

# DISTRIBUCION DE CLOSTRIDIUM BOTULINUM EN MENDOZA, ARGENTINA

Dres. Domingo F. Giménez<sup>1</sup> y Alberto S. Ciccarelli<sup>2</sup>

*Se presentan los resultados de un estudio sobre la distribución de Clostridium botulinum en suelos de Mendoza, Argentina, indicándose que la prevalencia es similar a la registrada en otras áreas de América y haciéndose notar la identificación de cinco tipos diferentes de toxinas.*

El hallazgo de *Clostridium botulinum* en el contenido intestinal de un cerdo por Kempner y Pollak (citado por Burke) y la contaminación de ciertos alimentos por esta bacteria, sugirió que el suelo podría ser su vehículo o habitat. Esta hipótesis fue probada por Burke (1) y luego ampliamente estudiada por K. Meyer y colaboradores a partir de 1922, cuyos resultados dieron lugar a una serie de trabajos sobre la distribución de *C. botulinum* en varias partes del mundo (2).

En América del Sur existe un conocimiento muy restringido de la existencia de este anaerobio en el medio natural. Esto puede deberse a que, para la mayoría de los países que integran esta área, el botulismo no representa un problema de salud pública o, más probablemente, a que el efecto de otras enfermedades infecciosas, cuya mortalidad rebasa la debida al botulismo, desvirtúa la verdadera importancia de este; supuestamente, todo ello agravado por un inadecuado conocimiento de la real incidencia ya sea por la falta de denuncia de todos los casos o por deficiencias en los registros de los servicios de salud pública.

En la Argentina, donde el primer brote de botulismo se registró en 1922 (3), no se ha estudiado intensivamente la presencia de *C. botulinum* en la naturaleza. La provincia

de Mendoza posee atributos que la señalan como lugar de elección para el desarrollo del presente estudio: a) la mayoría de los brotes de botulismo registrados en la Argentina se produjeron por consumo de alimentos envasados, caseros o industriales, elaborados en esta provincia (3, 4); b) es el principal centro industrial del país en la producción de conservas vegetales; además, en el seno de la familia mendocina se cultiva la antigua tradición de elaborar conservas vegetales caseras.

Esta provincia está situada en el centro oeste de la Argentina, comprendida entre los 31°59' y 37°33' de latitud sur, y 66°30' y 70°35' de longitud oeste. Su clima es templado continental con una temperatura media anual (en la ciudad de Mendoza) de 15.6°C, con una media mensual de 23.5°C en enero y 7.4°C en junio, y una media de precipitación de 200 mm anuales. La totalidad de las áreas cultivadas fueron ganadas al desierto por sucesivas extensiones de los sistemas de riego artificial con las aguas de sus ríos.

## Material y métodos

### Muestras

Se tomaron 129 muestras de suelo cultivado y 40 de suelos vírgenes de algunas áreas de la provincia. Se consideraron suelos vírgenes los no irrigados y con una flora xerofítica autóctona de la zona árida de la

<sup>1</sup> Profesor de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

<sup>2</sup> Profesor Adjunto de Microbiología de la misma Facultad.

región, dos índices de que estas tierras no fueron, probablemente, nunca labrantías; sin embargo, en estos suelos se observaron rastros de tránsito de animales, particularmente caprinos, equinos y bovinos.

Las muestras se recogieron en frascos esterilizados de boca ancha de 250 ml de capacidad, con una cucharilla metálica esterilizada, de una superficie de terreno de 10 a 15 cm por lado y de un par de centímetros de profundidad; la muestra fue bien mezclada dentro del frasco. En el laboratorio, se suspendieron unos 25 g de suelo en 50 ml de solución salina en tubo esterilizado de 200 x 25 mm con tapón de goma, agitando vigorosamente; el tubo se colocó en la gradilla y, después de 30 a 50 minutos de reposo, se tomaron unos 15 ml de sobrenadante, que se calentaron en otro tubo esterilizado por cinco minutos, en un baño de agua a 80°C. Posteriormente, se destinaron 10 ml a las siembras correspondientes y el resto se pasó a un tubo esterilizado, guardándose como duplicado de la muestra para una posible investigación ulterior.

