

T. 433

LUQUEZ, C
Clostridios Producto

2006 62161

62161



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Tesis de Doctorado

*“Clostridios productores de toxina botulínica:
distribución en suelos y caracterización fenotípica”*

Tesista Microbióloga Carolina Lúquez

Director Dr. Rafael A. Fernández
Área Microbiología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias
Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

Co-Directora Dra. Cristina I. Bogni
Área Genética Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología,
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad
Nacional de Río Cuarto.

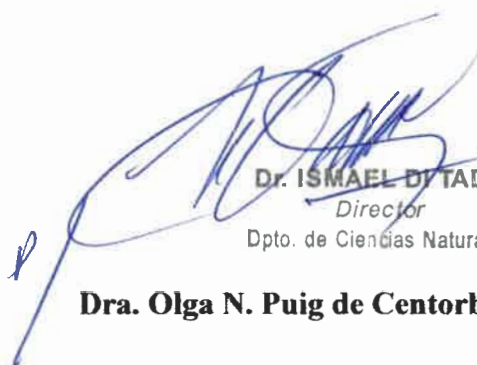
2006

62161

MEN:
Classif:

El presente trabajo fue realizado en el Área Microbiología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Aprobada por el Jurado



Dr. ISMAEL DITADA
Director
Dpto. de Ciencias Naturales

Dra. Olga N. Puig de Centorbi



Dra. Claudia G. Raspanti



Dra. Liliana M. Odierno

2006

A mi esposo, Diego
y mis hijos, Matías y Luna

La gratitud es la memoria del corazón...

El presente trabajo se realizó en el Área Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo y formó parte de proyectos de investigación subsidiados por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la misma universidad. Además, durante cinco años recibí una beca de CONICET, gracias a la cual pude dedicarme exclusivamente a mi doctorado. A mi querida Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto le debo mi formación de grado y postgrado.

Este ha sido un paso muy importante en mi vida. Más allá de la satisfacción de obtener un título, lo esencial fue el camino recorrido, el aprendizaje en todo sentido, el crecimiento profesional y personal. Además, durante el curso de este trabajo conocí a muchas personas, a quienes les debo mi agradecimiento:

Al Dr. Rafael Fernández, mi director de tesis, porque siempre confió en mí, me alentó, acompañó y guió en todo este largo camino.

A la Dra. Cristina Bogni, mi co-directora, por su ayuda incondicional, a pesar de las distancias. Su buena onda y predisposición fueron muy importantes para poder concretar este trabajo.

A los miembros del jurado, Dra. Olga Puig de Centorbi, Dra. Lilita Odierno y Dra. Cristina Raspanti, por sus valiosos aportes que contribuyeron con el enriquecimiento de este trabajo.

A María Delia, por ser mi amiga incondicional, compañera y mentora, por escucharme, alentarme y confiar en mí. Porque nunca dejó de apoyarme y me enseñó a no bajar la cabeza.

A Isabel, por estar siempre a mi lado, por compartir tantas horas de trabajo, proyectos, errores y aciertos... y porque siempre empujamos las dos para el mismo lado!!

A María del Carmen, Pichi, Betina y Cecilia, por hacer más ameno el trabajo, por aceptarme y compartir tantos buenos momentos.

A Cristian, mi "amigo-becario-colega" porque supo poner un poco de aire fresco en estos últimos arduos meses.

A Isí, porque me ayudó a dar los primeros pasos en el laboratorio y me enseñó a trabajar con entusiasmo y responsabilidad.

A Mariel y su equipo, por su colaboración desinteresada y buena predisposición.

A Pablo, porque con sus plaquitas de TLC me ayudó a ver las cosas de otro modo.

A Stella y Susana, por ayudarme con las pruebas bioquímicas... y hacer que ese "tedioso" trabajo fuera mucho más liviano y agradable!!

A todos los integrantes del laboratorio del Área Microbiología quienes, en mayor o menor medida, colaboraron con la realización de este trabajo.

Ser mujer, esposa, mamá e investigadora a la vez no es una tarea fácil... mucho menos si se pretende, además, ser una buena mujer, buena esposa, buena mamá y buena investigadora... Y no sé si lo estoy logrando, pero Dios es testigo de cuánto lo intento día a día!!! Pero mi esfuerzo no serviría de nada si no fuera por "los de siempre", los que, sin comprender muy bien de qué se trata todo esto del botulismo, me dan su apoyo incondicional:

A mi esposo y mis hijos, porque sin ellos este trabajo no tendría sentido. Porque supieron compartir esta esposa-mamá con el laboratorio, la compu, los clostridios, los cursos, los viajes, etc., etc., etc. Porque son, en mi vida, motor y combustible a la vez.

A mamá y papá, porque me educaron e hicieron de mí lo que soy. Porque con su ejemplo de vida me enseñaron a seguir siempre, a pesar de todo.

A mi hermana y familia, por compartir alegrías y tristezas, por escucharme y estar a mi lado en todo momento... gracias por el aguante!!!

A mis abuelas y a mi tía Yuyí, porque siempre me dieron su aliento y a mi tía Cecilia y mi abuelo Publio quienes ya no están físicamente, pero nunca dejaron de acompañarme.

A mi familia política (Erilda, Carlos, Carina, Marisa, Marcelo, Milena y Nerina), porque supieron comprender lo importante que es para mí este trabajo y siempre me brindaron su apoyo.

A Patricia y familia, por cuidar con tanto amor a mis niños!!

A mis amigas incondicionales, Vero y Yaní, porque confiaron en mí. Porque en los malos momentos me alentaron a seguir adelante y en los buenos supieron compartir conmigo las alegrías. Porque su amistad fue esencial para llegar hasta acá.

A mis amigos Amparo, Nahuel, Marco, Vilma y Diego quienes, a pesar de la distancia, me acompañaron en todo este camino con su amistad.



RESUMEN

El botulismo es una enfermedad neuroparalítica causada por la acción de la toxina botulínica, que afecta al hombre y los animales. Para evaluar el riesgo de adquirir esta enfermedad, es fundamental conocer la distribución de clostridios productores de toxina botulínica (CPTB: *Clostridium botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* y *C. argentinense*) en el suelo, su principal reservorio. Si bien la distribución geográfica de los CPTB ha sido estudiada extensivamente en Europa, Asia y América del Norte, en Argentina se ha investigado en forma parcial. Por este motivo, uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar la presencia de esporas de CPTB en suelos de Argentina. Se analizaron 445 muestras de Entre Ríos, Chaco, Formosa, Misiones y Buenos Aires. Además, se recopilaron datos de estudios previos y se realizó un análisis estadístico de los mismos. Así, las 445 muestras se sumaron a 1564 analizadas previamente, quedando un total de 2009 muestras, de las cuales 472 (23,5%) resultaron positivas. Esta prevalencia, comparada con la de otros países, fue relativamente alta. La distribución de CPTB en las distintas regiones geográficas no fue homogénea, ya que las regiones Oeste y Noroeste mostraron prevalencias elevadas y las regiones Sur y Nordeste presentaron menor número de muestras positivas. Se desconoce qué factores podrían incidir específicamente sobre la presencia de los CPTB en el suelo. En este trabajo encontramos que el número de muestras positivas era mayor en suelos con valores de pH comprendidos entre 5,5 y 7,6 y de bajo contenido en materia orgánica. Con respecto a los serotipos, el A fue el más frecuentemente identificado. Se observó, además, una gran diversidad serológica ya que también se detectaron los tipos B, F y G, mezclas de tipos (A+B, A+F y B+F) y el subtipo Af.

Actualmente, el botulismo del lactante es la principal forma detectada del botulismo, sin embargo, su transmisión no ha sido esclarecida completamente. Se han propuesto dos fuentes potenciales de esporas botulínicas: el suelo y la miel. Dado que el suelo es el principal reservorio de estos clostridios, proponemos que la inhalación y posterior deglución de las esporas vehiculizadas por el polvo ambiental es, muy probablemente, la principal forma de transmisión del botulismo del lactante. En este sentido, sería de esperar que en regiones donde existe un importante número de casos, la prevalencia de CPTB en suelos también fuese elevada. Esta relación fue observada sólo en las regiones Oeste y Nordeste. Esto podría estar indicando que otras fuentes de esporas podrían estar implicadas en la transmisión. O bien, que otros factores, como la carga de esporas de CPTB en suelos, características climáticas, etc., serían relevantes en la transmisión de esta enfermedad. Además, consideramos que el botulismo del lactante podría estar subdiagnosticado, especialmente en zonas donde el personal de salud no ha sido adecuadamente advertido sobre esta enfermedad.

En Argentina el primer caso de botulismo del lactante se detectó en 1982 y hasta diciembre de 2004 se habían registrado 336 casos. En todos los episodios se identificó el serotipo A, y no se conoce con certeza si las cepas aisladas de estos casos poseen atributos (genéticos, bioquímicos y fisiológicos) específicos que permitan diferenciarlas de las aisladas de ambientes naturales. En el presente trabajo no se observó una clara diferencia fenotípica entre cepas de CPTB aisladas de casos de botulismo del lactante y cepas aisladas de otras fuentes. Los caracteres bioquímicos, patrones de sensibilidad a antimicrobianos, producción de neurotoxina-hemaglutinina positiva y patrones de unión a gangliósidos, no revelaron diferencias con cepas de CPTB aisladas de diferentes orígenes. Esto podría indicar que las cepas productoras de botulismo del lactante no poseerían caracteres específicos, por lo que las esporas de CPTB aisladas de diferentes fuentes serían potenciales agentes etiológicos de esta enfermedad.

Botulism is a severe neurological disease caused by botulinum neurotoxin. It is characterized by a flaccid paralysis and affects humans and animals. Since the soil is the main source of botulinum toxin-producing clostridia (BTPC: *Clostridium botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum* and *C. argentinense*), the knowledge of its distribution is necessary to evaluate the incidence of botulism. Geographical distribution of these clostridia has been extensively studied in Europe, Asia and North America. Since their prevalence in Argentina has been only partially studied, one of the aims of this study was to gain insight into this area. We studied the presence of BTPC in 445 soil samples from Entre Ríos, Chaco, Formosa, Misiones and Buenos Aires. Also, data of previous studies were added and it was carried out a statistical analysis. Thus, the 445 samples were added at 1564 analyzed previously, being 2009 samples. BTPC were detected in 472 soil samples (23.5%). This prevalence was relatively high with regard to other countries. However, distribution amongst the geographical regions was not homogeneous. West and Northwest regions exhibited elevated prevalences whereas Northeast and South regions showed low prevalences. These regions present different climatic and geographical characteristics and, probably, a combination of these influences the prevalence of these clostridia in soils. Factors that could influence specifically on the presence of BTPC in soils are unknown. In this work, we found that the number of positive samples was higher in soils with pH between 5,5 and 7,6 and with low organic content soils. Type A was the most frequently detected. In addition, a great diversity of types is observed in Argentina, since types B, F, G, subtype Af and mixtures of types (A+B, A+F y B+F) were also found.

Although soil is the main source of BTPC and infant botulism has become the most common form of botulism, its transmission has not been elucidated. Thus, we suggest that environmental dust is the most important vehicle of spores in infant botulism cases. Therefore, a high prevalence of clostridia in soils would be associated with a high number of cases. We found association between presence of clostridia in soils and incidence of infant botulism in only two regions: West and Northeast. This could be indicating that another sources of BTPC spores could be implicated, or because climatic conditions could influence the presence and dispersion of spores. In addition, we suggest that this disease is frequently subdiagnosed. This could occur principally in areas where physicians are not aware about this illness.

In Argentina, 336 infant botulism cases were reported between 1982 and December 2004. Type A was identified in all cases and it is unknown if strains isolated from infant botulism cases have particular genetic, biochemical and physiologic characteristics, concerning strains isolated from environmental sources. Biochemical tests, antimicrobial susceptibility, binding to gangliosides patterns and haemagglutinin positive neurotoxin production showed uniformity among the BTPC strains isolated from infant botulism cases and other sources. Regardless of the toxigenic type, source, or geographical location, the same acid products were produced, and similar reactions were observed with regard to carbohydrates fermented, gelatin and milk digestion, production of lipase and other biochemical reactions. These results could be indicating that infant botulism strains have not particular characteristics, at least in a biochemical aspect, and strains from soil could produce the illness if they arrive to the infant intestine.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
1. Botulismo.....	1
1.1. El agente etiológico: características generales y clasificación.....	1
1.2. La enfermedad: características generales, clasificación y epidemiología.....	7
1.3. La neurotoxina: estructura y mecanismo de acción.....	11
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Medios de cultivo.....	20
2. Medios diferenciales para pruebas bioquímicas.....	23
3. Diluyente de Crisley.....	29
4. Indicador de anaerobiosis.....	29
5. Animales de experimentación.....	29
6. Antitoxinas botulínicas.....	29
7. Buffers.....	30
8. Solución reveladora para inmunotinción.....	31
9. Suspensión de glóbulos rojos.....	31
10. Cepas de CPTB.....	32
11. Detección de CPTB en suelos y muestras clínicas.....	33
12. Determinación de pH y materia orgánica de suelos.....	40
13. Identificación bioquímica de cepas de CPTB.....	40
14. Determinación de antibiograma farmacológico.....	43
15. Test de hemaglutinación para NTBo.....	44
16. Inmunotinción de cromatografía en capa delgada.....	44
17. Obtención de toxinas botulínicas en altas dosis.....	45
18. Tratamiento estadístico.....	46
RESULTADOS	
1. Presencia de CPTB en suelos de Argentina.....	47
1.1. CPTB en suelos de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Formosa y Misiones.....	48
1.2. CPTB en suelos de diferentes regiones de Argentina.....	49
1.3. Análisis integral de CPTB en suelos de diferentes regiones de Argentina.....	57
1.4. Análisis de factores que podrían influir en la presencia de CPTB en el suelo.....	61
1.5. Relación entre prevalencia de CPTB en suelos y número de casos de botulismo del lactante.....	62
2. Caracterización de cepas de CPTB.....	63
2.1. Determinación de características bioquímicas.....	63
2.2. Determinación de antibiograma farmacológico.....	70
2.3. Propiedad hemaglutinante de la NTBo.....	71
2.4. Identificación de receptores celulares del tipo gangliósidos.....	73
DISCUSIÓN	
1. Presencia de CPTB en suelos de Argentina.....	74
2. Caracterización de cepas de CPTB.....	78
CONCLUSIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82



Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1.....	2
Figura 1.....	11
Figura 2.....	12
Figura 3.....	12
Figura 4.....	15
Figura 5.....	16
Figura 6.....	17
Tabla 2.....	32
Tabla 3.....	34
Tabla 4.....	47
Tabla 5.....	48
Tabla 6.....	49
Tabla 7.....	49
Tabla 8.....	50
Tabla 9.....	50
Tabla 10.....	51
Tabla 11.....	51
Tabla 12.....	52
Tabla 13.....	52
Tabla 14.....	53
Tabla 15.....	53
Tabla 16.....	54
Tabla 17.....	54
Tabla 18.....	55
Tabla 19.....	55
Tabla 20.....	56
Tabla 21.....	56
Tabla 22.....	56
Tabla 23.....	57
Figura 7.....	58
Tabla 24.....	59
Tabla 25.....	60
Figura 8.....	60
Figura 9.....	61
Figura 10.....	61
Tabla 26.....	62
Tabla 27.....	63
Figura 11.....	64
Tabla 28.....	65
Figura 12.....	70
Figura 13.....	71
Figura 14.....	72
Tabla 29.....	73





INTRODUCCIÓN



1. Botulismo

El botulismo es una enfermedad neuroparalítica producida por la acción de una potente neurotoxina elaborada, principalmente, por *Clostridium botulinum*. Esta enfermedad puede afectar, además del hombre, a la mayoría de mamíferos y aves. El término botulismo deriva del latín *botulus* que significa embutido. Cuando esta enfermedad comenzó a ser reconocida en Europa, a fines del siglo XIX, se la asociaba casi exclusivamente a los embutidos y de allí derivó su nombre. Esta denominación, aunque relevante históricamente, en la actualidad ha perdido su importancia ya que los alimentos de origen vegetal son los vehículos más frecuentes del botulismo alimentario y los embutidos ya no constituyen la principal causa de esta intoxicación. El botulismo es una enfermedad poco común pero potencialmente fatal, especialmente cuando no es diagnosticada a tiempo y, por lo tanto, no se trata precozmente en forma adecuada.

1.1. El agente etiológico: características generales y clasificación

En 1897 van Ermengem informó el aislamiento de bacilos anaeróbicos toxigénicos a partir de una muestra de jamón crudo salado proveniente de un brote de botulismo, que afectó a varios músicos de una orquesta en Ellezelles, Bélgica (van Ermengem, 1897). Este microorganismo fue denominado *Bacillus botulinus*. Posteriormente fue asignado al género *Clostridium* que comprende bacilos anaerobios, formadores de endosporas que, por lo general, deforman el cuerpo bacteriano. A partir de numerosos brotes de botulismo humano y animal en diferentes países, comenzaron a aislarse cepas productoras de neurotoxina botulínica (NTBo) que presentaban diferencias fisiológicas y serológicas. A pesar de esta diversidad, ciertas características en común, como producción de lipasas, hidrólisis de gelatina y fermentación de hidratos de carbono, permitieron agruparlas en una sola especie: *Clostridium botulinum*. El Subcomité de Nomenclatura de la Asociación Internacional de Microbiólogos sugirió, en 1953, que todos los microorganismos productores de NTBo fueran incluidos dentro de esta especie (Prevot, 1953). Sin embargo, mediante estudios de homología de ADN (Lee y Riemann, 1970), se hizo evidente que esta decisión no concordaba con las propiedades genotípicas de las cepas. En base a estos estudios, Holdeman y Brooks



(1970) dividieron la especie en tres grupos y, posteriormente, Smith y Hobbs (1974) incluyeron al serotipo G en un cuarto grupo. Basándose en la gran diversidad observada dentro de la especie, se ha sugerido que los distintos grupos metabólicos de *C. botulinum* deberían ser asignados a especies diferentes. En particular el grupo IV, que presenta diferencias importantes con relación a los demás grupos (lipasa negativo y asacarolítico), fue propuesto como una nueva especie, *Clostridium argentinense* (Suen y col., 1988a). La taxonomía de *C. botulinum* se ha complicado aún más en los últimos años debido al aislamiento de cepas de *Clostridium butyricum* y *Clostridium baratii* productoras de NTBo, las cuales han sido implicadas en casos de botulismo (Aureli y col., 1986; Hall y col., 1985; McCroskey y col., 1986, 1991). En resumen, seis grupos bioquímicamente diferentes tienen la propiedad de producir NTBo y son denominados, en conjunto, clostridios productores de toxina botulínica (CPTB). En la Tabla 1 se describen características generales de estos grupos.

Tabla 1. Características fenotípicas de CPTB

Clasificación	Tipo serológico de neurotoxina	Producción de		Fermentación de glucosa	Hidrólisis de gelatina	Digestión de caseína	Productos metabólicos ⁽¹⁾
		Lecitinasa	Lipasa				
<i>C. botulinum</i> Grupo I	A, B, F	-	+	+	+	+	A, iB, B, iV
<i>C. botulinum</i> Grupo II	E, B, F	-	+	+	+	-	A, B
<i>C. botulinum</i> Grupo III	C, D	+	+	+	+	±	A, P, B
<i>C. botulinum</i> Grupo IV	G	-	-	-	+	+	A, iB, B, iV
<i>C. baratii</i>	F	+	-	+	-	-	A, B
<i>C. butyricum</i>	E	-	-	+	-	-	A, B

⁽¹⁾ Productos metabólicos volátiles, determinados por cromatografía en fase gaseosa. A: ácido acético; iB: ácido isobutírico; B: ácido butírico; iV: ácido isovalérico; P: ácido propiónico.

Desde el punto de vista de la microbiología clínica, existe cierta reticencia a un cambio profundo de la nomenclatura de *C. botulinum*, y se considera conveniente mantener la agrupación de estos microorganismos en una sola especie. Sin embargo, de

acuerdo al estado del conocimiento de la diversidad de estos clostridios, una nomenclatura que sólo se basa en la producción de la NTBo resulta insatisfactoria.

1.1.1. *Clostridium botulinum*

La especie *C. botulinum* (van Ermengem, 1897) es la denominación taxonómica dada a un grupo de microorganismos anaerobios, Gram-positivos, esporulados, capaces de producir NTBo. Se reconocen siete serotipos de NTBo: A, B, C, D, E, F y G, diferenciados por su especificidad antigénica. Esta denominación se hace extensiva a las cepas de *C. botulinum* que producen un determinado serotipo de NTBo.

En 1910, Leuchs informó que la NTBo producida por una cepa aislada de un brote de botulismo en Alemania podía ser distinguida de la toxina producida por la cepa de van Ermengem mediante neutralización con sueros específicos. En 1919 se estableció la designación de los tipos A y B (Burke, 1919). El tipo C se identificó por primera vez a partir de un aislamiento de *C. botulinum* en aves, en Estados Unidos, y de ganado vacuno, en Australia (Bengston, 1922; Seddon, 1922). El tipo D fue descrito por Meyer y Gunnison en 1928 en un brote en ganado bovino, en Sudáfrica. El tipo E se identificó a partir de dos brotes de botulismo alimentario, uno en Estados Unidos (Hazen, 1937) y el otro en Ucrania (Gunnison y col., 1937). El tipo F fue aislado en un brote de botulismo alimentario en Dinamarca (Moller y Scheibel, 1960). El tipo G fue descrito por Giménez y Ciccarelli (1970a) a partir de una muestra de suelo de Argentina.

Aunque la mayoría de las cepas producen un solo tipo serológico, se han aislado algunas que producen dos tipos de toxina, denominadas subtipos (Giménez y Giménez, 1993). Hasta el presente se han descrito cuatro: Ab, Ba, Af y Bf. El subtipo Af fue aislado por primera vez en 1965 a partir de una muestra de suelo (Giménez y Ciccarelli, 1970c). En 1976, a partir de un caso de botulismo del lactante, se aisló una cepa identificada en ese momento como una variante atípica del serotipo B (Hatheway y col., 1981), que posteriormente fue correctamente tipificada como subtipo Ba por Giménez (1984). El subtipo Ab fue aislado de un caso de botulismo alimentario en Francia (Poumeyrol y col., 1983). El subtipo Bf fue descrito por primera vez en 1984, aislado a partir de un caso de botulismo del lactante (Hatheway y McCroskey, 1987).



De acuerdo a sus propiedades bioquímicas, las cepas de *C. botulinum* fueron divididas en tres grupos metabólicos (Holdeman y Brooks, 1970). El serotipo G, descrito por Giménez y Ciccarelli (1970a) fue incluido en un cuarto grupo (Smith y Hobbs, 1974). Esta división ha sido validada por estudios de homología de ADN (Lee y Riemann, 1970) y por el análisis de secuencias de ARN ribosomal 16S (Collins y col., 1994; Hutson y col., 1993).

Cada grupo presenta características particulares (Cato y col., 1986):

a) Grupo I (cepas tipo A y cepas proteolíticas tipos B y F): son bacilos móviles, con flagelos peritricos, rectos o ligeramente curvados, de $0,6-1,4 \times 3,0-20,0 \mu\text{m}$. Las esporas son ovales y subterminales y deforman la célula. La temperatura óptima de crecimiento es $30-40^\circ\text{C}$. El crecimiento es inhibido por 6,5% NaCl y pH superior a 8,5. Son proteolíticos, digieren gelatina, leche y carne y producen ácido a partir de glucosa. Los productos de fermentación en caldo Proteosa-Extracto de levadura-Glucosa (PYG) incluyen cantidades elevadas de ácido acético y butírico y cantidades moderadas de ácido isobutírico e isovalérico. También se pueden detectar ácido propiónico, isocaproico y valérico. Las cepas de este grupo presentan homología genética con *Clostridium sporogenes* y sólo se diferencian por la producción de la NTBo.

b) Grupo II (cepas tipo E y cepas no proteolíticas B y F): son bacilos rectos, de $0,8-1,6 \times 1,7-15,7 \mu\text{m}$. Son móviles, con flagelos peritricos. Las esporas son ovales, subterminales y generalmente deforman la célula. La temperatura óptima de crecimiento es de $25-37^\circ\text{C}$. El crecimiento es inhibido por 6,5% NaCl y pH superior a 8,5. Hidrolizan la gelatina, pero no digieren leche ni carne. Producen ácido a partir de glucosa, fructosa, maltosa, manosa y sacarosa. Los productos de fermentación en caldo PYG son ácido acético y butírico.

c) Grupo III (cepas tipo C y D): son bacilos rectos, de $0,5-2,4 \times 3,0-22,0 \mu\text{m}$. Son móviles, con flagelos peritricos. Las esporas son ovales y subterminales y deforman la célula. La temperatura óptima de crecimiento es $30-37^\circ\text{C}$. El crecimiento es inhibido por 6,5% NaCl y pH superior a 8,5. Hidrolizan gelatina, acidifican, coagulan o digieren la leche y algunas cepas digieren la carne. Producen ácido a partir de glucosa y algunas cepas lo hacen a partir de maltosa y manosa. Los productos de fermentación en caldo PYG incluyen ácido acético, butírico y propiónico. También se pueden detectar trazas de ácido valérico. Las cepas de este grupo son similares fenotípicamente a *Clostridium*



novyi tipo A, pero se diferencian fácilmente por la producción de NTBo y por los patrones de proteínas identificados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

d) Grupo IV (cepas tipo G): son bacilos rectos, móviles, de $1,3-1,9 \times 1,6-9,4 \mu\text{m}$. Las esporas, que no se observan con frecuencia, son ovales, subterminales y deforman la célula. La temperatura óptima de crecimiento es $30-37^\circ\text{C}$. El crecimiento es inhibido por 6,5% NaCl. Digieren gelatina, leche y carne. No producen ácido a partir de los hidratos de carbono. A partir del caldo PYG producen ácido acético, butírico, isobutírico e isovalérico. A diferencia de los otros grupos de *C. botulinum*, las cepas tipo G no son lipolíticas. Presentan características fenotípicas idénticas a las de *Clostridium subterminale* y se diferencian por la producción de NTBo y por los patrones de proteínas solubles identificados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Debido a las diferencias metabólicas que presenta con los demás grupos, este grupo fue propuesto como una nueva especie, *C. argentinense* (Suen y col., 1988a)

1.1.2. Otros clostridios productores de NTBo

En 1985 se informó en Estados Unidos (Hall y col. 1985; McCroskey y col., 1991) el aislamiento de una cepa de *C. baratii* productora de NTBo tipo F a partir de un caso de botulismo del lactante. Esta cepa corresponde a un bacilo Gram-positivo, anaerobio estricto que, a diferencia de *C. botulinum*, es lecitinasa-positivo, lipasa-negativo e inmóvil. Además, reduce el nitrato y no hidroliza la gelatina. Algunas de estas características se presentan en la Tabla 1.

