

CLOSTRIDIUM BOTULINUM EN SUELOS DEL ESTADO MÉRIDA, VENEZUELA

Beatriz NIEVES *
Roberto GABALDÓN P. **

RIAL-A/426

NIEVES, B. & GABALDÓN P., R. — *Clostridium botulinum* en suelos del Estado Mérida, Venezuela, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 131-137, 1975/76.

RESÚMEN: Se estudiaron 100 especímenes de suelo, preferentemente de zonas próximas a las márgenes del Río Chama, incluyendo regiones de diversas características climáticas y suelos de diferente naturaleza.

Clostridium botulinum tipo A fué demostrado en tres especímenes de El Vigía y tipo D en dos especímenes de las zonas vecinas a Ejido y Estánquez respectivamente.

El hecho de que el botulismo humano ó animal no ha sido descrito en el país puede atribuirse a fallas de diagnóstico y se sugiere su investigación en enfermedades con síntomas compatibles con él.

DESCRIPTORES: *Clostridium botulinum* (Mérida, Venezuela).

INTRODUCCION

El botulismo puede definirse como "enfermedad neuro-paralítica, siempre grave, que afecta al hombre y animales en varias regiones del mundo y generalmente resultante de la ingestión de alimentos que contienen metabolitos tóxicos de uno o varios tipos conocidos de *Clostridium botulinum*, cuyo habitat natural es el suelo de ciertas regiones geográficas"².

A esta definición, consignada por Dolman

en 1.964, deben agregarse los conceptos más recientes acerca de la posibilidad de contraer la enfermedad, por contaminación de heridas con esta especie bacteriana. Se han descrito diez casos de este tipo en la literatura mundial hasta 1.973 y cinco casos adicionales entre marzo y septiembre de 1.974, todos ellos ocurridos en EE.UU. por heridas traumáticas¹⁰.

La revisión bibliográfica nacional no revela ningún informe sobre casos de botulismo ocurridos en el país, ni sobre inves-

* Del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de l'Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

** Del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de l'Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

tigación de esporas de *Clostridium botulinum* en sus suelos. La única referencia encontrada sobre presencia de esporas de esta especie, en zonas vecinas a nuestro país, se relaciona con la demostración de *C. botulinum* en sedimentos marinos y animales acuáticos en el Golfo de Venezuela y en el Golfo de Darién, investigada por Carrol y col.¹, posiblemente con la finalidad de determinar la calidad sanitaria de productos derivados de la pesca en sus aguas, ya que la investigación fué auspiciada por el Bureau of Commercial Fisheries (Pascagoula, Miss.)

MATERIAL Y MÉTODOS

Cien especímenes de suelos fueron coleccionados entre Octubre de 1.973 y Mayo de 1.975, tomadas en distintas zonas del Estado Mérida, en regiones áridas, fértiles, arenosas, boscosas y pastizales, preferentemente en las márgenes del Río Chama y a diferentes altitudes de su curso.

Aproximadamente 10 g de espécimen de suelo, fueron suspendidos en 25 ml de gelatina-fosfato. 1 ml de esta suspensión fué inoculado en cada uno de tres tubos conteniendo caldo-carne picada adicionado de 0,3% de dextrosa y 0,2% de almidón, previamente reducido y enfriado. Un tubo fué calentado a 75°C, por 15 minutos, un segundo tubo a 80°C, por 10 minutos y el tercer tubo no recibió tratamiento alguno. Los tubos de caldo-carne-dextrosa-almidón, así inoculados y tratados, fueron incubados en anaerobiosis por cinco días a 30°C.

1. Clarificación

a) La porción líquida de los cultivos, así obtenidos, fué transferida a tubos plásticos de centrifuga.

b) Se centrifugó a 12.350 x g durante 10 minutos a 4°C.

c) El sobrenadante fue vertido en tubos de 15 x 125 mm.

2. Tripsinización

Se mezclaron 4,5 ml del sobrenadante con 0,5 ml de una solución de tripsina al 1%, se incubó a 37°C, por 45 minutos.