El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su siembra varió entre 24 horas y dos meses. En algunos casos en que se hicieron resiembras de muestras positivas, habían transcurrido de dos a cinco años, no observándose diferencia en la concentración de toxinas entre ambas siembras.

#### *Medio de cultivo*

Se utilizó un medio de infusión de corazón de bovino (medio No. 14, de la Fundación G. Williams Hooper). Se molieron 500 g de músculo cardíaco, privado de tejido conectivo y grasa, en una máquina de picar carne con criba de orificios de 9 mm de diámetro, llevándose a un Erlenmeyer de tres litros con 1,000 ml de agua destilada; se hizo hervir durante 45 minutos, ajustando el pH a 8.0 en caliente con solución de hidróxido de sodio, continuando la ebullición durante 10 minutos más, al cabo de los cuales se agregaron 10 g de proteosa peptona (Oxoid)

y 5 g de cloruro de sodio. Se llevó de nuevo a ebullición durante 10 minutos; por segunda vez, se ajustó el pH a 8.0, haciéndose finalmente hervir durante un par de minutos. A continuación, se filtró por una rejilla metálica capaz de retener la carne picada y, de inmediato, se filtró el caldo por cuatro traveses de gasa; se completó el volumen con cantidad suficiente del líquido obtenido por lavado de la carne picada con agua destilada sobre la malla metálica, y se dejó a 4°C hasta el día siguiente; la grasa solidificada se eliminó por colado en frío y, luego, se calentó hasta 80-90°C, filtrándose finalmente por papel de filtro. La carne picada, lavada con agua destilada, se guardó separadamente a 4°C hasta la preparación final del medio.

En un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se colocaron 130 ml de la infusión peptonada y músculo picado hasta representar aproximadamente 1/3 del espesor del medio; se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Antes de la siembra, se sumergió el medio en baño de agua hirviente durante 30 minutos. Este calentamiento se obvió cuando el medio había sido recientemente extraído del autoclave; una vez enfriado a 40° ó 50°C, se procedió a sembrar los 10 ml de la suspensión de suelo, cubriéndose con una capa de vaselina sólida esterilizada de 0.3 a 0.5 cm de espesor, previamente fundida. Los cultivos se incubaron a 30-31°C por un período de 8 a 12 días.

#### *Identificación de la toxina*

Se investigó preliminarmente la presencia de toxina inyectando, por vía intraperitoneal, dos ratones "lauchas" blancos de unos 20 g de peso cada uno, con 0.2 y 1.0 ml, respectivamente, de cada uno de los caldos que presentaron desarrollo bacteriano con gas, y observados durante unas 30 horas. De los cultivos que causaron la muerte con síntomas de botulismo hasta 8 horas después de la inoculación, se centrifugaron 10 ml a 5,000 por g durante 10 minutos, destinándose el

sobrenadante a la prueba de neutralización. Se diluyeron los sueros en solución salina hasta contener cuatro unidades internacionales por ml. Antes de la prueba de neutralización se procedió a la estimación aproximada de la toxicidad de los caldos, basándose en la relación entre el tiempo de muerte de los animales y la concentración de toxina (5). Los caldos con alto título se diluyeron adecuadamente con agua destilada para ajustar la concentración de toxina entre 100 y 1,000 DL<sub>50</sub> por ml. Se transfirieron iguales volúmenes de las diluciones de los sueros y las toxinas a tubos, bien mezclados, y se dejaron a temperatura ambiente durante una hora. Se inoculó de 0.5 a 1.0 ml de la mezcla en cada una de las dos "lauchas" por vía intraperitoneal, observándose a los animales durante tres días. Para cada prueba de neutralización se agregaron dos controles: a) caldo (a la misma concentración que el usado en la prueba de neutralización) diluido en proporción de 1:2 en solución salina, y b) caldo calentado a 100°C durante dos minutos.

