

720394

# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



(4)  
401

Incidencia de Clostridium perfringens  
en Carnes y su Importancia Sanitaria

**TESIS PROFESIONAL**

Que Para Obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

Beatriz de Gpe. Serrano López

México, D. F.

1978



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB. TESIS 1978  
ABO M. T. ~~405~~ 399  
FECHA \_\_\_\_\_  
PREC \_\_\_\_\_  
2 9 \_\_\_\_\_



PRESIDENTE Natalia Salcedo Olavarrieta  
VOCAL Maria Luisa García Padilla  
SECRETARIO Enrique Bravo Medina  
1er. SUPLENTE Lilia Vierna García  
2o. SUPLENTE Olga Velazquez Madrazo

Sitio donde se desarrolló el Tema: Facultad de Química  
Instituto de Biología

Sustentante Beatriz de Gpe. Serrano López  
Asesor del Tema Natalia Salcedo Olavarrieta  
Supervisor Técnico Enrique Bravo Medina.

*Beatriz Serrano López*  
*Natalia Salcedo Olavarrieta*  
*Enrique Bravo Medina*

A mi madre

A mis abuelos

A mis hermanos

Al I. Q. Benedicto Serrano Alvarez.

Con cariño y agradecimiento a:

Los Sres. Carmen y Juan Antonio Careaga  
Mtra. Maria Luisa García Padilla  
Mtra. Natalia Salcedo Olavarrieta.

A mis amigos.

Temario	PAG.
Introducción	1
Generalidades	3
Pruebas Bioquímicas	8
Enfermedades e Intoxicaciones	9
Incidencia de <i>C. perfringens</i> en alimentos	17
Tablas	36
Gráficas	55
Importancia Sanitaria	61
Esporas y Toxinas	70
Gráficas	80
Inhibición de <i>C. perfringens</i>	86
Tablas	92
Conclusión	102
Bibliografía	105

## INTRODUCCION

La salud en la población mexicana ha ido mejorando considerablemente en este siglo, de 505,000 defunciones por 15 millones — de habitantes (33 %) en 1919, se disminuyó a solamente 9 de cada 1,000 (0.9 %) en 1972. Este descenso se debe principalmente a la — disminución del número de personas que mueren antes de los 15 — años. A pesar de que el porcentaje de estos menores representa — el 48.4 % en relación con el de defunciones totales.

Este hecho, aparentemente, indica una mejora constante de — todo lo relacionado con la salud. Sin embargo, parecería ser que — un aumento en la densidad de población es sinónimo de una mala — higiene.

La demanda alimenticia es tan grande hoy en día que los com — comerciantes venden sus alimentos sin dar casi ninguna importancia — a las medidas sanitarias que deben observarse con éstos. Prueba — de ello es el gran número de infecciones gastrointestinales que pa — dece la población. Entre éstas las enteritis y las enfermedades dia — rreicas juegan un papel importante por la incidencia que presentan — siendo la población preescolar la más afectada, ya que es la que pa — dece más infecciones gastrointestinales, y la clase campesina humil — de y los habitantes de las colonias proletarias son los que sufren — en mayor proporción de estos padecimientos, por lo que puede dedu — cirse que la higiene inadecuada de los alimentos no se debe única — mente a los comerciantes, sino a que en la mayoría de los hogares — tampoco prestan atención a este asunto.

La enteritis, entre otras, es de las enfermedades gastrointes — tinales debida a la negligencia para el manejo higiénico de alimen — tos, uno de los microorganismos que la produce es Clostridium per — fringens. Este se desarrolla de preferencia en áreas altamente —

contaminadas, por lo que si no se toman en cuenta las normas sanitarias, habrá desarrollo del microorganismo y por lo tanto contaminación de alimentos.

El objetivo de este trabajo es señalar la importancia de que -- Clostridium perfringens es uno de los microorganismos anaerobios más abundantes en la naturaleza, causante de intoxicaciones y enfermedades y al mismo tiempo hacer hincapié en la importancia sanitaria de los alimentos, de lo cual parece no existir conciencia en la mayoría de los responsables del manejo de ellos.

## II. - GENERALIDADES

Clostridium perfringens es un microorganismo anaeróbico - que se encuentra en la mayoría de los alimentos que contienen -- un gran contenido proteico. Fué reportado por primera vez en - - 1800 asociado con la gastroenteritis. En 1945, Mc Clung demostró su etiología en las intoxicaciones al realizar una investigación en 4 brotes relacionados con el consumo de pollo.

Clostridium perfringens fue reconocido como un importan-- te productor de envenenamiento en alimentos en EE UU. y Gran -- Bretaña en 1953.

Se aisló en Pudget Sound (Washington) y su distribución - en la población total de los Clostridia se determinó en entrañas de pollo, áreas altamente contaminadas, sedimentos de agua dulce y suelos. El número mayor de este microorganismo fue obtenido en sedimentos marinos cerca de la salida del drenaje de West Point y un menor número de aislamientos fué hecho a partir de pescado recolectado en zonas menos contaminadas.

Las esporas de esta bacteria están en casi todos los alimen-- tos crudos, cocidos y en excrementos de animales. Su incidencia principal es en carnes, pescados, pollos, salsas, sopas y especias

Su transmisión se lleva a cabo generalmente por una hi-- giene insuficiente de utensilios manipulados y personal mal ase-- do.

## 2.1 Taxonomía.

La familia Bacillaceae, a la cual pertenece C. perfringens -- se encuentra dividida en 2 grandes grupos:

### I) Células de forma redondeadas.

A). - Anaerobias o facultativas, producen catalasa  
Género I Bacillus

B). - Microanaerobias, no producen catalasa  
Género II Sporolactobacillus

C). - Anaerobias

1. - No reducen sulfatos a sulfuros.

Género III Clostridium.

2. - Reducen sulfatos a sulfuros.

Género IV Desulfotomaculum

### II) Células esféricas en paquetes.

Género V Sporosarcina.

Los miembros de esta familia son células esféricas. No producen micelio, la mayoría son Gram + , tienen movilidad por flagelos peritricos, laterales, o bien son inmóviles. Forman endosporas que se diferencian de las células vegetativas en que son altamente resistentes, pues están envueltas por una capa exterior llamada "exosporio". Presentan un alto contenido de proteínas, aminoácidos sulfurados, calcio, DPA (5-15% en base seca), y tienen un bajo contenido de polisacáridos. No consumen O<sub>2</sub> del medio y la actividad enzimática es prácticamente nula.

Son resistentes a la acción de la lisozima, calor, radiaciones, desinfectantes y antibióticos.

El género Clostridium comprende cerca de 100 especies, éstas, algunas veces, se dividen en base a sus propiedades enzimáticas de fermentación o proteólisis.

Las principales características del género Clostridium, pueden observarse en el siguiente cuadro:

Células formadoras de esporas, gram + o gram variables, Anaerobias no producen catalasa.

A). - Fermentadores de compuestos nitrogenados:

1). - Fermentadores de uno o pares de amino ácidos -- con formación de ac. butírico, propiónico,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ .

a). - Proteolíticos.

C. botulinum.

C. tetani.

C. sporogenes.

b). - No proteolíticos

C. tetanomorphum.

2). - Fermentadores de purinas y ác. úrico con producción de  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  y ác. -- acético.

C. acidurici

B). - Fermentadores de carbohidratos. Azúcares, almidón y pectina son fermentados para producir grandes cantidades de ác. acético y butanol.

1). - Productores de -- isopropanol,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ .

C. butyricum.

C. perfringens.

C. pasteurianum.

C. acetobutyricum.

2). - Fermentadores de celulosa con producción de ác. acético, -- ác. succínico, etanol,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ .

C. cellobioperum.

3). - Fermentadores de -- mezclas de etanol, ác. acético y ác. grasos superiores.

C. kluyverii

La Taxonomía de este tipo de bacterias es confusa, ya que no existen los suficientes datos para elaborar un estudio de este tipo. Por conveniencia para su identificación, el género está dividido en 4 grupos, basándose en la posición de la espora y en la licuefacción de la gelatina.

Grupos del género Clostridium:

- |                               |   |                        |
|-------------------------------|---|------------------------|
| A). - No hidrolizan gelatina  | → | Esporas subterminales. |
| B). - Si hidrolizan gelatina  | → |                        |
|                               |   |                        |
| A). - No hidrolizan gelatina. | → | Esporas terminales.    |
| B). - Si hidrolizan gelatina. | → |                        |

Todos los Clostridia son anaerobios estrictos, gram +, por lo menos en las primeras etapas del crecimiento. Son bacterias cilíndricas que forman esporas ovoides o esféricas que ocasionalmente distienden al bacilo. Algunas especies del género Clostridium producen esporas con protuberancias prominentes; éstas están compuestas de glucosamina, fosfatos y 17 a. a. comunes.

La mayoría de las especies son móviles, usualmente por flagelos peritricos y ocasionalmente son inmóviles. Varían en forma y tamaño, el promedio de sus dimensiones es de 0.5- 10.00  $\mu\text{m}$ .

Para su desarrollo requieren de un medio orgánico complejo como carne (preferentemente cocinada), o glucosa sangre, ya que fermentan azúcares, polialcoholes, a. a., ác. orgánicos, purinas y otros muchos compuestos orgánicos. Algunos géneros fijan  $\text{N}_2$  y no reducen a los sulfatos.

