

## CLOSTRIDIUM TETANI EN SUELOS DE LA CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Francisco Hernández<sup>1</sup>, Evelyn Rodríguez<sup>1</sup>, Pablo Vargas<sup>1</sup> y Maricela Umaña<sup>1</sup>.

### RESUMEN

*Clostridium tetani* es un habitante de suelos y el agente etiológico del tétanos. La distribución de este agente en suelos de diferentes países muestra un ámbito de 7 a 53%, tal amplitud podría deberse a la sensibilidad de los métodos empleados o reflejar una distribución real. Para evaluar su frecuencia en suelos de la Universidad de Costa Rica, 30 muestras de suelo fueron recogidas cerca de cada Facultad y cultivadas por *C. tetani*. Se encontraron 13 muestras positivas, 9 fueron toxigénicas y 4 no toxigénicas. Además, se identificaron 3 áreas del Campus en las cuales se encontraron conglomeraciones de cepas positivas. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1996- 17-2 34-38)

### Palabras clave:

*Clostridium tetani*, microbiología de suelos, tétanos, fenómeno de "swarming".

### INTRODUCCION

*Clostridium* es un género de bacterias anaerobias, bacilares, Gram positivas, esporuladas que habitan suelos, sedimentos marinos e intestino de animales (1, 2, 3). El género incluye

1- Laboratorio de Investigación en Bacterias Anaerobias (LIBA), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

unas 20 especies toxigénicas, entre ellas *C. tetani* causante del tétanos (2).

*C. tetani* es parte de la microbiota del suelo y por esa razón la mayoría de los casos de tétanos se asocian con traumatismos expuestos contaminados con tierra. Sin embargo, la frecuencia descrita para esta bacteria en el suelo de diferentes territorios oscila desde 7% (4) hasta 53% (5). Tal ámbito podría reflejar realmente una distribución heterogénea de la bacteria en los territorios evaluados; aunque podría deberse sólo a la sensibilidad de los métodos de aislamiento empleados en los diversos estudios, o bien a ambos factores.

En este informe se describe la frecuencia de aislamiento de *C. tetani* en suelos de la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio; una zona en la cual se realizan muchas actividades relacionadas directa o indirectamente con el suelo, que incluye desde los trabajos propios de jardinería, hasta deportes y entrenamientos en agrimensión; por lo tanto, la presencia de esta bacteria en el suelo obviamente representa un riesgo para la salud de los involucrados en tales actividades.

### MATERIAL Y METODOS

Se colectaron 30 muestras de suelo (ca. 100 g/muestra) en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica. Los sitios de muestreo se seleccionaron tratando de obtener una muestra representativa del área. Se

tomó una muestra cercana a cada Facultad, en zonas donde el terreno aparentemente no fuese removido con frecuencia (Fig. 1, Cuadro 1).

Las muestras se desecaron a 30°C por 2 a 3 semanas, se molieron en morteros, se tamizaron a través de mallas con una porosidad de ca de 0,5 mm de diámetro y de cada muestra se hizo una suspensión de 1 g en 5 ml de solución salina estéril. De esa suspensión se tomaron dos alícuotas de 1,5 ml, una se calentó a 60°C/10 min y ambas se inocularon en sendos tubos de caldo de carne cocida prerreducidos. Los tubos se incubaron a 35°C durante 7 días, extrayendo muestras para cultivo a los 2 y 7 días. La inoculación de cada muestra se realizó en agar sangre, mediante una estría con asa bacteriológica, cerca de la periferia del plato e incubándole en anaerobiosis (GasPak) a 35°C por 24 horas. Si hubo una película de crecimiento, tipo "swarming", se tomó una asada del borde de esa película y se rayó en otra placa de agar sangre, pero esta vez con agar al 4% (lo que denominamos "agar duro"), cuyo objetivo es inhibir el fenómeno de "swarming" y obtener colonias discretas que permitan verificar la pureza de las cepas aisladas (3).

Las cepas obtenidas se identificaron mediante pruebas bioquímicas y cromatográficas (1). Las posibles cepas de *C. tetani* o *C. botulinum* se sometieron a pruebas de patogenicidad en ratones y subsiguiente neutralización con antitoxinas específicas (6).

## RESULTADOS

Se identificaron 15 cepas de *C. tetani* aisladas a partir de 13 muestras de suelos (43 %), cuya distribución se ilustra en la figura 1 y el cuadro 1. A

partir de 9 muestras se obtuvieron 10 cepas productoras de tetanospasmina, pues la inoculación de sobrenadantes libres de células de esos cultivos fueron letales para ratones y la inoculación en ratones previamente tratados con suero antitetánico no causó ningún efecto, o sea que se neutralizó la toxina, lo que corrobora que se trató de tetanospasmina.