### Resultados

En el cuadro 1 figuran los resultados obtenidos del estudio de las 169 muestras examinadas; 55 cultivos de suelos cultivados (42.6%) y 9 cultivos de suelos vírgenes (22.5%) mostraron una toxicidad suficiente para matar a las "lauchas" con síntomas típicos de botulismo dentro de las 30 horas de inoculadas.

En el cuadro 2 figuran, analíticamente, el departamento de donde se tomó la mues-

CUADRO 2—Distribución de *C. botulinum* en suelos de Mendoza, Argentina.

Departamento	Suelo y cultivo	Tipo de toxina
Lavalle	Virgen	F
	Virgen	no identificado <sup>a</sup>
Tupungato	Maíz	A
	Huerta	A
	Viña	B
	Papas	A y B
	Nogales	B
	Nogales	no identificado
	Pimientos	A y B
	Pimientos	A
	Desconocido	A
	Papas y perales	B
	Papas y zanahorias	B
	Viña	B
	Nogales	A y B
	Jardín	no identificado
	Virgen	A y B
Luján	Porotos	A
	Porotos	A
	Ajos	A
	Zanahorias	A
	Ajos	A
	Ajos	A
	Viña	A
	Viña	A
San Rafael	Virgen	A y B
	Virgen	no identificado
	Olivos	A
	Viña	84 <sup>b</sup>
	Viña	A
	Maíz	89 <sup>c</sup>
	Desconocido	no identificado
	Alfalfa	A
	Pimientos y tomates	A
	Tomates	A
	Virgen	A
	Viña	A
	Desconocido	no identificado
Santa Rosa	Desconocido	A
	Olivos	A
	Olivos	A
	Alfalfa	A
	Viña	84 <sup>d</sup>
	Viña	A
	Duraznos	B
	Virgen	84 <sup>d</sup>
	Virgen	F
	Duraznos	84 <sup>d</sup>

CUADRO 1—Incidencia de *C. botulinum* en suelos de Mendoza, Argentina.

Suelos	Examinados	Positivos	% de positivos
Cultivados	129	55	42.6 <sup>a</sup>
Vírgenes	40	9	22.5 <sup>a</sup>
Total	169	64	37.9

<sup>a</sup> La proporción de positivos en suelos cultivados es significativamente mayor que en suelos vírgenes ( $p < 0.028$ ).

<sup>a</sup> Cultivos toxigénicos no tipificados frente a las antitoxinas A y B.

<sup>b</sup> La cepa 84 ha sido descrita como un nuevo tipo de *C. botulinum*.

<sup>c</sup> La cepa 89 ha sido descrita como otro tipo de *C. botulinum*.

<sup>d</sup> La cepa no ha sido aislada, por lo que puede corresponder al tipo cepa 84 o a una mezcla de los tipos A y F.

tra, la clase de suelo y su cultivo principal en el momento de recogerse la muestra o en el año de cosecha precedente, y el tipo de

toxina identificado en 48 de los cultivos toxigénicos, de los cuales 24 (50%) correspondieron al tipo A; seis (12.5%) al tipo B; cinco (10.4%) a mezcla de los tipos A y B; cuatro (8.3%) al tipo cepa 84 (o una mezcla de los tipos A y F para tres muestras, en virtud de haberse aislado la cepa en estado puro sólo en uno de los tres caldos); dos (4.1%) al tipo F; uno (2%) al tipo cepa 89; y seis (12.5%), que no fueron identificados serológicamente, corresponden en su mayoría a las primeras muestras examinadas cuando sólo se disponía de antitoxinas A y B.