Este género incluye entre otros a los microorganismos productores de tétanos, gangrena gaseosa y botulismo.

Dentro de este género se encuentra la especie perfringens; - también conocida como welchii. Es una bacteria pequeña, delgada, con terminaciones redondas. Sus dimensiones son 0.9-1.3 x 3.0 -  $\mu\text{m}$ , es gram +, por lo menos durante las primeras etapas de su crecimiento. Generalmente vive sola y nunca en filamentos o cadenas. Forma esporas ovals sub-terminales y raramente en posición media. Es la única especie del género que no presenta movilidad, - y a diferencia de los demás Clostridia, reduce los nitratos a nitritos (la reducción dependerá del medio basal).

Sus paredes celulares contienen ácido L. diamino pimélico y azúcares como galactosa y ramnosa. Produce fermentaciones tumultosas de la leche, desprendiéndose ác. acético, butírico y butanol

C. perfringens es la bacteria patógena de más amplia distribución, sus cepas productoras de toxina se encuentran en agua, alimentos, polvo y conducto intestinal de hombre y animales.

Las pruebas bioquímicas más importantes para la identificación de este microorganismo son:

## PRINCIPALES PRUEBAS BIOQUIMICAS DE C. PERFRINGENS.

Caseina digerida	-
Lecitinasa	+
Indol	-
Lipasa	-
Glucosa	+
Manosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Fructosa	+
Galactosa	+
Inositol	+
Manitol	-
Melobiosa	-
Ramnosa	-
Sorbitol	-
Almidón	+
Sacarosa	+
Xilosa	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-
Licuefacción gelatina	+
Producción de toxina	+
Hemólisis	+

## 2.2 Enfermedades e Intoxicaciones producidas por C. perfringens.

Se podría definir a una enfermedad producida por la ingestión de alimentos contaminados como: el desarrollo de síntomas gastrointestinales que afecta a 2 ó más individuos, como resultado de la ingestión y reproducción de un organismo patógeno contenido en algún alimento o bebida.

Poco se sabe del papel fisiológico de la flora normal del cuerpo; especialmente en el conducto digestivo los anaerobios tienen, sin duda, un papel importante por el gran número en que existen, por ejemplo la síntesis de vitamina K, transformación de ácidos biliares en el intestino, etc.

Las bacterias anaerobias son básicamente saprófitas y se distribuyen por todo el cuerpo como flora normal y sólo en ciertas condiciones invaden los tejidos produciendo enfermedades devastadoras. Una de las mayores defensas contra anaerobios es el potencial redox (+ 120 mv.). El descenso del valor normal del potencial permite la multiplicación de anaerobios intratisulares.

### 2.2.1 Enfermedades.

La enfermedad por anaerobios más comunmente conocida es la gangrena gaseosa y los causantes son: C. perfringens, C. histolyticum, C. septicum, C. noryi y C. bifermentans.

La infección se desarrolla, usualmente, tras un traumatismo post-operatorio o por contaminación con tierra o heces fecales. La gangrena gaseosa es común en presencia de enfermedades vasculares isquémicas como en aterosclerosis periférica y diabetes mellitus. Las extremidades del perineo y los glúteos son sitios frecuentes de infecciones por Clostridia.

Las características clínicas de la gangrena gaseosa son: amplias áreas de equimiosis y necrosis con piel edematizada, un líquido seroso oscuro exuda de la herida y aparecen vesículas y burbujas llenas de aire.

## 2.2.2 Intoxicaciones producidas por alimentos contaminados.

Las intoxicaciones producidas por la ingestión de alimentos contaminados por C. perfringens, constituyen una de las mayores catástrofes en la industria de alimentos.

Han sido estudiadas un total de 83 cepas de C. perfringens - treinta en Europa y Asia asociadas a la ingestión de alimentos contaminados, 28 de los EE. UU. asociadas a la contaminación y 25 de fuentes naturales o patológicas, para determinar su relación serológica, esporulación y resistencia de esporas al calor.

Los principales síntomas causados al ingerir un alimento contaminado por C. perfringens son: diarrea, dolor abdominal agudo, náusea y raramente vómito. La intoxicación producida se conoce con el nombre de enteritis.

Ha sido producida experimentalmente en seres humanos voluntarios, que han ingerido un gran número de células bacterianas, las cuales forman sus toxinas en el intestino, pues las formas en el alimento no producen ninguna reacción patológica. La enfermedad puede aparecer de las 8 hasta las 24 h. después de haber ingerido el alimento contaminado, especialmente tratándose de carnes en donde se multiplica el microorganismo debido a un enfriamiento lento y un almacenamiento prolongado del alimento.

Una vez cocinado el alimento, las esporas se multiplican en condiciones favorables desde 15° C hasta 50° C, posiblemente el calor de cocción produce un estímulo en la membrana de la espora -

por lo cual ésta puede germinar. Tras de ingerirse el alimento con el microorganismo, aquel deberá soportar las condiciones ácidas -- del estómago y llega al intestino para producir un desequilibrio en la flora normal.

En el intestino grueso esporula raramente y las esporas -- son excretadas con las heces, pasando a los sistemas de drenaje.

La intoxicación dura muy poco, más o menos un día. De acuerdo con los investigadores ingleses las cepas productoras de esta intoxicación son algunas cepas atípicas de C. perfringens tipo A. Estas difieren de los otros miembros del tipo A en su baja producción de  $\alpha$  toxina (lecitinasa) poca o casi nada de  $\Theta$  toxina (hemoliasa), formación de esporas resistentes ( $100^{\circ}\text{C/h}$  más o menos) y por sus constituyentes antigénicos que les permiten agruparse en 13 serotipos.

Se han postulado varios mecanismos para explicar este tipo de enteritis. La forma exacta en que actúan los compuestos que la producen no se conoce aún. Algunas de las teorías postuladas son las de Craintz y Gilmore, que atribuyen la enfermedad a una toxina termoestable que produce náusea, dolor abdominal y vómito en las personas alimentadas con 75-100 ml. de un filtrado de un cultivo de C. perfringens. Los síntomas se presentaron 45-80 min. después de la ingestión, solamente hubo diarrea en una persona. Dische y Elek concluyeron que los síntomas observados por los investigadores no constituían una intoxicación típica de C. perfringens y encontraron que si hubiera sido calentado a  $100^{\circ}\text{C}$ , no producirán estos síntomas en los voluntarios que habían ingerido el cultivo. Hygren sugirió que la fosforilcolina, un producto resultante de la hidrólisis de la lecitina, en la presencia de toxina era el agente responsable del envenenamiento.

Hauschild (1971) hizo varios experimentos para la producción de diarrea en intestinos de borregos y conejos, suministrando células vegetativas suspendidas en medio nutritivo, dando como

resultado una acumulación del líquido y distensión del intestino ligado.

El trabajo descrito por Hauschild y Nilo trata de demostrar la enteropatogénesis de C. perfringens en intestinos ligados de borregos, asociada a la producción de un factor eritemal que es idéntico al factor producido in vitro, y que es el causante de la enteritis, - Para poder probar ésto inyectaron 3 cepas distintas no esporuladas y sin actividad eritematosa, en porciones de intestino de borrego. - Después de 6.5 h, el microorganismo había esporulado y había una gran concentración de líquido. Con una sola excepción, todos los intestinos infectados contenían un número mayor de  $10^9$  esporas -- viables y sus sedimentos contenían de 24 a 153 unidades eritematosas por intestino. La excepción era la cepa 80235 donde el grupo infectado no contenía el factor responsable de actividad eritematosa y solamente presentaba un bajo contenido de esporas.

En cambio otro tipo de esporas presentaba enterotoxinas, con características comunes in vivo e in vitro, el líquido sobrenadante contenía una variación considerable de actividad eritematosa no solamente en distintos animales, sino también en las distintas porciones del intestino del mismo animal. Es probable que el contenido de toxina, en un cierto tiempo, dependiera de la fase del desarrollo de C. perfringens, por ejemplo, el crecimiento de nuevas esporas, resultantes del rompimiento del esporangio y por lo tanto un gran incremento de enterotoxina en intestino.

Las enterotoxinas producidas in vitro fueron neutralizadas -- con suero inmune. Según Hauschild debido a las características -- comunes de la células obtenidas in vivo e in vitro, ésto era suficiente para poder decir que las toxinas producidas in vivo eran enteropatogénicas, pero Duncan y H. Strong (1969) aseguran que este factor, la toxina, no es el responsable de la acumulación de líquido en el intestino, ya que en ninguno de los dos casos, fluido sobrenadante, y medio solo, causaban diarrea o acumulación de líquido -- por si mismos.