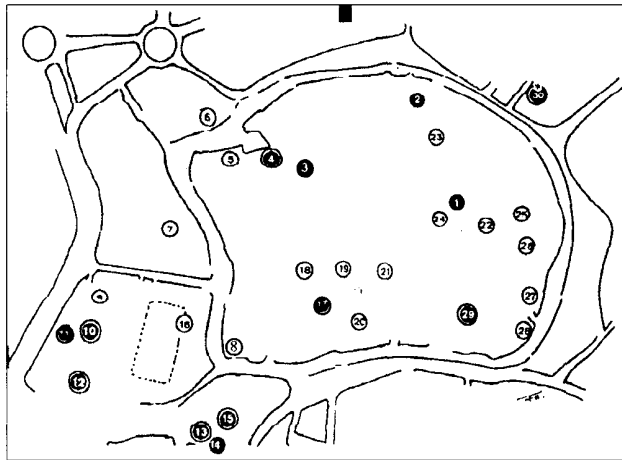
El análisis de la distribución de las muestras analizadas en el Campus mostró dos áreas en las que, aparentemente hay conglomeración de muestras positivas, ambas localizadas en el extremo suroeste del Campus. La primera de esas áreas incluye las muestras 10, 11 y 12, que corresponden a los sitios cercanos al Auditorio de Derecho, y los Edificios Administrativos. La segunda área está representada por las muestras 13, 14 y 15, que corresponden a las zonas verdes de los edificios de Arquitectura y Enfermería (Fig. 1). También las muestras 3 y 4 presentaron cepas toxigénicas y fueron tomadas de dos zonas relativamente cercanas (Facultad de Odontología y Biblioteca de Ciencias de la Salud, respectivamente) De la muestra 30, correspondiente a la Facultad de Agronomía e indicada con un asterisco en la figura 1, se aislaron dos cepas, una toxigénica y otra no toxigénica.

**CUADRO 1**  
**Distribución de muestras de suelo cultivadas por**  
*Clostridium tetani*

1.	Fac. Biología *	16.	Bibliot. Tinoco
2.	Fac. Farmacia *	17.	Bibliot. C. Monge **
3.	Biblioteca Cienc. Salud **	18.	Esc. Físico Matemat.
4.	Fac. Odontología **	19.	Esc. Cienc. Sociales
5.	Esc. Geología	20.	Estudios Generales
6.	Esc. Letras	21.	Plaza 24 abril
7.	Centro Recreación	22.	Esc. Química
8.	Fac. Ingeniería	23.	Fac. Microbiología
9.	Fac. Derecho	24.	Esc. Química
10.	Auditorio Derecho **	25.	Esc. Artes Musicales
11.	Edificio Administr. A *	26.	Esc. Bellas Artes
12.	Edificio Administr. B **	27.	Esc. Bellas Artes
13.	Fac. Arquitectura **	28.	Esc. Educación
14.	Esc. Enfermería *	29.	Esc. Educación**
15.	Esc. Enfermería **	30.	Fac. Agronomía *, **

\* *C. tetani* no toxigénica.

\*\* *C. tetani* toxigénica.



**DESCRIPCION DE LA FIGURA 1.**

Esquema de la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, en que se ilustran los sitios de muestreo. Los números en círculos negros indican las muestras positivas por *C. tetani*. Los círculos sencillos corresponden a cepas no toxigénicas y los círculos dobles a muestras toxigénicas. La muestra 30 se resalta con un asterisco para indicar que produjo dos cepas una toxigénica y otra no. En el Cuadro 1 se indica la ubicación de cada muestra.

## DISCUSION

La frecuencia de *C. tetani* obtenida en este estudio fue de 43% (13 muestras positivas); previamente en 30 muestras obtenidas de la Meseta Central sólo se había encontrado un 7%, 2 muestras positivas (4). Tal diferencia podría deberse a la metodología empleada, pues en el trabajo de Rodríguez et. al (4) se trató de aislar el mayor número posible de especies de *Clostridium*, en tanto en el presente estudio la metodología se orientó exclusivamente al aislamiento de las especies de *Clostridium* con desplazamiento tipo "swarming", entre las cuales destaca *C. tetani* (7, 8).