Las 16 muestras restantes que no figuran en el cuadro 2 no se tipificaron por el bajo título de toxina encontrado al practicarse la prueba de neutralización. En general, estos cultivos mostraron una baja concentración de toxina en el momento de la prueba preliminar, matando a los animales después de las 10 horas de inoculados. En algunos casos, este tiempo fue menor y permitió practicar la primera prueba de neutralización con mezcla de antitoxinas; pero tres o cuatro días después, al realizarse el segundo ensayo de tipificación con antitoxinas individuales, no se obtuvieron resultados consistentes. Sin embargo, estos 16 cultivos se han considerado como positivos ya que las "lauchas" inoculadas con ellos murieron con síntomas de intoxicación botulínica.

### Discusión

La alta incidencia de *C. botulinum* en los suelos de Mendoza se compara con la registrada en algunas áreas del mundo. Sin embargo, debe señalarse una diferencia con los resultados de K. Meyer (6, 2) sobre la mayor prevalencia de este bacilo en suelos vírgenes: en los suelos de Mendoza, al igual que los resultados obtenidos en los suelos del estado de Nueva York (7), la mayor incidencia de *C. botulinum* se observó en los suelos cultivados.

La metodología clásica para esta clase de estudios, como la seguida en el presente

trabajo, sólo brinda una buena indicación de la verdadera prevalencia de *C. botulinum* en suelos, pero es muy probable que un alto porcentaje de muestras positivas no sean evidenciadas. El principal inconveniente de este método lo constituye la muerte rápida (entre cinco y 30 minutos) de las "lauchas" inoculadas con caldos con desarrollo bacteriano, debida probablemente a la presencia de productos tóxicos por la degradación de las proteínas del medio (8), y cuyos síntomas han sido bien descritos por Haines (9). Por esta razón, es necesaria la inoculación de dos "lauchas" con distintas cantidades de caldo, según se explicó al comienzo, ya que, en algunos casos la toxina botulínica se puso en evidencia al inocular baja cantidad de caldo (0.1 a 0.2 ml), pues la inoculación de rutina, de 0.5 ml a 1 ml, mataba prematuramente a los animales por la presencia simultánea de estas "aminas" tóxicas en el medio de cultivo.

La incorporación de otras técnicas más sensibles que la inoculación intraperitoneal en "laucha," como son la inmunodifusión, la hemaglutinación y, probablemente, la de anticuerpos fluorescentes, seguramente aumentaría el porcentaje de muestras positivas.

En un reducido experimento, en que se sometieron 10 muestras consideradas negativas por la presencia de "aminas" tóxicas a la prueba de inmunodifusión, en cuatro de ellas se obtuvieron resultados positivos frente a sueros antitóxicos A y B.

Un hecho llamativo es el hallazgo de cinco tipos serológicos dentro de un área relativamente circunscrita pero con un mismo sistema ecológico; los tipos A y B son cosmopolitas; el tipo F, aislado en Dinamarca, se ha encontrado en la naturaleza sólo en los Estados Unidos y en la Argentina (10), y en este trabajo figuran los primeros dos hallazgos de este tipo serológico en tierras vírgenes de área desértica; las cepas 84 y 89 corresponden a dos nuevos tipos de *C. botulinum* recientemente descritos (11,

12) encontrados en muestras de suelos de Mendoza.

### Resumen

Se ha realizado un estudio sobre la prevalencia de *Clostridium botulinum* en suelos de la provincia de Mendoza, Argentina. Del total de las 169 muestras examinadas, 64 (37.9%) produjeron cultivos tóxicos, identificándose toxina botulínica por la prueba de la inoculación en ratón "laucha" blanco. Los especímenes se obtuvieron de suelos vírgenes y cultivados; el mayor porcentaje de cultivos tóxicos correspondió a los suelos cultivados, con 55 positivos de 129 examinados (41.9%), frente a nueve positivos de 40 examinados (22.5%) correspondientes a los suelos vírgenes.