3. Inoculación al ratón

a) Se prepararon las distintas mezclas de sobrenadante-antitoxina como se muestra en la tabla 1, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos.

b) Se inyectaron dos ratones de 15 a 20 g de peso, por vía intraperitoneal, con cada mezcla (0,5 ml por ratón). Se observaron los ratones por un período de cuatro días. La muerte de los ratones por botulismo ocurre generalmente entre 6-24 horas, ocasionalmente puede ser tardía. Los síntomas de botulismo en los ratones a menudo aparecen cuatro horas después de la inoculación e incluye erizamiento de la piel, respiración abdominal laboriosa y parálisis de los miembros.

c) Si la toxina botulínica está presente en los cultivos en suficiente cantidad para ser detectada en estas condiciones, las mezclas no calentadas matarán a los ratones, excepto aquellos que reciben la antitoxina específica. Los ratones inoculados con el sobrenadante calentado a 100°C, sobrevivirán.

Aislamiento

Para obtener cultivos puros de *C. botulinum*, se sub-cultivó de caldo-carne-dextrosa-almidón, en placas de agar yema de huevo modificado por McClung-Toabe⁶, incubando anaeróticamente a 37°C, por 48 horas.

La incubación en anaerobiosis se realizó en jarras de Brewer, con catalizador en caliente y reemplazo del aire por una mezcla de 10% de H₂, 80% de N₂ y 10% de CO₂, utilizando un indicador de anaerobiosis constituido por trazas de azul de metileno en solución de glucosa.

Se seleccionaron las colonias sospechosas, lipasa positiva, cultivando cinco de ellas en caldo-carne-dextrosa-almidón e in-

cubando a 30°C, para máxima producción de toxina. La identificación de los cultivos puros fué establecida por pruebas bioquímicas³, y el tipo de toxina botulínica fué determinado por neutralización de la toxina descrita anteriormente*.

TABLA 1

Neutralización de las toxinas de C. Botulinum

Tubo N.º	Sobrenadante	Antitoxina	Tratamiento
1	1 ml	—	100°C, 10 min.
2	1 ml	—	Temp. amb. 30 min.
3	0,8 ml	0,2 ml anti A	Temp. amb. 30 min.
4	0,8 ml	0,2 ml anti B	Temp. amb. 30 min.
5	0,8 ml	0,2 ml anti C	Temp. amb. 30 min.
6	0,8 ml	0,2 ml anti D	Temp. amb. 30 min.
7	0,8 ml	0,2 ml anti E	Temp. amb. 30 min.