En 1986, en Italia, se registró el primer caso de botulismo del lactante debido al tipo E (Aureli y col., 1986). Sin embargo, el microorganismo productor de la NTBo no fue identificado como *C. botulinum* sino como *C. butyricum* (Aureli y col., 1986; McCroskey y col., 1986). La cepa aislada presentó las siguientes características: bacilo Gram-positivo, inmóvil, lecitinasa y lipasa-negativo, no reduce el nitrato ni hidroliza la gelatina. En la Tabla 1 se presentan algunas de estas características. En un estudio realizado por Giménez y Sugiyama (1988) se confirmó que la neurotoxina elaborada por esta cepa es semejante a la neurotoxina tipo E producida por *C. botulinum*.



1.1.3. Ecología de los CPTB

C. botulinum se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. El suelo es su hábitat más frecuente, pero también se lo halla en polvo ambiental, barros, sedimentos de lagunas y océanos y en la superficie de vegetales, por lo que no resulta difícil su acceso a los alimentos y, en consecuencia, al aparato digestivo del hombre y de los animales.

Existen trabajos sobre la distribución de *C. botulinum* en varias partes del mundo que demuestran una distribución desigual en los distintos continentes. La densidad de esporas de CPTB en suelos (expresadas en número más probable por kilogramo de suelo) varía desde 1 en Gran Bretaña hasta 2.500 en Holanda (Hauschild, 1989). Los tipos A y B predominan en suelos continentales de América (Gamboa y col., 1993; Smith, 1978; Yamakawa y col., 1990) y Europa (Smith y Young, 1980; Sonnabend y col., 1987). El tipo E es el más frecuente en suelos de Alaska, norte de Europa y Japón y es particularmente abundante en sedimentos acuáticos (Hauschild, 1989; Huss, 1980). Los tipos C y D predominan en África y Japón (Karasawa y col., 2000; Kobayashi y col., 1992; Yamakawa y col., 1988). El tipo F ha sido hallado en suelos de Argentina (Giménez y Ciccarelli, 1968), Estados Unidos (Smith, 1978) e Indonesia (Suhadi y col., 1981). El tipo G sólo ha sido aislado a partir de suelos de Argentina y Suiza (Giménez y Ciccarelli, 1970a; Sonnabend y col., 1987).

En América del Sur existe un conocimiento muy restringido de la existencia de los CPTB en el medio natural. Esto puede deberse a que, para la mayoría de estos países, el botulismo no representa un problema de salud pública o, más probablemente, a que el efecto de otras enfermedades infecciosas, cuya mortalidad excede la debida al botulismo, desvirtúa la verdadera importancia del botulismo; todo esto agravado por un inadecuado conocimiento de la real incidencia de la enfermedad, ya sea por la falta de denuncia de todos los casos o por deficiencias en los registros de los servicios de salud pública. En Argentina, la presencia de CPTB en suelos se ha estudiado y publicado en forma parcial (Ciccarelli y col, 1981; De Rigo, 1963; Fernández, 1994; Giménez y col, 1970b).

1.2. La enfermedad: características generales, clasificación y epidemiología

Actualmente el botulismo se clasifica en dos formas fisiopatogénicas: intoxicación y toxiinfección. La primera es ocasionada por acción de la NTBo preformada y puede subdividirse en: 1) botulismo por alimentos, 2) botulismo iatrogénico, 3) botulismo intencional y 4) botulismo accidental. La toxiinfección, en cambio, es causada por la multiplicación del clostridio en el organismo y producción *in situ* de la NTBo. Dependiendo del sitio de colonización y toxinogénesis, se subdivide en: 1) botulismo por heridas y 2) botulismo intestinal. Dentro de esta última categoría se han descrito el botulismo críptico y del lactante.

La signosintomatología del botulismo comprende: visión borrosa, diplopía, fotofobia, disfagia, dificultad respiratoria y debilidad muscular generalizada, simétrica y descendente. Además, en el botulismo por alimentos suelen estar presentes trastornos gastrointestinales, mientras que en el botulismo por heridas puede presentarse fiebre y alteraciones sensoriales unilaterales. En el botulismo del lactante la signología típica consiste en constipación (tres o más días sin defecación), reflejo fotomotor disminuido y otros signos de hipotonía como somnolencia, letargia, disminución del reflejo de succión, llanto débil y babeo. En todos los casos la muerte puede sobrevenir por paro respiratorio o cardio-respiratorio.

El botulismo por alimentos es la forma más antigua y conocida y resulta de la ingestión de la NTBo preformada en alimentos. En Estados Unidos continúa siendo un serio problema de salud pública: desde 1899 hasta 1996 se registraron 991 brotes, con un promedio de 9,4 brotes por año (Centers for Disease Control, 1998) y entre los años 2001 y 2003 se presentaron 24 brotes (Centers for Disease Control, 2001-2003). En Argentina desde 1922 hasta 2004 se registraron 86 brotes, con un promedio de 1,03 brotes por año. Los alimentos de origen vegetal fueron el vehículo más frecuente de esta intoxicación, aunque también se han producido brotes por alimentos de origen animal. En Argentina, a diferencia de otros países, no es muy frecuente que ocurra un brote por alimentos de origen marino. En la mayoría de los casos se debe a alimentos en conserva de elaboración casera, aunque han ocurrido también brotes a partir de conservas elaboradas industrialmente. En nuestro país más del 75% de los casos se debe al tipo A. También se han registrado brotes por los tipos B, E y F y un brote por el subtipo Af.



El botulismo iatrogénico deriva del uso farmacológico de la NTBo. Desde que en 1980 se realizó la primera publicación sobre el efecto de la NTBo en el tratamiento del estrabismo (Scott, 1980), los trabajos que reportan el uso de la NTBo en clínica humana son cada vez más numerosos. En la actualidad, la NTBo se utiliza para el manejo de ciertos desórdenes de la tonicidad muscular: estrabismo, blefaroespasma, tortícolis espasmódica, disfonía espasmódica, espasmo hemifacial, etc. Además, esta toxina se ha convertido en las últimas décadas en el tratamiento de medicina estética con más rápido crecimiento en su demanda. Aunque se han reportado síntomas sistémicos de botulismo después de administración terapéutica de NTBo (Bakheit y col., 1997; Bhatia y col., 1999; Cobb y col., 2000; Tugnoli y col., 2002), es muy poco probable que se origine botulismo luego de un tratamiento, debido a que las dosis inoculadas localmente son varias veces menores a la dosis necesaria para que la toxina ingrese a la circulación sistémica.

El botulismo intencional surge a raíz del potencial uso de la toxina como arma biológica (Arnon y col., 2001; Cole, 1996), en forma de aerosoles o mediante la contaminación de alimentos o agua con *C. botulinum*. La NTBo es extremadamente potente y relativamente fácil de producir, lo que la convierte en una poderosa arma biológica. A principios de los '90, la secta religiosa Aum Shinrikyo de Japón intentó, sin resultados, provocar botulismo por inhalación en Tokio, en tres ocasiones (Bossi y col., 2004). Se cree que varios países han producido y almacenado armas biológicas con NTBo. En 1992 se reportó que Irak poseía misiles con NTBo (Arnon y col., 2001).

El botulismo accidental puede presentarse en personal de laboratorio que manipula clostridios neurotoxigénicos o la toxina. Por esta razón, todo material sospechoso de contaminación con NTBo debe ser manipulado con extremo cuidado y exclusivamente por personal de laboratorio experimentado, siguiendo normas básicas de bioseguridad (Centers for Disease Control, 1998). El único caso de botulismo accidental conocido ocurrió en investigadores que intentaban administrar a animales la neurotoxina aerosolizada (Holzer, 1962). Es aconsejable que el personal de laboratorio que manipula frecuentemente NTBo sea protegido mediante la administración del toxoide correspondiente.

El botulismo por heridas resulta de la producción *in situ* de la NTBo luego de la colonización de una herida, análogamente a lo que ocurre en el caso del tétanos (Merson

y Dowell, 1973). El primer caso de botulismo por heridas ocurrió en Estados Unidos en 1943 (Davis y col., 1951). Hasta 1996, en Estados Unidos se registraron 111 casos de botulismo por heridas (Centers for Disease Control, 1998). A partir de 1980, la mayoría de los casos de botulismo por heridas se describen en personas con adicción a drogas ilícitas, y se lo ha asociado tanto a heridas por inoculación subcutánea de “alquitrán negro” (*black tar heroin*) como a sinusitis por aspiración de cocaína (Passaro y col., 1998). Entre los años 2001 y 2003, en Estados Unidos se reportaron 77 casos de botulismo por heridas, de los cuales 75 se relacionaron con el abuso de drogas ilícitas (Centers for Disease Control, 2001-2003). Hasta la fecha, en Argentina, se han registrado cuatro casos de botulismo por heridas, aunque, hasta donde llega nuestro conocimiento, dos fueron confirmados por pruebas de laboratorio.

El botulismo críptico comprende aquellos casos de adultos y niños mayores de un año de edad, confirmados por el laboratorio, en los que no se detectan heridas y tampoco es posible implicar un alimento específico como vehículo de la toxina. En estos casos el origen de la enfermedad sería la colonización del intestino por CPTB y producción *in situ* de la neurotoxina (McCroskey y Hatheway, 1988). En la mayoría de los casos de botulismo críptico el paciente había sido sometido a cirugía gastrointestinal o presentaba enfermedad inflamatoria intestinal (Freedman y col., 1986; Griffin y col., 1997).

El botulismo del lactante afecta a menores de un año de edad y resulta de la producción *in situ* de NTBo luego de la colonización de CPTB en el intestino. En la actualidad es la forma clínica y epidemiológica más importante del botulismo humano, debido al elevado número de casos, a la dificultad en el diagnóstico diferencial con otras enfermedades neurológicas y a su compromiso con el síndrome de muerte súbita infantil (Arnon y col., 1978, Bartram y Singer, 2004, Sonnabend y col., 1985). Su forma de transmisión aún no ha sido esclarecida completamente, pero como la toxiinfección ocurre en el tracto intestinal, el arribo de las esporas se intentó explicar por consumo de alimentos contaminados (Midura, 1996). Se estudió una gran variedad de alimentos: azúcar, cereales, leche de fórmula en polvo, suplementos vitamínicos, frutas y verduras en conserva y jarabe de maíz, entre otros. La miel es el único alimento reconocido como posible fuente de esporas (Fenicia y col., 1993), por lo que su administración a niños menores de un año de edad es desaconsejada por la Organización Mundial de la Salud.

Además, en estudios recientes (Satorres y col., 1999; Bianco, 2002) se encontraron esporas botulínicas en hierbas medicinales que tradicionalmente se administran como infusión a lactantes, como manzanilla (*Matricaria spp.*), poleo (*Lippia turbinata*), yerba del pollo (*Alternanthera pungens*), anís (*Pimpinella anisum*) y sen (*Senna acutifolia*). Por otro lado, teniendo en cuenta que el suelo es el principal reservorio de los CPTB, se propone que la inhalación y posterior deglución de las esporas vehiculizadas por el polvo ambiental, es muy probablemente la principal forma de transmisión del botulismo del lactante. Por lo tanto, sería de esperar que en regiones donde existe un importante número de casos de botulismo del lactante, la prevalencia de las esporas en suelos también fuese elevada. Además, otros factores como clima, características topológicas y geográficas, etc., podrían influir en la dispersión de las esporas.

En Argentina el primer caso de botulismo del lactante se detectó en 1982 y hasta diciembre de 2004 se habían registrado 336 casos (datos suministrados por el Área Microbiología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo y por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud [ANLIS] "Dr. Carlos G. Malbrán"). En la Figura 1 se detalla la distribución de casos por provincia. En todos los episodios ocurridos en Argentina se identificó *C. botulinum* tipo A; sin embargo, no se conoce con certeza si las cepas aisladas de estos casos poseen atributos genéticos, bioquímicos y fisiológicos específicos, con respecto no sólo a otras especies de clostridios, sino también a biotipos pertenecientes a la misma especie. Tabita y col. (1991) sugirieron que, entre cepas de CPTB provenientes de casos de botulismo del lactante y de brotes de botulismo alimentario, existirían diferencias en algunos aspectos, como el peso molecular de sus toxinas, infectividad en ratón, antigenicidad y afinidad por receptores, entre otros. También se conoce que las secuencias nucleotídicas del gen de las NTBo producidas por cepas provenientes de casos del lactante no son idénticas a las secuencias de genes de NTBo producidas por cepas de otros orígenes (Minton, 1995).

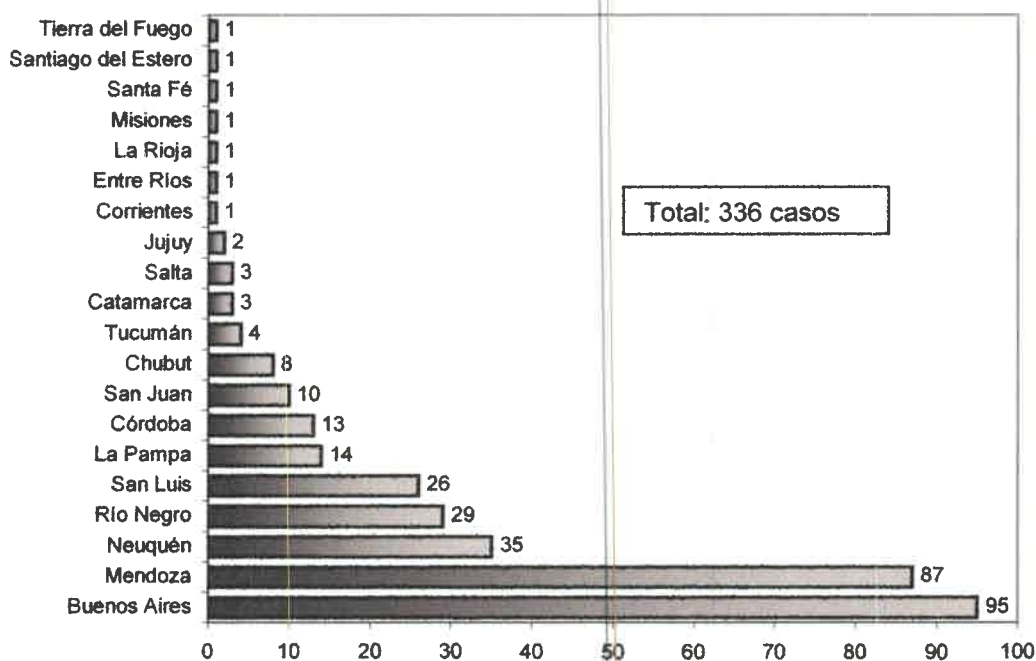


Figura 1. Distribución del número de casos de botulismo del lactante por provincia en Argentina (1982-2004).

NOTA: Formosa, Chaco y Santa Cruz no registran ningún caso de botulismo del lactante.

1.3. La neurotoxina: estructura y mecanismo de acción

Las NTBos son Zn-endopeptidasas que poseen especificidad por las sinapsis nerviosas colinérgicas. Son polipéptidos de aproximadamente 150 kDa, producidas intracelularmente durante la fase de crecimiento logarítmico y liberadas al medio circundante mediante lisis celular. Son similares, en estructura y modo de acción, a la neurotoxina tetánica (NTTe), producida por *Clostridium tetani*. Consisten en una cadena pesada o H (100 kDa) y una cadena liviana o L (50 kDa), que se mantienen unidas mediante un puente disulfuro intercatenario. Las toxinas son sintetizadas inicialmente como cadena simple inactiva, la cual es clivada por enzimas proteolíticas endógenas o exógenas para formar la estructura activa dicatenaria (Figura 2).

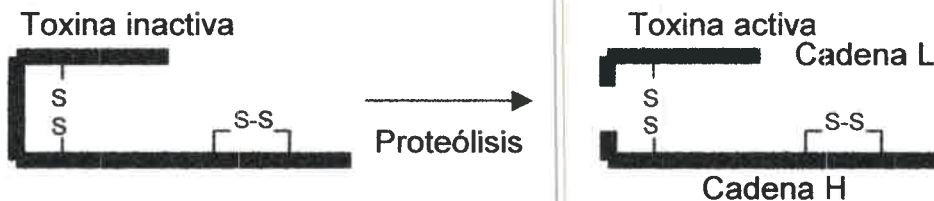


Figura 2. Estructura de la NTBo. Las toxinas son sintetizadas como cadena simple inactiva, y luego por proteólisis se forma la estructura activa dicatenaria: una cadena pesada o H y una cadena liviana o L, unidas mediante un puente disulfuro intercatenario.

La estructura de la NTBo revela tres dominios funcionales diferentes de aproximadamente 50 kDa cada uno: 1) la cadena L, que posee el motivo His-Glu-X-X-His, característico del sitio catalítico de las Zn-endopeptidasas, 2) el dominio de translocación, ubicado en el extremo N-terminal de la cadena H (H_N) y 3) el dominio de unión neuroespecífica, en el extremo C-terminal de la cadena H (H_C) (Figura 3). Este último está compuesto, a su vez, por dos subdominios: el N-terminal (H_{CN}), que se uniría a moléculas que contienen oligosacáridos, y el C-terminal (H_{CC}), que estaría implicado en la unión específica a receptores del tipo gangliósidos (Lalli y col., 2003).

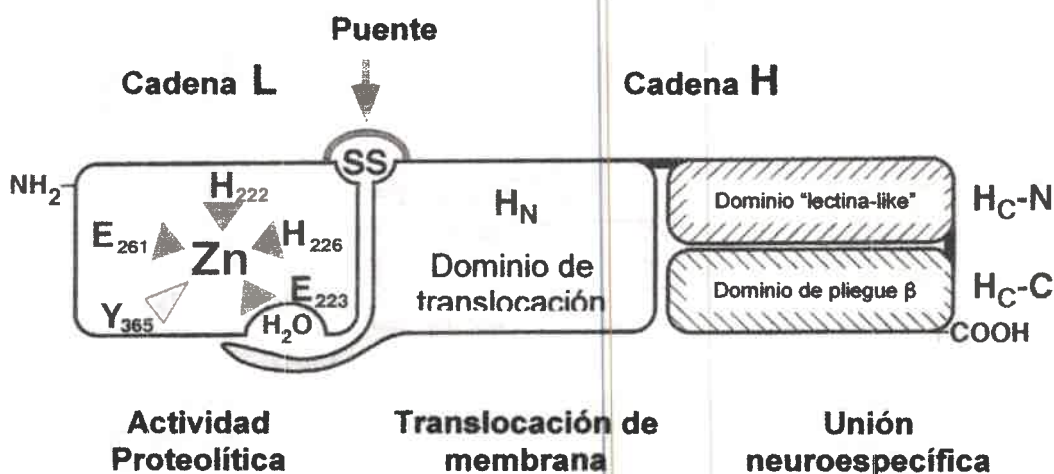
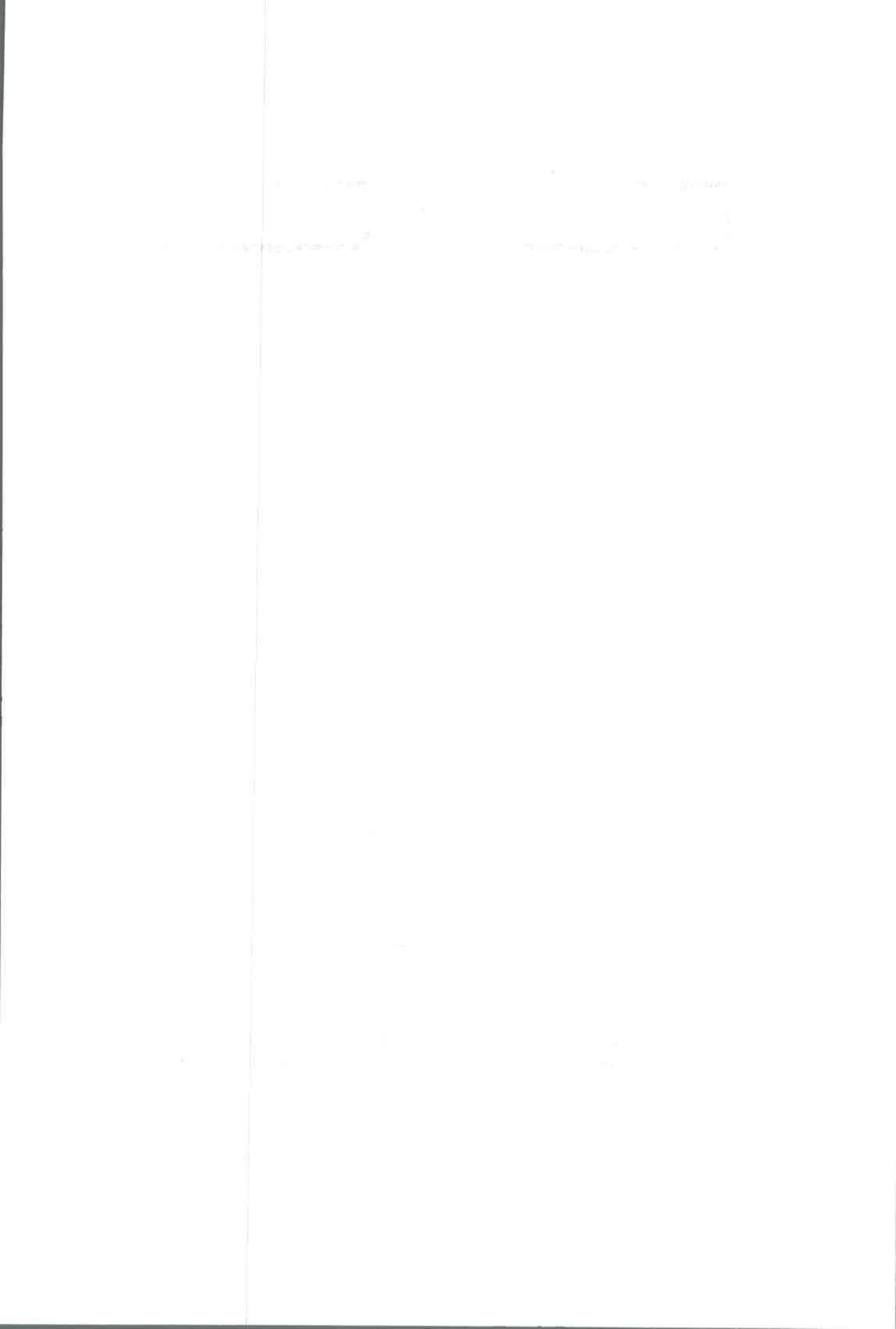


Figura 3. Dominios funcionales de la NTBo: la cadena L, que posee el sitio catalítico de las endopeptidasas; el dominio de translocación, ubicado en el extremo N-terminal de la cadena H (H_N) y el dominio de unión neuroespecífica, en el extremo C-terminal (H_C) (Adaptado de Schiavo y col., 2000).



Las NTBos actúan a nivel de la placa neuromotora, impidiendo la fusión de las vesículas sinápticas, que contienen neurotransmisores, con la membrana presináptica de las terminales nerviosas. De este modo, se bloquea la liberación de acetilcolina, y, si el tejido blanco es un músculo, causa una parálisis flácida. Las glándulas exocrinas también pueden ser afectadas por las NTBos y, en este caso, se bloquea la secreción glandular. El mecanismo de acción de estas neurotoxinas está representado en la Figura 4 (B) y puede dividirse en cuatro pasos:

1) Unión: desde el sitio de producción o de absorción, las NTBos difunden a los fluidos corporales y se unen a las membranas presinápticas de las terminales nerviosas colinérgicas. Como se mencionó, el dominio H_C juega un rol importante en la unión neuroespecífica; sin embargo, habría otras regiones de la toxina que serían necesarias en este paso (Pelizzari y col. 1999). Si bien se sabe que los receptores del tipo gangliósido están involucrados, sería improbable que éstos fueran los únicos receptores para las toxinas y, por ende, se ha propuesto un modelo de doble receptor lípido-proteína (Montecucco, 1986). Por ejemplo la NTBo tipo B se une a sinaptotagmina I y II en presencia de los gangliósidos GD1a y GT1b (Nishiki y col., 1996). No obstante, no se tiene una respuesta única y definitiva sobre el tipo y número de sitios de unión de estas neurotoxinas.