Las pruebas de neutralización sólo se practicaron en 48 muestras; de estas, 24 (50%) se identificaron como pertenecientes al tipo A; seis (12.5%) al tipo B; cinco

(10.4%) a una mezcla de tipos A y B; cuatro (8.3%) al tipo cepa 84 o a una mezcla de los tipos A y F, para tres de ellas en que no se practicó el aislamiento correspondiente; dos (4.1%) al tipo F; una (2.0%) al tipo cepa 89; y seis (12.5%), que no se tipificaron frente a los sueros A y B, corresponden en su mayoría a las primeras muestras examinadas cuando sólo se disponía de aquellas dos antitoxinas. Las 16 muestras restantes no se identificaron serológicamente porque su baja concentración de toxinas no permitió practicar la prueba de neutralización.

Finalmente, es interesante notar el hallazgo de cinco tipos serológicos diferentes de toxina de *C. botulinum* en un área relativamente restringida pero con un mismo sistema ecológico. □

### Agradecimiento

Se agradece la eficiente asistencia técnica del Sr. Esteban Kemeñy.

### REFERENCIAS

- (1) Burke G. S. "The occurrence of *Bacillus botulinus* in nature". *J Bacteriol* 4:541-553, 1919.
- (2) Meyer K. F. "The status of botulism as a world health problem". *Bull WHO* 15: 281-298, 1956.
- (3) Miyara S. "El botulismo en la provincia de Mendoza". *Novena reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional*, págs. 776-812, 1935.
- (4) Henderson D. A. "Epidemic of botulism". Informe técnico del Centro Nacional de Enfermedades Transmisibles del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, 10 páginas, 1957.
- (5) Schantz E. J. "Purification and characterization of *C. botulinum* toxins". En *Botulism, Proceedings of a symposium*. Compilado por K. H. Lewis y K. Cassel, Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, págs. 91-104, 1964.
- (6) Meyer K. F. y Dubovsky B. J. "The distribution of the spores of *B. botulinus* in the United States". IV. *J. Infect Dis* 31: 559-594, 1922.
- (7) Parry, E. W. "Prevalence of *Clostridium botulinum* in soils of central New York State". *Food Research* 11:203-209, 1946.
- (8) Dubovsy, B. J. y Meyer K. F. "An experimental study of the methods available for the enrichment, demonstration and isolation of *B. botulinus* in specimens of soil and its products, in suspected food, in clinical and in necropsy material". *J Infect Dis* 31:501-540, 1922.
- (9) Haines R. B. "The occurrence of toxigenic anaerobes, especially *Clostridium botulinum*, in some English soils". *J Hyg (Londres)* 42:323-327, 1942.
- (10) Giménez D. F. y Ciccarelli A.S. "*Clostridium botulinum* type F in the soil of Argentina". *Appl Microbiol* 16(5):732-734, 1968.
- (11) Giménez, D. F. y Ciccarelli A. S. "Studies on strain 84 of *Clostridium botulinum*". *Zentr Bakteriell Parasitenk* (en prensa). Fascículo 2, Vol. 215.
- (12) Giménez D. F. y Ciccarelli A. S. "Another type of *Clostridium botulinum*". *Zentr Bakteriell Parasitenk* (en prensa). Fascículo 2, Vol. 215.

### Distribution of *Clostridium botulinum* in Mendoza, Argentina (Summary)

The distribution of *Clostridium botulinum* in the Province of Mendoza, Argentina, has been studied in 169 samples of soil. Sixty four, or 37.9 percent, of the total samples collected yielded toxic cultures identified as *C. botulinum* toxin in the mouse inoculation test. The soil specimens were obtained from cultivated and virgin areas; the greatest percentage of toxic cultures belonged to the cultivated soils with 55 positive of 129 examined, or 41.9 percent; from the virgin soils, 9 samples of 40, or 22.5 percent, were positive.