Ellos experimentaron en intestino de conejo; de un total de 29 cepas, solamente 14 produjeron exudación de fluido en los segmentos de íleon, el experimento se llevó a cabo con cultivos desarrollados en medio láctico por 4 h. a 32°C. Otras cepas que no fueron extraídas de alimentos contaminados, también fueron inocu- das y 15 de 18 no produjeron nada, y con ésto se probó la inacti- vidad de la toxina por sí sola. Sin embargo, produjeron diarrea en intestinos, pero esto dependía de 3 factores: Tipo de cepa, método de preparación para su desarrollo y número de células inyectadas. El primer estudio se hizo con la cepa NCTC 8798, la cual contenía un factor tóxico lábil que perdía toda actividad cuando se elevaba la temperatura a 60°C durante 10 min. Otros tipos de cepa no produ- cían diarrea cuando se desarrollaban en un medio de tioglicolato, en cambio sí la producían cuando se desarrollaban en un medio DS para esporulación. Los extractos de ambos medios fueron inocu- lados en intestino y ninguno produjo acumulación de fluido, lo- cual señala que no toda la célula es capaz de producir todos estos síntomas cuando se ha desarrollado en un mismo medio. También llevaron a cabo una prueba para ver el efecto del almacenamiento en los alimentos y encontraron, que desde los 21°C hasta los 37°C había actividad tóxica.

En otra parte del experimento se trató de probar la correla- ción de la habilidad de los extractos de células para producir acu- mulación de líquido y diarrea (Los extractos de células que produ- cían acumulación fueron obtenidos de cepas que producían diarrea y acumulación en el íleon). La diarrea tuvo lugar a las 10 h., -- después de la inyección y terminaba a las 24 h.

De 16 cepas inoculadas en medio láctico, el 61.5% fueron -- activas. El resto eran cepas inactivas y por lo tanto, sus extractos eran inactivos y cuando fueron inyectados en intestino no produje- ron nada. Y de éstas el 87.5% produjo células viables activas que al ser inoculadas producían diarrea.

Por lo tanto, las colonias activas se obtuvieron de medios --

para esporulación y no de medios anasporogénicos lo cual puede indicar que la producción del factor tóxico está asociada a la producción de esporas, o bien refleja solamente una diferencia nutricional de los 2 medios. Actualmente se están haciendo estudios para ver si la producción de este factor está relacionado con la esporulación de los microorganismos. Los factores productores de diarrea tanto intracelulares como extracelulares, son probablemente los mismos, ya que ambos son lábiles y se inactivan por Pronasa (una enzima proteolítica con un alta especificidad), pero no por tripsina, lipasa o amilasa. El factor puede ser puesto en evidencia solamente después que ha ocurrido un nivel considerable de lisis en las células.

"Si el factor activo productor de diarrea está asociado a la diarrea, producida por la intoxicación de alimentos debida a C. perfringens, es evidente que alguna de las cepas previamente asociadas al envenenamiento por alimentos tenga repetidos subcultivos que pierdan la habilidad para producir este factor, ya que solamente 4 de los 24 extractos de células obtenidos de alimentos lo presentaban. La forma en que dejaron de producirse los síntomas en seres humanos alimentados con filtrados de C. perfringens pudo haber sido causada por disminuciones del factor activo presente en los filtrados o bien por inactivación de este factor debido a las condiciones ácidas del estómago"

Durante el experimento se trabajó a distintos pHs y se encontró que a los valores de 1, 3, 5 y 12 hubo pérdida completa o parcial de este factor.

Dos de los 5 tipos de C. perfringens, de acuerdo con la clasificación de producción de toxinas, son capaces de producir enfermedades en el hombre: el tipo A, causante de la enteritis y la que provoca una intoxicación mucho más seria llamada enteritis necrótica, el tipo C.

Este tipo de toxina fué aislado por primera vez en Alemania, de latas de carne de conejo y en Nueva Guinea en carne de cerdo. La intervención quirúrgica en los casos graves y las necropsias -- han demostrado unas lesiones más o menos difundidas en el intes tino delgado y preferentemente en el yeyuno, caracterizadas por in tensa inflamación con zonas necróticas y desprendimiento de la -- mucosa con úlceras profundas y frecuentes flomones parietales, to do esto con la correspondiente reacción peritoneal.

El cuadro clínico se presenta con un dolor fuerte en la parte alta del abdomen. Aparecen náuseas y vómitos junto con disten ción abdominal.

Los decesos ocurren con una frecuencia del 40-50%. Es recomendable el tratamiento con sulfamidas o con tetraciclinas, pero al mismo tiempo hay que emplear todas las medidas de reanimación del paciente fuertemente colapsado.

Existen organismos de salubridad que se encargan de recopilar los datos de casos de intoxicaciones por alimentos, algunos de ellos son: Center for Disease Control en EE. UU., y en Inglaterra el Food Hygiene Laboratory, el Central Public Health Laboratory y el de la Health and Social Security.

El Center for Disease Control reportó, en 1971, 13453 casos de los cuales el 16% fueron provocados por C. perfringens, siendo -- el 13% de éstos causados por carne de res.

En Inglaterra, los distintos organismos informaron que el -- 94% de los casos producidos por este microorganismos se debieron -- al manejo impropio de utensilios en los diferentes establecimientos, un 49% ocurrió en restaurantes y un 19% en hogares.

ENFERMEDADES E INTOXICACIONES PRODUCIDAS POR ALIMENTOS  
EN 1971.

	Enfermedades e Intoxicaciones		Pacientes	
	Núm.	%	Núm.	%
<u>S. aureus</u>	92	29	5115	38
<u>C. perfringens</u>	51	16	3856	16
<u>Salmonella spp</u>	30	9	760	6
Otros microorganismos	28	9	2349	17
Total	201	63	12080	90

En los últimos 25 años la Public Health Service y el Department of Health and Social Security han recopilado también los incidentes causados por intoxicaciones de alimentos. Los resultados se reportaban anualmente en el boletín llamado Food Poisoning in England and Wales publicado por The Ministry of Health and Public Health Laboratory.

Características de las intoxicaciones por alimentos.

Prevalencia	Común en heces, suelo, polvo y alimentos
Crecimiento	Anaerobio, principalmente en carne
Tiempo de Desarrollo	10-12 min.
Temp. óptima	43 - 47 ° C.
" mínima	15 - 20 ° C.
" máxima	50 ° C.
Esporulación	Escasa en alimentos, alta en intestino
D <sub>100</sub>	menos de 1 min. a 17 min.
Mecanismo	Toxina liberada en intestino
Incubación	12 - 18 h.
Síntomas	Diarrea y dolor abdominal
Dosis	Un gran número de microorganismos
Prevención	Detener el desarrollo del microorganismo.

### III. - INCIDENCIA DE C. perfringens EN ALIMENTOS.

Para que se lleve al cabo una intoxicación por alimentos existe un grupo de factores esenciales.

- a) El microorganismo que ha entrado a la cocina por medio de los alimentos.
- b) Las manos de las personas que manejan el alimento, la superficie en que se expone, utensilios, ropa y todos aquellos artículos que pueden ser fuente de contaminación, así como los animales domésticos.
- c) Las condiciones en que se encuentra el alimento que pueden ser aptas para su desarrollo.
- d) Condiciones poco favorables durante el amacernamiento en un período mayor de 2 h.
- e) Seres humanos susceptibles.

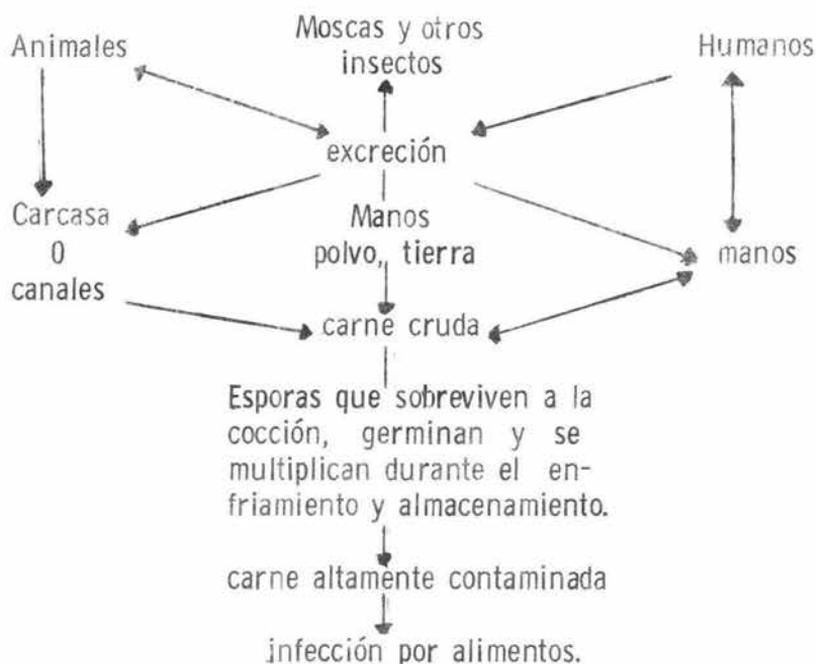
La investigación de las intoxicaciones por alimentos dependerá de la habilidad para encontrar los detalles relativos a cada uno de estos 5 puntos.

Sin embargo, existen otros caminos para la diseminación de esta infección causada por alimentos, por ejemplo, las moscas han sido siempre consideradas como el factor de mayor diseminación de infecciones, especialmente donde la sanidad es deficiente y las enfermedades intestinales como enteritis, tifoidea, paratifoidea, son endémicas, la abundancia de estos insectos constituye una gran amenaza.