2) Internalización: las NTBo ingresan a la célula mediante endocitosis, quedando de este modo en el interior de compartimentos vesiculares. El ambiente ácido de éstos induce un cambio en su estructura conformacional, que resulta en la traslocación de la toxina a través de la membrana hidrofóbica (Pelizzari y col., 1999).

3) Translocación: la cadena L atraviesa la barrera hidrofóbica de la membrana de la vesícula endocítica mediante un mecanismo no aclarado en su totalidad. Se han propuesto tres modelos, de los cuales el más aceptado propone que la cadena H formaría una grieta hidrofílica transmembrana. Esto permitiría el pasaje de la cadena L parcialmente desnaturizada a través de la bicapa fosfolipídica. El pH neutro del citosol permitiría la renaturalización de la cadena L a la forma neutra hidrosoluble (Montecucco y col., 1994).

4) Actividad endopeptidasa: los sitios blanco de las NTBo son las llamadas proteínas SNARE (*soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive fusion] attachment protein receptor*), las cuales participan en exocitosis celular. En la Figura 5 se muestra la estructura de estas proteínas y los sitios de clivaje de las NTBos. Las NTBo A y E clivan

la proteína de 25 kDa asociada a sinaptosoma (SNAP-25), cada una en sitios diferentes y la NTBo C cliva la SNAP-25 y la syntaxina (Schiavo y col., 2000). Las NTBo B, D, F y G clivan la proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP/sinaptobrevina), pero cada una en sitios diferentes. Algo interesante de resaltar es que la NTTe cliva la proteína VAMP exactamente en la misma unión peptídica (Gln-76, Phe-77) que la NTBo B; sin embargo, cada una de ellas ocasiona los efectos opuestos del tétanos y el botulismo, respectivamente. Esto indica que los signos característicos de estas enfermedades derivan de los diferentes sitios de acción de las toxinas y no de diferentes mecanismos moleculares de acción, ya que la NTTe actúa a nivel del sistema nervioso central¹, mientras que el sitio de acción de la NTBo es periférico. En todos los casos, ya sea por interferir en la formación de los complejos SNARE o por la desestabilización de los mismos, se produce un bloqueo en la fusión de la membrana presináptica con las vesículas exocíticas y la acetilcolina no puede ser liberada, con la consiguiente pérdida de excitación muscular.

¹ NOTA: La NTTe, a dosis elevadas, puede causar parálisis flácida, actuando a nivel periférico.

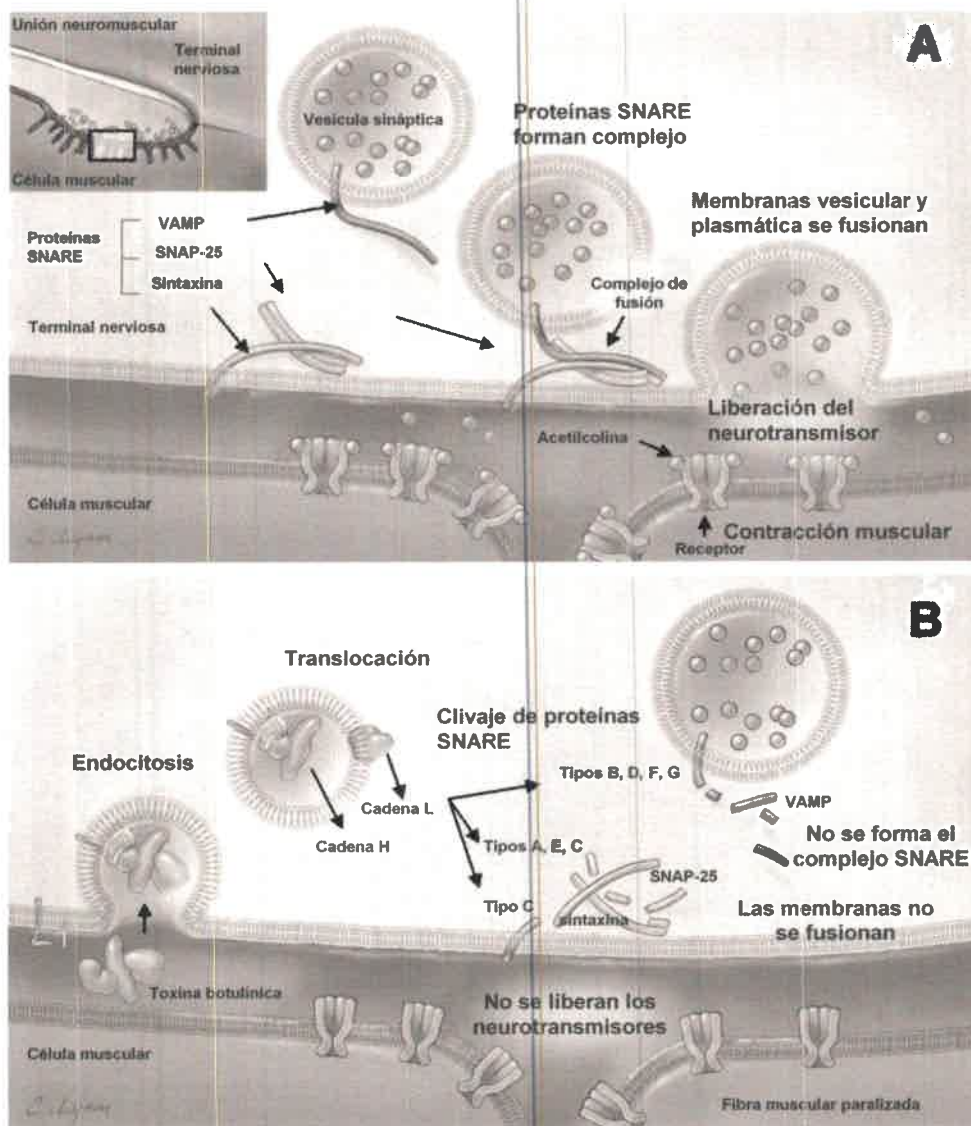


Figura 4. A) Mecanismo normal de liberación del neurotransmisor: La liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular está mediada por la formación del complejo SNARE, que permite que las vesículas que contienen acetilcolina se fusionen con la membrana presináptica, liberando el neurotransmisor. Éste se une a los receptores de la célula muscular y se produce la contracción muscular. B) Mecanismo de acción de la NTBo: La neurotoxina botulínica se une a receptores en la membrana presináptica e ingresa a la terminal nerviosa por endocitosis. Luego la cadena L pasa al citosol y allí cliva las proteínas del complejo SNARE, antes que éste se forme. Los tipos B, D, F y G clivan la proteína VAMP, los tipos A, C y E la proteína SNAP-25 y el tipo C la sintaxina (Adaptado de Arnon y col., 2001).

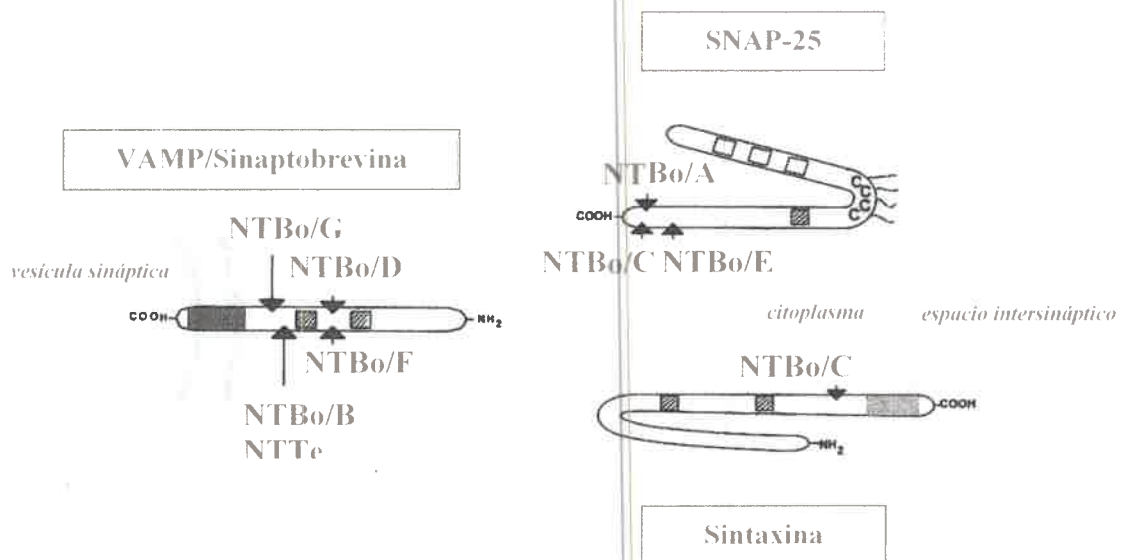


Figura 5. Estructura esquemática de las proteínas SNARE. La proteína VAMP está anclada a la membrana de la vesícula sináptica; la sintaxina está inserta en la membrana plasmática y SNAP-25 se une a la cara citosólica de la membrana presináptica. Las flechas indican los sitios de clivaje de las NTBo y la NTTe (Adaptado de Rossetto y col., 2001).

1.3.1. Toxinas progenitoras

Las NTBos se hallan asociadas, mediante uniones no covalentes, a componentes proteicos no tóxicos con los cuales forma grandes complejos denominados toxinas progenitoras (Hatheway, 1990). Algunas de estas proteínas asociadas son hemaglutininas (HA). Además, una proteína no tóxica no hemaglutinante (NTNH) de 139 kDa está siempre presente. Existen distintas clases de complejos, clasificados en tres grupos principales: 1) toxina 12S (de 300 kDa, formado por la fracción tóxica de 150 kDa y el componente NTNH), 2) toxina 16S (de 600 kDa, compuesto por la toxina 12S y hemaglutininas) y 3) toxina 19S (de 900 kDa, formado por dímeros de la toxina 16S) (Figura 6). Se cree que esta asociación sería importante en la patogénesis del botulismo alimentario ya que los componentes no tóxicos preservarían a la parte tóxica de la acción de los jugos gástrico e intestinal. Además, las HA se ligarían a las células epiteliales del intestino delgado mediante unión a receptores (Fujinaga y col., 2000), que varían en su composición química según el serotipo de las toxinas progenitoras, siendo los más

importantes las glicoproteínas, gangliósidos y glicolípidos (Inoue y col., 1999; Inoue y col., 2001). Parte de los complejos serían absorbidos como tal en la cavidad oral, en el esófago o en el estómago y la disociación de la parte tóxica ocurriría en los fluidos circulantes. Alternativamente, los complejos podrían disociarse en el intestino, siendo de este modo la NTBo adsorbida directamente por las células epiteliales del intestino.

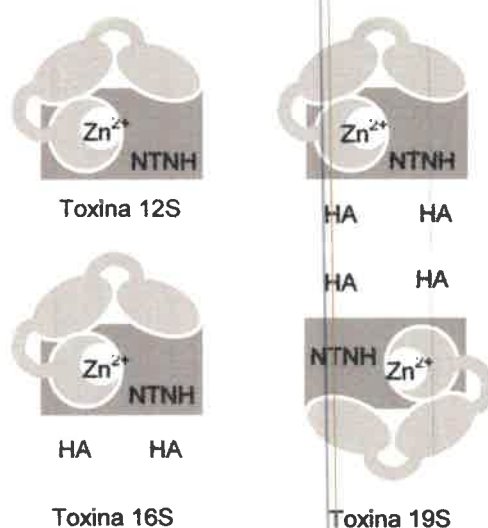


Figura 6. Estructura esquemática de las toxinas progenitoras. La toxina 12S está formada por la parte tóxica y la proteína no tóxica-no hemaglutinante (NTNH); la toxina 16S está compuesta por la toxina 12S y hemaglutininas (HA). La toxina 19S es un dímero de la toxina 16S (Adaptado de Montecucco y col., 1996).

En las cepas tipo A, B, C y D las toxinas progenitoras están codificadas por dos clusters: el cluster I, que contiene los genes que codifican para la NTBo y el componente NTNH y el cluster II, que contiene tres genes que codifican para HA (Hauser y col., 1994). Por lo tanto, estas cepas pueden producir tanto toxinas 16S (HA positivas) como 12S (HA negativas); en el caso de las cepas tipo A también se producen complejos 19S. En las cepas tipo E (Fujii y col., 1993) y F (East y Collins, 1994) las toxinas progenitoras están codificadas por los genes *nt* y *ntnha*, que codifican para NTBo y NTNH respectivamente, por lo que estas cepas sólo producen la toxina 12S. Si bien se ha establecido el o los tipos de toxinas progenitoras producidas por cada uno de

los serotipos, Tabita y col. (1991) informaron el aislamiento de cepas tipo A provenientes de casos de botulismo del lactante no producen toxinas 16S ni 19S. Además, Sugi y col. (1978) sugirieron la importancia del medio donde se desarrolla una cepa, sea sintético o un alimento, en la producción de un determinado tipo de toxina progenitora.



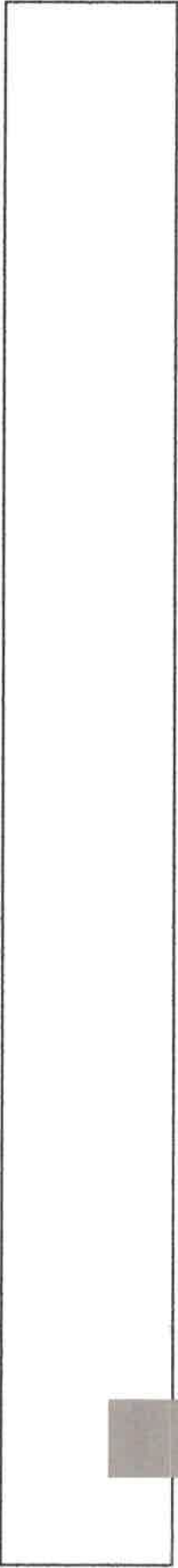
OBJETIVOS

1. Objetivos generales

- Contribuir al conocimiento de la ecología del suelo en lo que respecta a los CPTB.
- Contribuir al conocimiento de la epidemiología del botulismo del lactante.

2. Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de esporas de CPTB y distribución de serotipos en suelos de regiones aún no estudiadas de Argentina.
- Estudiar la relación entre la incidencia del botulismo del lactante y la prevalencia de CPTB en suelos de Argentina.
- Investigar características bioquímicas de cepas de CPTB, aisladas de diversos orígenes.
- Determinar antibiotipos mediante estudios de susceptibilidad antimicrobiana con drogas antianaeróbicas de uso común en clínica humana.
- Determinar propiedades hemaglutinantes de NTBo.
- Estudiar la unión de NTBo a receptores celulares del tipo gangliósidos.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo no selectivos

1.1. Medio de carne picada (MCP)

Carne picada	500g
NaCl	5g
Proteosa peptona (Oxoid)	10g
Agua destilada	1000ml

Se trozó corazón bovino, se eliminó el tejido conectivo y graso y se pasó por máquina de picar carne. Se pesó y se agregó agua destilada en una proporción de 1000 ml cada 500 g de carne; se hirvió durante 45 min. Se llevó a pH 8 con NaOH 10% y luego se hirvió durante 5 min más. Se agregaron 5 g de NaCl por cada 1000 ml y se llevó nuevamente a pH 8. Se agregaron 10 g de proteosa peptona por cada 1000 ml y se dejó hervir un par de minutos más. Se filtró el caldo por tres capas de gasa y una de algodón. La carne, bien escurrida, se colocó en una fuente y se conservó hasta el día siguiente a 4°C. El líquido filtrado se midió con probeta y se llevó a 1000 ml con agua destilada. Se calentó nuevamente el caldo, sin dejar hervir. Se filtró nuevamente a través de papel de filtro grueso. Se colocaron aproximadamente 3 g de carne picada en Erlenmeyer de 125 ml de capacidad y se agregaron 70 ml de caldo; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Antes de la siembra, se calentó el medio por inmersión de los recipientes en baño de agua hirviente durante 15 min. Una vez enfriado a 40-50°C se procedió a sembrar, cubriéndose luego con vaselina sólida estéril previamente fundida, hasta lograr una capa de 3-5 mm de espesor.

1.2. Agar al 1,5%

Extracto de carne	4 g
Glucosa	10 g
Proteosa peptona (Oxoid)	40 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron los componentes en agua destilada. Se ajustó el pH entre 7,0 y 7,2. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Se distribuyó en placas de Petri.

1.3. Agar al 4%

Extracto de carne	4 g
Glucosa	10 g
Proteosa peptona (Oxoid)	40 g
NaCl	5 g
Agar	40 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron los componentes en agua destilada. Se ajustó el pH entre 7,0 y 7,2. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Se distribuyó en placas de Petri.

1.4. Agar yema de huevo (AYH)

Extracto de carne	4 g
Glucosa	10 g
Proteosa peptona (Oxoid)	40 g
NaCl	5 g
Agar	25 g
Suspensión de yema de huevo 50%	50 ml
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron los componentes en agua destilada, excepto la suspensión de yema de huevo. Se ajustó el pH entre 7,0 y 7,2 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Se mantuvo el medio a 60°C y luego, con técnica aséptica, se agregó la suspensión de yema de huevo. Se homogeneizó y se distribuyó en placas de Petri.

1.5. Medio para cultivo y diálisis en sacos de celofán

Tripticasa (BBL)	40 g
Proteosa peptona (Oxoid)	10 g

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada. El pH del medio se ajustó a 7,2. Se colocaron 450 ml del medio en frascos con tapa de goma, con tres orificios, atravesando: un dispositivo para permitir el intercambio gaseoso y dos tubos de vidrio para sostener el saco de celofán y permitir la siembra del microorganismo. Se introdujo en el frasco un tubo de celofán de 40 cm × 25 mm (Arthur H. Thomas N° 4465-A2) y se agregó 50 ml de solución salina (NaCl 0,15 M) en su interior. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 min.

1.6. Infusión cerebro-corazón (BHI)

Infusión cerebro-corazón	37 g
L-Cistina	0,5 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada. El pH del medio se ajustó a 7,2. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

1.7. Agar infusión cerebro-corazón (BHIA)

Infusión cerebro-corazón	37 g
L-Cistina	0,5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada. El pH del medio se ajustó a 7,2. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

1.8. Caldo Peptona-Extracto de levadura-Tripticasa (PET)

Tripticasa	20 g
Proteosa Peptona (Oxoid)	10 g

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Cisteína	0,75
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada. Se disolvió por calentamiento y se ajustó el pH a 7,2. Se esterilizó en autoclave 121°C durante 20 min.

2. Medios diferenciales para pruebas bioquímicas

2.1. Fermentación de carbohidratos

- Solución de carbohidratos

Hidrato de carbono	100 g
Agua destilada	1000 ml

Se utilizaron: glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa y manosa. Cada carbohidrato se solubilizó en agua destilada y se esterilizó por filtración.

- Base de fermentación

Tripticasa	17 g
Peptona	3 g
NaCl	2,5 g
Sulfito de sodio	0,1 g
L-Cistina	0,25 g
Extracto de levadura	2 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Agar	0,7 g
Azul de bromotimol 1%	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Se suspendieron todos los componentes en agua destilada, excepto agar y tioglicolato, que se agregaron luego de ajustar el pH a 7,0. Se disolvió por calentamiento y distribuyó en tubos de ensayo tapa a rosca que contenían campana de Durham invertida. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Para determinar

fermentación de azúcares, se agregó 0,5 ml de las soluciones de hidratos de carbono por cada 8 ml de medio base esterilizado.

2.2. Producción de ureasa

- Caldo urea

Extracto de levadura	1 g
KH ₂ PO ₄	91 g
Na ₂ HPO ₄	95 g
Urea (Difco)	200 g
Rojo fenol	0,1 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada. Se esterilizó por filtración.

- Medio Base

Tripticasa	17 g
Peptona	3 g
NaCl	2,5 g
Sulfito de sodio	0,1 g
L-Cistina	0,25 g
Extracto de levadura	2 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Agar	0,7 g
Agua destilada	1000 ml

Se suspendieron todos los componentes en agua destilada, excepto agar y tioglicolato, que se agregaron luego de ajustar el pH a 6,8. Se disolvió por calentamiento y distribuyó en tubos de ensayo tapa a rosca. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Para determinación de producción de ureasa, se agregó 1 ml de caldo urea por cada 8 ml de medio base de fermentación esterilizado.

2.3. Actividad sobre la leche

- Medio Leche

Leche descremada en polvo	100 g
Limaduras de hierro	cantidad necesaria
Agua destilada	1000 ml

Se disolvió la leche en agua y se distribuyó en tubos tapa a rosca que contenían limaduras de hierro. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.4. Reducción de nitratos

- Medio Indol-Nitrato

Tripticasa	20 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
Glucosa	1 g
Agar	1 g
KNO ₃	1 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada y se ajustó el pH en 7,2. Se disolvió por calentamiento y se distribuyó en tubos tapa a rosca. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

- Reactivos

Solución A

Ácido sulfanílico	5 g
Ácido acético 5N	1000 ml

Solución B

Dimetil-alfa-naftilamina	5 g
Ácido acético 5N	1000 ml

Cada solución se preparó en recipientes separados.

2.5. Producción de indol

- Medio Indol-Nitrato

Se utilizó el medio descrito en el punto 2.4.

- Reactivo de Ehrlich

Alcohol etílico absoluto	95 ml
P-dimetilaminobenzaldehído	1 g
HCl	20 ml

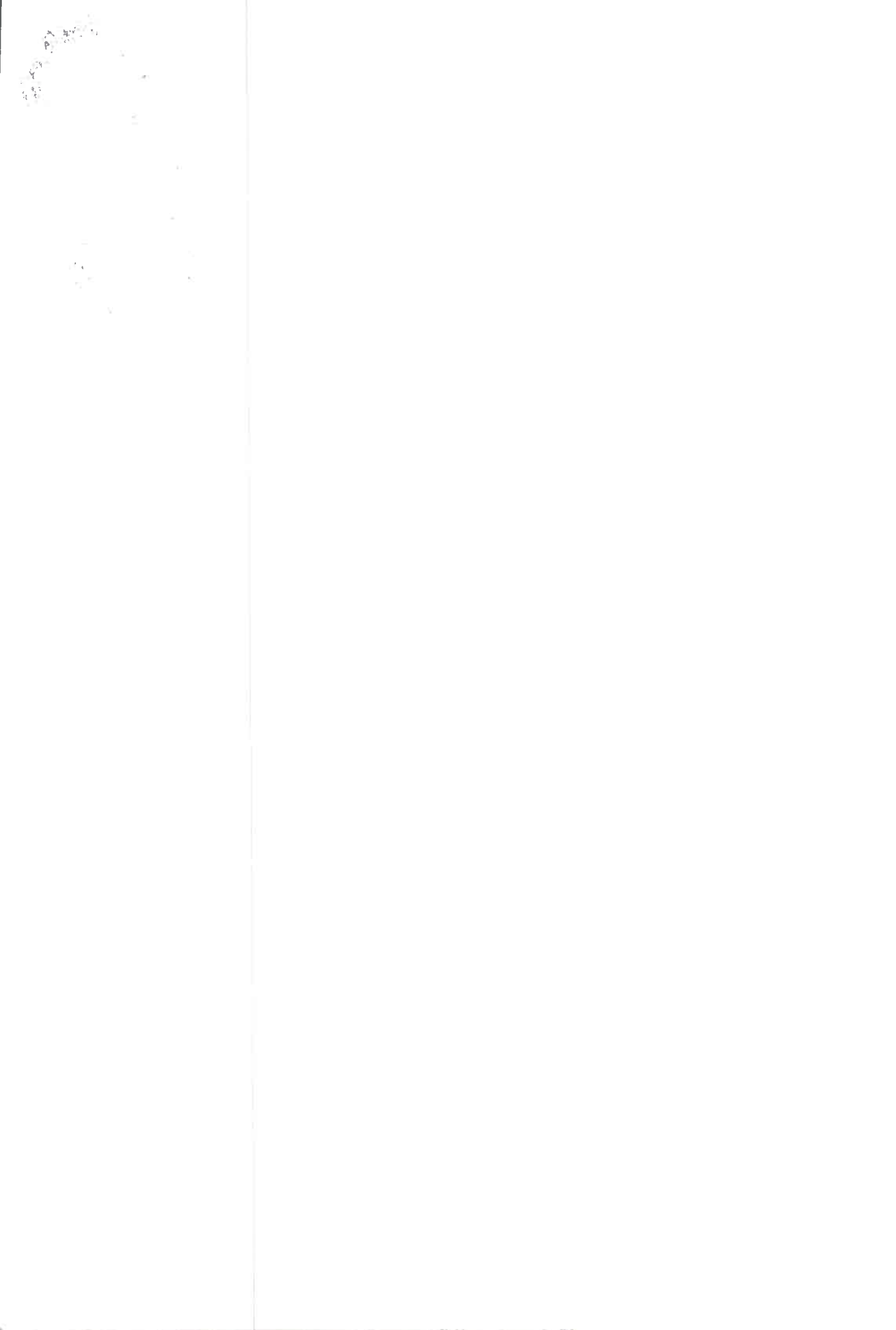
2.6. Producción de H₂S

Tripticasa	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	2 g
Glucosa	5 g
Acetato de plomo 10%	20 ml
Agua destilada	1000 ml

Se suspendieron todos los componentes en agua destilada y se disolvió por calentamiento. Se agregó la solución de acetato de plomo. Se ajustó el pH entre 7,2 y 7,3. Se distribuyó en tubos tapa a rosca y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.7. Motilidad

Bacto-triptosa	8 g
NaCl	5 g
Extracto de carne	1,5 g
Peptona	2,5 g
Agar	4 g
Agua destilada	1000 ml





Se suspendieron todos los componentes en agua destilada y se disolvió por calentamiento. Se ajustó el pH en 7,2. Se distribuyó en tubos tapa a rosca y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.8. Hidrólisis de esculina

- Medio Esculina

Triptosa	10 g
NaCl	5 g
Esculina	1 g
Agar	1 g
Caldo nutritivo	1000 ml

Se suspendieron todos los componentes en agua destilada y se disolvió por calentamiento. Se ajustó el pH en 7,0. Se distribuyó en tubos tapa a rosca y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

- Reactivo

Citrato amónico férrico	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se disolvió el citrato férrico amónico en agua destilada.