RESULTADOS

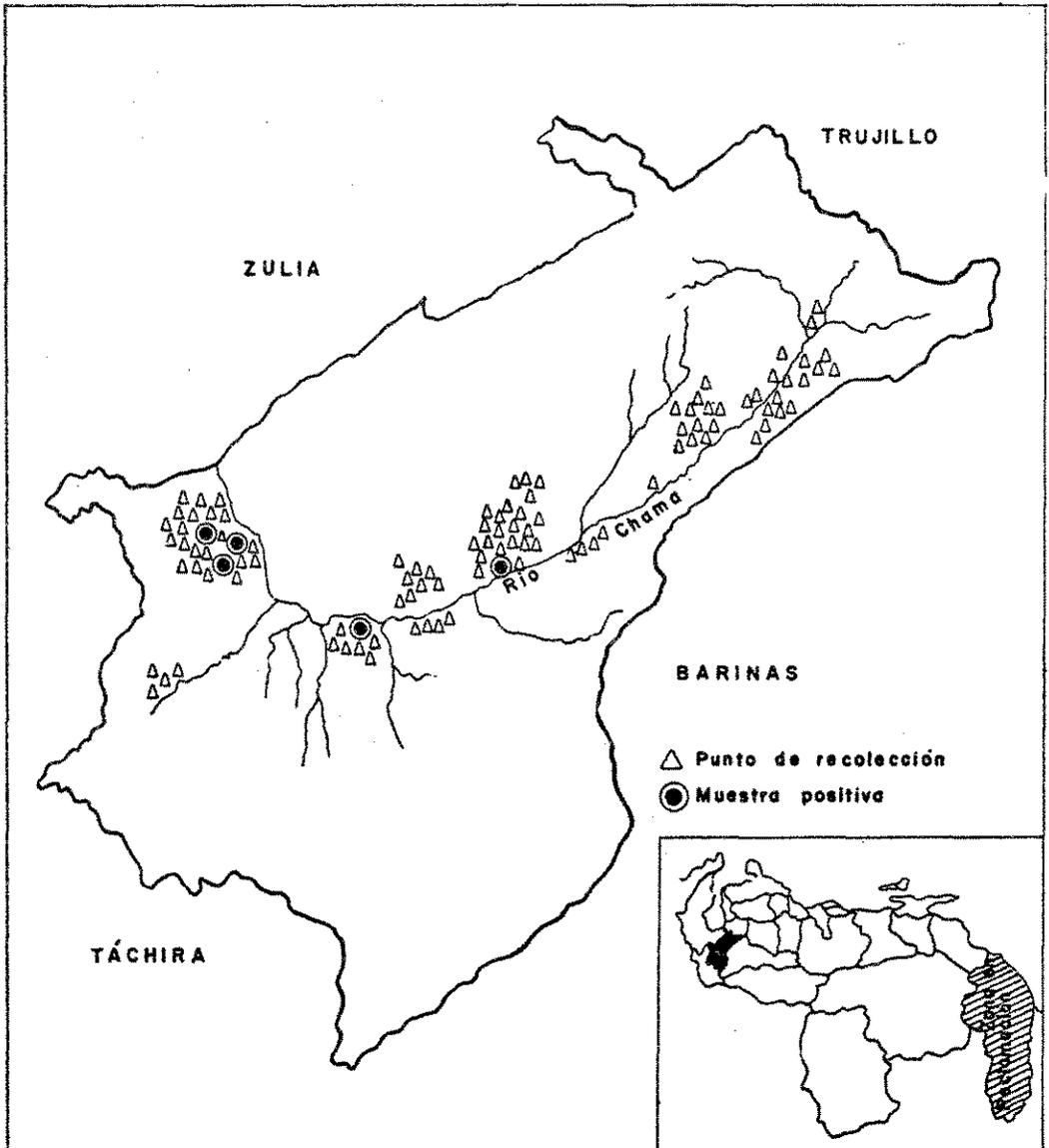
Con el propósito de determinar la distribución de *C. botulinum* en suelos del Estado Mérida, se investigó un total de cien especímenes de tierra, coleccionados en diversos puntos del Estado, principalmente en la cuenca del Río Chama que atraviesa el Estado Mérida de Norte a Sur, por los Distritos Rangel, Libertador, Campo Elías, Sucre, Tovar y Rivas Dávila.

La presencia de *C. botulinum* en los 100 especímenes de diferentes tipos, de suelos del Estado Mérida, se resumen en la tabla 2 y la ubicación de los sitios de colección, en la figura (pág. 127).

En la muestra estudiada, el 5% de los especímenes fueron tóxicos en los cultivos iniciales en caldo-carne-dextrosa-almidón. La prueba de neutralización de la toxina con antisueros monovalentes tipo A, B, C, D y E, reveló *C. botulinum* tipo D en dos casos y *C. botulinum* tipo A en tres casos (tabla 3).

Sin tomar en cuenta la toxicidad de los cultivos iniciales, se intentó el aislamiento de *C. botulinum* a partir de los mismos, en medio de agar yema de huevo modificado por Mc Clung y Toabe⁶, obteniéndose colonias lipasa positiva y lecitinasas negativa, pero sin clara evidencia de toxicidad.

* Las antitoxinas tipo específicas A y B utilizadas fueron obtenidas de Wellcome Burroughs (Londres) y los tipos C, D, y E, gentilmente cedidas por el Anaerobic Laboratory, C.D.C., Atlanta, U.S.A.



DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA MUESTRA DE SUELO

TABLA 2

Ocurrencia de *C. botulinum* en suelos del Estado Mérida
(Octubre de 1973 - Mayo de 1975)

Zona Alturas (Mt. S. N. M.)	N.º de Especímenes	N.º de Especímenes conteniendo <i>C. botulinum</i>	Tipo de <i>C. botulinum</i>
Alto Chama (1.800-4.000)	31	0	—
Chama Medio (1.800-800)	24	1	A
Bajo Chama (800-0)	45	4	A y D
Totales	100	5	

TABLA 3

Letalidad de los neutralizados de toxinas botulínicas

Muestra N.º	Ratón N.º	Efecto en el ratón recibiendo 0,4 ml del centrifugado más 0,1 ml de antisuero tipo:					Control	N.º Protegidos
		A	B	C	D	E		
67	1	M	M	M	S	M	S	M
	2	M	M	M	S	M	S	M
78	1	M	M	M	S	M	S	M
	2	M	M	M	S	M	S	M
87	1	S	M	M	M	M	S	M
	2	S	M	M	M	M	S	M
89	1	S	M	M	M	M	S	M
	2	S	M	M	M	M	S	M
96	1	S	M	M	M	M	S	M
	2	S	M	M	M	M	S	M

M = Muertes
S = Sobrevivientes

D I S C U S I Ó N

La ocurrencia de *C. botulinum* en la muestra estudiada, en un 5%, nos revela la relativa poca frecuencia de este germen en los suelos investigados. Los cinco especímenes positivos para *C. botulinum* fueron coleccionados en la zona sur del Estado: Ejido, Estánquez y el Vigía. *C. botulinum* tipo A fué detectado en tres muestras y *C. botulinum* tipo D en dos muestras.

En los países donde se ha observado, el botulismo se presenta en brotes de pequeña escala y muy raramente en la población humana, a diferencia de los animales en los que produce brotes en gran escala por la ingestión de alimentos contaminados, por animals particularmente susceptibles a ciertos tipos antigénicos de la toxina (tipos C y D en aves y bovinos respectivamente). Tal situación es explicable por los procedimientos utilizados en la alimentación regulada del ganado y por las costumbres migratorias de aves salvajes, que los llevan a consumir masivamente un tipo de alimento que puede estar contaminado.

Globalmente se ha establecido que entre el 1% y el 25% de los suelos contienen esporas de *C. botulinum* (EE.UU., Australia, Hawai, China, Suecia, Inglaterra, Alemania)¹⁰. En Norte América el tipo A predomina al oeste de las Montañas Rocosas y el tipo B en el valle del Rio Mississippi y región de los grandes Lagos⁹. En 1967, Kravchenko encontró *C. botulinum*⁵, en el 10,5% de los suelos de la Unión Soviética, con predominio del tipo E en el 62% de las muestras positivas, observando a la vez mayor porcentaje de muestras positivas en el sur del país. El mismo autor afirma que no halló relación entre la positividad de los suelos y la mayor densidad de población, de suelos cultivados o dedicados al pastoreo, en cambio, se observó alguna influencia por parte de la presencia de aluvión o arena. El predominio del tipo E en ambientes acuáticos parece circunscribirse a latitudes septentrionales, ya que según

los trabajos de Carroll y Ward en el Golfo de Méjico¹², Golfo de Darién y Golfo de Venezuela¹, aunque revelan la presencia de los tipos A, C y E, observan predominio de los dos primeros.

En Europa, por muchos años, ha aparecido el tipo B como predominante⁹, pero recientes investigaciones indican que el tipo E es más común en el norte del continente, particularmente Suecia y Dinamarca⁹; los tipos C y D, aunque están presentes, son relativamente raros. El tipo B ha sido aislado en suelos de Hawai, China y Japón, siendo el tipo E el más común en este último país⁴.

Muestras de sedimentos del Estado de Ceará, Brasil, y muestras de peces capturados en las costas de Nicaragua y Honduras, revelaron resultados similares a los de los Golfos de Venezuela y Darién¹¹.