Las moscas se paran en la basura, heces, aguas encharcadas, etc., trayendo consigo partículas de material infectado que son depositadas en los alimentos, ya sea en restaurantes, fábricas u hogares. Estos alimentos son ingeridos por los seres humanos, que pueden contraer la infección, o bien ser transmisores por medio de las heces fecales.

No obstante, en algunos países esta situación ha sido erradicada por medio de insecticidas, debiéndose la contaminación más importantes a seres humanos y animales.

## RESERVORIOS HUMANOS Y ANIMALES DE C. perfringens



También la contaminación de alimentos se debe en gran parte a objetos inanimados como: toallas, lapices, equipos de W.C., manijas, cubiertos, platos, etc., los cuales son importantes intermediarios en la transferencia de infecciones, de persona a persona o de persona a alimento.

Los utensilios de metal son autoesterilizables y se recomiendan en lugar de los de madera, hule, plástico. Cuando se sospecha que existe una contaminación en alimentos por C. perfringens - el alimento y los utensilios deberán ser examinados, pues este --

microorganismo es común en alimentos cocinados y es excretado en pequeñas cantidades por la mayoría de las personas. Cualquiera que sea la fuente de contaminación en alimentos, el error principal es el enfriamiento lento y prolongado que da lugar a su multiplicación. Por lo tanto, se deberá investigar no solamente la fuente de proliferación, sino además la forma en que ésta se lleva a cabo, tanto en las personas cuanto en alimentos crudos o cocinados.

El microorganismo puede estar presente en algunas especies como el curry, en leche, huevos, pescado, pero sobre todo en carnes rojas y aves. En general se presenta en alimentos con un elevado contenido proteico.

El pescado que es fresco es un vehículo improbable de intoxicación, sin embargo algunas bacterias, entre ellas C. perfringens -- han sido aisladas de pescado de ríos contaminados y de los que se encuentran en algún orificio de los barcos lavado con las aguas sucias de los puertos.

La contaminación también se puede llevar a cabo cuando los pescados son desvicerados o rebanados en sitios insalubres como los muelles.

En cuanto a la leche, se podrá encontrar a este microorganismo sobre todo en aquella que no ha sido pasteurizada y desde luego en algunos de sus derivados. En este alimento produce fermentaciones que provocan una coagulación tormentosa y por ende fácilmente observable.

La contaminación en huevos se deberá sobre todo al medio -- ambiente que rodea a las aves como gallinas y patos, ya que el alimento que éstos ingieren puede ir contaminado con excremento, -- tierra, o bien aguas contaminadas.

Las carnes rojas y las aves son los vehículos responsables -

del mayor número de intoxicaciones de este tipo.

Esta clase de carnes, ya sean cocinadas, frescas, asadas, -- hervidas o fritas, cuando son ingeridas inmediatamente se ha visto que se reducen considerablemente los casos de intoxicación por su ingestión. (Tabla Núm. 1)

En la preparación de productos cárnicos el período entre la cocción y la ingestión contribuye a la reproducción microbiana, dando como resultado una intoxicación.

De la Tabla Núm. 1, se puede ver que los alimentos recalentados son vehículos predominantes, seguidos por las carnes frías y las aves.

La carne recalentada es usualmente carne fresca que ha sido calentada con anticipación a la hora en la que será ingerida.

En este tipo de alimentos C. perfringens es el agente más común. La supervivencia de sus esporas al calor y el subsiguiente crecimiento y desarrollo, se ven reforzados por un almacenamiento prolongado y el nuevo calentamiento que se les administra para ser ingeridos.

En las cocinas grandes, como las de fábricas, escuelas, etc., la carne se prepara y deja enfriar durante un período prolongado donde permanece a temperatura ambiente y después se almacena en un cuarto frío durante toda la noche. Al día siguiente es servida caliente, fría, en rebanadas, junto con algún guiso, en pastel o en pudín. Este procedimiento de elaboración de alimentos es peligroso por 2 razones:

- a) En carnes cocinadas a temperaturas no mayores de 100° C, por ejemplo, hervidas o asadas, las esporas sobreviven al calor, germinan y se multiplican por un enfriamiento lento y dan como resultado células bacterianas activas que son ca

paces de producir una intoxicación.

- b) El calor penetra de una manera muy lenta a través de la carne y por lo tanto grandes porciones de ésta, sobre todo las centrales, son particularmente ineficaces. En carnes enrolladas, cuando el exterior queda contaminado y se dobla hacia adentro, puede suceder que el calor no penetre suficientemente para destruir a los microorganismos contaminantes (20)

Por último, la contaminación puede ocurrir después de que ha sido cocinada la carne, cuando se está rebanando o manipulando de alguna manera, por los utensilios y manos mal aseados.

La carne enlatada raramente causa intoxicaciones por C. perfringens; generalmente las intoxicaciones por ella son debidas a -- botulismo.

Los estándares para este tipo de procesamiento son bastantes estrictos, y cuando existe una intoxicación se puede deber a:

1. - El número exagerado de microorganismos que presenta la carne antes de su procesado.
2. - Contaminación después de que la lata ha sido abierta.

Sin embargo, ocasionalmente existen fallas en la manufactura que traen como consecuencia pequeñas fisuras en las costuras de las latas y éstas se elongan durante el proceso de calentamiento del alimento. Si se utiliza agua contaminada para enfriar las latas después del tratamiento, los microorganismos son succionados a través de las fisuras, y si las condiciones de almacenamiento son buenas para el desarrollo de C. perfringens, éste se multiplicará y -- causará un deterioro al alimento o bien provocara una intoxicación.

A pesar de que este tipo de errores es descubierto antes de --

que la lata deje la fábrica, los organismos anaerobios, como C. perfringens pasan desapercibidos, se desarrollan dentro de la lata y algunas veces no causarán deterioro en el alimento pero si intoxicaciones, por lo que se deberá tener sumo cuidado con las costuras de las latas y con los tiempos y temperaturas para la esterilización.

Muchas carnes enlatadas presentan un peligro mayor, como es el caso de la carne de cerdo y la lengua de res; ya que en ellas es importante conservar sus características organolépticas y no son calentadas a temperaturas de esterilización.

Se han hecho varios experimentos inoculando C. perfringens en distintos tipos de carne; por ejemplo, en 1976, Pearson, Hapchuk y Price estudiaron la acción del microorganismo en músculo porcino. Lo inocularon y después extrajeron las proteínas de sarcoplasma y miofibrillas. Los cambios que se llevaron al cabo en las proteínas, a consecuencia de la inoculación, se siguieron por electroforesis.

(Gráfica Núm. 1) De aquí se concluyó que a pesar de que en los 2 casos de sarcoplasma, inoculado y sin inocular, disminuía el nivel de proteínas, en el primer caso descendía en mayor proporción, lo que indicaba que C. perfringens producía una proteólisis en sarcoplasma cuando se incubaba a 37° C. También aumentó el NPN (nitrogeno no proteico) lo que venía a afirmar esta acción de C. perfringens sobre la carne.

En 1963 Sharp observó también un incremento en el NPN -- en músculo de conejo al incubarlo a 37° C., sin embargo, él lo atribuía a una autólisis, pero no tomaba en cuenta el crecimiento microbiano en el músculo.

En la electroforesis que llevaron al cabo Hapchuk, Pearson y Price también concluyeron que no solamente había un rompimiento de proteínas, sino que además se formaban nuevas estructuras pro-

técas, ya que en las gráficas aparecían nuevos picos después de la incubación.

Por lo que se refiere a las miofibrillas, inoculadas y sin inocular, ambas decrecieron también, pero en el caso de la muestra - inoculada e incubada se supuso que contenía proteínas solubles del protoplasma, ya que C. perfringens produce colagenasa y de ahí -- que en la gráfica aparezca un valor más alto para mg. de proteínas en esta muestra. Si se hubiera corregido el error por colagenasa - la muestra inoculada hubiera presentado mucho menor cantidad de proteínas que el blanco.

Igualmente se han hecho evaluaciones sobre cómo actúa el microorganismo en carnes adicionadas con soya, o bien en carnes - suplementadas con proteínas vegetales. Estas pruebas se han hecho necesarias debida a la gran aceptación que han tenido estos - - productos. Aunque en México no se llevan al cabo pruebas para anaerobios, la cantidad de carne enriquecida que se vende es enorme.

En 1976 Kokocza y Stevenson investigaron el efecto del crecimiento de C. perfringens en carnes, al adicionar semilla de algodón y soya. Las fuentes de proteínas fueron:

soya - "Soyflour" \* "Bontral" \*  
semilla de algodón - "Proflo" \*\* y "Pharmamedia" \*\* (Gráficas 2, 3 y 4)

- 1) La adición de semillas de algodón a carne de res, pollo y pavo, como fuente proteica producía un efecto inhibitorio en el crecimiento de C. perfringens si se comparaba con el que se presentaba cuando la carne era la única fuente de proteína.
- 2) La adición de soya no producía ningún efecto en el crecimiento (21)

\* Richard Food Corp. Illinois, U.S.A.

\*\* General Mills. Minneapolis, U.S.A.

En 1974 Clifford estudió el comportamiento de C. perfringens frente a distintos carbohidratos y obtuvo como resultado que la adición de xilosa o ribosa a distintos medios inhibía el crecimiento de las esporas de C. perfringens, mientras que la de glucosa lo incrementaba.