2.9. Licuefacción de gelatina

- Medio Tiogel

Peptona Tripticasa	17 g
Peptona	3 g
Glucosa	6 g
NaCl	2 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
L-Cistina	0,25 g
Sulfito de sodio	0,1 g
Gelatina	50 g
Agar	0,7 g

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

Se suspendieron todos los componentes en agua destilada y se disolvió por calentamiento. Se ajustó el pH en 7,0. Se distribuyó en tubos tapa a rosca y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.10. Producción de ácidos grasos volátiles

- Caldo Peptona-Extracto de levadura-Glucosa (PYG)

Peptona (Fisher)	20 g
Extracto de levadura	10 g
Solución salina(*)	40 ml
Cisteína	0,5 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se solubilizaron todos los componentes en agua destilada y se ajustó el pH en 7,2. Se distribuyó en tubos tapa a rosca y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

(*) Solución Salina

CaCl ₂ anhidro	0,2 g
MgSO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaHCO ₃	10 g
NaCl	2 g
Agua destilada	1000 ml

Se mezclaron CaCl₂ y MgSO₄ en 300 ml de agua destilada hasta disolución. Se agregó 500 ml de agua agitando lentamente y se agregaron las sales restantes. Se continuó agitando hasta disolución completa. Se agregó 200 ml de agua destilada. Se conservó a 4°C.

3. Diluyente de Crisley

Para la dilución de las toxinas se utilizó solución diluyente de Crisley, preparada con gelatina 0,2% en solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M de pH 6,5. La gelatina y la solución amortiguadora se prepararon en doble concentración y se esterilizaron por separado. En el momento de su empleo se mezclaron, en forma aséptica, en partes iguales.

4. Indicador de anaerobiosis ($Eh_{(pH\ 7,00; 20^{\circ}C)} = +0.01$ voltios)

Glucosa	0,2 g
Bicarbonato de sodio	0,8 g
Agua destilada	4,5 ml
Azul de metileno 0.3%	50 μ l

En un tubo de 12 \times 75 mm se colocaron todos los componentes y se suspendieron en agua destilada; se agitó y se agregó el azul de metileno.

5. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones albinos de cepa suiza, de 18 a 25 g de peso, de ambos sexos.

6. Antitoxinas botulínicas

Tipo A: Lederle. Lote 1012G. EE.UU. Potencia: 5×10^3 UI por ml.

Tipo B: BWH (William Hooper). Área Microbiología, FCMélicas, UNC, Mendoza, Argentina. Potencia: 1×10^3 a-DL₅₀ por ml.

Tipo C: British Standar. Inglaterra. Potencia: 1×10^2 UI por ml.

Tipo D: British Standar. Inglaterra. Potencia: 1×10^2 UI por ml.

Tipo E: CDC (Centers for Disease Control). EE.UU. Potencia: 1×10^1 UI por ml.

Tipo F: F-ovejá. Área Microbiología, FCM, UNC, Mendoza, Argentina. Potencia: 1×10^5 a-DL₅₀ por ml.

Tipo G: G-oveja antitoxina 89. Área Microbiología, FCM, UNC, Mendoza, Argentina.

Potencia: 5×10^3 a-DL₅₀ por ml.

Todas las antitoxinas se diluyeron con solución salina isotónica (NaCl 0,15 M) hasta obtener 4 UI por ml (1 UI de antitoxina A equivale a 10.000 a-DL₅₀ por ml).

7. Buffers

7.1. Buffer PBS

NaCl	8,5 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,5 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,156 g
Agua destilada	1000 ml

Se disolvieron todos los componentes en agua destilada. El pH se ajustó en 7,2.

7.2. Buffer 1% BSA-PBS

NaCl	8,5 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,5 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,156 g
Albumina sérica bovina	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se disolvieron todos los componentes en agua destilada. El pH se ajustó en 7,2.

7.3. Buffer citrato 0,1 M

A una solución de ácido cítrico 0,1 M se le agregó una solución de citrato de sodio 0,1 M hasta llegar a pH 5,5.

7.4. Buffer citrato 0,05 M

A una solución de ácido cítrico 0,05 M se le agregó una solución de citrato de

sodio 0,05 M hasta llegar a pH 5,5.

7.5. Buffer fosfato 0,05 M

A una solución de Na_2HPO_4 0,05 M se le agregó una solución de NaH_2PO_4 0,05 M hasta llegar a pH 6,0.

8. Solución reveladora para inmunotinción

0,5% 4-cloro-1-naftol (en metanol)	1 ml
H_2O_2	10 μl
Tris-HCl 20 mM, pH 7.5	29 ml

Se colocó el buffer en baño a 37°C y se agregó el 4-cloro-1-naftol. Luego se agregó el H_2O_2 .

9. Suspensión de glóbulos rojos

Se recolectó sangre fresca humana en recipiente con anticoagulante. Se centrifugó para separar el plasma y se lavó cuatro veces con solución salina isotónica (NaCl 0,15 M). Luego, se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 2% en solución salina isotónica. Se conservó refrigerada a 4°C.

10. Cepas de CPTB

Se utilizaron 40 cepas de CPTB aisladas de diferentes orígenes (suelo, casos de botulismo del lactante, brotes de botulismo alimentario, polvo ambiental y muestras de manzanilla) y seis cepas de colección (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas de CPTB de colección y aisladas de diferentes orígenes.

Cepa	Tipo serológico	Origen
A-Hall	A	Cepa de colección ⁽¹⁾
A-BL10	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL12	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL13	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL17	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL18	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL20	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL21	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL22	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL23	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL24	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL25	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL27	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-BL43	A	Caso de botulismo del lactante, Mendoza ⁽²⁾
A-Berenjena	A	Brote de botulismo alimentario, Mendoza ⁽²⁾
A-Pepino	A	Brote de botulismo alimentario, Mendoza ⁽²⁾
A-Queso	A	Brote de botulismo alimentario, San Juan ⁽²⁾
A-Jardinera	A	Brote de botulismo alimentario, Mendoza ⁽²⁾
A-Manz2	A	Manzanilla comercial, Mendoza ⁽²⁾
A-Manz20	A	Manzanilla comercial, Mendoza ⁽²⁾
A-AMB15	A	Polvo ambiental, Mendoza ⁽²⁾
A-M110	A	Suelo, Mendoza ⁽²⁾
A-ER1423	A	Suelo, Entre Ríos ⁽²⁾
A-F1575	A	Suelo, Formosa ⁽²⁾
A-M1814	A	Suelo, Mendoza ⁽²⁾
A-M1822	A	Suelo, Mendoza ⁽²⁾
A-M1823	A	Suelo, Mendoza ⁽²⁾
B-WH	B	Cepa de colección ⁽¹⁾
B-M612	B	Suelo, Mendoza ⁽²⁾
B-M609	B	Suelo, Mendoza ⁽²⁾
C-London	C	Cepa de colección ⁽¹⁾
D-Africa	D	Cepa de colección ⁽¹⁾
E-Japón	E	Cepa de colección ⁽¹⁾
E-Malbrán	E	Cepa de colección ⁽¹⁾
E-Ch1128	E	Suelo, Chubut ⁽²⁾
ER1723	NI ⁽³⁾	Suelo, Entre Ríos ⁽²⁾
F-Langeland	F	Cepa de colección ⁽¹⁾
F-Anchoa	F	Brote de botulismo alimentario, Mendoza ⁽²⁾
F-AMB268	F	Polvo Ambiental, Mendoza ⁽²⁾
F-AMB270	F	Polvo Ambiental, Mendoza ⁽²⁾
F-ER1425	F	Suelo, Entre Ríos ⁽²⁾
F-BA160	F	Suelo, Buenos Aires ⁽²⁾
F-T824	F	Suelo, Tucumán ⁽²⁾
F-T843	F	Suelo, Tucumán ⁽²⁾
G-89	G	Cepa de colección ⁽¹⁾
G-Briozzo	G	Cepa de colección ⁽¹⁾

(1) Cepario del Área Microbiología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo; (2) Cepas aisladas en el laboratorio del Área Microbiología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo; (3) NI: tipo serológico no identificado aún.

11. Detección de CPTB en suelos y muestras clínicas

11.1. Tipos de muestras

Durante este trabajo de tesis se tomaron y analizaron 445 muestras de suelo: 251 de Entre Ríos, 27 de Chaco, 78 de Formosa, 60 de Misiones y 29 de Buenos Aires. Para lograr la validez estadística de los datos se requiere un número mínimo de 30 muestras por provincia; sin embargo, esto no fue posible en Buenos Aires y Chaco. El bajo número de muestras de Buenos Aires se debe a que, si bien se intentó el contacto con varias municipalidades de la provincia, sólo dos (Colón y Zárate) enviaron muestras de suelos. En el caso de Chaco, se realizó un convenio con la Universidad Nacional de Formosa, recibándose sólo 27 muestras.

De acuerdo con el objetivo principal de completar el mapa de distribución de CPTB en suelos de Argentina, posteriormente se recopilaron los datos provenientes de estudios previos a este trabajo y se realizó un análisis estadístico de los mismos. Así, las 445 muestras estudiadas durante el presente trabajo se sumaron a 1564 analizadas previamente, resultando un total de 2009 muestras. Debido a la gran heterogeneidad en el número de muestras de las diferentes provincias, y para lograr la validez estadística de los datos, las provincias se agruparon por regiones. Después de analizar diversos esquemas de regionalización y de estudiar las características climáticas, geográficas y topológicas, se optó por el establecido por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, resultando la siguiente agrupación: 1) Región Centro: Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe; 2) Región Nordeste: Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones; 3) Región Noroeste: Catamarca, Jujuy, La Rioja, Salta, Santiago del Estero y Tucumán; 4) Región Oeste: Mendoza, San Juan y San Luis; 5) Región Sur: Chubut, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz, Tierra del Fuego y Sector Antártico. Estas regiones presentan características climáticas y geográficas particulares, que se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Características climáticas, topológicas y geográficas de cinco regiones de Argentina.

Región	Localización	Área (km ²)	Clima	Precipitaciones anuales (mm)	Temperatura media anual	Vientos (km/h)
Centro	28°-41° lat ⁽¹⁾ S ⁽²⁾ 57°-68° long ⁽³⁾ O ⁽⁴⁾	824.493	Templado	500	15°C	9-17
Nordeste	23°-30° lat S 63°-53° long O	289.699	Subtropical sin estación seca en E ⁽⁵⁾	500-1.500	21°C	7-14
Noroeste	22°-32° lat S 69°-62° long O	559.864	Árido; Subtropical en NE ⁽⁶⁾	250; 1.500 en NE	18-22°C	4-18
Oeste	28°-38° lat S 65°-71° long O	315.226	Árido	300	14-16°C	8-15
Sur	38°-55° lat S 63°-73° long O	787.291	Frío y árido	250 en NO ⁽⁷⁾ y 1.500 en E	0-10°C	13-30

(1) lat: latitud; (2) S: sur; (3) long: longitud; (4) O: oeste; (5) E: este; (6) NE: nordeste; (7) NO: noroeste

Se tomaron muestras de suelos vírgenes y no vírgenes. El suelo virgen se definió por la ausencia obvia de su laboreo y la existencia de flora autóctona. Suelo urbanizado se consideró aquel que fue modificado por la mano del hombre para la construcción de viviendas, caminos, industrias, etc.

Durante este trabajo también se estudiaron muestras de alimentos, sangre, heces, contenido gástrico y heridas obtenidas de casos de botulismo humano.

11.2. Recolección de las muestras

Las muestras de suelo se recogieron con cucharilla esterilizada y se colocaron en bolsas de polietileno estériles y rotuladas. La porción de suelo escogida, de unos 100 cm², se raspó con el canto de la cucharilla, eliminando unos 2 a 5 mm de la superficie; luego, con la cucharilla se picó hasta unos 3 cm de profundidad, homogeneizando *in situ* la muestra antes de su inmediata recolección (Giménez y Ciccarelli, 1970b).

De los casos sospechosos de botulismo humano se tomó muestras de sangre, contenido intestinal o heridas, dependiendo del tipo de botulismo; en el caso de sospecharse botulismo alimentario se tomó muestra de los posibles alimentos implicados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas durante el traslado y hasta el momento de su procesamiento.

11.3. Estudio de las muestras

Se investigó la presencia de CPTB en todos los tipos de muestras, excepto en suero sanguíneo, y la detección directa de la NTBo se realizó en las muestras clínicas y de alimentos. En todos los casos se utilizó el método de bioensayo en ratón.

11.3.1. Investigación de CPTB

Las muestras de suelo se procesaron suspendiendo 25 g de suelo en 50 ml de solución salina isotónica (NaCl 0,15 M), agitando vigorosamente. Después de 40 min de reposo se tomaron dos alícuotas: una se sembró directamente en MCP y la otra se sometió a un tratamiento térmico (80°C, 10 min) y posteriormente se sembró en MCP. Ambos caldos se incubaron 5 días a 34°C. Luego de la incubación, los caldos sembrados con las alícuotas calentada y sin calentar se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante 10 min a 4°C y posteriormente se inocularon por duplicado en ratones, por vía intraperitoneal (IP). Los ratones fueron observados durante 96 h para detectar signos y muerte compatibles con botulismo.

En las muestras positivas se realizó la prueba de neutralización semicuantitativa frente a antitoxinas polivalente (ABFG) y tipo específicas (A, B, F y G) (cuando fue necesario se utilizó antitoxinas C, D y E). Para ello se incubó a 34°C durante 20 min partes iguales de toxina y antitoxina (a nivel de, aproximadamente, 2.000 DL₅₀ por ml). La estimación aproximada de la potencia de las toxinas se realizó basándose en la relación entre el tiempo de muerte de los animales y la concentración de la toxina (Schantz, 1964). Se utilizó una mezcla de toxina y diluyente de Crisley como control. Se inoculó 0,5 ml de cada mezcla en ratón, por duplicado, vía IP. Los ratones inoculados fueron observados durante 96 h.

Las muestras de contenido intestinal se homogeneizaron con diluyente de Crisley. Luego se centrifugó a $12.000 \times g$, durante 20 min a 4°C. El sedimento obtenido por centrifugación se resuspendió en solución salina isotónica (NaCl 0,15 M). Se tomaron dos alícuotas: una se sembró directamente en MCP y la otra se sometió a un tratamiento térmico (80°C, 10 min) y posteriormente se sembró en MCP. Se prosiguió de la misma manera que con las muestras de suelo. En el caso de las muestras de alimentos, cuando contenían una fase líquida se trituraron directamente en

homogeneizador hermético, mientras que si eran sólidos se trituraron con cantidad suficiente de diluyente de Crisley y posteriormente se procedió como con las muestras de suelo.

11.3.2. Investigación directa de NTBo

Para la investigación directa de NTBo en suero sanguíneo se inoculó en ratón por vía IP 1 ml de suero del paciente; simultáneamente se realizó la prueba de neutralización, para lo cual se inoculó en ratón por vía IP 1,1 ml de una mezcla de 2,3 ml de suero con 0,23 ml de antitoxina polivalente. Para la investigación directa de NTBo en contenido intestinal y alimentos, se inoculó en ratón por vía IP el sobrenadante de la centrifugación (obtenido como se explicó en el punto 11.3.1). Se procedió simultáneamente con la prueba de neutralización.

11.3.3. Aislamiento y purificación de cepas

A partir de los caldos positivos para NTBo se intentó el aislamiento de las cepas de CPTB en medios sólidos (agar 1,5%, agar 4% y AYH). Se incubaron a 34°C durante 24, 48 y 72 h respectivamente, en jarras con atmósfera interna anaeróbica (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%). En el medio con agar al 1,5% se puede observar una película o colonias planas muy extendidas que desarrollan cepas móviles de *C. botulinum*. En el medio con agar al 4% se obtienen colonias bien circunscriptas, lo cual permite la descripción morfológica de las mismas. En el AYH se evidencia la producción de lipasa mediante la observación de iridiscencia en el borde y superficie de la colonia e incluso, a veces, un halo bien manifiesto.

Estudiada la morfología de las colonias bajo lupa, se tomaron del agar al 4% unas diez colonias aisladas, transfiriendo cada una a MCP en tubos tapa a rosca. De los cultivos en medio con agar al 1,5% se realizaron dos a cuatro subcultivos a partir de los bordes de avance de la película o de bordes de colonias extendidas. Del AYH se transfirieron dos a cuatro colonias lipolíticas a MCP. Todos los tubos de MCP se incubaron a 34°C durante 5 días y se inocularon 0,5 ml del cultivo vía IP en ratón, por duplicado.



Para controlar la pureza de las cepas aisladas, se sembró en dos placas con agar al 4 %. Una placa se incubó a 34°C en aerobiosis y la otra a 34°C en jarra con atmósfera interna anaeróbica. Si no hay desarrollo en la placa incubada en aerobiosis y se observan colonias con morfología homogénea en la placa incubada en anaerobiosis se considera cepa aislada pura. Cuando fue necesario, se realizaron sucesivos subcultivos a partir de una colonia de la placa con agar al 4% o AYH y nuevo control de pureza, hasta asegurar un cultivo puro.

11.3.4. Identificación serológica cuantitativa

Una vez obtenidos los cultivos puros, las cepas fueron cultivadas en MCP e incubadas a 34°C durante 18 h. Una alícuota fue sembrada en medio PET y el cultivo fue incubado en anaerobiosis a 34°C durante 5 días. Luego el caldo se centrifugó a $12.000 \times g$, 10 min a 4°C y posteriormente se inoculó 0,5 ml en ratón, vía IP, por duplicado. Luego se procedió a determinar el título de la toxina, de acuerdo a lo detallado en el punto 11.3.4.1.

La identificación serológica definitiva se realizó mediante pruebas de neutralización cuantitativas a nivel de 4.000 DL₅₀ por ml. Diluciones de toxina con 8.000 DL₅₀ por ml se mezclaron con volúmenes iguales de antitoxinas botulínicas (a nivel de 4UI por ml). Las mezclas, adecuadamente agitadas, se incubaron durante 20 min a 34°C. Se utilizó una mezcla de toxina y diluyente de Crisley como control. Se inocularon 0,5 ml por ratón, por duplicado, vía IP. Los ratones fueron observados durante 96 h.

Cuando no se alcanzó un título de toxina de 8.000 DL₅₀ por ml, se realizó producción de toxina en altas dosis por cultivo y diálisis en sacos de celofán (Sterne y Wentzel, 1950), como se detalla en el punto 11.3.4.2.

Cuando la toxina no pudo ser identificada por el método anteriormente descrito, se preparó la antitoxina correspondiente a la cepa, de acuerdo a la metodología detallada en el punto 11.3.4.3, y se determinó la potencia de la antitoxina, según se explica en el punto 11.3.4.4. Luego, se enfrentó la antitoxina de la cepa no identificada con las toxinas botulínicas conocidas a niveles de 20, 200 y 2.000 DL₅₀ por ratón, de acuerdo a lo detallado en el punto 11.3.4.5.

11.3.4.1. Titulación de las toxinas

Se realizaron diluciones seriadas de la toxina en escala logarítmica en base 10 y se inocularon dos ratones por dilución, para una estimación preliminar aproximada de la concentración de la toxina. Para la titulación se realizaron diluciones seriadas de la toxina, en escala logarítmica en base 2. Se inocularon 0,5 ml de cada dilución, vía IP, a lotes de 10 animales. Se registró la letalidad en cada lote hasta las 96 h de observación. En todas las pruebas de titulación se usó solución diluyente de Crisley. El título de la toxina, expresado en DL_{50} por ml, se estimó por el método de Reed y Muench (1938).

11.3.4.2. Producción de toxinas en altas dosis (Sterne y Wentzel, 1950)

Se realizó un cultivo en MCP de la cepa pura y se incubó a 34°C durante 18 h. Una alícuota fue sembrada en un saco de celofán (Arthur H. Thomas, catálogo N° 4465-A2, ancho 25 mm) sumergido en medio de producción de toxina. Luego de incubar en anaerobiosis durante seis días a 34°C, el contenido del saco de celofán fue centrifugado a $12.000 \times g$, 10 min a 4°C.

11.3.4.3. Producción de antitoxina en conejo

Para la preparación del toxoide se agregó formol (concentración final de formaldehído 0,5%) a la toxina obtenida según lo descrito en el punto 11.3.4.2. Se incubó a 37°C durante un periodo variable, de 5 a 20 días, hasta que la inoculación de 0,5 ml por vía IP en ratón demostró la pérdida de toxicidad.

Para la producción de antitoxinas se utilizaron conejos hembra, de raza californiana, de 2.500 a 3.000 g. Cada animal recibió dos dosis de 4 ml de toxoide adsorbido (con adyuvante de Freund completo): 2 ml vía subcutánea (SC) y 2 ml intramuscular (IM) en miembros posteriores (1 ml en cada miembro), con un mes de intervalo entre cada dosis. A continuación recibieron 10 dosis de 1ml de toxoide fluido (0,5 ml IM y 0,5 ml endovenoso) con un intervalo irregular de siete a diez días entre cada dosis. Aproximadamente a los 13 a 15 días después de la séptima dosis se realizó una sangría parcial, mediante punción cardiaca. Con el suero obtenido se hizo una

estimación de la concentración de antitoxina en el animal, para poder determinar las DL_{50} de toxina a ser inoculadas. Luego se continuó la inmunización de los conejos con toxina activa, inoculándose seis dosis de 1 ml, por vía SC, con un intervalo de siete días entre cada dosis. A los 20 días de la última dosis los animales se sangraron a blanco por punción cardíaca.

11.3.4.4. Titulación de las antitoxinas

Diluciones seriadas de la antitoxina en escala logarítmica en base 10, se mezclaron en partes iguales con la toxina homóloga (para un nivel de 400 DL_{50} por ratón) e incubaron 20 min a 34°C. Se realizó una estimación preliminar aproximada de la concentración de la antitoxina inoculando dos ratones por dilución. Para la titulación final se realizaron diluciones seriadas de la antitoxina, en escala logarítmica en base 1,2; cada dilución se mezcló con igual volumen de una dilución de la toxina (para un nivel de 400 DL_{50} por ratón) y se incubaron 20 min a 34°C; luego se inocularon 0,5 ml a lotes de seis ratones por dilución. El título de cada antitoxina, expresado en anti-dosis letales 50 ($a-DL_{50}$) por ml, se calculó en base a la más alta dilución de antitoxina que protegió al 100% de los animales durante 96 horas.

11.3.4.5. Pruebas serológicas a tres niveles de potencia (Giménez y Giménez, 1995)

En algunos casos particulares, cuando se sospechó un subtipo, un nuevo tipo serológico o una variante intratípica, fue necesario realizar pruebas de neutralización a tres niveles de toxina: 20, 200 y 2.000 DL_{50} por ratón. Diluciones de toxina con 80, 800 y 8.000 DL_{50} por ml respectivamente para cada uno de aquellos niveles de prueba, se mezclaron con volúmenes iguales de antitoxina con 40.000 $a-DL_{50}$ por ml. Las mezclas, adecuadamente agitadas, se incubaron 20 min a 34°C. Se utilizó una mezcla de toxina y diluyente de Crisley como control. Se inoculó vía IP un volumen de 0,5 ml por ratón, por duplicado. Los ratones fueron observados durante 96 h.

12. Determinación de pH y materia orgánica de suelos

Fueron realizadas en el Área Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Cuyo) en colaboración con el Ing. Agr. J. A. Maffei. La determinación de materia orgánica se realizó mediante oxidación con $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 y posterior valoración (Walkley y Black, 1934). La determinación de pH se efectuó de dos maneras: (1) muestra de suelo humedecida hasta saturación y (2) suspensión de suelo en agua 1:2,5.

13. Identificación bioquímica de cepas de CPTB

Los clostridios fueron caracterizados teniendo en cuenta aspectos morfológicos, tintoriales y bioquímicos. Se utilizó coloración de Gram de cultivo de 24 h para observar tamaño y forma de los microorganismos, como así también presencia y localización de esporas. La producción de lipasa y lecitinasa se evidenció en AYH. La actividad proteolítica fue determinada por cultivo en MCP. La serie básica de pruebas bioquímicas consistió en: fermentación de glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa y manosa; producción de ureasa; acción sobre la leche; reducción de nitratos; producción de indol y ácido sulfhídrico; motilidad; hidrólisis de esculina y gelatina. Se incluyó cromatografía en fase gaseosa para la detección de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico y caproico).