The tests of neutralization were carried out in only 48 samples; of these, 24 (50%) were

identified as type A; 6 (12.5%) type B; 5 (10.4%) a mixture of types A and B; 4 (8.3%) type strain 84 (or a mixture of type A and F for three of them); 2 (4.1%) type F; 1 (2.0%) type strain 89; and 6 (12.5%) not typed with A and B antitoxins. The remaining 16 samples did not contain an adequate concentration of toxin for running the neutralization tests.

Finally, it is interesting to note the finding of five different serologic toxins of *C. botulinum* in a relatively restricted area but within the same ecologic system.

### Distribuição de *Clostridium botulinum* em Mendoza, Argentina (Resumo)

Foi realizado um estudo sobre a prevalência de *Clostridium botulinum* em solos da província de Mendoza, Argentina. Do total das 169 amostras examinadas, 64 (37,9%) produziram culturas tóxicas, havendo-se identificado toxina botulínica mediante a prova de inoculação em rato branco. Os espécimes foram obtidos de solos virgens e cultivados. A maior percentagem de culturas tóxicas correspondeu aos solos cultivados, com 55 positivos de 129 examinados (41,9%) em contraposição a 9 positivos de 40 examinados (22,5%) correspondentes a solos virgens.

As provas de neutralização somente foram feitas em 48 amostras. Destas, 24 (50,0%) foram identificadas como pertencentes ao tipo A; seis (12,5%) ao tipo B; cinco (10,4%) a uma mistura de tipos A e B; quatro (8,3%) ao tipo

cepa 84 ou a uma mistura dos tipos A e F, no tocante a três delas em que não se realizou o isolamento respectivo; dois (4,1%) ao tipo F; uma (2,0%) ao tipo cepa 89; e seis (12,5%), que não foram tipificadas ante os soros A e B, correspondem em sua maioria às primeiras amostras examinadas quando apenas se dispunha daquelas duas antitoxinas. As 16 amostras restantes não foram identificadas sorologicamente porque sua baixa concentração de toxinas não permitiu realizar a prova de neutralização.

Finalmente, é interessante notar a descoberta de cinco tipos sorológicos diferentes de toxina de *C. botulinum* numa área relativamente restrita mas com um mesmo sistema ecológico.

### Répartition du *Clostridium botulinum* à Mendoza, Argentine (Résumé)

Une étude a été réalisée sur la prévalence du *Clostridium botulinum* dans les sols de la province de Mendoza (Argentine). Sur un total de 169 échantillons examinés, 64 (37,9%) ont produit des cultures toxiques en identifiant la toxine botulique par l'épreuve d'inoculation à la souris blanche. Les spécimens ont été prélevés dans des sols vierges et cultivés; la majeure partie des cultures toxiques provenait de sols cultivés, à savoir 55 spécimens positifs sur 129 examinés (41,9%) contre 9 positifs sur 40 examinés (22,5%) provenant de sols vierges.

Les épreuves de neutralisation n'ont été pratiquées que sur 48 échantillons; sur ces derniers, 24 (50%) ont été identifiés comme appartenant au type A; six (12,5%) au type B; cinq (10,4%) à un mélange de types A et B;

quatre (8,3%) au type souche 84 ou à un mélange de types A et F pour trois de ceux où il n'a pas été procédé à l'isolement correspondant; deux (4,1%) au type F; une (2%) au type souche 89 et six (12,5%) qui n'ont pas été identifiés en présence des sérums A et B, correspondent en majeure partie aux premiers échantillons examinés lorsqu'on ne disposait que de ces deux antitoxines. Les 16 échantillons restants n'ont pas été identifiés du point de vue sérologique, étant donné que leur faible concentration de toxines n'a pas permis d'effectuer l'épreuve de neutralisation.

Enfin, il est intéressant de signaler la découverte de cinq types sérologiques différents de toxine de *Clostridium botulinum* dans une zone relativement limitée mais ayant le même régime écologique.