De acuerdo a la literatura, Pharmamedia y Proflo contienen 6% de glucosa, 1.5% de xilosa y 2.3% de manosa, ribosa y ramnosa, por lo que la presencia de esta mezcla de carbohidratos en las semillas de algodón podría ser la causante del efecto inhibitorio.

En otros experimentos para carne de pollo o de pavo, Mead (1972), encontró el tiempo que tarda C. perfringens en alcanzar  $10^7$  células / g. a  $37^{\circ}\text{C}$  viendo su crecimiento y esporulación. (Tablas 2 y 3). Durante estas pruebas se observó la imposibilidad de la cepa para crecer a T menores a  $15^{\circ}\text{C}$ , y el desarrollo rápido del microorganismo entre  $30 - 50^{\circ}\text{C}$ , el crecimiento máximo se encontró a  $37^{\circ}\text{C}$  cuando alcanzó una población de  $10^7$  células / g en 5 h. - Esto demuestra la rapidez con que el microorganismo puede desarrollarse, a menos que la carne sea enfriada rápidamente después de su cocción. (25)

La esporulación de C. perfringens dependerá también del pH y del tipo de carne, siendo el pH óptimo de 7.2.

De los datos sobre la incidencia de C. perfringens en alimentos, en Inglaterra y en U.S.A., se observa que en la mayoría de los casos, la flora predominante de los alimentos analizados es de C. perfringens y la presencia simultánea de otros Clostridia es muy rara. En esta circunstancia se basan los científicos para identificar y enumerar a C. perfringens.

La gelosa sulfito-ferro ha sido propuesta por varios investigadores para enumerar a los Clostridia (Cameron, 1938, Thomson, 1939, Lyons y Owen, 1942, Prevot, 1948, Buttiaux, 1955). La reacción que se lleva a cabo en este medio es la reducción de los sulfitos por Clostridium, precipitándose como sulfuro de hierro y -

dando como resultado colonias negras. Sin embargo, otros organismos como Salmonella, Proteus, E. freundii, Paracolobactrum, algunas especies de Erwinia y Achromobacter se desarrollan también en este medio.

Mossel, en 1958, reportó que añadiendo 0.05% de sulfito de Na y 10 ppm de sulfato de polimixina B, se obtenían grandes cantidades de cultivos puros de varias especies de Clostridia, sin embargo, a pesar de haber adicionado estas sales se obtenían colonias negras producidas por Proteus, Salmonella y ciertos Paracolobactrum.

Galton, Lowar y Hardy (1972) añadieron sulfadiazina para evitar el crecimiento de Proteus, Pseudomonas y coliformes y encontraron que la adición de 0.12 mg/ml inhibía a los miembros de la familia Enterobacteriaceae y esta cantidad era insuficiente para inhibir el crecimiento de C. perfringens.

Pocos años más tarde, en 1961, se elaboraron algunos análisis para determinar el efecto de los constituyentes de los alimentos en las propiedades selectivas del medio. El resultado obtenido fue que los constituyentes no interfieren en la formación de colonias negras producidas por C. perfringens, ni tampoco en la habilidad para recobrar cantidades cuantitativas de este microorganismo.

En vista de la habilidad de ciertos aerobios para desarrollarse en este medio, se empezaron a estudiar una serie de pruebas más rígidas para la identificación de C. perfringens en alimentos, y cada uno de los experimentos donde se llevó al cabo una identificación de C. perfringens, se determinó por el número de colonias negras desarrolladas en SPS.

Angelotti, Hall, et al. idearon un medio basal para enumerar a este microorganismo:

1.5% bacto-triptina

1.0% extracto de bacto-levadura

- 1.5 % bacto agar
- 0.05 % citrato de fierro.

Este medio fue ajustado a  $\text{pH} = 7 \pm 0.1$  y esterilizado a  $121^\circ \text{C}$ . por 5 min. A cada litro de medio estéril se añadieron:

- 5 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  al 10 % recién preparado ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 10 ml de solución de sulfato de polimixina B
- 10 ml de solución de sulfadiazina sodica (12 mg/ml).

Las pruebas bioquímicas que se hicieron para confirmar la presencia del microorganismo fueron:

- 1) Movilidad-nitrato.
- 2) Esporulación
- 3) Producción de toxinas.

Los resultados de estos experimentos se pueden observar en las Tablas 4, 5, 6 y 7. Se llegó a la conclusión de que este método presenta algunas desventajas como son: consumo de tiempo y la necesidad de analizar la mayoría de las colonias para obtener un resultado representativo. Por esta razón se trabajó con la dilución más grande, y dado que C. perfringens representa una minoría en la población de los reductores de sulfatos o sulfitos puede permanecer -- sin ser observado debido a la dilución utilizada.

Resumiendo los resultados de todas estas pruebas fue posible el desarrollo de un análisis diferencial para la identificación de C. perfringens. Una porción de una colonia negra obtenida a partir del medio SPS es inoculada en un tubo que contiene bacto nitrato y se incuba a  $37^\circ \text{C}$  en un baño de agua hasta que aparece crecimiento evidente (12-24 h. dependiendo de la cepa).

Los microorganismos que forman una línea de crecimiento -- definida, se prueban para la producción de nitritos en el tubo. Tan pronto como el crecimiento es fácilmente visible se adicionan ác. -- sulfanílico y dimetil- $\alpha$ -naftilamina y se desarrolla un color rosa que denota la presencia de nitritos.

Hall y Janes desarrollaron otro método usando SPS pero incorporando al medio de lactosa, yema de huevo. De las cepas usadas en este experimento, 7 fueron obtenidas a partir de salchichas las cuales se sospechaban que contenían *C. perfringens*. Las placas con SPS se inocularon con diluciones de diferentes cultivos y se incubaron anaeróbicamente a 35° C durante 24 h.

El número de células por mililitro se obtuvo calculando el número de colonias blancas y multiplicando por el factor de dilución. Para enumerar las esporas se calentaron las diluciones problema a 80°C durante 20 min. enfriándose rápidamente hasta 5° C en 10 min. Se obtuvieron 10 colonias negras que se inocularon en un medio de tioglicolato-gelatina. Se incubaron por 4 h. a 46° C. en un baño, hasta que el crecimiento fue evidente. En estos mismos tubos se llevaron a cabo las pruebas de movilidad-nitrato y lactosa yema de huevo. Todas estas pruebas se incubaron anaeróbicamente 24 h a 35°C. obteniéndose los siguientes resultados:

Morfología		Gram +
Movilidad	-	Crecimiento +
Reducción de nitratos	+	Naftilamina y ác. sulfanilico
Licuefacción de gelatina	+	Licuefacción del medio con tioglicolato gelatina, después de incubación y refrigeración a 10° C durante 30 min.

De las placas del medio lactosa-yema de huevo, el microorganismo fue transferido a un medio de gelosa LEY por medio de estria en paralelo en el centro de la placa, esto se hizo con el objeto de ver la producción de lecitinasa y fermentación de lactosa. La actividad de la lecitinasa se observó como una zona opaca rojo ladrillo alrededor de la línea de crecimiento. La fermentación se vió como un halo amarillo alrededor de la línea de crecimiento. Cuando se efectúan simultáneamente ambas pruebas en el mismo lugar, en caso positivo, se observa una zona de color amarillo (14)

De las 7 pruebas de salchichas que se analizaron, 5 de ellas

contenían C. perfringens. Los resultados finales de este experimento para la identificación del microorganismo fueron:

Morfología - células Gram +  
Producción de H<sub>2</sub>S  
Producción de lecitinasa  
Fermentación de lactosa  
Anaerobiosis  
Licuefacción de gelatina  
Movilidad  
Reducción de nitratos producción de nitritos

Se concluyó que C. perfringens es el único microorganismo de los Clostridia que produce lecitinasa, es inmóvil y fermenta la lactosa.

Otros investigadores, Shahidi y Ferguson (1971), han desarrollado un nuevo medio para la identificación de este microorganismo por considerar que los mencionados anteriormente son semicuantitativos, y consumen gran cantidad de tiempo.

Durante 3 años usaron medio SPS comercial para la obtención de C. perfringens a partir de alimentos, sin embargo los resultados eran malos aunque seguían todas las indicaciones para la determinación cuantitativa; una investigación preliminar con cultivos puros, reveló que este medio inhibía a varias cepas de Clostridia y muchas veces los microorganismos no producían las colonias negras características debido a la inestabilidad de los ingredientes del medio.

En adición a éstos autores, algunos de los anteriores coinciden en la dificultad para demostrar la reducción de nitratos y la esporulación.

Marshall (1971) reportó una nueva técnica para la identificación de C. perfringens con triptona-sulfito-neomicina (TSN), incu-

bando a 46°C., pero no ha sido utilizada por ningún otro laboratorio hasta ahora.

El medio desarrollado por Shahidi y Ferguson es, según estos autores, nutritivo, selectivo, con ingredientes estables y da como resultado un análisis rápido tanto cualitativo como cuantitativo de C. perfringens en alimentos. También introdujeron la gelosa -- lactosa-movilidad como una prueba confirmativa para la identificación de este microorganismo.