Las cepas de CPTB fueron cultivadas en MCP a 34°C durante 24 h, en anaerobiosis. A partir de estos cultivos se sembró en cada uno de los medios para determinación de características bioquímicas. Se utilizó siempre un testigo sin sembrar. Se incubó en jarra de anaerobiosis, a 34°C. A las 48 h se realizó la primera lectura de pH en las pruebas de fermentación de azúcares y la preparación de las muestras para determinación de ácidos grasos volátiles por cromatografía. Se incubó nuevamente en anaerobiosis, a 34°C hasta completar siete días. Se realizó la segunda lectura de pH en las pruebas de fermentación de azúcares y demás determinaciones.

13.1. Fermentación de hidratos de carbono

A las 48 h y a los siete días de incubación se realizó la lectura de pH del medio y se observó producción de gas. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Ácido (fermentación del hidrato de carbono): pH menor a 5,5
- Reacción débil (fermentación débil del hidrato de carbono): pH entre 5,5 y 5,9
- Reacción negativa (sin fermentación del hidrato de carbono): pH superior a 6

13.2. Producción de ureasa

Luego de siete días de incubación se observó la coloración del medio de cultivo:

- Reacción positiva (presencia de la enzima ureasa): coloración rojo intenso
- Reacción negativa (ausencia de la enzima ureasa): no hay cambio de color

13.3. Actividad sobre la leche

Luego de siete días de incubación, se observó la acción sobre la leche:

- Coagulación: precipitación de la caseína
- Digestión: digestión de la caseína
- Sin reacción: no se observan cambios en el medio

13.4. Reducción de nitrato

Luego de siete días de incubación se reveló por adición al cultivo de 5 gotas de solución A y cinco de solución B. Cuando no se observó color rojo se agregó Zn en polvo. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Reacción positiva (presencia de la enzima nitrato reductasa): color rojo
- Reacción positiva (presencia de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa): no se observa color rojo con el agregado de Zn
- Reacción negativa (ausencia de ambas enzimas): rojo al agregar Zn

13.5. Producción de indol

Luego de siete días de incubación, se reveló con reactivo de Ehrlich, previa extracción con cloroformo. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Reacción positiva (presencia de la enzima triptofanasa): color rojo
- Reacción negativa (ausencia de la enzima triptofanasa): no hay cambio de color

13.6. Producción de H₂S

Luego de siete días de incubación se observó coloración del medio. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Reacción positiva (con producción de H₂S): se observa coloración negra
- Reacción negativa (sin producción de H₂S): no hay cambio de color

13.7. Motilidad

Luego de siete días de incubación se observó el desarrollo del microorganismo sobre la línea de siembra.

13.8. Hidrólisis de esculina

Luego de siete días de incubación se reveló con citrato férrico amónico 1%. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Reacción positiva (hidrólisis de esculina): se observa coloración castaño oscuro
- Reacción negativa (sin hidrólisis de esculina): no hay cambio de color

13.9. Licuefacción de gelatina

Luego de los siete días de incubación, los cultivos y el control fueron mantenidos a 4°C. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Reacción positiva: se observa licuefacción
- Reacción negativa: no se observa licuefacción

13.10. Producción de ácidos grasos volátiles

- Preparación de la muestra

Luego de 48 h de incubación, se colocaron 4 ml de cada cultivo en tubo de centrífuga y se llevó a pH 2-3 con H₂SO₄ 50%. Se agregó 1 ml de éter y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 1.500 × g durante 5 min. Se llevó a -20°C h durante 1 h y luego se pasó la capa etérea a un tubo que contenía sulfato de amonio anhidro. Se mantuvo a 0°C hasta el momento de realizar la corrida cromatográfica.

- Preparación del testigo de ácidos grasos volátiles

Ácido acético	10 µl
Ácido propiónico	10 µl
Ácidoisobutírico	10 µl
Ácido butírico	10 µl
Ácido isovalérico	10 µl
Ácido valérico	10 µl
Ácido isocaproico	10 µl
Ácido caproico	10 µl
Éter	10 ml

14. Determinación de antibiotipo farmacológico

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) se empleó el método de dilución en agar (método de referencia del National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]). Se realizaron diluciones seriadas en base dos de los antibióticos (ampicilina, amoxicilina y amoxicilina-sulbactama) en agua destilada, hasta obtener concentraciones comprendidas entre 20 y 0,3 µg por ml. Se agregó 1,2 ml de cada dilución a 10,8 ml de BHIA fundido (a 50°C aproximadamente) a fin de obtener diluciones 1:10 del antibiótico, se mezcló por inversión y se vertió en placas de Petri. Por otro lado se cultivó cada cepa en MCP, 24 h a 34°C, y a partir de este cultivo se sembró en medio sólido, en anaerobiosis, 48 h, a 34°C. A partir de estas placas se realizó una suspensión bacteriana en BHI, con una densidad equivalente al 0,5 de la

escala de Mc Farland. Se sembró 4 μ l de la suspensión bacteriana en cada placa de Petri con antibiótico, a fin de obtener una concentración final de 1×10^5 UFC por placa. Se utilizó una placa sin antibiótico como control de crecimiento. Se incubó en anaerobiosis, a 34°C, durante 48 h. La CIM se consideró como la menor concentración de antibiótico que produjo cambios (ausencia de crecimiento, disminución notoria en el tamaño y número de colonias, etc.) en el desarrollo del microorganismo con respecto al control. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Las CIM₅₀ y CIM₉₀ fueron consideradas como la concentración de antibiótico que inhibió el desarrollo del 50% y 90% de la población, respectivamente.

15. Test de hemaglutinación para NTBo

Las cepas de CPTB se cultivaron en medio PET y se incubaron 5 días a 34°C en anaerobiosis. La toxina se obtuvo mediante centrifugación del medio a $12.000 \times g$, 20 min, 4°C. Para la prueba de hemaglutinación se utilizaron policubetas. Se realizaron diluciones en base dos de las toxinas, utilizando PBS como diluyente y se mezclaron con igual volumen de suspensión de glóbulos rojos al 2%. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se procedió a la lectura. En cada prueba se utilizaron controles positivos y negativos de hemaglutinación. Las pruebas se realizaron por duplicado y se repitieron al menos dos veces. La formación de un botón en el fondo del pocillo se interpretó como negativo.

16. Inmunotinción de cromatografía en capa delgada (TLC) para identificación de receptores celulares del tipo gangliósidos

Se sembró 10 μ l de una suspensión 0,3 nM de gangliósidos totales, extraídos de cerebro humano (cedidos por Dr. G. A. Nores, CIQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba), en placa de TLC. Se separaron por cromatografía mediante corrida en solvente cloroformo-metanol-CaCl₂ acuoso (45:45:10) utilizando un recipiente diseñado para obtener cromatogramas altamente reproducibles (Nores y col., 1994). Luego de la corrida, las placas se dejaron secar y se sumergieron en una solución 0,5% de polyisobutylmetacrilato en hexano-cloroformo (9:1), para plastificar las placas. Se dejó



secar 10 min. Cada placa se incubó con 800 μ l de toxina (obtenida de acuerdo a lo detallado en el punto 17.2) diluida (1:2) en 1% BSA-PBS, durante 24 h a 20°C. Luego, se lavó tres veces con PBS y se incubó con 800 μ l de antitoxina diluida (1:250) en 1% BSA-PBS, durante 1 h 30 min, a 20°C. Se lavó tres veces con PBS y se incubó con 800 μ l de anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo, diluido (1:2.500) en 1% BSA-PBS, durante 1h 30 min, a 20°C. Se lavó tres veces con PBS y se procedió al revelado. Se utilizó una placa de TLC sembrada con 10 μ l de suspensión 0,3 nM de gangliósidos totales revelada con solución de orcinol al 0,5% en H₂SO₄ 3 N, como control.

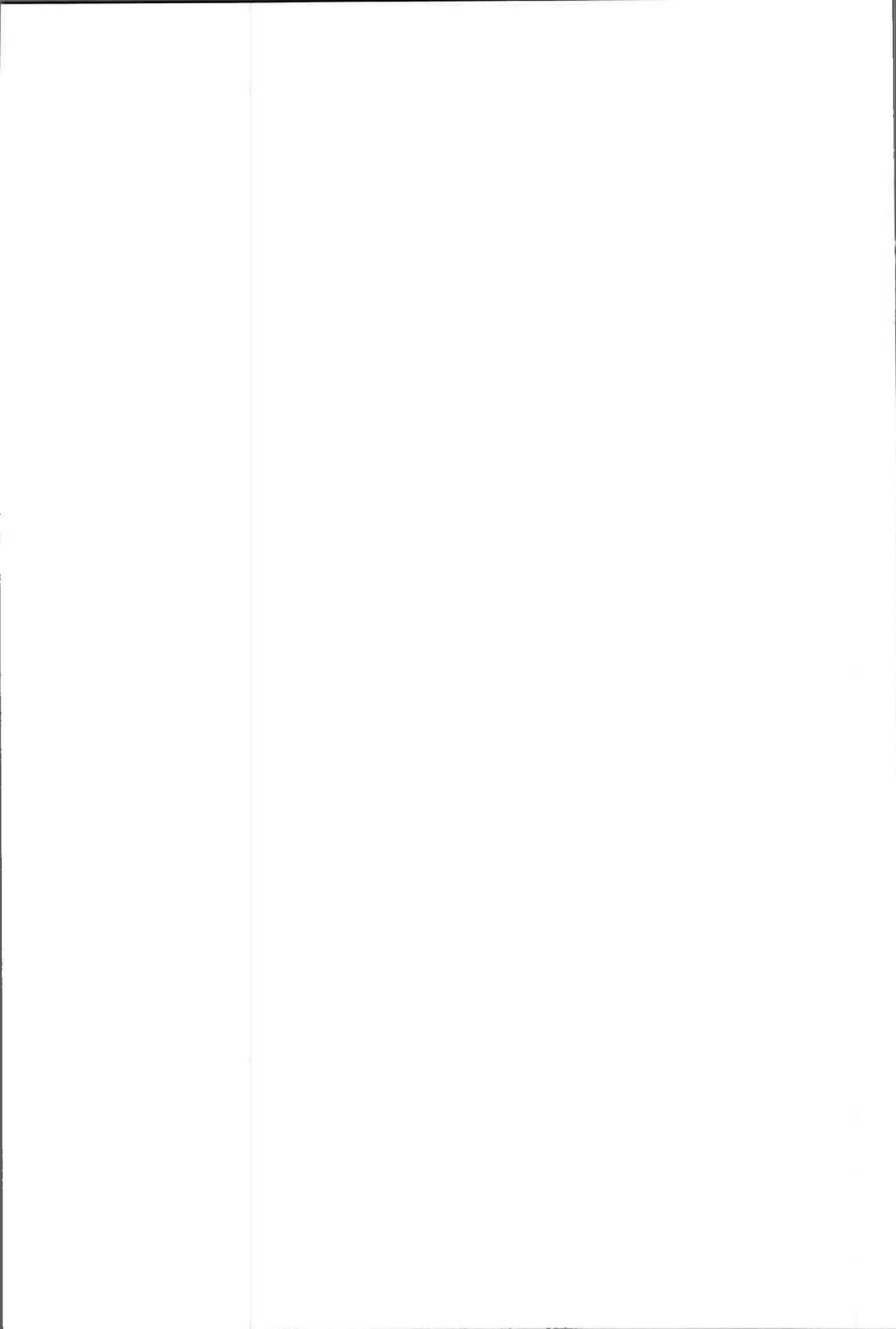
17. Obtención de toxinas botulínicas en altas dosis

17.1. Precipitación simple con sulfato de amonio

A partir de cultivo en caldo Peptona-Extracto de levadura-Trypticasa (PET) de 5 días de incubación, se realizó precipitación con sulfato de amonio (39,1 g/100 ml) durante 24 h, a 4°C. El precipitado se recolectó por centrifugación (20.000 \times g, 20 min, 4°C) y se resuspendió en volumen suficiente de diluyente de Crisley.

17.2. Precipitación ácida y extracción (Das Gupta y Sathyamoorthy, 1984)

Se realizó cultivo de la cepa en MCP y se incubó a 34°C, 24 h. Una alícuota fue sembrada en un saco de celofán (Sterne y Wentzel, 1950) sumergido en medio de producción de toxina. Se incubó durante 5 días a 34°C y luego el contenido del saco de celofán se acidificó hasta pH 3,5 con H₂SO₄ 3 N. Luego de 4 h a temperatura ambiente se descartó el sobrenadante clarificado y el sedimento se recolectó por centrifugación (2.400 \times g, 20 min, 4°C). Se lavó dos veces con agua destilada. El precipitado se resuspendió en buffer citrato 0,1 M pH 5,5 y se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Se centrifugó (9.800 \times g, 20 min, 4°C) y el sedimento se resuspendió nuevamente en el mismo buffer para una segunda extracción, realizada de la misma forma que la primera. Los sobrenadantes de las dos extracciones fueron mezclados y parcialmente saturados con sulfato de amonio (35,1 g/100 ml). Se dejó en reposo 18 h a 4°C. El



precipitado, recolectado por centrifugación ($12.000 \times g$, 20 min, 4°C), se resuspendió en buffer fosfato 0,05 M pH 6,0 y se precipitó nuevamente con sulfato de amonio (35,1g/100 ml). Se dejó en reposo a 8°C durante 16 h. El precipitado, recolectado por centrifugación ($17.000 \times g$, 20 min, 4°C), se resuspendió en buffer citrato 0,05 M, pH 5,5 y se dializó con el mismo buffer durante 18 h, con tres cambios de buffer.

18. Tratamiento estadístico

Para determinar la relación entre prevalencia de esporas de CPTB en suelos y números de casos de botulismo del lactante se realizó una prueba de correlación lineal. Para comparar las prevalencias de CPTB de provincias y regiones se utilizó la prueba de Chi-cuadrado.





RESULTADOS



1. Presencia de CPTB en suelos de Argentina

Este trabajo de tesis es parte de una línea de investigación iniciada en 1964 para investigar la prevalencia de CPTB en suelos de Argentina. Como objetivo inicial, se propuso continuar con la línea de investigación, analizando suelos de alguna provincias aún no estudiadas, para lo cual se investigó la presencia de CPTB en 445 muestras: 251 de Entre Ríos, 27 de Chaco, 78 de Formosa, 60 de Misiones y 29 de Buenos Aires. De acuerdo con el objetivo principal de completar el mapa de distribución de CPTB en suelos de Argentina, se recopilaron los datos provenientes de estudios previos a este trabajo y se realizó un análisis estadístico de los mismos. Así, las 445 muestras estudiadas durante el presente trabajo se sumaron a 1564 analizadas previamente, quedando un total de 2009 muestras. Debido a la gran heterogeneidad en el número de muestras de las diferentes provincias, y para lograr la validez estadística de los datos, se decidió agrupar las provincias por regiones, las cuales fueron descritas en el punto 11.1 de la sección Materiales y Métodos. En la Tabla 4 se detalla el número de muestras por región, analizadas durante el presente trabajo y las recopiladas de estudios anteriores.

Tabla 4. Número de muestras analizadas por región.

Región	Muestras estudiadas		
	En el presente trabajo	En trabajos anteriores	Total de muestras
Centro	280	205	485
Nordeste	165	105	270
Noroeste	-	283	283
Oeste	-	481	481
Sur	-	490	490
Total	445	1564	2009

A continuación se muestran los resultados de las 445 muestras de suelo y luego el análisis estadístico realizado con el total de muestras de Argentina.



1.1. CPTB en suelos de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Formosa y Misiones

Se analizó un total de 445 muestras de suelo virgen y no-virgen, de las cuales 47 (10,6%) resultaron positivas para la presencia de CPTB (Tabla 5). La prevalencia de CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes fue similar en la provincia de Entre Ríos, mientras que en Formosa fue mayor en suelos no-vírgenes (Tabla 6). En las provincias de Buenos Aires y Chaco no se pudo realizar este tipo de comparación ya que sólo se contó con muestras de suelos no-vírgenes. Las muestras de suelo, vírgenes y no-vírgenes, obtenidas de la provincia de Misiones resultaron negativas. El serotipo A se detectó en 20 muestras positivas (42,5%), el serotipo B en 10 (21,3%), el serotipo F en una (2,1%) (Tabla 7). En el 34,1% de las muestras positivas (16/47) no se pudo determinar el tipo serológico, ya que si bien en el bioensayo a partir de los cultivos primarios se observaron signos y muerte compatibles con NTBo, no se pudo realizar la prueba de neutralización cuantitativa definitiva por no aislarse la cepa.

Tabla 5. CPTB en suelos de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Formosa y Misiones.

Provincia	Muestras de suelo (n=445)		
	Positivas	Total	%
Buenos Aires	3	29	10,3
Chaco	3	27	11,1
Entre Ríos	35	251	13,9
Formosa	6	78	7,7
Misiones	0	60	0,0
Total	47	445	10,6



Tabla 6. CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Formosa y Misiones.

Provincia	Tipo de suelo					
	No-virgen ⁽¹⁾			Virgen ⁽²⁾		
	Positivas	Total	%	Positivas	Total	%
Buenos Aires	3	29	10,3	-	-	-
Chaco	3	27	11,1	-	-	-
Entre Ríos	29	207	14,0	6	44	13,6
Formosa	6	70	8,6	0	8	0,0
Misiones	0	49	0,0	0	11	0,0
Total	41	382	10,7	6	63	9,5

(1) Se consideró suelo no-virgen aquel que fue modificado por el hombre (suelos cultivados, urbanizados, industrializados); (2) El suelo virgen se definió por la ausencia de laboreo y la existencia de flora autóctona

Tabla 7. Serotipos de CPTB en 47 muestras de suelo positivas de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos y Formosa.

Región	Tipo serológico(%)							
	A	B	C	D	E	F	G	ND ⁽¹⁾
Buenos Aires	-	1 (33,3)	-	-	-	-	-	2 (66,7)
Chaco	2(66,7)	-	-	-	-	-	-	1(33,3)
Entre Ríos	14(40,0)	9 (25,7)	-	-	-	1(2,9)	-	11 (31,4)
Formosa	4 (66,7)	-	-	-	-	-	-	2(33,3)
Total	20(42,5)	10(21,3)	-	-	-	1(2,1)	-	16(34,1)

(1) ND: tipo no determinado (muestra positiva no identificada serológicamente)

1.2. CPTB en suelos de diferentes regiones de Argentina

En esta sección se presentan los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado sobre las 2009 muestras de suelos de Argentina. A continuación se informa la distribución de CPTB en cada una de las cinco regiones.

1.2.1. Región Centro

Se analizaron 485 muestras de la región Centro, de las cuales 120 (24,7%) resultaron positivas (Tabla 8). La distribución de los CPTB no fue homogénea en esta región, ya que se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las prevalencias

de cada provincia. La Pampa y Córdoba presentaron prevalencias elevadas (58,1% y 39,4%, respectivamente), mientras que Buenos Aires y Entre Ríos registraron prevalencias más bajas (10,3% y 13,9%, respectivamente). Además, las muestras provenientes de Santa Fe resultaron negativas. En la Tabla 9 se muestra la distribución de CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes de la región Centro. En Entre Ríos la prevalencia en ambos tipos de suelos fue similar, en Córdoba fue mayor en suelos no-vírgenes y en La Pampa fue mayor en suelos vírgenes. Los serotipos A y B fueron los más frecuentemente detectados (45,0% y 29,2%, respectivamente) (Tabla 10).

Tabla 8. CPTB en suelos de la región Centro.

Provincia	Muestras de suelo (n=485)		
	Positivas	Total	%
Buenos Aires	3	29	10,3
Córdoba	28	71	39,4
Entre Ríos	35	251	13,9
La Pampa	54	93	58,1
Santa Fe	0	41	0,0
Total	120	485	24,7

Tabla 9. CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes de la región Centro.

Provincia	Tipo de suelo					
	No-virgen ⁽¹⁾			Virgen ⁽²⁾		
	Positivas	Total	%	Positivas	Total	%
Buenos Aires	3	29	10,3	-	-	-
Córdoba	26	65	40,0	2	6	33,3
Entre Ríos	29	207	14,0	6	44	13,6
La Pampa	31	62	50,0	23	31	74,2
Santa Fe	0	34	0,0	0	7	0,0
Total	89	397	22,4	31	88	35,2

(1) Se consideró suelo no-virgen aquel que fue modificado por el hombre (suelos cultivados, urbanizados, industrializados, etc.); (2) El suelo virgen se definió por la ausencia obvia de su laboreo y la existencia de flora autóctona

Tabla 10. Serotipos de CPTB en 120 muestras de suelo positivas de la región Centro.

Región	Tipo serológico(%)								
	A	B	C	D	E	F	G	A+B	ND ⁽¹⁾
Buenos Aires	-	1 (33,3)	-	-	-	-	-	-	2 (66,7)
Córdoba	9(32,1)	12(42,9)	-	-	-	1(3,6)	-	4(14,3)	2 (7,1)
Entre Ríos	14(40,0)	9 (25,7)	-	-	-	1(2,9)	-	-	11 (31,4)
La Pampa	31(57,4)	13(24,1)	-	-	-	-	-	-	10 (18,5)
Santa Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	54(45,0)	35(29,2)	-	-	-	2(1,7)	-	4(3,3)	25(20,8)

(1) ND: tipo no determinado (muestra positiva no identificada serológicamente)

1.2.2. Región Nordeste

De las 270 muestras estudiadas, sólo 12 (4,4%) resultaron positivas. Esta baja prevalencia fue observada en todas las provincias de la zona (Tabla 11). La diferencia entre las prevalencias de CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes no fue significativa (Tabla 12). En esta región se detectó el serotipo A en el 75,0% de las muestras (Tabla 13).

Tabla 11. CPTB en suelos de la región Nordeste.

Provincia	Muestras de suelo (n=270)		
	Positivas	Total	%
Chaco	3	27	11,1
Corrientes	3	105	2,9
Formosa	6	78	7,7
Misiones	0	60	0,0
Total	12	270	4,4

Tabla 12. CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes de la región Nordeste.

Provincia	Tipo de suelo					
	No-virgen ⁽¹⁾			Virgen ⁽²⁾		
	Positivas	Total	%	Positivas	Total	%
Chaco	3	27	11,1	-	-	-
Corrientes	0	5	0,0	3	100	3,0
Formosa	6	70	8,6	0	8	0,0
Misiones	0	49	0,0	0	11	0,0
Total	9	151	6,0	3	119	2,5

(1) Se consideró suelo no-virgen aquel que fue modificado por el hombre (suelos cultivados, urbanizados, industrializados, etc.); (2) El suelo virgen se definió por la ausencia obvia de su laboreo y la existencia de flora autóctona

Tabla 13. Serotipos de CPTB en 12 muestras de suelo positivas de la región Nordeste.

Región	Tipo serológico(%)							
	A	B	C	D	E	F	G	ND ⁽¹⁾
Chaco	2(66,7)	-	-	-	-	-	-	1(33,3)
Corrientes	3(100,0)	-	-	-	-	-	-	-
Formosa	4 (66,7)	-	-	-	-	-	-	2(33,3)
Total	9(75,0)	-	-	-	-	-	-	3(25,0)

(1) ND: tipo no determinado (muestra positiva no identificada serológicamente)

1.2.3. Región Noroeste

Se estudiaron 283 muestras provenientes de la región Noroeste, de las cuales 85 (30,0%) resultaron positivas (Tabla 14). La distribución de los CPTB no fue homogénea en esta región, ya que se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las prevalencias de cada provincia. En Catamarca, Salta y Tucumán el número de muestras positivas fue elevado (50,0%, 52,8% y 57,6%, respectivamente), mientras que La Rioja y Santiago del Estero registraron prevalencias más bajas (19,2% y 23,2%, respectivamente). En cambio, las muestras de Jujuy resultaron negativas. En la mayoría de las provincias de esta región, la prevalencia en suelos vírgenes fue menor ($p < 0,01$),

excepto en Tucumán, donde ésta resultó mayor ($p < 0,01$) y en Santiago del Estero no se observó una diferencia significativa (Tabla 15). En el 67,1% de las muestras positivas se detectó el serotipo A (Tabla 16).

Tabla 14. CPTB en suelos de la región Noroeste.

Provincia	Muestras de suelo (n=283)		
	Positivas	Total	%
Catamarca	21	42	50,0
Jujuy	0	51	0,0
La Rioja	10	52	19,2
Salta	19	36	52,8
Stgo. del Estero	16	69	23,2
Tucumán	19	33	57,6
Total	85	283	30,0

Tabla 15. CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes de la región Noroeste.

Provincia	Tipo de suelo					
	No-virgen ⁽¹⁾			Virgen ⁽²⁾		
	Positivas	Total	%	Positivas	Total	%
Catamarca	15	23	65,2	6	19	31,6
Jujuy	0	40	0,0	0	11	0,0
La Rioja	9	34	26,5	1	18	5,6
Salta	15	22	68,2	4	14	28,6
Stgo. del Estero	8	30	26,7	8	39	20,5
Tucumán	13	25	52,0	6	8	75,0
Total	60	174	34,5	25	109	22,9

(1) Se consideró suelo no-virgen aquel que fue modificado por el hombre (suelos cultivados, urbanizados, industrializados, etc.); (2) El suelo virgen se definió por la ausencia obvia de su laboreo y la existencia de flora autóctona



Tabla 20. CPTB en suelos de la región Sur.

Provincia	Muestras de suelo (n=490)		
	Positivas	Total	%
Antártida	1	119	0,8
Chubut	13	83	15,7
Neuquén	21	77	27,3
Río Negro	37	211	17,5
Total	72	490	14,7

Tabla 21. CPTB en suelos vírgenes y no-vírgenes de la región Sur.