De la muestra de suelo investigada en el presente trabajo se logró aislar colonias lipasa positiva en un 55%, de los especímenes que aparentemente corresponden, por las pruebas bioquímicas, a *C. sporogenes*, microorganismo estrechamente relacionado con *C. botulinum* y del cual solo se diferencia por su falta de toxicidad. En este aspecto, nos enfrentamos al problema ya planteado por otros autores^{6,7} en cuanto a la dificultad de aislar *C. botulinum* en cultivo puro, de materiales altamente contaminados. En este sentido debe advertirse también la posibilidad de interferencia que sobre la producción de toxina botulínica y sobre el crecimiento de *C. botulinum* pudiera ejercer la presencia de otra flora asociada (*C. perfringens*, *C. sporogenes* y *B. cereus*), como lo ha demostrado recientemente Smith⁸.

La ausencia de informes sobre casos de botulismo en el país es atribuida a carencia de su investigación sistemática como procedimiento de diagnóstico en cuadros con síntomas y signos compatibles, por lo que se sugiere su investigación en casos que lo ameriten.

RIAL-A/426

NIEVES, B. GABALDÓN P., R. — *Clostridium botulinum* in soils of Mérida state, Venezuela. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 131-137, 1975/76.

SUMMARY: One hundred soil samples from regions along Chama River were studied. The samples were taken from places presenting different weather conditions and several types of soil.

Type A *Clostridium botulinum* was found in three samples from El Vigía and type B was found in two samples from the neighborhood of Ejido and Estánquez.

The fact that both human and animal botulism were never reported in the country can be laid to diagnostic failures and its investigation in diseases with compatible symptomatology is suggested.

DESCRIPTORS: *Clostridium botulinum* (Mérida, Venezuela).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARROL, B.J.; GARRET, E.S.; REESE, G.B. & WARD, B.Q. — Presence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Venezuela and the Gulf of Darién. *Appl. Microbiol.*, 14: 837-8, 1966.
2. DOLMAN, C.E. — Botulism as a world problem. Botulism 1964 Proceedings of a Symposium. ed Lewis & Cassel. Cincinnati. Public Health Service n.º 999-FP, 1964.
3. DOWELL, V.R. & HAWKINS, T.M. — Laboratory methods in anaerobic-bacteriology. Atlanta, C.D.C., 1974. DHEW Publication n.º 74-8272.
4. KANZAWA, K.O.; TELJI, O.; KARASHIMADA, T. & IIDA, H. — Distribution of *Clostridium botulinum* type E in Hokkaido, Japan. Proceedings of the First U.S. Japan Conference on Toxic Microorganisms. p. 299-308, 1970.
5. KRAVCHENKO, A.T. & SHUSLINA, L.M. — Distribution of *Clostridium botulinum* in the soil and water of U.R.R.S. Botulism 1966. Proceedings of the Fifth International Symposium of Food Microbiology. Ed. Ingram & Roberts. London. 1967.
6. McCLUNG, L.S. — A review of enrichment and isolation methods of *Clostridium botulinum*. Botulism 1966. Proceedings of the Fifth International Symposium of Food Microbiology. Ed. Ingram & Roberts. London, 1967.
7. SLOCUM, G.C. — Problems of isolation and identification of *Clostridium botulinum*. Botulism 1964. Proceedings of a Symposium. Ed. Lewis & Cassel. Cincinnati. Public Health Service n.º 999-FP-1, 1964.
8. SMITH, L.D.S. — Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. *Appl. Microbiol.*, 30: 319-23, 1975.
9. SMITH, L.D.S. & HOLDEMAN, L.V. — *The pathogenic anaerobic bacteria*. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, 1968.
10. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE — Botulism in U.S.A. 1899-1973. Atlanta, C.D.C., 1974.
11. WARD, B.Q. — Botulism along the eastern coast of America, south of Staten Island, N.Y. — Proceedings of the first U.S. Japan Conference on Toxic Microorganisms. p. 292-8, 1970.
12. WARD, B.Q. & CARROLL, B.J. — Presence of *Clostridium botulinum* type E in estuarine waters of the Gulf of Mexico. *Appl. Microbiol.*, 13: 502, 1965.

Recebido para publicação em 25 de novembro de 1975.

