Vaillancourt, J.P. y Woudstra, C. (2023). *Clostridium botulinum* type C, D, C/D, and D/C: An update. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1099184, pp: 1-18.
- Meurice, L., Filleul, L., Fischer, A., Burbaud, A., Delvallez, G., Diancourt, L., Belichon, S., Clouzeau, B., Malvy, D., Oliva-Labadie, M., Bragança, C., Wilking, H., Franca, R., Martin, G., Godbole, G., Tourdjman, M. y Jourdan-Da, S.N. (2023). Foodborne botulism outbreak involving different nationalities during the Rugby World Cup: critical role of credit card data and rapid international cooperation, France, September 2023. *Euro Surveillace*, 28 (47): 2300624, pp: 1-6.
- Moore, R.J. y Lacey, J.A. (2019). Genomics of the Pathogenic Clostridia. *Microbiology Spectrum*, 7 (3), pp: 1-17.
- Munir, M.T., Mtimet, N., Guillier, L., Meurens, F., Fravallo, P., Federighi, M. y Kooh, P. (2023). Physical Treatments to Control *Clostridium botulinum* Hazards in Food. *Foods*, 12: 1580, pp: 1-25.
- Nelson, K.A., Busta, F.F., Sofas, J.N. y Wagner, M.K. (1983). Effect of polyphosphates in combination with nitrite-sorbate or sorbate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production in chicken frankfurter emulsions. *Journal of Food Protection*, 46, pp: 846-850.
- Notermans, S., Dufrenne, J. y Keybets, J.H. (1985). Use of preservatives to delay toxin formation by *Clostridium botulinum* (Type B, strain Okra) in vacuum-packed, cooked potatoes. *Journal of Food Protection*, 49 (10), pp: 851-855.
- Parker, M.D., Barrett, P.I., Shepherd, J., Price, L.J. y Bull, S.D. (2015). Characterisation of non-toxigenic *Clostridium* spp. strains, to use as surrogates for non-proteolytic *Clostridium botulinum* in chilled food challenge testing. *Journal of Microbiological Methods*, 108, pp: 83-91.
- Peck, M.W., Goodburn, K.E., Betts, R.P. y Stringer, S.C. (2006). *Clostridium botulinum* in vacuum packed (VP) and modified atmosphere packed (MAP) chilled foods. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237298240_Clostridium_botulinum_in_vacuum_packed_VP_and_modified_atmosphere_packed_MAP_chilled_foods [acceso: 23-06-24].
- Peck, M.W., Goodburn, K.E., Betts, R.P. y Stringer, S.C. (2008). Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. *Trends in Food Science & Technology*, 19, pp: 207-216.
- Peck, M.W. (2009). Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Advances in Microbial Physiology*, 55, pp: 183-265.
- Peck, M.W., Smith, T.J., Anniballi, F., Austin, J.W., Bano, L., Bradshaw, M., Cuervo, P., Cheng, L.W., Derman, Y., Dorner, B.G., Fisher, A., Hill, K.K., Kalb, S.R., Korkeala, H., Lindström, M., Lista, F., Lúquez, C., Mazuet, C., Pirazzini, M., Popoff, M.R., Rossetto, O., Rummel, A., Sesardic, D., Singh, B.R. y Stringer, S.C. (2017). Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins (Basel)*, 9: 38, pp: 1-21.
- Peck, M.W., Webb, M.D. y Goodburn, K.E. (2020). Assessment of the risk of botulism from chilled, vacuum/modified atmosphere packed fresh beef, lamb and pork held at 3 °C-8 °C. *Food Microbiology*, 91: 103544, pp: 1-9.

- Pernu, N., Keto-Timonen, R., Lindström, M. y Korkeala, H. (2020). High Prevalence of *Clostridium botulinum* in Vegetarian Sausages. *Food Microbiology*, 91: 103512, pp: 1-5.
- Pflug, I.J. (1987). Factors important in determining the heat process values, FT, for low-acid canned foods. *Journal of Food Protection*, 50, pp: 528-533.
- Popoff, M.R. y Brüggemann, H. (2022). Regulatory Networks Controlling Neurotoxin Synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium Tetani*. *Toxins*, 14: 364, pp: 1-19.
- Portinha, I.M., Douillard, F.P., Korkeala, H. y Lindström, M. (2022). Sporulation strategies and potential role of the exosporium in survival and persistence of *Clostridium botulinum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2): 754, pp: 1-17.
- Poulain, B. y Popoff, M.R. (2019). Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic? *Toxins*, 11: 34, pp: 1-18.
- Qiu, X., Chang, J., Jin, Y. y Wu, W.J. (2022). Pulsed Electric Field Treatments with Nonlethal Field Strength Alter the Properties of Bacterial Spores. *Journal of Food Protection*, 85, pp: 1053-1060.
- Rawson, A.M., Dempster, A.W., Humphreys, C.M. y Minton, N.P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridium botulinum*. *Virulence*, 14 (1): 2205251, pp: 1-28.
- Rhodehamel, E.J., Reddy, N.R. y Pierson, M.D. (1992). Botulism: the causative agent and its control in foods. *Food Control*, 3, pp: 125-143.
- RIVM (2000). Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Hazard identification and characterization, and dose response assessment of spore forming pathogens in cooked chilled food containing vegetables. Disponible en: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/149106008.html> [acceso: 2-08-24].
- Roberts, T.A. y Smart, J.L. (1976) The occurrence and growth of *Clostridium* spp. in vacuum-packed bacon with particular reference to *Cl. Perfringens* (welchii) and *Cl. botulinum*. *Journal of Food Technology*, 11 (3), pp: 229-244.
- Rossetto, O., Pirazzini, M., Fabris, F. y Montecucco, C. (2021). Botulinum Neurotoxins: Mechanism of Action. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 263, pp: 35-47.
- Shen, A., Edwards, A.N., Sarker, M.R. y Paredes-Sabja, D. (2019). Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 7, pp: 1-30.
- Smith, T.J., Xie, G., Williamson, C.H.D., Hill, K.K., Fernández, R.A., Sahl, J.W., Keim, P. y Johnson, S.L. (2020). Genomic Characterization of Newly Completed Genomes of Botulinum Neurotoxin-Producing Species from Argentina, Australia, and Africa. *Genome Biology and Evolution*, 12, pp: 229-242.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Ross, I.K. y Bremer, P.J. (2020). Effect of Pulsed Electric Field with Moderate Heat (80 °C) on Inactivation, Thermal Resistance and Differential Gene Expression in *B. Cereus* Spores. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44: e14503.
- Tompkin, R.B. (1980). Botulism from meat and poultry products - a historical perspective. *Food Technology*, 34, pp: 229-236.
- UE (2008). Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. DO L 354 de 13 de diciembre de 2008, pp: 16-33.
- Valdez-Narváez, M.I., Fernández-Felipe, M.T., Martínez, A. y Rodrigo, D. (2024). Inactivation of *Bacillus cereus* Spores and Vegetative Cells in Inert Matrix and Rice Grains Using Low-Pressure Cold Plasma. *Foods*, 13: 2223, pp: 1-12.
- Whiting, R.C. y Naftulin, K.A. (1992). Effect of Headspace Oxygen Concentration on Growth and Toxin Production by Proteolytic Strains of *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*, 55 (1), pp: 23-27.