Provincia	Tipo de suelo					
	No-virgen ⁽¹⁾			Virgen ⁽²⁾		
	Positivas	Total	%	Positivas	Total	%
Antártida	-	-	-	1	119	0,8
Chubut	7	42	16,7	6	41	14,6
Neuquén	17	43	39,5	4	34	11,8
Río Negro	36	203	17,7	1	8	12,5
Total	60	288	20,8	12	202	5,9

(1) Se consideró suelo no-virgen aquel que fue modificado por el hombre (suelos cultivados, urbanizados, industrializados, etc.); (2) El suelo virgen se definió por la ausencia obvia de su laboreo y la existencia de flora autóctona

Tabla 22. Serotipos de CPTB en 72 muestras de suelo positivas de la región Sur.

Región	Tipo serológico(%)							
	A	B	C	D	E	F	G	ND ⁽¹⁾
Antártida	1(100,0)	-	-	-	-	-	-	-
Chubut	3 (23,1)	5 (38,5)	-	-	-	-	-	5 (38,5)
Neuquén	10(47,6)	8 (38,1)	-	-	-	-	-	3 (14,3)
Río Negro	23(62,2)	8 (21,6)	-	-	-	1 (2,7)	-	5 (13,5)
Total	37(51,4)	21(29,2)	-	-	-	1 (1,4)	-	13(18,1)

(1) ND: tipo no determinado (muestra positiva no identificada serológicamente)

1.3. Análisis integral de CPTB en suelos de diferentes regiones de Argentina

A continuación se resumen los datos presentados en los puntos anteriores. De las 2009 muestras analizadas, resultaron positivas 472 (23.5%) (Tabla 23).

Tabla 23. CPTB en suelos de Argentina.

Región	Muestras de suelo (n=2009)		
	Positivas	Total	%
Centro	120	485	24,7
Nordeste	12	270	4,4
Noroeste	85	283	30,0
Oeste	183	481	38,0
Sur	72	490	14,7
Total	472	2009	23,5

La distribución de CPTB en las regiones geográficas no fue homogénea (Figura 7). Las regiones Oeste y Noroeste presentaron mayor número de muestras positivas (38,0% y 30,0%, respectivamente), mientras que las regiones Nordeste y Sur mostraron prevalencias más bajas (4,4% y 14,7% respectivamente). La región Centro tuvo una prevalencia intermedia (24,7%).

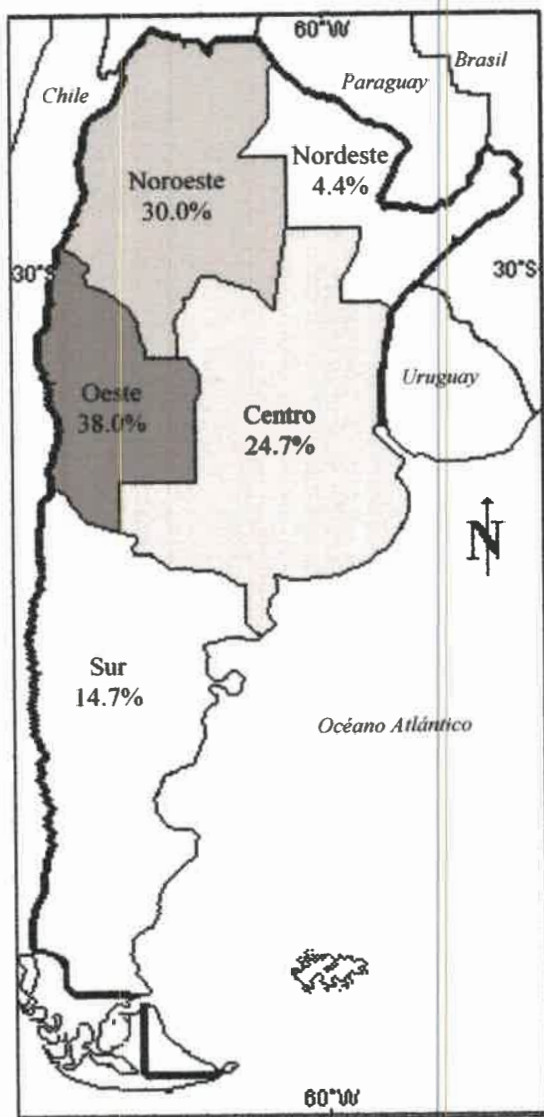


Figura 7. Prevalencia (%) de CPTB en suelos de las distintas regiones de Argentina.

En las regiones Oeste y Sur, la presencia de CPTB fue mayor en suelos no-virgenes ($p < 0,001$) (Tabla 24), a diferencia de la región Centro que presentó mayor número de muestras positivas en suelos vírgenes ($p < 0,05$). En las regiones Noroeste y Nordeste esta diferencia no fue significativa.

Tabla 24. Presencia de CPTB en suelos vírgenes y no-virgenes de las distintas regiones de Argentina.

Región	Tipo de suelo					
	No-virgen ⁽¹⁾			Virgen ⁽²⁾		
	Positivas	Total	%	Positivas	Total	%
Centro	89	397	22,4	31	88	35,2
Nordeste	9	151	6,0	3	119	2,5
Noroeste	60	174	34,5	25	109	22,9
Oeste	147	338	43,5	36	143	25,2
Sur	59	288	20,5	13	202	6,4
Total	364	1348	27,0	108	661	16,3

(1) Se consideró suelo no-virgen aquel que fue modificado por el hombre (suelos cultivados, urbanizados, industrializados); (2) El suelo virgen se definió por la ausencia de su laboreo y la existencia de flora autóctona

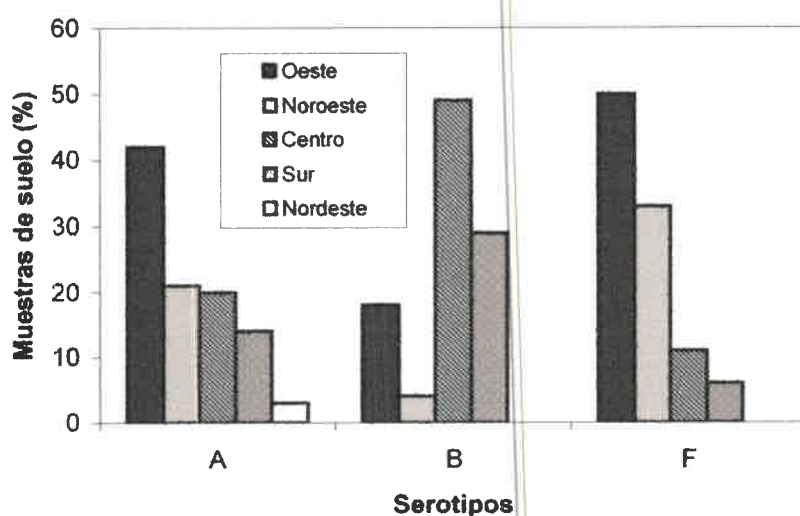
El serotipo A se detectó en el 57,0% (269/472) de las muestras positivas (Tabla 25). Además, se identificó el subtipo Af y mezclas de serotipos en el 3,6% y 3,4% de las muestras positivas, respectivamente. En el 16,6% de las muestras positivas no se pudo realizar la identificación serológica. Es importante notar que la gran diversidad serológica fue observada principalmente en la región Oeste. Por el contrario, en la región Nordeste solo se encontró el tipo A.

Tabla 25. Serotipos de CPTB en 472 muestras de suelo positivas.

Región	Tipo serológico (%)								
	A	B	F	G	Af	A+B	A+F	B+F	ND ⁽¹⁾
Centro	45,0	29,2	1,7	-	-	3,3	-	-	20,8
Nordeste	75,0	-	-	-	-	-	-	-	25,0
Noroeste	67,1	3,5	7,1	-	-	-	-	1,2	21,1
Oeste	61,2	7,1	4,9	1,1	9,3	5,5	0,5	-	10,4
Sur	51,4	29,2	1,4	-	-	-	-	-	18,0
Total	57,0	15,3	3,8	0,4	3,6	3,0	0,2	0,2	16,6

⁽¹⁾ ND: tipo no determinado (muestra positiva no identificada en las pruebas de neutralización)

La distribución de los tipos A, B y F en las cinco regiones no fue homogénea (Figura 8). El tipo A se encontró en 267 muestras, de las cuales el 41,9% correspondió a la región Oeste, mientras que el 20,6%, 20,2%, 13,8%, y 3,4% correspondió a las regiones Noroeste, Centro, Sur y Nordeste, respectivamente. La distribución del tipo F fue similar. Por otro lado, el 48,6% de las muestras positivas para el tipo B fueron detectadas en la región Centro, el 29,2% en la región Sur y el resto (22,2%) en las regiones Oeste y Noroeste.

**Figura 8.** Distribución de los serotipos A, B y F en suelos de Argentina.

1.4. Análisis de factores que podrían influir en la presencia de CPTB en el suelo

Se estudió la relación de la presencia de CPTB con el pH y el contenido de materia orgánica del suelo en 53 muestras de la provincia de Entre Ríos. Los valores de pH de todas las muestras positivas para CPTB estuvieron comprendidos entre 5,5 y 7,6 (Figura 9), mientras que la presencia de CPTB en suelos se pudo relacionar con valores bajos de contenido de materia orgánica ($p < 0,05$) (Figura 10).

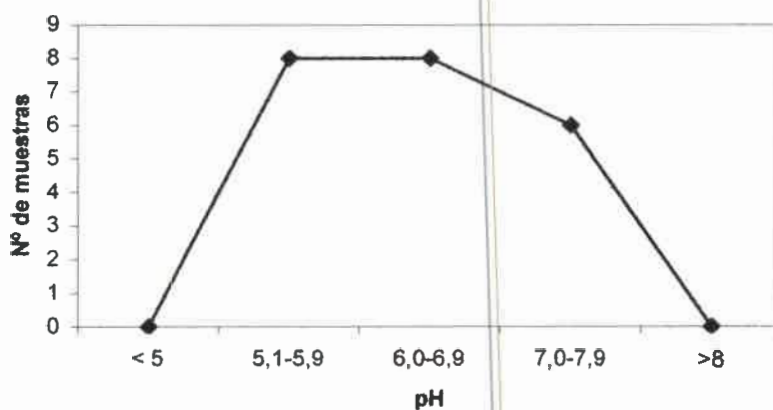


Figura 9. Relación entre pH del suelo y presencia de CPTB.

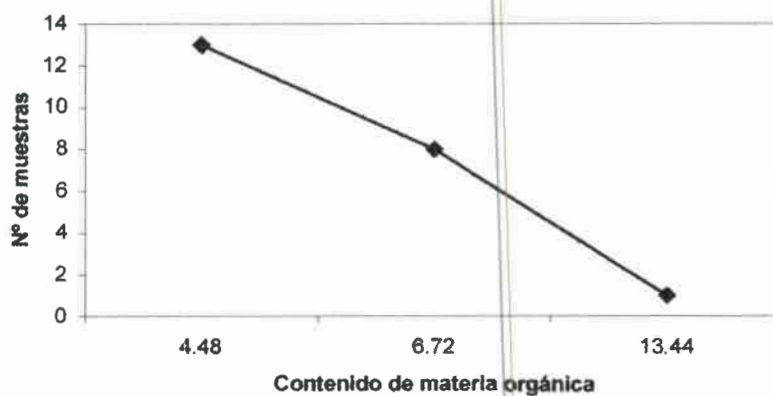


Figura 10. Relación entre contenido de materia orgánica del suelo y presencia de CPTB.

1.5. Relación entre prevalencia de CPTB en suelos y número de casos de botulismo del lactante

Como se mencionó en la sección Introducción, desde 1982 se han registrado 336 casos de botulismo del lactante en Argentina (datos suministrados por Área Microbiología, Departamento de patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo y por Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud [ANLIS] "Dr. Carlos G. Malbrán"). En la Figura 1 se detalló la distribución de casos por provincia. Si bien estos datos no son resultados obtenidos durante el presente trabajo de tesis, se consideran significativos para poder establecer la relación existente entre la prevalencia de esporas de CPTB y los casos de botulismo del lactante.

La incidencia anual promedio de botulismo del lactante en Argentina fue de 2,1 por 100.000 nacidos vivos, sin embargo en las regiones Oeste y Sur se observaron valores más altos (Tabla 26).

Tabla 26. Casos de botulismo del lactante en Argentina (1982-2003⁽¹⁾).

Región	Nacidos vivos ⁽²⁾	Casos de BL ⁽³⁾	Casos por año (SD) ⁽⁴⁾	Incidencia anual promedio (SD)
Centro	8.965.864	114	5,4 (5,2)	1,27 (1,3)
Nordeste	1.750.764	2	0,1 (0,3)	0,11 (0,4)
Noroeste	2.102.746	13	0,6 (0,9)	0,62 (1,0)
Oeste	1.112.903	113	5,3 (4,2)	10,15 (8,1)
Sur	794.643	64	3,2 (3,3)	8,05 (8,6)
Total	14.726.920	306	14,6 (11,5)	2,08 (1,6)

(1) Para calcular la incidencia anual se tuvieron en cuenta los casos de botulismo del lactante hasta el año 2003 (306 casos), ya que sólo se cuenta con el registro de nacidos vivos hasta diciembre de ese año; (2) Datos suministrados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina (INDEC); (3) BL: botulismo del lactante; (4) SD: desviación estándar

En la Tabla 27 se muestra la relación entre la incidencia anual del botulismo del lactante y la prevalencia en suelos de CPTB. En la región Nordeste se observó relación, ya que se registraron los valores más bajos en ambos parámetros (0,11 y 4,4%, respectivamente). En la región Oeste también se observó esta relación, debido al elevado número de muestras positivas en suelos (38,0%) y la alta incidencia de la

enfermedad (10,15). En la región Sur la incidencia del botulismo del lactante (8,05) fue mayor de lo que se hubiese esperado en relación con la prevalencia del clostridio en el suelo (14,7%). Por el contrario, en las regiones Centro y Noroeste se observó una alta prevalencia de CPTB en suelos (24,7% y 30,0%, respectivamente) pero baja incidencia de casos de botulismo del lactante (1,27 y 0,62, respectivamente). A pesar de esta falta de correlación en algunas regiones, los resultados obtenidos permitirían especular sobre la existencia de una asociación entre la distribución del serotipo A en suelos (57,0% de las muestras positivas) y la toxina tipo A, detectada en todos los casos de botulismo del lactante.

Tabla 27. Incidencia de botulismo del lactante y su relación con la presencia en suelos de CPTB.

Región	Incidencia anual promedio de BL ⁽¹⁾	Prevalencia (% de CPTB ⁽²⁾ tipo A en suelos	Prevalencia (%) de CPTB en suelos
Centro	1,27	12,0	24,7
Nordeste	0,11	3,3	4,4
Noroeste	0,62	20,1	30,0
Oeste	10,15	25,6	38,0
Sur	8,05	7,5	14,7
Total	2,08	14,1	23,5

(1) BL: botulismo del lactante; (2) CPTB: clostridios productores de toxina botulínica

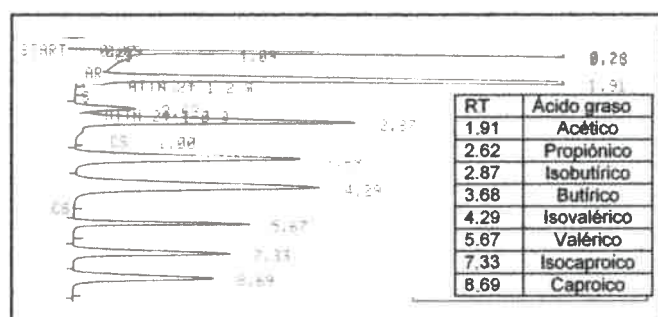
2. Caracterización de cepas de CPTB

2.1. Determinación de características bioquímicas

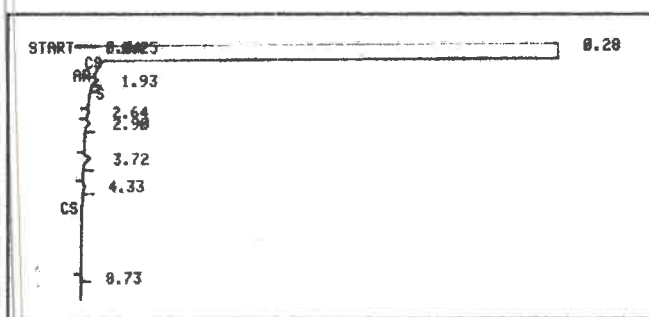
Se realizó caracterización bioquímica a 40 cepas de CPTB aisladas de diferentes orígenes (suelo, casos de botulismo del lactante, brotes de botulismo alimentario, polvo ambiental y muestras de manzanilla) y a seis cepas de colección (Tabla 2). La caracterización se realizó en base a las pruebas de: utilización de azúcares, proteólisis, lipólisis, hidrólisis de gelatina y esculina, actividad sobre la leche, producción de indol

y ureasa, motilidad y reducción de nitratos. Se incluyó, además, cromatografía en fase gaseosa para identificar la producción de ácidos grasos volátiles (Figura 11).

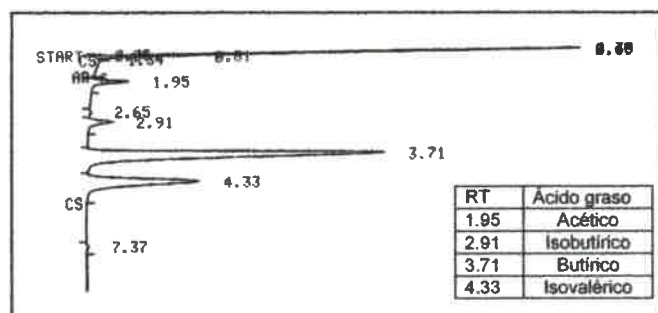
Dentro de un mismo grupo bioquímico, las cepas presentaron homogeneidad, a pesar de haber sido aisladas de diferentes fuentes (Tabla 28). En particular, las 13 cepas aisladas de casos de botulismo del lactante no difirieron del resto de las cepas del Grupo I, teniendo en cuenta incluso los patrones de ácidos grasos volátiles.



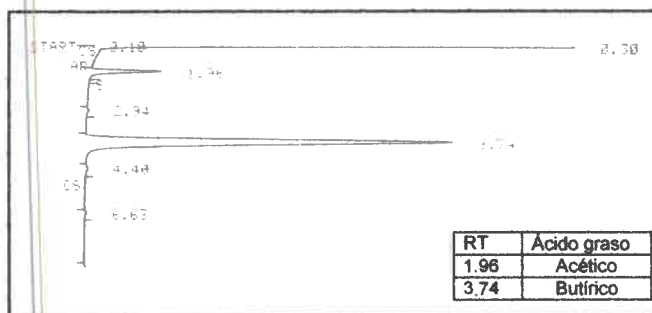
[A]



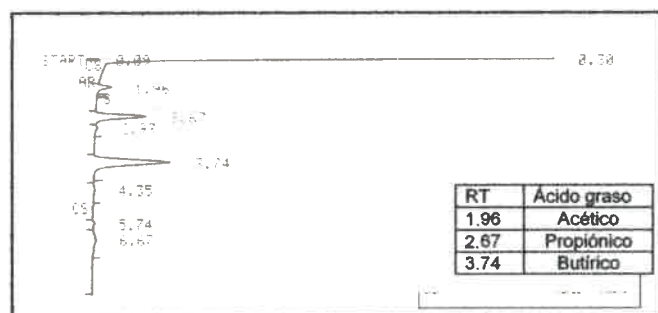
[B]



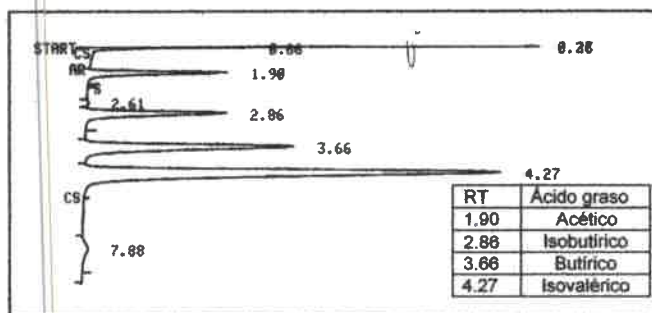
[C]



[D]



[E]



[F]

Figura 11. Detección de ácidos grasos volátiles mediante cromatografía en fase gaseosa: A) testigo de ácidos grasos volátiles; B) blanco; C) cepa A-M110, perteneciente al Grupo I (proteolíticas); D) cepa E- Malbrán, perteneciente al Grupo II (no proteolíticas), E) cepa D-África, perteneciente al Grupo III, F) cepa G-89, perteneciente al Grupo IV.

-Continuación Tabla 28

Características	Cepas								
	A-BL23	A-BL24	A-BL25	A-BL27	A-BL43	A-berenjena	A-pepino	A-queso	A-jardinera
Origen	Caso BL	Caso BL	Caso BL	Caso BL	Caso BL	Brote BA ⁽²⁾	Brote BA	Brote BA	Brote BA
Tipo serológico	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Proteólisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lecitinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido producido a partir de:									
Glucosa	+	W	W	+	+	W	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leche	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión
Ácidos grasos en PYG	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV



-Continuación Tabla 28

Características	Cepas								
	A-Manz2	A-Manz20	A-AMB15	A-M110	A-ER1423	A-F1575	A-M1814	A-M1822	A-M1823
Origen	Manzanilla	Manzanilla	Polvo ambiental	Suelo	Suelo	Suelo	Suelo	Suelo	Suelo
Tipo serológico	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Proteólisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lecitinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de esculina	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido producido a partir de:									
Glucosa	+	-	+	+	+	+	W	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	W	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	SD	-	+	+	+	+	-	+	+
Manosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leche	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión
Ácidos grasos en PYG	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV

-Continuación Tabla 28

Características	Cepas								
	B-WH	B-M609	B-M612	C-London	D-África	E-Japón	E-Malbrán	E-Ch1128	ER1723
Origen	De colección	Suelo	Suelo	De colección	De colección	De colección	De colección	Suelo	Suelo
Tipo serológico	B	B	B	C	D	E	E	E	¿?
Proteólisis	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Motilidad	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lecitinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de esculina	SD	+	+	-	-	-	-	-	+
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido producido a partir de:									
Glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Manitol	-	-	-	-	SD	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	SD	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	-	SD	+	+	+	-
Manosa	-	-	-	-	-	W	W	W	-
Gelatina	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Leche	Digestión	Digestión	Digestión	SD	SD	-	-	-	Digestión
Ácidos grasos en PYG	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A B P	A B P	A B	A B	A B	A iB iV

-Continuación Tabla 28

Características	Cepas									
	F-Langeland	F-Anchoa	F-AMB268	F-AMB270	F-ER1425	F-BA160	F-T824	F-T843	G-89	G-Briozzo
Origen	Referencia	Brote BA	Polvo amb.	Polvo amb.	Suelo	Suelo	Suelo	Suelo	Referencia	Suelo
Tipo serológico	F	F	F	F	F	F	F	F	G	G
Proteólisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lecitinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido producido a partir de:										
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	W	+	+	+	+	W	+	+	-	-
Manosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leche	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Digestión	Coagulación	Coagulación
Ácidos grasos en PYG	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV	A iB B iV

(1) BL: botulismo del lactante; (2) BA: botulismo alimentario; (3) A, ácido acético; B, ácido butírico; iB, ácido isobutírico; P, ácido propiónico; V, ácido valérico; iV, ácido isovalérico
Símbolos: SD, sin datos; +, reacción positiva (pH de azúcares menor a 5,5); -, reacción negativa (pH de azúcares mayor a 6,0); W, reacción débil (pH de azúcares 5,5-5,9)

2.2. Determinación de antibiotipo farmacológico

Se determinó la CIM para ampicilina, amoxicilina y amoxicilina-sulbactama de 46 cepas de CPTB, mediante el método establecido por el NCCLS. Debido a que las CIM para los tres antibióticos fueron comparables, los resultados se agruparon en una sola figura (Figura 12). La CIM₅₀ fue de 0,5 µg/ml y la CIM₉₀ de 2 µg/ml. En la Figura 13 se comparan las CIM de 13 cepas de CPTB aisladas de casos de BL y de 14 cepas serotipo A, aisladas de diferentes orígenes. Las CIM₅₀ en ambos grupos resultaron iguales (0,25 µg/ml). La CIM₉₀ de las cepas aisladas de casos de botulismo del lactante fue de 0,5 µg/ml, mientras que la CIM₉₀ de las aisladas de otros orígenes fue de 1 µg/ml, sin embargo esta diferencia no fue significativa.