Medio SFP. un litro de medio contiene:	
Triptosa	15 g
Extracto de levadura	5 g
Citrato ferrico amoniacal	1 g
Meta bisulfito de sodio	1 g (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )
Sulfato de polimixina B	30 000 unidades
Sulfato de kanamicina	0,012 g
agar	20 g
agua	900 ml
emulsión de yema de huevo (50% en sol. salina)	100 ml

Todos los ingredientes, excepto la emulsión de yema de huevo, fueron disueltos en agua.

Se ajustó el pH a 7.6 y se esterilizó en porciones de 900 ml a 121°C. 10 min., después se enfrió a 50°C. y se añadieron 10 ml de emulsión de yema de huevo a cada 900 ml del medio basal. Se vertieron de 10 a 12 ml en cajas de Petri (15 x 100 mm), el medio se solidificó y se incubó a 35°C. durante toda la noche. Al día siguiente se revisó la humedad y la esterilidad del medio. Se pueden añadir antibióticos antes o después de la esterilización.

La gelosa SFP utilizada para cubrir las cajas inoculadas contenía exactamente lo mismo que la descrita anteriormente, excepto la emulsión de yema y los ingredientes fueron disueltos en 1000 ml de agua destilada en lugar de 900 ml.

Se repartió este medio en botellas, en porciones de 100 ml. y se esterilizaron a 118°C durante 15 minutos.

Los alimentos que se analizaron fueron obtenidos en restaurantes, supermercados y algunos hogares. También se analizaron algunos alimentos que estaban involucrados con incidentes de infecciones.

Las características fisiológicas que se utilizaron para el desarrollo de este análisis fueron:

- a) reducción de sulfitos a sulfuros
- b) producción de lecitinasa
- c) resistencia a la acción de polimixima B y bajos niveles de kanamicina.
- d) movilidad
- e) fermentación de lactosa.

En gelosa SFP, las 16 cepas de C. perfringens desarrollaron colonias negras con 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas de una zona blanca de precipitado opaco de 3 a 4 mm de diámetro. (32)

El medio ya listo y vertido en las placas no presentó ningún tipo de descomposición en 2 meses, cuando se almacenaron en envases de plástico bajo refrigeración.

Para verificar la efectividad de los 2 medios SPS y SFP, se sembraron series de distintas diluciones por duplicado y también se hicieron las pruebas con gelosa sangre. Los resultados de este experimento se pueden observar en la tabla 8. Resumiendo estos resultados:

Promedio de recuperación	Gelosa
100%	Sangre (patrón)
98.5 %	SFP
99.5 %	SFP sin antibiótico

Los resultados son similares entre los medios SFP y SFP sin antibiótico, además, éste último es tan nutritivo como la gelosa sangre.

En la Tabla número 9 se puede observar los resultados de las comparaciones hechas entre los distintos medios y los alimentos, ya que se ha reportado anteriormente que los ingredientes de un alimento pueden modificar la selectividad y las propiedades diferenciales de un medio.

La Tabla número 10 muestra los resultados de los 464 análisis que se hicieron en carne y aves, obtenidos comercialmente.

Casi todas las colonias obtenidas que pertenecían a C. perfringens tenían un mayor tamaño en el medio SFP que en el SPS.

Para asegurarse de la presencia de C. perfringens se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- 1) fermentación de glucosa
- 2) " " maltosa
- 3) " " sacarosa
- 4) " " lactosa
- 5) " " salicilato
- 6) " " manitol
- 7) reducción de nitratos
- 8) esporulación
- 10) crecimiento en aerobiosis
- 11) morfología

Se hizo una nueva confirmación con el medio lactosa-movilidad a partir de las colonias obtenidas en SFP, se obtuvo aquí un 100 % de confiabilidad de la presencia del microorganismo.

Con las comparaciones hechas entre los 2 medios propuestos por estos autores, SFP y lactosa-movilidad (Tabla Núm. 11), concluyeron que el empleo de la combinación de estos dos medios traerá - como resultado un análisis cuantitativo y cualitativo en menos de - 48 h para la identificación de C. perfringens.

Hauschild y Hilshemier (1974) elaboraron un experimento para determinar la aplicabilidad de la gelosa TSC sin yema de huevo - (gelosa triptosa cicloserina sin yema de huevo) para la enumeración de C. perfringens en alimentos y evaluar las condiciones para su - transporte y aislamiento sin pérdida de viabilidad.

La enumeración presuntiva de C. perfringens se hizo en los siguientes medios:

SFP (Shahidi-Ferguson - perfringens)

TSC (Triptosa-sulfato-cicloserina)

EY-free-TSC (TSC sin yema de huevo)

OPSP (oleandomicina-polimixina-sulfadiazina perfringens)

Para las pruebas confirmatorias se utilizaron los medios nitrato movilidad, lactosa movilidad y lactosa gelatina.

Los resultados de las cuentas de C. perfringens en 13 alimentos utilizando diferentes medios se pueden observar en la Tabla Núm. 12. Los datos reflejan resultados similares en casi todos los casos.

Con el medio SFP en los alimentos B, I, J, K y L se obtuvieron valores mayores para los microorganismos no específicos, en relación con las cuentas de C. perfringens. Quizás se deba ese resultado a que los microorganismos no específicos (anaerobios facultativos) interfirieron con C. perfringens en las pruebas de movilidad nitritos.

Para la segunda parte del experimento, o sea la conservación

de la viabilidad del microorganismo durante su aislamiento, se indica que en estudios preliminares se encontró que almacenando los alimentos en glicerina (10 %) las pérdidas de viabilidad pueden reducirse considerablemente. Estos resultados se confirmaron y puede verse en la Tabla 13 que la pérdida más pequeña en la cuenta viable ocurrió cuando los alimentos fueron mezclados 1:1 en glicerol (p/v) al 20 % y almacenados en hielo seco.

Para evaluar la gelosa OPSP para la enumeración de C. perfringens en alimentos se incluyó este medio en las pruebas de viabilidad. En la Tabla 14 se pueden comparar los resultados obtenidos en los medios TSC sin YH y OPSP en 6 alimentos que fueron almacenados por 4 semanas en 10 % de glicerina a 4 ° C.

Las cuentas para C. perfringens fueron esencialmente las mismas en las 2 gelosas por lo cual se le pidió a un grupo de investigadores de 5 países que hicieran una comparación entre los siguientes métodos:

Método A	SFP
" B	TSC
" C	SC
" D	Neomicina sangre.

Algunos otros métodos como el SPS, TSN y OPSP fueron descartados porque son inhibidores de algunas cepas de C. perfringens.

Este análisis se llevó a cabo de la siguiente manera:

1) Métodos A, B y C. Se pidió a los investigadores que siguieron éstos, que todas las colonias negras encontradas se tomaran como presuntivas de C. perfringens y que se seleccionaran números representativos de cada tipo de colonia para las pruebas confirmativas.

De cada alimento se tomaron 10 colonias presuntivas para ser tratadas en estas pruebas. Las colonias obtenidas fueron a partir de cada método o sea 10 por método. Fueron probadas en análisis-

de movilidad, reducción de nitratos, fermentación de lactosa y licuefacción de gelatina. Ambos medios, movilidad-nitrato y gelosa lactosa gelatina, fueron almacenados a 4°C. y desoxigenados por calentamiento a 100°C durante 10 minutos antes de usarse.

2) Método D. Las colonias que presentaron una hémolisis — parcial o completa fueron presuntivas de C. perfringens, la prueba-confirmatoria fue modificada, ya que no se indica la reducción de sulfitos y la gelosa gelatina lactosa fue suplementada con meta bisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}$ ); después de la incubación fue colocado un disco con acetato de plomo (preparándolo por sumersión en solución saturada y luego secándolo) sobre el medio, ennegreciéndose instantáneamente en presencia de C. perfringens.

Las cuentas confirmadas del microorganismos fueron determinadas de la siguiente manera:

Cuenta presuntiva x colonias confirmadas x 10

Las cuentas de C. perfringens confirmadas y las no específicas fueron expresadas como porcentaje de los valores más altos encontrados por los diferentes métodos (Tabla 15 y Tabla 16).

Solamente algunos alimentos implicados en intoxicaciones por C. perfringens fueron utilizados para éste análisis comparativo. Los otros fueron sometidos a condiciones semejantes a los alimentos que produjeron las infecciones.

Los análisis se llevaron a cabo a partir de carne cocinada y derivados, pero el tipo de ésta y su tratamiento fue distinto en cada laboratorio. Los alimentos utilizados se adquirieron en bares, restaurantes, cafeterías, supermercados y algunos fueron preparados en los mismos laboratorios, sometiéndolos a contaminaciones naturales e incubando semianaeróticamente.

Algunos de los alimentos utilizados fueron: res, cerdo, goulash,

pasteles y sopas de carne, carne en salsas y sopas, pollos fritos y asados, pavo, etc.

De la Tabla 15 puede observarse que, con algunas excepciones, el porcentaje de colonias presuntivas que fueron confirmadas como de C. perfringens fué esencialmente el mismo para todos los laboratorios.

En las cuentas de C. perfringens no intervinieron otro tipo de microorganismos en cuentas no específicas, ya que los valores de las cuentas de éste, excedían a los de los microorganismos no específicos.

