

COMUNICACIONES

Primer aislamiento de *Clostridium botulinum* en Costa Rica

María del Mar Gamboa, Evelyn Rodríguez y Bernal Fernández
Laboratorio de Anaerobios, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(Rec. 12-V-1992. Acep. 30-XI-1992)

Abstract: Among 60 isolates from Costa Rican soils, one shared biochemical and chromatographic correspondence with *C. botulinum* A,B,F group (proteolytic) and produced a toxin which could be identified as belonging to the A type when mouse neutralization tests were carried out employing both polyvalent and type specific antisera.

Key words: *Clostridium botulinum*, soil microorganisms, toxin, Costa Rica.

Clostridium botulinum fue aislado por primera vez en 1896 por Emile van Ermengem. A partir de entonces, se ha aislado de sedimentos marinos, de suelos y del contenido intestinal de pájaros y mamíferos en todos los continentes (Smith 1977).

C. botulinum es un conglomerado de microorganismos con características de cultivo diferentes, que producen neurotoxinas de acción farmacológica idéntica, divididas serológicamente en 7 tipos: A, B, C, D, E, F y G. Los tipos más importantes como agentes de botulismo en el hombre son los A, B y E (Smith y Williams 1984).

Se ha informado de su presencia en Centroamérica únicamente en aguas costeras de Nicaragua y Honduras (Ward 1967). En Costa Rica, aunque se han presentado casos sospechosos de botulismo, este es el primer informe del aislamiento de *C. botulinum*, ello como parte de un estudio ecológico de clostridios en suelos.

Se recolectaron 60 muestras de suelo del Valle Central y de la Región del Pacífico Seco, las que se desecaron en estufa a 30° C durante 4 a 6 semanas. Posteriormente fueron molidas y pasadas por un tamiz de 0.5 mm. De cada muestra se tomó una porción de 10 g que se mezcló con 30 ml de agua destilada estéril a

60° C, la cual se agitó y se dejó a esa temperatura durante 10 minutos. Transcurrido ese plazo, la muestra se enfrió rápidamente al añadirle 15 ml de agua destilada estéril y 45 ml de alcohol etílico de 95%, ambos a temperatura ambiente. La concentración final del alcohol fue de 47.5% y la temperatura se mantuvo a 37° C por 30 minutos. Seguidamente se inocularon 10 tubos de medio Carne Picada Levadura (CMY), prerreducido (Holdeman *et al.* 1977), que se incubaron a 30° C por 7 días.

A partir de los tubos de CMY que presentaron crecimiento, se procedió a inocular tubos arrollados con medio Agar Infusión Cerebro Glucosa Levadura, prerreducido (Holdeman *et al.* 1977), los que se incubaron a 35° C a fin de obtener los diferentes morfotipos coloniales. Las pruebas bioquímicas y cromatográficas se hicieron de acuerdo con las recomendaciones del Laboratorio de Anaerobios del Instituto Politécnico de Virginia, E.U.A. (Holdeman *et al.* 1977). Para la identificación de los aislamientos se utilizó un programa de computación diseñado para el género *Clostridium* (Rodríguez 1992).

Se aisló una cepa de *C. botulinum* grupo A, B, F (proteolítico) a partir de una muestra de tierra procedente de La Palma, Guanacaste (85° 04'W y 10° 15'N), cuyo valor de pH fue

de 6.25 y el de materia orgánica de 3.27%, determinados según los métodos de Schweizer *et al.* y Walkey y Black modificado, respectivamente (Schweizer *et al.* 1980). Se demostró, en ratones, la capacidad toxigénica de la cepa y se neutralizó el sobrenadante de cultivo con anti-suero polivalente y específico contra la toxina tipo A, de acuerdo con las recomendaciones del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (Dowell y Hawkins 1981). No hubo marcadas diferencias en el perfil bioquímico y cromatográfico de la cepa costarricense y *C. botulinum* A,B,F (proteolítico) (Holdeman *et al.* 1977).

C. botulinum tipo A se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y junto con el tipo B, parecen ser los más comunes en suelos (Smith y Williams 1984). La baja frecuencia con que logramos aislar dicha cepa en las muestras analizadas se podría explicar por haber empleado un método de aislamiento selectivo para los diversos clostridios y no uno específico para *C. botulinum*, ya que se sabe que la susceptibilidad de sus esporas al calor y al alcohol puede variar según los diferentes tipos de la especie (Ward *et al.* 1967, Smith 1977). Por otra parte, podría ser que la frecuencia real de *C. botulinum* sea baja. Para tratar de resolver esta disyuntiva, estamos realizando un estudio empleando una metodología sensible y específica para *C. botulinum*.

En Taiwan (Tsai y Ting 1977) y en Gran Bretaña (Smith y Moryson 1975) se ha informado del aislamiento de *C. botulinum* de suelos sin que se presenten casos de botulismo, como está ocurriendo en Costa Rica. Sin embargo, la presencia de esta especie en suelos costarricenses debe alertar al personal médico y paramédico, así como también al de la industria de alimentos, en cuanto al riesgo potencial que implica su presencia.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Charles L. Hatheway, del Center for Disease Control, Atlanta, su gentileza al enviarnos los antisuecos necesarios. A William Castillo y a Pablo Vargas por su ayuda técnica y a la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica (Proyecto #430-088-038), por el financiamiento.

REFERENCIAS

- Dowell, V.R. Jr. & T.M. Hawkins. 1981. Laboratory methods in anaerobic bacteriology, C.D.C. Laboratory manual. Dep. of Health and Human Services, H.H.S. publication C.D.C. 81-8272. Center for Disease Control, Atlanta. 96 p.
- Holdeman, L.V., E.P. Cato & W.E.C. Moore (eds.). 1977. Anaerobe laboratory manual. 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 152 p.
- Rodríguez, E. 1992. Clostridios mesófilos en tierras de la Meseta Central de Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, San José.
- Schweizer, S., H. Coward & A. Vásquez. 1980. Metodología para análisis de suelos, plantas y aguas. Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José, Costa Rica.
- Smith, L.D.S. 1977. Botulism: The organism, its toxins, the disease. C. C. Thomas, Springfield, Illinois. 236 p.
- Smith, G.R. & C.J. Moryson. 1975. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. J. Hyg. Camb. 75:371-379.
- Smith, L.D.S. & B.L. Williams. 1984. The pathogenic anaerobic bacteria. 3rd ed. C. C. Thomas, Springfield, Illinois. 331 p.
- Tsai, C. & S. Ting. 1977. Ecological studies of *Clostridium botulinum* in soils of Taiwan. J. Formos. Med. Assoc. 76:563-570.
- Ward, B.Q., E.S. Garrett & G.B. Reese. 1967. Further indication of *Clostridium botulinum* in Latin American Waters. Appl. Microbiol. 15:1509.