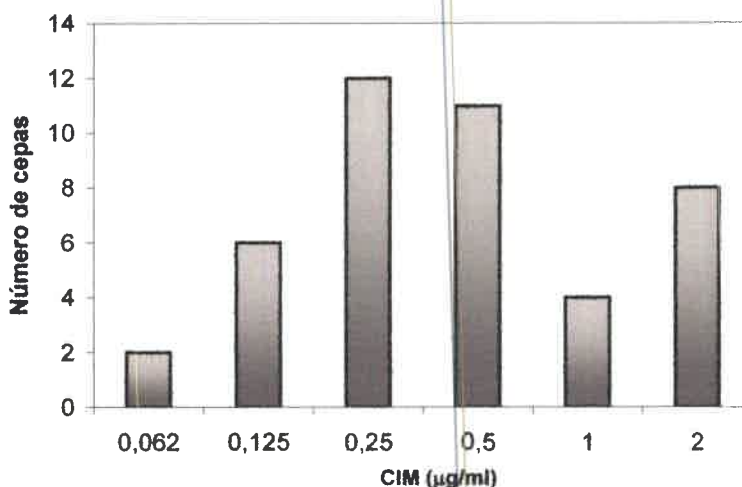


Figura 12. CIM para ampicilina, amoxicilina y ampicilina sulbactama de 43 cepas de CPTB aisladas de diferentes orígenes.

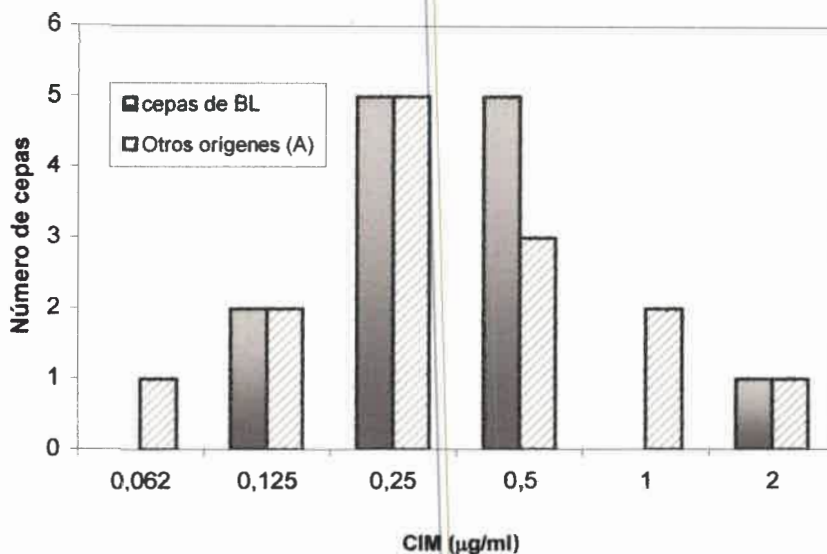


Figura 13. CIM para ampicilina, amoxicilina y ampicilina sulbactama de 13 cepas de CPTB aisladas de casos del lactante y de 14 de diferentes orígenes (tipo A).

2.3. Propiedad hemaglutinante de la NTBo

Se estudió producción de HA en 46 cepas de CPTB provenientes de diversos orígenes. Las NTBo de cepas autóctonas resultaron todas HA negativas. Sólo tres cepas de colección produjeron NTBo HA positivas: A-Hall, C-London y D-Africa, con un título de 128, 4 y 128, respectivamente (Figura 14).

Además, se estudió la producción de HA de la cepa A-Hall en diferentes medios de cultivo. Los títulos de HA obtenidos por cultivo en los medios PET, PET suplementado con una suspensión de arvejas, MCP, BHI y PYG fueron de 128, 64, 8, 16 y 32, respectivamente. Además, se estudió la producción de HA en medio de alta producción de toxina por diálisis en sacos de celofán, previa concentración mediante precipitación con sulfato de amonio. En este caso, el título fue 8 para el sobrenadante y 16.384 para el precipitado.

El estudio de la producción de HA en las cuatro cepas tipo A provenientes de brotes de botulismo alimentario, por siembra en medio MCP (24 h, 48 h y 5 días de incubación), medio PET y medio PET suplementado con arvejas, y luego de la precipitación con sulfato de amonio, resultó negativo.

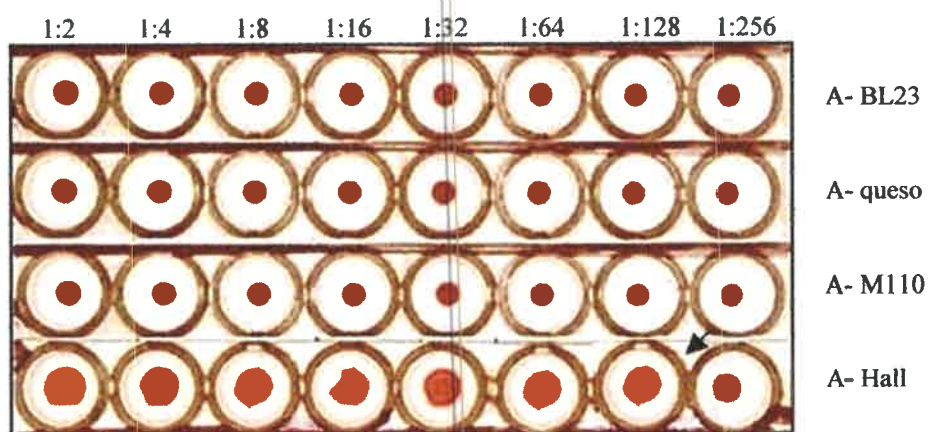


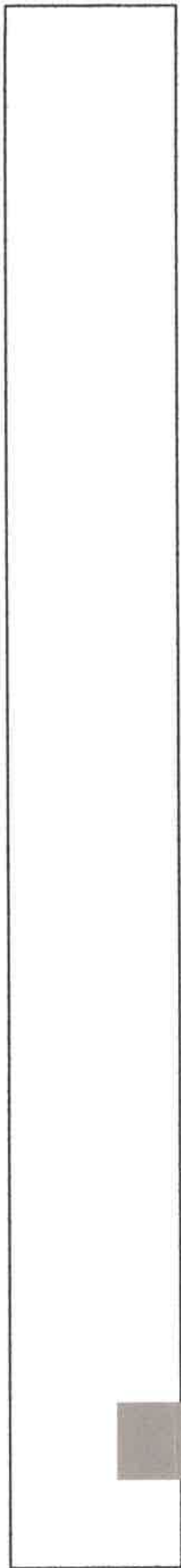
Figura 14. Test de hemaglutinación para NTBo (la flecha indica el punto de corte)

2.4. Identificación de receptores celulares del tipo gangliósidos

Se estudió la unión a gangliósidos de NTBo de cepas tipos A, B, C, D, E y F, mediante inmunotinción en TLC. Los resultados muestran diferentes patrones de unión a receptores dependiendo del tipo serológico (Tabla 29).

Tabla 29. Patrón de unión de NTBo a receptores del tipo gangliósidos

NTBo	Gangliósido						
	GT1b	GD1a	GD1b	GM1	LM1	GA1	sulfátidos
A-Hall	-	-	-	-	-	-	+
A-BL10	-	+	+	+	-	+	-
A-M110	-	+	+	+	+	+	+
A-Berenjena	-	+	+	+	+	+	-
B-WH	-	+	-	+	-	-	-
B-M612	-	+	-	+	+	-	-
C-London	-	+	+	+	-	-	-
D-África	-	+	-	+	+	-	-
E-Japón	-	+	-	+	-	-	-
E-Ch1128	-	+	-	+	-	-	-
ER1723	-	+	-	+	-	-	-
F-Langeland	-	+	-	+	-	-	-
F-Anchoa	-	+	-	+	-	-	-



DISCUSIÓN

1. Presencia de CPTB en suelos de Argentina

Los CPTB se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. El suelo es su hábitat más frecuente, aunque también se los encuentra en polvo ambiental, superficie de vegetales, sedimentos de lagunas y océanos, etc. La distribución geográfica de los CPTB ha sido estudiada extensamente en Europa, Asia y América del Norte (Aianin y col., 1968; Bulatova y col., 1969; Gamboa y col., 1993; Gao, 1984; Haq y Suhadi, 1981; Huss, 1980; Karasawa y col., 2000; Kobayashi y col., 1992; Meyer y Dubovsky, 1922; Mortojudo y col., 1973; Notermans y col., 1985; Parry, 1946; Smith y Young, 1980; Smith, 1978; Sonnabend y col., 1987; Wobeser y col., 1987; Yamakawa y col., 1988; Yamakawa y col., 1990). Sin embargo, el conocimiento de su existencia en suelos de América del Sur es restringido y en Argentina se ha estudiado en forma parcial (Cicarelli y col, 1981; De Rigo, 1963; Fernández, 1994; Giménez y col, 1970b). Por este motivo, uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar la presencia de esporas de CPTB y la distribución de serotipos en suelos de Argentina.

Las 445 muestras de suelo provenientes de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Formosa y Misiones, analizadas durante este trabajo de tesis, representan un significativo aporte al conocimiento de la ecología del suelo de Argentina, ya que los resultados obtenidos permitieron determinar la prevalencia de CPTB y distribución de serotipos en estas provincias. Por otro lado, el procesamiento de datos y posterior análisis estadístico de las 2009 muestras de suelo de Argentina analizadas hasta el momento, permitieron tener un conocimiento acabado sobre la distribución de CPTB en nuestro país. Si bien existen trabajos anteriores (Cicarelli y col, 1981; De Rigo, 1963; Fernández, 1994; Giménez y col, 1970b), no se había realizado una comparación entre las distintas regiones geográficas de Argentina, en cuanto a la distribución de CPTB y sus serotipos, así como tampoco un estudio que informe sobre la posible asociación entre pH o contenido de materia orgánica y presencia de CPTB en el suelo.

Se estudiaron 2009 muestras de suelo de Argentina, de las cuales 472 (23,5%) resultaron positivas. Esta prevalencia fue relativamente alta, comparada con la de algunos países: 5,7% (10/174) en Reino Unido (Smith y Young, 1980) y 16,5% (44/266) en Japón (Yamakawa y col., 1988), y similar a la de otros: 23,3% (7/30) en Costa Rica (Gamboa y col., 1993) y 23,5% (61/260) en Estados Unidos (Smith, 1978).

La distribución de CPTB en las distintas regiones geográficas de Argentina no fue homogénea. Las regiones Oeste y Noroeste mostraron elevadas prevalencias (38,0% y 30,0%, respectivamente), mientras que las regiones Sur y Nordeste presentaron menor número de muestras positivas (14,7% y 4,4%, respectivamente). Estas regiones poseen características climáticas y geográficas muy diferentes entre sí y probablemente existan factores que podrían incidir específicamente sobre la presencia de los CPTB en el suelo. En este trabajo encontramos que el número de muestras positivas era mayor en suelos con bajo contenido de materia orgánica. Además, los valores de pH de todas las muestras positivas para CPTB estuvieron comprendidos entre 5,5 y 7,6. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Gamboa y col. (1993) quienes observaron una asociación entre la presencia de CPTB en suelos y bajo contenido de materia orgánica, no así con el pH. Por otra parte, Smith (1975) encontró una asociación de los tipos A y B con suelos de bajo contenido de materia orgánica y valores de pH neutros a alcalinos.

En las regiones Oeste y Sur, analizadas en este trabajo, la presencia de CPTB fue mayor en suelos no-virgenes. En coincidencia con estos resultados, Huss (1980) encontró que la prevalencia de *C. botulinum* en suelos de Dinamarca fue del 41,0% en suelos cultivados, mientras que no se registraron muestras positivas en suelos vírgenes. Además, Parry (1946) reportó una mayor incidencia de *C. botulinum* en suelos cultivados en el estado de Nueva York (Estados Unidos). Si bien un 35,2% de las muestras de suelo virgen provenientes de la región Centro resultaron positivas, se debe tener en cuenta el reducido número de muestras analizadas en dicha región. En las regiones Noroeste y Nordeste el número de muestras positivas en los distintos tipos de suelo fue similar.

En cuanto a los serotipos identificados en el presente estudio, el A fue el más frecuente en todas las regiones analizadas. Sin embargo, también se determinó una gran diversidad serológica ya que se detectaron los tipos B, F y G, mezclas de A, B y F y el subtipo Af. La diversidad serológica fue observada principalmente en la región Oeste, mientras que en la región Nordeste sólo se encontró el tipo A. No existen reportes sobre la presencia del subtipo Af en suelos y se ha informado la presencia del serotipo F en suelos de Suiza (Sonnabend y col., 1987) y Paraguay (Yamakawa y col., 1990) y el tipo G sólo en suelos de Suiza (Sonnabend y col., 1987). No se detectaron los tipos C, D y E

en ninguna de las muestras de las regiones estudiadas. Los tipos C y D parecen ser predominantes en ambientes tropicales (Huss, 1980; Mortojudo, 1973) y las cepas tipo E son aisladas principalmente de ambientes acuáticos, especialmente de aguas frías (Huss, 1980). Por otro lado, la distribución de los tipos A, B y F en las cinco regiones no fue homogénea. Los tipos A y F fueron detectados con mayor frecuencia en la región Oeste, mientras que el tipo B se detectó con mayor frecuencia en las regiones Centro y Sur. La intensa actividad agrícola-ganadera desarrollada en la región Centro de nuestro país podría contribuir a una mayor prevalencia del serotipo B, considerando el predominio de este serotipo en suelos cultivados de Dinamarca y Estados Unidos (Huss, 1980; Smith, 1978).

Actualmente, el botulismo del lactante representa la principal forma de la enfermedad, sin embargo, su transmisión no ha sido esclarecida completamente. Se han propuesto dos fuentes potenciales de esporas botulínicas: el suelo y los alimentos, principalmente la miel (Arnon, 1992). Sin embargo, la prevalencia de esporas de *C. botulinum* en miel es baja. Si bien no siempre se puede correlacionar la ingesta de este alimento con los casos de botulismo del lactante, estudios realizados en diferentes países han informado entre 3,5% y 10% de prevalencia en este alimento (Fernández y col., 2000; Midura y col., 1979; Schocken-Iturrino y col., 1999). Por otra parte, Satorres y col. (1999) encontraron esporas botulínicas en un 4% (4/100) de muestras de hierbas medicinales tradicionalmente administradas como infusión a lactantes. Además, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio se encontró un 12% (11/92) de muestras de *Matricaria spp* positivas para CPTB (datos no publicados), aunque la carga de esporas no fue elevada (0,31 NMP/g de hierba). Si bien se han aislado esporas de CPTB a partir de polvo de aspiradora, suelo de jardín y macetas de los hogares de pacientes, sólo han sido reportados en un bajo número de casos (Arnon y col., 1979). En un trabajo reciente (Nevas y col., 2005) se informó un caso de botulismo del lactante con aislamiento de *C. botulinum* del intestino del lactante y de polvo del hogar del paciente. Mediante estudios genéticos se pudo identificar que se trataba de la misma cepa.

Teniendo en cuenta la baja prevalencia de esporas botulínicas halladas en miel y hierbas medicinales y dado que el suelo es el principal reservorio de estos clostridios, proponemos que la inhalación y posterior deglución de las esporas vehiculizadas por el polvo ambiental es, muy probablemente, la principal forma de transmisión del botulismo

del lactante. Sin embargo, no deberían desestimarse como factores de riesgo la ingesta de miel e infusiones de hierbas. En este sentido, sería de esperar que en regiones donde existe un importante número de casos de botulismo del lactante, la prevalencia de las esporas en suelos también fuese elevada, como fue determinado en las regiones Oeste y Nordeste. La incidencia de la enfermedad determinada en la región Sur, en relación a la prevalencia de CPTB, resultó mayor a la esperada. Esto podría deberse a las condiciones climáticas, principalmente fuertes vientos y escasas precipitaciones, que favorecerían la dispersión de las esporas y su permanencia en suspensión. Por el contrario, las regiones Noroeste y Centro presentaron menor incidencia de la que podría esperarse de acuerdo a la prevalencia de CPTB en suelos. La falta de correlación entre la incidencia de la enfermedad y la prevalencia de CPTB en suelos en estas regiones podría estar indicando que otros factores, como la carga de esporas de CPTB en suelos y características climáticas, serían relevantes en la transmisión del botulismo del lactante. Sin embargo, la relación entre la presencia del microorganismo en suelos y el número de casos podría estar desvirtuada, debido a la falta de diagnóstico en niños con hipotonía pasajera, con signos muy sutiles, o en casos de síndrome de muerte súbita infantil, por falta de un adecuado entrenamiento del personal de salud.

2. Caracterización de cepas de CPTB

Tradicionalmente, la taxonomía del género *Clostridium* ha estado determinada por propiedades culturales, morfológicas (endosporas y células vegetativas), fenotípicas (patrones de fermentación de azúcares, producción de ácidos grasos volátiles, estructura de la pared celular) y genotípicas (homología de secuencia del gen 16S RNAr, contenido de G+C). En los últimos años, la secuenciación de genes que codifican para la subunidad 16S del RNAr ha contribuido a demostrar que *Clostridium* es un grupo polifilogenético, que consistiría, según proponen algunos autores, en más de 20 géneros y varias familias (Collins y col., 1994; Stackenbrandt y Rainey, 1997). En particular, la especie *C. botulinum* exhibe una gran variabilidad fenotípica y genotípica. Teniendo en cuenta la homología de la secuencia del gen 16S RNAr, los grupos metabólicos de *C. botulinum* se encuentran menos relacionados entre sí que con algunas especies no toxigénicas, como es el caso del Grupo I (proteolíticos) que están más cercanos a *C. putrificum* y *C. sporogenes* que al Grupo II (sacarolíticos) (Collins y col., 1994). Sin embargo, cuando sólo se tienen en cuenta técnicas de biología molecular para la clasificación de clostridios toxigénicos, pueden cometerse algunos errores, en particular en lo que se refiere a la fisiología, regulación de la producción de toxinas, transferencia génica, etc. (Johnson y Bradshaw, 2001). Es importante, por consiguiente, que la clasificación de los CPTB combine propiedades fenotípicas y genotípicas para una más adecuada caracterización.

Con respecto a las propiedades bioquímicas de las cepas de CPTB de diversos orígenes (suelo, casos de botulismo del lactante, brotes de botulismo alimentario, polvo ambiental y muestras de manzanilla) estudiadas durante el presente trabajo, podemos destacar que no presentaron diferencias con respecto a los estándares (Cato y col., 1986). Dentro de un mismo grupo bioquímico, las cepas presentaron una gran homogeneidad, a pesar de haber sido aisladas de diferentes fuentes. En particular, las 13 cepas aisladas de casos de botulismo del lactante no difirieron del resto de cepas del Grupo I (proteolíticas), teniendo en cuenta incluso los patrones de ácidos grasos volátiles.

Del mismo modo, los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ para ampicilina, amoxicilina y ampicilina-sulbactama de las 46 cepas de CPTB estudiadas estuvieron comprendidos dentro de los informados en la bibliografía (Dezfulian y Dowell, 1980; Swenson y col.,

1980). Además, los valores de CIM de las cepas aisladas de casos de botulismo del lactante no difirieron significativamente de los hallados para cepas de otros orígenes. Estos resultados coinciden con los descritos en los estudios realizados por Dezfulian y Dowell (1980), quienes informaron valores similares de CIM₅₀ y CIM₉₀ de cepas aisladas de casos de botulismo del lactante y de brotes de botulismo alimentario. Resulta de interés destacar que, hasta el presente, no se cuenta para anaerobios con cepas de referencia para determinar la sensibilidad a antimicrobianos.

En general, se acepta que las NTBo se producen asociadas a proteínas NTNH. Además, los tipos A, B, C, D y G pueden incluir HA en los complejos toxigénicos, mientras que los tipos E y F sólo poseen la fracción NTNH asociada a la neurotoxina (Hatheway, 1990). Se postula que estos complejos proteicos serían importantes para la toxicidad oral, ya que la fracción no tóxica protegería a la NTBo de la digestión durante el paso por el tracto digestivo (Ohishi y Sakaguchi, 1977; Sugi y col., 1977). En el presente estudio la prueba de hemaglutinación resultó positiva sólo para tres cepas de colección tipos A, C y D, mientras que el resto de las cepas tipo A y las cepas tipo B, E, F y G resultaron negativas. Además, el cultivo de la cepa A-Hall en medio PET y PET suplementado con suspensión de arvejas permitió obtener los títulos de HA más altos, mientras que en el medio MCP se obtuvo el título de HA más bajo. Estos resultados coinciden con los informados por Sugi y col. (1978) quienes plantearon la importancia del medio de cultivo en la producción de toxinas progenitoras HA positivas, teniendo en cuenta la producción de complejos tóxicos de mayor tamaño molecular y toxicidad oral por las cepas tipo A y B, con relación a la producción en alimentos cárnicos. Por otro lado, en este estudio se demostró la ausencia de HA en las toxinas de las cepas de origen alimentario y en las 13 cepas aisladas de casos de botulismo del lactante, cultivadas en diferentes medios de cultivo, incluida la precipitación de la toxina con sulfato de amonio. Estos resultados sugieren que el origen de la cepa no parece ser un factor condicionante en la producción de HA. Sin embargo, en un estudio realizado por Tabita y col. (1991) se encontró que dos de tres cepas de *C. botulinum* aisladas de brotes de botulismo alimentario produjeron toxinas HA positivas, mientras que las cinco cepas aisladas de casos de botulismo del lactante resultaron HA negativas. Si bien estos autores muestran una asociación entre producción de HA y origen de la cepa, el número

de cepas analizadas es muy reducido. No existen hasta el presente otros estudios sobre la producción de HA en cepas aisladas de diversos orígenes.

Los resultados obtenidos sobre la identificación de receptores celulares del tipo gangliósidos señalan que existirían diferencias entre las NTBo estudiadas. La unión a sulfátidos de la NTBo acomplejada con HA producida por la cepa A-Hall coincide con las investigaciones realizadas por Inoue y col. (2001), quienes demostraron que la NTBo tipo A asociada a HA no se une a gangliósidos, aunque posee capacidad de unión a ciertos glicolípidos carentes de ácido siálico. Por el contrario, la toxina precursora HA negativa o la neurotoxina de 150 kDa no se unirían a estos glicolípidos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio muestran diferentes patrones de unión a receptores, dependiendo del tipo serológico y la producción de HA, en coincidencia con la diversidad de patrones de unión informado por otros autores (Inoue y col., 1999; Inoue y col., 2001; Kamata y col., 1993; Kamata y col., 1997; Kozaki y col., 1987; Ochanda y col., 1986; Schengrund y col., 1991; Takamizawa y col., 1986; Yowler y Schengrund, 2004). Además, se han encontrado cepas productoras de NTBo HA negativa de igual serotipo con idéntico perfil de unión a receptores (E-Japón y E-Ch1128; F-Langeland y F-Anchoa), como así también cepas productoras de NTBo HA negativa de igual serotipo con diferente perfil de unión a receptores (B-WH y B-M612; A-BL10 y A-M110). Estos resultados apoyan la hipótesis sobre la existencia de otro factor que podría influir en la unión de las NTBo a receptores, pudiendo especularse que un análisis genotípico de un mayor número de cepas podría contribuir a su identificación.



CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos generales planteados en este trabajo de tesis y los resultados obtenidos, podemos aportar las siguientes conclusiones:

- La distribución de CPTB en suelos de las distintas regiones geográficas de Argentina no fue homogénea, siendo las regiones Oeste y Nordeste las de mayor y menor prevalencia, respectivamente.
- Si bien se observó una gran multiplicidad de serotipos, no registrada en otras regiones del mundo, el serotipo A fue el de mayor frecuencia en todas las regiones estudiadas.
- Con respecto a los posibles factores que podrían influir en la prevalencia de esporas de CPTB en el suelo, se encontró una asociación entre la presencia de las esporas y un bajo contenido de materia orgánica y valores de pH comprendidos entre 5,5 y 7,6.
- No se observó correlación entre presencia de CPTB en suelos y número de casos de botulismo del lactante, excepto en las regiones Oeste y Nordeste. De esta manera se podría especular que otras fuentes de esporas podrían estar implicadas en la transmisión del botulismo del lactante. O bien, que otros factores, como la carga de esporas de CPTB en suelos y características climáticas, serían relevantes en la transmisión de esta enfermedad. Sin embargo, proponemos que el registro de un número de casos de botulismo del lactante inferior al número real, debido a la falta de diagnóstico, especialmente en zonas donde el personal de salud no ha sido adecuadamente capacitado en el diagnóstico de esta enfermedad, podría desvirtuar la relación entre la presencia del microorganismo en suelos y el número de casos.
- No se observaron marcadas diferencias en las propiedades fenotípicas entre cepas de CPTB aisladas de casos de botulismo del lactante y cepas aisladas de otras fuentes, considerando el análisis de los caracteres bioquímicos, patrones de sensibilidad a antimicrobianos, producción de NTBo-HA positivas y patrones de unión a gangliósidos. De esta manera, no se han identificado caracteres específicos en las cepas productoras de botulismo del lactante, y por ende, todas las esporas de CPTB aisladas de diferentes orígenes podrían ser potenciales agentes etiológicos de la enfermedad.