El muestreo realizado, tomando un espécimen de suelo en el área verde correspondiente a cada edificio del Campus de la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, brinda una idea de la distribución de *Clostridium tetani* en este Campus, cuya área es de aproximadamente 50 hectáreas. Además, debe considerarse que esta zona presenta condiciones especiales en cuanto a manejo de los suelos, si se compara con otro territorio, pues es atendido por las mismas cuadrillas de jardineros que están removiendo plantas; a la vez los trabajos de construcción y remoción de suelos podrían estar llevando a una homogeneización del suelo, redistribuyendo su microbiota. Ello podría explicar las conglomeraciones de cepas de *C. tetani*. Por ejemplo, la primera zona mencionada incluye las muestras 10, 11 y 12, de ellas sólo la 11 produjo una cepa no toxigénica; esta área corresponde a una de las zonas de construcción más reciente del Campus, que incluye el Auditorio de la Facultad de Derecho y los edificios administrativos. Cerca de esos edificios

se ubica la cancha de fútbol, indicada en la figura 1 por un rectángulo en línea discontinua. La cercanía de esas zonas positivas a una área dedicada al deporte, refuerza la necesidad de mantener al día los esquemas de vacunación anti-tetánica, sobre todo en los usuarios de ese campo deportivo.

La segunda área de conglomeración de muestras positivas corresponde a las muestras 13, 14 y 15.

En esa zona se ubican los edificios de la Facultad de Arquitectura y la Escuela de Enfermería; sin embargo, en el pasado, allí estuvo la Facultad de Agronomía y es posible que por el tipo de trabajo y prácticas de campo de los agrónomos, la microbiota de esa zona haya sido enriquecida con bacterias transportadas de otros sitios. Eso parece reforzarse por el hallazgo de dos cepas, una toxigénica y otra no, en la muestra 30, correspondiente a los alrededores del edificio actual de la facultad de Agronomía. La recomendación lógica es que los trabajadores y estudiantes de Agronomía deben mantener al día su esquema de vacunación.

Finalmente, también se aislaron cepas toxigénicas de las muestras cercanas a la Biblioteca de Ciencias de la Salud y Facultad de Odontología, ubicadas prácticamente en la misma área. Estos datos indican la importancia de exigir el esquema de vacunación antitetánico a los pacientes de Odontología.

Los datos obtenidos deben motivar a mantener al día los esquemas de vacunación contra este agente en la población universitaria y si no, al menos en los trabajadores y estudiantes, cuya labor involucra contacto con el suelo, tal como se está haciendo (M. Romero. Oficina de Salud, UCR, comunicación personal). La población de las áreas

señaladas con conglomeración de muestras positivas por *C. tetani* toxigénicas deben vacunarse prioritariamente.

Este llamado a actualizar y vigilar los esquemas de vacunación es importante, pues la campaña de vacunación anti-tetánica ya cumplió los diez años y comienza a mostrar fallas. Durante 1995 (9) se informó de 6 casos de tétanos, 3 de los cuales fueron fatales. Ello hace sospechar que no toda la población del país cuenta con el esquema completo de vacunación, que incluye la aplicación del toxoide cada diez años, el cual posiblemente lo estén recibiendo sólo los individuos que debido a un trauma importante acuden a recibir atención médica.

#### ABSTRACT

*Clostridium tetani* is an inhabitant of soils and the etiological agent of tetanus. It is widely distributed in soils and positive isolates in different countries ranged from 7 to 53%. The wide range could be the result of culture method variability or reflect real distribution differences. To evaluate its frequency in soils of the University of Costa Rica main campus, 30 samples of soil taken near each building Faculty were cultured for *C. tetani*. Fifteen strains were isolated from 13 samples (42%); 9 of them were toxigenic. Also, three areas of the Campus were identified with clusters of positive samples.

#### REFERENCIAS

1. Cato EP, George W, y Finegold S M. Genus *Clostridium* Prazmowski 1890. En: Sneath, P.H. A. (ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. William and Wilkins, Baltimore. 1986; p. 1141-1120.
2. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 3: 66-98.
3. Smith LDS, Williamns BL. The pathogenic anaerobic bacteria, 3th ed. C. C. Thomas, Springfield, Illinois. 1984; 331p.
4. Rodríguez E, Gamboa MM, Fernández B. Clostridios mesófilos en suelos de la Meseta Central de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1993; 41: 365- 370.
5. Beland S, Rossier E. Isolement et identification de *Clostridium tetani* dans le sol des cantos de L'Est de la province de Quebec. *Can. J. Microbiol.* 1973; 19: 1513-1518.
6. Holdelman LV, Cato EP, Moore WEC. (Eds.) Anaerobe manual. 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 1977; 152 p.
7. Hernández F, Rodríguez E. The swarming phenomenon in *Clostridium tetani*. *Rev. Biol. Trop.* 1993; 42: 101-104.
8. Hernández, F. y Rodríguez, E. El fenómeno de "swarming" y otros tipos de desplazamiento bacteriano. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1993; 14: 45-51.
9. Trejos ME. Casos de tétanos 1995. *Semana Epidemiológica*, Ministerio de Salud, Costa Rica. 1995;39:1 -2.