De esto se puede deducir que la selectividad de un medio se refleja en las cuentas específicas y no específicas de contaminación. En esencia, se concluye que todos los métodos son igualmente buenos (Tabla 17).

Recientemente se han encontrado otros Clostridia que también cumplen las pruebas confirmatorias de C. perfringens, sin embargo, ninguno de éstos las realizan en el tiempo y con la concentración de sustancias en las que trabaja C. perfringens.

Los autores de este experimento aún no han escogido un método en particular, quizá lo hagan cuando se termine la segunda fase de este método comparativo.

TABLA I. Composición de trozos típicos de carne y productos de carne

Carne	Por ciento				mg/100 g						Calorías por 100 g
	H <sub>2</sub> O	Proteínas	Grasas	Cenizas	Calcio	Fósforo	Hierro	Tiamina	Riboflavina	Niacina	
<b>Vaca</b>											
Pernil delantero . . . . .	65.0	18.6	16.0	0.9	11	167	2.8	0.08	0.17	4.5	224
Picadillo . . . . .	55.0	16.0	20.0	0.8	9	128	2.4	0.07	0.14	3.8	371
Solomillo . . . . .	57.0	17.4	25.0	0.8	10	134	2.5	0.07	0.15	4.2	296
Costillas . . . . .	59.0	17.4	23.0	0.8	10	149	2.6	0.07	0.15	4.2	282
Muslo . . . . .	69.0	19.5	11.0	1.0	11	100	2.9	0.08	0.17	4.7	162
Cadera . . . . .	55.0	16.2	28.0	0.8	9	131	2.4	0.07	0.14	3.9	322
Seca . . . . .	48.0	34.3	6.3	11.6	20	404	5.1	0.07	0.32	3.8	203
Retazo para conserva . . . . .	54.2	15.8	25.0	5.0	9	125	2.4	0.05	0.10	1.7	293
<b>Bistec</b>											
Chuletas . . . . .	51.9	14.9	32.4	0.8	9	138	2.2	0.13	0.18	4.3	956
Brazuelo . . . . .	58.3	15.6	25.3	0.8	9	155	2.3	0.14	0.19	4.5	295
Pierna . . . . .	63.7	18.0	17.5	0.9	10	213	2.7	0.16	0.22	5.2	235
<b>Pastor</b>											
Lomo de Boston . . . . .	60.0	16.6	23.0	0.8	10	179	2.5	1.05	0.21	4.5	274
Pernil . . . . .	53.0	15.2	31.0	0.8	9	168	2.3	0.74	0.18	4.0	344
Lomo o chuletas . . . . .	58.0	16.4	21.0	0.9	10	186	2.5	0.80	0.19	4.3	296
Jamón curado y ahumado . . . . .	42.0	16.9	35.0	5.4	10	136	2.5	0.70	0.19	4.0	389
Tocino . . . . .	20.0	9.1	65.0	4.3	13	108	0.8	0.38	0.12	1.9	630
Tocino canadiense . . . . .	56.0	22.1	15.0	6.2	13	216	3.3	0.91	0.25	5.2	231
<b>Ternera</b>											
Solomillo . . . . .	69.0	19.2	11.0	1.0	11	207	2.9	0.18	0.27	6.3	175
Muslo . . . . .	70.0	19.5	9.0	1.0	11	200	2.9	0.14	0.26	6.5	164
Paletilla . . . . .	70.0	19.4	10.0	1.0	11	199	2.9	0.14	0.26	6.5	173
<b>Órganos carnosos</b>											
Sesos . . . . .	78.0	10.4	8.6	1.4	16	330	3.6	0.23	0.26	4.4	125
Corazón de vaca . . . . .	77.0	16.9	3.7	1.1	9	203	4.6	0.58	0.89	7.8	108
Riñones de vaca . . . . .	75.0	15.0	8.1	1.1	9	221	7.9	0.37	2.55	6.4	141
Hígado de vaca . . . . .	70.0	20.0	3.5	1.4	7	358	6.6	0.26	3.33	13.7	136
<b>Productos de carne</b>											
Salchichas de Bolonia . . . . .	62.0	14.8	15.9	3.3	9	112	2.2	0.18	0.19	2.7	221
Embutidos de puerco . . . . .	41.9	10.8	44.8	2.1	6	100	1.6	0.43	0.17	2.3	450
Salchichas de Frankfort . . . . .	60.0	14.2	20.5	2.7	8	100	1.5	0.18	0.19	2.8	257
<b>Aves</b>											
Gallina . . . . .	66.0	20.2	12.6	1.0	14	260	1.5	0.08	0.16	8.0	200
Pavo . . . . .	58.0	20.0	20.0	0.8	23	320	3.8	0.09	0.14	8.0	262

Tabla Núm.1

INTOXICACIONES PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS  
EN VARIOS TIPOS DE ALIMENTOS.

Vehículo de infección	<u>Salmonella</u>	Estafilococo	<u>C. perfringens</u>
CARNES RECALENTADAS:			
aves	3	1	2
picadillo	-	-	6
res	-	-	4
cerdo	1	-	1
borrego	-	1	2
CARNES FRIAS PROCESADAS:			
jamón, tocino	2	9	-
lengua	-	1	-
CARNE FRESCA:			
aves	9	5	2
res	2	-	3
cerdo	4	-	-
carne cocinada	1	-	1
CARNE ASADA:			
aves	5	-	2
borrego	-	-	1
PLATILLOS HECHOS EN CASA:			
tarta del pastor	-	-	2
vol au vent	-	-	2
bistec	-	-	1

Hobbs (1974)

Tabla Núm. 2

MULTIPLICACION DE *C. perfringens* A 37 ° C. EN PECHUGA Y PIERNA DE PAVO Y POLLO COCINADAS

SUSTRATO	pH	Log. cuenta viable /g		tiempo necesario para alcanzar 10 <sup>7</sup> cel/g	
		antes cocinar	despues cocinar	h	min.
Pechuga de pollo	5.9	6.3	3.6	5	28
Pierna " "	6.5	6.6	5.3	4	0
Pechuga de pavo	6.0	6.5	3.7	8	49
Pierna de pavo	6.4	5.7	3.3	8	0

Tabla Núm. 3

CRECIMIENTO Y ESPORULACION DE *C. perfringens* EN CARNES DE AVES A 37 ° C.

SUSTRATO	pH	Logaritmo de cuenta de células vegetativas viables más esporas y de esporas por gramo de carne despues de la incubación			
		24 h.		72 h.	
		Sin calentar	caliente	Sin calentar	caliente
<b>CRUDOS:</b>					
Pechuga de pollo	5.5	9.1	5.6	7.8	4.9
Pierna de pollo	6.6	8.5	3.2	7.3	5.0
Pechuga de pavo	6.0	7.0	5.1	6.9	3.1
Pierna de pavo	6.5	8.1	2.2	6.9	4.3
<b>COCINADOS:</b>					
Pechuga de pollo	5.8	7.0	4.3	7.0	1.7
Pierna de pollo	6.8	8.4	3.0	8.0	4.3
Pechuga de pavo	6.2	7.6	4.4	6.4	3.7
Pierna de pavo	6.8	7.8	3.8	7.5	5.8

Tabla Núm.4

RECUPERACION DE C. perfringens EN VARIOS MEDIOS

Origen de los cultivos	cepa	Inóculo/ml ( $3 \times 10^6 - 350 \times 10^6$ ) Recuperado en: *	
		Infusión de cerebro corazón Tioglicolato %	tioglicolato %
Intoxicación de alimentos Tipo A (Hobbs)	2	55	164
	6	115	104
	7	74	75
	8	118	90
	9	76	84
Colección Nacional de cul- tivos tipo (Gran Bretaña)	Tipo B	65	95
	" C	58	77
	" D	49	84
	" E	55	50
	" F	179	50
Colección Americana de cultivos tipo	" A	46	78
	" B	109	-
	" C	29	-
Aislados de alimentos con- taminados que causaron - enfermedades en E. U. A.	B <sub>2</sub>	82	93
	B <sub>4</sub>	87	89
	B <sub>5</sub>	56	23
	B <sub>6</sub>	52	87
	B <sub>7</sub>	81	96
	MW	97	83

\* Porcentajes comparados con gelosa SPS tomado como 100%  
Angelotti, Hall et al. (1961)



Tabla Núm.5

EFFECTOS DE LOS CONSTITUYENTES DE ALGUNOS ALIMENTOS EN LA SELECTIVIDAD DE GELOSA SPS Y RECUPERACION DE C. perfringens

ALIMENTO	Organismo / g antes de la inoculación		Cultivo usado	C. perfringens /g despues de la inoculación	
	Cuenta Aeróbica	Cuenta Anaeróbica		Adición por g X 10 <sup>5</sup>	Recuperación por g X 10 <sup>5</sup>
Res	520	0	" " 8	5.4	6.6
Pavo	600	50	B	19	18
Pollo	1080	590	B	14	12

Angelotti, Hall et al (1961)

Tabla Núm.6

RECUPERACION DE C. perfringens A PARTIR DE ALIMENTOS, EN PRESENCIA DE OTROS ORGANISMOS.