BIBLIOGRAFÍA

- Aianin, K. M., T. I. Bulatova, K. I. Matveev.** 1968. The distribution of *Clostridium botulinum* and *C. tetani* in the soil in Armenia SSR. Gig. Sanit. 33:114-116.
- Arnon S. S.** 1992. Infant botulism. p. 1095-1102. In R. D. Feigen and J. D. Cherry (ed.) Textbook of pediatric infectious disease, 3rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Arnon, S. S., T. F. Midura, K. Damus, B. Thompson, R. M. Wood, J. Chin.** 1979. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. J. Pediatr. 94:331-336.
- Arnon S. S., T. F. Midura, K. Damus, R. M. Wood, J. Chin.** 1978. Intestinal infection and toxin production by *Clostridium botulinum* as one cause of sudden infant death syndrome. Lancet i: 1273-1277.
- Arnon S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Barlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat; Grupo de Trabajo de Biodefensa Civil.** 2001. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management.. JAMA 285: 1059-70
- Aureli P., L. Fenicia, B. Pasolini, M. Gianfranceschi, L. M. McCroskey, C. L. Hatheway.** 1986. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. J. Infect. Dis. 154: 207-211.
- Bakheit A. M., C. D. Ward, D. L. McLellan.** 1997. Generalized botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: a report of two cases. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 62:198.
- Bartram U., D. Singer.** 2004. Infant botulism and sudden infant death syndrome. Klin. Padiatr. 216:26-30.
- Bengston I. A.** 1922. Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. Public Health Rep. 37: 164-170.
- Bhatia K. P., A. Munchau, P. D. Thompson, M. Houser, V. S. Chauhan, M. Hutchinson, A. H. Shapira, C. D. Marsden.** 1999. Generalized muscular weakness after botulinum toxin injections for dystonia: a report of three cases. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:90-93.
- Bianco M. I.** 2002. *Clostridium botulinum* en plantas medicinales administradas en infusiones a lactantes. Trabajo de Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

- Bossi P., A. Tegnell, A. Baka, F. Van Loock, J. Hendriks, A. Werner, H. Maidhof, G. Gouvras.** 2004. Bichat guidelines for the clinical management of botulism and bioterrorism-related botulism. *Euro Surveill.* 9(12).
- Bulatova, T. I., K. I. Matveev, I. S. Kazdobina.** 1969. Distribution of *Clostridium botulinum* in the soil of the shores of Lake Balkhash. *Gig. Sanit.* 34: 114-116.
- Burke G. S.** 1919. Notes on *Bacillus botulinus*. *J. Bacteriol.* 4: 555-565.
- Cato E. P., W. L. George, S. M. Finegold.** 1986. Genus *Clostridium*. Prazmowski 1880, 23AL. p. 1141-1200. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- Centers for Disease Control.** 1998. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. Centers for Disease Control, Atlanta.
- Centers for Disease Control.** 2001. Surveillance for Botulism. Summary of 2001 data. Centers for Disease Control, Atlanta.
- Centers for Disease Control.** 2002. Surveillance for Botulism. Summary of 2002 data. Centers for Disease Control, Atlanta.
- Centers for Disease Control.** 2003. Surveillance for Botulism. Summary of 2003 data. Centers for Disease Control, Atlanta.
- Ciccarelli A. S., D. F. Giménez.** 1981. Clinical and epidemiological aspects of botulism in Argentina. p. 291-301. In G. E. Jr. Lewis and P. S. Angel (ed.). *Biomedical Aspects of Botulism*, Academic Press.
- Cobb D. B., W. A. Watson, M. C. Fernandez.** 2000. Botulism-like syndrome after injections of botulinum toxin. *Vet. Hum. Toxicol.* 42:163.
- Cole L. A.** 1996. The specter of biological weapons. *Sci Am.* 275:60-5.
- Collins M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Córdoba, J. Fernández-Garayzabal, P. García, J. Cai, H. Hippe, J. A. E. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 812-826.
- DasGupta B. R., V. Sathyamoorthy.** 1984. Purification and amino acid composition of type A botulinum neurotoxin. *Toxicon.* 22: 1415-1424.
- Davis J. B., L. H. Mattman, M. Wiley.** 1951. *Clostridium botulinum* in a fatal wound

- infection. *J. Am Med. Assoc.* 146:646-648.
- De Rigo A. M.** 1963. Prevalencia de *Clostridium botulinum* en suelos de las provincias de San Luis y Córdoba. Tesis doctoral. Universidad Nacional de San Luis.
- Dezfulian M., V. R. Dowell.** 1980. Cultural and physiological characteristics and antimicrobial susceptibility of *Clostridium botulinum* isolated from foodborne and infant botulism cases. *J.Clin. Microbiol.* 11: 604-609.
- East A. K., M. D. Collins.** 1994. Conserved structure of genes encoding components of botulinum neurotoxin complex M and the sequence for the gene coding for the nontoxic component in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type F. *Curr. Microbiol.* 29:69-77.
- Fenicia, L., A. M. Ferrini, P. Aureli, and M. Pocecco.** 1993. A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 9:671-673.
- Fernández R. A.** 1994. Distribución y prevalencia de *Clostridium botulinum* en Argentina. Implicancia en patología humana y animal. Tesis doctoral. Universidad Juan Agustín Maza.
- Fernández R. A., L. I. T. de Jong, A. S. Ciccarelli, O. N. Centorbi, F. Rosetti, M. L. Farace, A. Francavilla, M. Siravegna.** 2000. Miel y botulismo en Argentina. V Encuentro Bromatológico Latinoamericano, Córdoba, Argentina.
- Freedman M., R. M. Armstrong, J. M. Killian, D. Boland.** 1986. Botulism in a patient with jejunoileal bypass. *Ann. Neurol.* 20:641-643.
- Fujii N., K. Kimura, N. Yokosawa, T. Yashiki, K. Tsuzuki, K. Oguma.** 1993. The complete nucleotide sequence of the gene encoding the nontoxic component of *Clostridium botulinum* type E progenitor toxin. *J. Gen. Microbiol.* 139:79-86.
- Fujinaga Y., K. Inoue, T. Nomura, J. C. Sasaki, Marvayd, M. R. Popoff, S. Kozaki, K. Oguma.** 2000. Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett.* 467:179-183.
- Gamboa M. M., E. Rodriguez, B. Fernandez.** 1993. *Clostridium botulinum* in Costa Rica soils. *Rev. Biol. Trop.* 41: 359-363.
- Gao, Q. Y.** 1984. Distribution of toxigenic *Clostridium botulinum* in coastal areas in China. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 18:129-131.
- Giménez D. F.** 1984. *Clostridium botulinum* subtype Ba. *Zentralbl. Bakteriolog.*

- Parasitenkd. Infektionskr. Abt. Orig. 257: 68-72.
- Giménez D. F., A. S. Ciccarelli.** 1968. *Clostridium botulinum* type F in the soil of Argentina. Appl. Microbiol. 16:732-734.
- Giménez D. F., A. S. Ciccarelli.** 1970a. Another type of *Clostridium botulinum*. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. Orig. 215: 215-220.
- Giménez D. F., A. S. Ciccarelli.** 1970b. Distribución de *Clostridium botulinum* en Mendoza, Argentina. Bol. Of. Sanit. Panam. 69: 505-510.
- Giménez D. F., A. S. Ciccarelli.** 1970c. Studies on strain 84 of *Clostridium botulinum*. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. Orig. 215: 212-220.
- Giménez D. F., J. A. Giménez.** 1993. Serological subtypes of botulinical neurotoxins. p. 421-431. In B. R. Das Gupta (ed.). Botulinum and Tetanus Neurotoxins, Plenum Press, New York.
- Giménez D. F., J. A. Giménez.** 1995. The typing of botulinical neurotoxins. Int. J. Food Microbiology 27: 1-9.
- Giménez, J. A., H. Sugiyama.** 1988. Comparison of toxins of *Clostridium butyricum* and *Clostridium botulinum* type E. Infect. Immun. 56:926-929.
- Griffin, P. M., C. L. Hatheway, R. B. Rosenbaum, R. Sokolow.** 1997. Endogenous antibody production to botulinum toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Chron's Disease. J. Infect. Dis. 175:633-637.
- Gunnison J. B., J. R. Cummings, K. F. Meyer.** 1937. *Clostridium botulinum* type E. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 35: 278-280.
- Hall J. D., L. M. McCroskey, B. J. Pincomb, C. L. Hatheway.** 1985. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulinical toxin from an infant with botulism. J. Clin. Microbiol. 21: 654-655.
- Haq, I., F. Suhadi.** 1981. Epidemiological report: incidence of *Clostridium botulinum* in coastal and inland areas of West Java. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 34:231-235.
- Hatheway C. L.** 1990. Toxigenic clostridia. Clin. Microbiol. Rev. 3: 66-98.
- Hatheway C. L., L. M. Mc Croskey.** 1987. Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients. J. Clin. Microbiol. 25: 2334-2338.
- Hatheway C. L., L. M. Mc Croskey, G. L. Lombard, V. R. Dowell.** 1981. Atypical toxin variant of *Clostridium botulinum* type B associated with infant botulism. J. Clin. Microbiol. 14. 607-611.

- Hauschild A. H. W.** 1989. *Clostridium botulinum*. p.112-189. In M. P. Doyle (ed.). Foodborn bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hauser D., M. W. Eklund, P. Boquet, M. R. Popoff.** 1994. Organization of the botulinum neurotoxin C1 gene and its associated non-toxic protein genes in *Clostridium botulinum* C 468. Mol. Gen. Genet. 243:631-640.
- Hazen E. L.** 1937. A strain of *B. botulinus* not classified as type A, B, or C. J. infect. Dis. 60: 260-264.
- Holdeman L. V., J. B. Brooks.** 1970. Variation among strains of *Clostridium botulinum* and related clostridia. p. 278-286. In M. Hetzberg (ed.) Proceedings of the First U. S. - Japan Conference of Toxic Microorganisms, Washington DC.
- Holzer E.** 1962. Botulism Durch inhalation. Med. Klinik 57: 1735-1738.
- Huss, H. H.** 1980. Distribution of *Clostridium botulinum*. Appl. Environ. Microbiol. 39:764-769.
- Hutson R. A., D. F. Thompson, P. A. Lawson, R. P. Schocken-Itturino, E. G. Bötger, M. D. Collins.** 1993. Genetic interrelationships of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B F and other members of the *Clostridium botulinum* complex as revealed by small-subunit rRNA gene secuencias. Antonie van Leeuwenhock 64: 273-283.
- Inoue K., Y. Fujinaga, K. Honke, H. Arimitsu, N. Mahmut, Y. Sakaguchi, T. Ohyama, T. Watanabe, K. Inoue, K. Oguma.** 1999. Characterization of haemagglutinin activity of *Clostridium botulinum* type C and D 16S toxins, and one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiology* 145:2533-2542.
- Inoue K., Y. Fujinaga, K. Honke, H. Arimitsu, N. Mahmut, Y. Sakaguchi, T. Ohyama, T. Watanabe, K. Inoue, K. Oguma.** 2001. *Clostridium botulinum* type A haemagglutinin-positive progenitor toxin (HA+-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiology* 147: 811-819.
- Johnson E. A., M. Bradshaw.** 2001. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon* 39: 1703-1722.
- Kamata Y., Y. Kimura, T. Hirió, G. Sakaguchi, S. Kozaki.** 1993. Purification and characterization of the ganglioside-binding fragment of *Clostridium botulinum* type E neurotoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 213-218.

- Kamata Y., M. Yoshimoto, S. Kozaki.** 1997. Interaction between botulinum neurotoxin type A and ganglioside: ganglioside inactivates the neurotoxin and quenches its tryptophan fluorescence. *Toxicon* 35:1337-1340.
- Karasawa, T., X. Wang, T. Maegawa, S. Nakamura, B. M. Hang'ombe, and E. Isogai.** 2000. Demonstration of botulinum toxins of types B and D in soil samples from Zambia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94:409-411.
- Kobayashi T., K. Watanabe, K. Ueno.** 1992. Distribution of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in Okinawa Prefecture. *Kansenshogaku Zasshi* 66:1639-1644.
- Kozaki S., J. Ogasawara, Y. Shimote, Y. Kamata, G. Sakaguchi.** 1987. Antigenic structure of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids. *Infect. Immun.* 55:3051-3056.
- Lalli G., S. Bohnert, K. Deinhardt, C. Verastegui, G. Schiavo.** 2003. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.* 11: 431-437.
- Lee W. H., H. Riemann.** 1970. Correlation of toxic and nontoxic strains of *Clostridium botulinum* by DNA composition and homology. *J. Gen. Microbiol.* 60: 117-123.
- Leuchs J.** 1910. Beitrage zur Kenntnis des Toxins und Antitoxins des *Bacillus botulinus*. *Z. Hyg. Infektionsskr.* 65: 55-84.
- McCroskey L. M., C. L. Hatheway.** 1988. Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1052-1054.
- McCroskey L. M., C. L. Hatheway, L. Fenicia, B. Pasolini, P. Aureli.** 1986. Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J. Clin. Microbiol.* 23: 201-202.
- McCroskey L. M., C. L. Hatheway, B. A. Woodruff, J. A. Greenburg, P. Jurgenson.** 1991. Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2618-2620.
- Merson M. H., V. R. Dowell.** 1973. Epidemiologic, clinical, and laboratory aspects of wound botulism. *N. Engl. J. Med.* 289:1005-1010.
- Meyer K. F., B. J. Dubovsky.** 1922. The distribution of the spores of *B. botulinus* in the United States. IV. *J. infect. Dis.* 31:559-594.

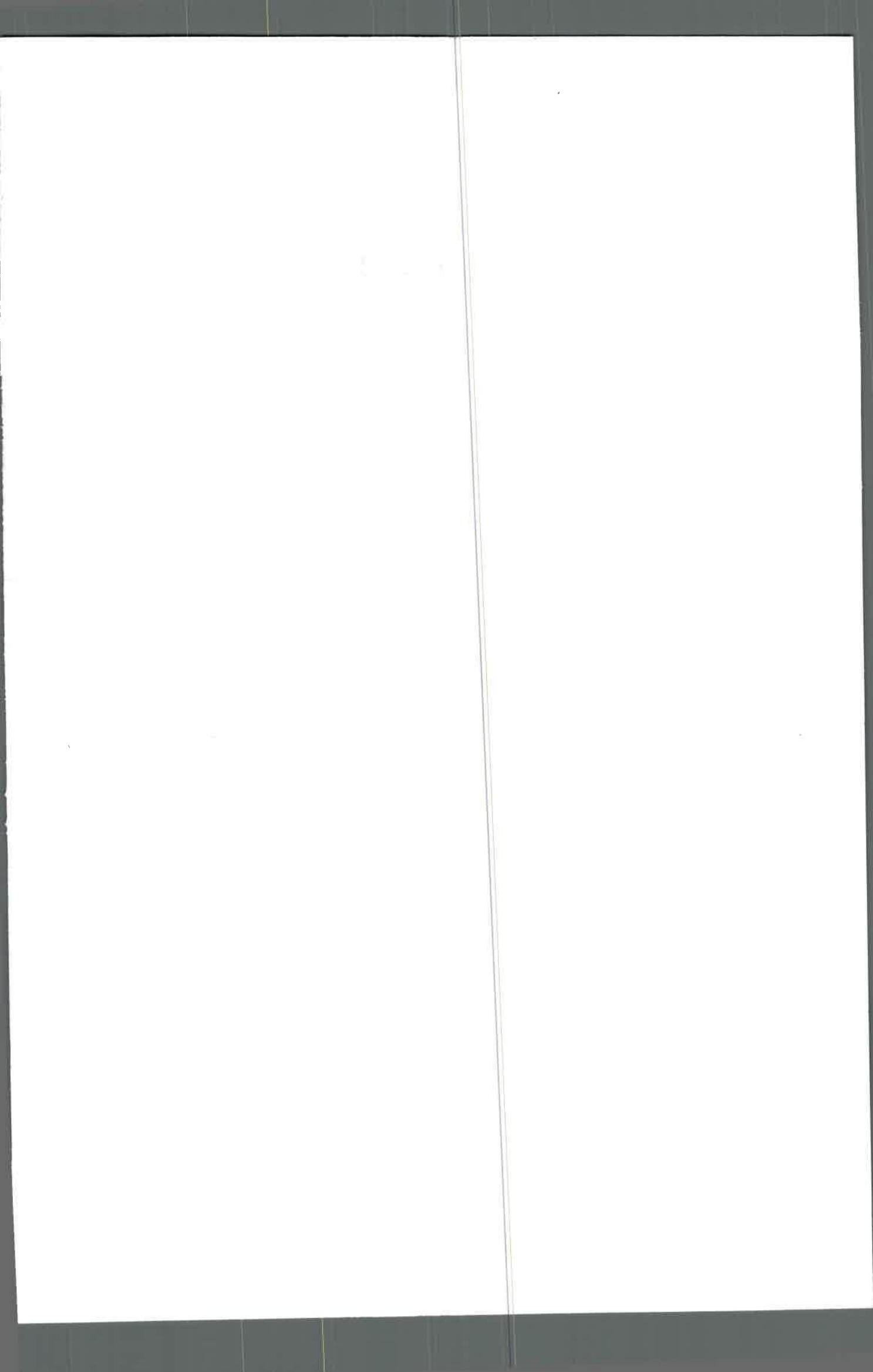
- Meyer K. F., J. B. Gunnison.** 1928. *Clostridium botulinum* type D, Sp. Nov. proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26: 88-89.
- Midura T. F.** 1996. Update: Infant botulism. Clin. Microbiol. Rev. 9:119-125.
- Midura T. F., S. Snowden, R. M. Wood, S. S. Arnon.** 1979. Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. J. Clin. Microbiol. 9: 282-283.
- Minton N. P.** 1995. Molecular genetics of clostridial neurotoxins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 195:161-194.
- Moller V., I. Scheibel.** 1960. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Cl. botulinum*. Acta pathol. Microbiol. Scand. 48: 80.
- Montecucco C.** 1986. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?. Trends Biochem. Sci. 11: 315-317.
- Montecucco C., G. Schiavo, V. Tugnoli, D. de Grandis.** 1996. Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. Molecular Medicine Today. Reviews.
- Montecucco C., E. Papini, G. Schiavo.** 1994. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. FEBS Lett. 346: 92-98.
- Mortojudo J. W., E. G. Siagian, F. Suhadi, B. Q. Ward, W. M. S. Ward.** 1973. The presence of *Clostridium botulinum* in Indonesian waters. J. Appl. Bacteriol. 36:437-440.
- Nevas M., M. Lindström, A. Virtanen, S. Hielm, M. Kuusi, S. S. Arnon, E. Vuori, H. Korkeala.** 2005. Infant botulism acquired from household dust presenting as sudden infant death syndrome. J. Clin. Microbiol. 43:511-513
- Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S.** 1996. The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. FEBS Lett. 378:253-7.
- Nores G. A., R. K. Mizutamari, D. M. Kremer.** 1994. Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. J. Chromatogr. A 686: 155-157.
- Notermans, S. H., A. H. Havelaar, J. B. Dufrenne, J. Oosterom.** 1985. Incidence of *Clostridium botulinum* on cattle farms. Tijdschr Diergeneeskd 110:175-180

- Ochanda J. O., B. Syuto, I. Ohishi, M. Naike, S. Kubo.** 1986. Binding of *Clostridium botulinum* neurotoxin to gangliosides. *J. Biochem.* 100: 27-33.
- Ohishi I., S. Sugi, G. Sakaguchi.** 1977. Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size. *Infect. Immun.* 16:107-109.
- Parry E. W.** 1946. Prevalence of *Clostridium botulinum* in soils of central New York State. *Food Research* 11: 203-209.
- Passaro D. J., S. B. Werner, J. McGee, W. R. MacKenzie, D. J. Vugia.** 1998. Wound botulism associated with black tar heroin among injecting drug users. *JAMA.* 279: 859-863.
- Pellizzari R., O. Rosseto, G. Schiavo, C. Montecucco.** 1999. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philosoph. Trans. Royal Soc. Lond. Biol. Sci.* 354: 259-268.
- Poumeyrol M., J. Billon, F. DeLille, C. Haas, A. Marmonier, M. Sebald.** 1983. Intoxication botulique mortelle due a une sucoche de *Clostridium botulinum* de type AB. *Malady and Infection* 13: 750-754.
- Prêvot A. R.** 1953. Rapport d'introduction du president du souscomite *Clostridium* pour l'unification de la nomenclature des types toxigeniques de *C. botulinum*. *International Bulletin of Bacterial Nomenclature* 3: 120-123.
- Reed L. J., H. Muench.** 1938. A simple method for estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Rossetto O., M. Seveso, P. Caccin, G. Schiavo, C. Montecucco.** 2001. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bud guys into good by research. *Toxicon* 39:27-41.
- Satorres S. E., L. E. Alcaráz, R. A. Fernández, O. N. Centorbi.** 1999. Isolation of *Clostridium botulinum* in medicinal plants. *Anaerobe.* 5:173-175.
- Schantz E. J.** 1964. Purification and characterization of *Clostridium botulinum* toxins. En KH Lewis y K Cassel (ed), *Botulism, Proceedings of a symposium*, US Dep. Hlth. Educ. Welf, Public Hlth. Serv.
- Schengrund C. L., B. R. DasGupta, N. J. Ringler.** 1991. Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. *J. Neurochem.* 57: 1024-1032.
- Schiavo G., M. Matteoli, C. Montecucco.** 2000. Neurotoxins affecting neuro exocytosis. *Physiol. Reviews* 80: 717-766.

- Schocken-Iturrino R. P., M. C. Carneiro, E. Kato, J. O. B. Sorbara, O. D. Rossi, L. E. R. Grebasi.** 1999. Study of the presence of spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. FEMS Imm. Med. Microbiol. 24: 379-382.
- Scott A. B.** 1980. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. Ophthalmology 87: 1044-1049.
- Seddon H. R.** 1922. Bulbar paralysis in cattle due to the action of a toxicogenic bacillus with a discussion of the relationship of the condition of forage poisoning (botulism). J. Comp. Pathol. Ther. 35: 147-190.
- Smith, G. R., A. M. Young.** 1980. *Clostridium botulinum* in British soil. J. Hyg. 85:271-274.
- Smith, L. D.** 1975. Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, in 21 soil specimens. Appl. Microbiol. 29: 590-594.
- Smith, L. D.** 1978. The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. Health Lab. Sci. 15: 74-80.
- Smith, L. D., G. Hobbs.** 1974. Genus *Clostridium*. Prazmowski 1880, 23 p. 551-572. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- Sonnabend O. A., W. F. Sonnabend, U. Krech, G. Molz, T. Sigrist.** 1985. Continuous microbiological study of 70 sudden and unexpected infant deaths: toxigenic intestinal *Clostridium botulinum* infection in 9 cases of sudden infant death syndrome. Lancet ii: 237-241.
- Sonnabend W. F., U. P. Sonnabend, T. Krech.** 1987. Isolation of *Clostridium botulinum* type G from Swiss soil specimens by using sequential steps in an identification scheme. Appl. Environ. Microbiol. 53:1880-1884.
- Stackebrandt E., F. A. Rainey.** 1997. Phylogenetic relationships. p. 3-19. In J. I. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, R. W. Titball (ed.). The clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press, San Diego.
- Sterne M., L. M. Wentzel.** 1950. A new method for the large-scale production of high-titre botulinum formol-toxoid types C and D. J. Immunol. 65: 175-183.
- Suen J. C., C. L. Hatheway, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner.** 1988a. *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously

- identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 375-381.
- Sugi S., I. Ohishi, G. Sakaguchi.** 1977. Correlation between oral toxicity and in vitro stability of *Clostridium botulinum* type A and B toxins of different molecular sizes. Infect. Immun. 16:910-914.
- Sugi S., I. Ohishi, G. Sakaguchi.** 1978. Molecular sizes of botulinum toxins in foods. Japan J. Med. Sci. Biol. 31: 159-161.
- Suhadi F., S. S. Thayib, N. Sumarsono.** 1981. Distribution of *Clostridium botulinum* around fishing areas of the western part of Indonesian waters. Appl. Environ. Microbiol. 41:1468-1471.
- Swenson J. M., C. Thornsberry, L. M. McCroskey, C. L. Hatheway, V. R. Dowell.** 1980. Susceptibility of *Clostridium botulinum* to thirteen antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 13-19.
- Tabita K., S. Sakaguchi, S. Kosaki, G. Sakaguchi.** 1991. Distinction between *Clostridium botulinum* type A strains associated with food-borne botulism and those with infant botulism in Japan in intrainestinal toxin production in infant mice and some other properties. FEMS Microbiol. Lett. 79: 251-256.
- Takamizawa K., M. Iwamori, S. Kozaki, G. Sakaguchi, R. Tanaka, H. Takayama, Y. Nagai.** 1986. TLC immunostaining characterization of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids. FEBS Lett. 201:229-232.
- Tugnoli V., R. Eleopra, R. Quatrate, J. G. Capone, M. Sensi, E. Gastaldo.** 2002. Botulism-like syndrome after botulinum toxin type A injections for focal hyperhidrosis. Br. J. Dermatol. 147: 808-809.
- van Ermengem E.** 1897. Ueber einem anaeroben *Bacillus* und seine Beziehungen zum Botulismus. Z. Hyg. Infektionskrankh 26: 1-56. English translation 1979 Rev. Infect. Dis. 1: 701-719.
- Walkley A., I. A. Black.** 1934. An examination of *degtjareff* method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. Soil. Sci. 37: 29-37.

- Wobeser G., S. Marsden, R. J. MacFarlane.** 1987. Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* type C in the soil of wetlands in Saskatchewan. J. Wildl. Dis. 23:67-76.
- Yamakawa K., S. Kamiya, S. Nishida, K. Yoshimura, H. Yu, D. Y. Lu, S. Nakamura.** 1988. Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang district of China. Microbiol. Immunol. 32:579-587.
- Yamakawa K., T. Hayashi, S. Kamiya, K. Yoshimura, S. Nakamura.** 1990. *Clostridium botulinum* in the soil of Paraguay. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 43:19-21.
- Yowler B. C., C. L. Schengrund.** 2004. Glycosphingolipids-Sweets for botulinum neurotoxin. Glycocon. J. 21:287-293.



U.N.R.C.
Biblioteca Central



62161

62161