Alimento	Núm. de micro-organismos / g	Núm. de <u>Clostridia</u> / g	Núm. de <u>Clostridia</u> recuperado / g*
Chow mein	<u>Enterococci</u>		
	3250	15,500	15,000
Pollo a la Rey	3250	16	10
	<u>Bacilli</u>		
	20625	3 125	3,300
	20625	31	30
Tarta de Atún	<u>Serratia marcescens</u>		
	27000	8,900	7,800
	27000	890	820

\* Cuentas hechas en gelosa SPS

Angelotti, Hall et al. (1961)

ANÁLISIS DE ALIMENTOS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS POR *C. perfringens*,  
EMPLEANDO GELOSA SPS, MEDIO MOVILIDAD - NITRATO Y ESPORULACIÓN.

Probable agente etiológico	Alimento analizado	Cuenta total/g aeróbicos	Flora aeróbica predominante	Núm. de colonias negras en gelosa SPS	Características de las colonias desarrolladas.		
					Producción de NO <sub>3</sub>	Movilidad	Producción de esporas
<i>C. perfringens</i>	Res asada	100,000	Enterococo	20,000	+	-	+
	Ejotes	2,700	"	0			
	Papas	90,000	"	0			
	Coctel de frutas	3,200	"	0			
	Tarta de manzana	60	Estafilococo	0			
	Aderezo de queso para ensalada	3,800	Enterococo	0			
<i>C. perfringens</i>	Ensalada de pollo	40,500	coliformes	560,000	+	-	+
Desconocido	Mayonesa						
	Encurtidos						
Desconocido	Tres latas de res seca	23,500,000	<i>B. stearothermophilus</i> .	2 a 10	+	-	+
	Nueve emparedados de jamón	68,000,000	Estafilococo				
Desconocido	Ensalada de Camarones	41,000,000					
		129,000,000	Coliforme	2,800	-	+	+

En los primeros tres casos se aisló *C. perfringens* y en el último *C. bifermentans*

Angelotti, Hal et al (1961)

Tabla Núm.8

COMPARACION DE LA RECUPERACION DE 16 CEPAS DE C.perfringens EN 3 MEDIOS DISTINTOS.

Cepas de <u>C.perfringens</u> tipo A			M e d i o					
No.	Cepa	Serotipo	Gelosa sangre		SFP sin antibiótico		SFP	
			cuenta /ml	Recuperación %	Cuenta/ml	Recuperación %	Cuenta /ml	Recuperación
1	NCTC8797	1	12x10 <sup>7</sup>	100	12 x 10 <sup>7</sup>	100	12 x 10 <sup>7</sup>	100.0
2	" 8238	2	28x <sup>11</sup>	"	29 "	103.6	27 "	96.4
3	" 8239	3	18x <sup>11</sup>	"	17 "	94.4	17 "	94.4
4	" 8247	4	13x <sup>11</sup>	"	14 "	107.7	14 "	107.7
5	" 8678	5	11x <sup>11</sup>	"	11 "	100	11 "	100.0
6	" 8679	6	15x <sup>11</sup>	"	15 "	100	14 "	93.3
7	" 8449	7	65x <sup>11</sup>	"	67 "	103.1	66 "	101.5
8	" 8235	8	11x <sup>11</sup>	"	11 "	100	11 "	100.0
9	" 8798	9	18x <sup>11</sup>	"	17 "	94.4	17 "	94.4
10	" 9799	10	17x <sup>11</sup>	"	16 "	94.1	17 "	100.0
11	" 9851	11	4x <sup>11</sup>	"	4 "	100	4 "	100.0
12	" 10239	12	54x <sup>11</sup>	"	53 "	98.1	51 "	94.4
13	" 10240	13	9x <sup>11</sup>	"	9 "	100	9 "	100.0
14	SEC S34	de pavo	63x <sup>11</sup>	"	62 "	98.4	61 "	96.8
15	" S40	de pavo	110x <sup>11</sup>	"	110 "	100	110 "	100.0
16	" S45	en salsa de res seca	60x <sup>11</sup>	"	59 "	98.3	58 "	96.7

Shahidi, Ferguson (1971)

Tabla Núm.9

EVALUACION DE LOS EFECTOS DE UNA VARIEDAD DE ALIMENTOS EN LA RECUPERACION DE CEPAS DE C. perfringens EN GELOSA SFP Y SPS.

ALIMENTO	Cuenta bacteriana aeróbica / g (a)	C. perfringens inoculado		Recuperacion de C. perfringens después de la inoculación.					
		Cepa	Cantidad añadida/g	SFP cantidad/g %		SPS (BBL) cantidad/g. %		SPS (Difco) cantidad/g %	
Ensalada de atún	$8 \times 10^2$	SEC S40	$36 \times 10^6$	$32 \times 10^6$	90	$24 \times 10^6$	67	$12 \times 10^6$	33
Res asada	$39 \times 10^5$	Hobbs 7	$34 \times 10^6$	$30 \times 10^6$	88	$13 \times 10^6$	38	$9 \times 10^6$	27
Jamón hervido	$53 \times 10^4$	" 2	$19 \times 10^6$	$19 \times 10^6$	100	$18 \times 10^6$	95	$18 \times 10^6$	95
Res con elote	$51 \times 10^5$	" 12	$65 \times 10^6$	$58 \times 10^6$	90	$47 \times 10^6$	72	$42 \times 10^6$	65
Pavo asado	$56 \times 10^4$	SEC-S34	$26 \times 10^6$	$22 \times 10^6$	85	$20 \times 10^6$	77	$21 \times 10^6$	81

(a) número de C. perfringens encontrado en SFP, SPS (BBL) y SPS (Difco) antes de inocular

Promedio de recuperación:

SFP	90 %
SPS (BBL)	69.98 %
SPS (Difco)	60.2 %

Shahidi, Ferguson (1971)

Tabla Núm.10

PROPORCION RECUPERADA DE *C. perfringens* EN SFP - -  
Y SPS (Difco) EN ALIMENTOS OBTENIDOS COMERCIALMENTE.

Alimento	<i>C. perfringens</i> / g.	
	SFP	SPS
1. - Alimento para perro	$40 \times 10^8$	0
2. - Res asada	$55 \times 10^5$	0
3. - Res asada	$21 \times 10^5$	0
4. - Filete de pescado	$52 \times 10^4$	$15 \times 10^4$
5. - Pavo asado	$33 \times 10^4$	0
6. - Hígado	$35 \times 10^3$	0
7. - Rollo de res	$30 \times 10$	0
8. - Asado de olla	$75 \times 10^4$	0
9. - Carne molida cruda	$20 \times 10^4$	$10 \times 10^1$
10. - Mezcla de res	$28 \times 10^3$	0
12. - Res asada	$17 \times 10^2$	0
13. - Hamburguesa cruda	$12 \times 10^2$	0
14. - Res asada	$11 \times 10^2$	0
15. - Estofado con calabazas	$10 \times 10^2$	0
16. - Hamburguesa	$80 \times 10^1$	0
17. - Sirloin	$80 \times 10^1$	0
18. - Hamburguesa cruda	$70 \times 10^1$	$7 \times 10^1$
19. - Pavo asado	$50 \times 10^1$	$10 \times 10^1$
20. - Salchichas crudas	$50 \times 10^1$	00
21. - Rollo de res	$50 \times 10^1$	$24 \times 10^1$
22. - Res en rebanadas	$40 \times 10^1$	0
23. - Jamón cocido	$20 \times 10^1$	0
24. - Rollo de res	$20 \times 10^1$	0
25. - Rollo de res	$10 \times 10^1$	0

Este análisis se hizo en 464 alimentos y *C. perfringens* fue encontrado en los 25 mencionados en la tabla.

Tabla Núm.11

ESQUEMA DE DIFERENCIACION ENTRE C. perfringens Y OTROS Clostridia  
TAMBIEN PRODUCTORES DE LECITINASA Y DE H<sub>2</sub>S EN SFP Y LM.

Bacteria	SPF		LM	
	Producción de lecitinasa	Produccion de H <sub>2</sub> S	Movilidad	Fermentadores de lactosa
<u>C. perfringens</u>	+	+	-	+
<u>C. bi fermentans</u>	+	+	+	-
<u>C. botulinum</u>	+	+	+	-
<u>C. haemoliticum</u>	+	+	+	-
<u>C. novyi</u>	+	+	+	-
<u>C. parabotulinum</u>	+	+	+	-
<u>C. sporogenes</u>	+	+	+	-

Shahidi y Ferguson (1971)

Tabla Núm.12

ENUMERACION DE *C. perfringens* A PARTIR DE ALGUNOS ALIMENTOS EN SFP, TSC Y TSC SIN Y H.

Alimento	Organismo	SFP	Cuenta (célula / g)		
			TSC	TSC sin Y H.	SFP sin antibiótico
A	<i>C. perfringens</i>	$5.5 \times 10^3$	$7.8 \times 10^3$	$10.8 \times 10^3$	$7.0 \times 10^3$
	No especificado	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
B	<i>C. perfringens</i>	$1.4 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$
	No especificado	$10^7 - 10^8$ <sup>a</sup>	$10^3 - 10^4$	$10^3 - 10^4$	$10^7 - 10^8$ <sup>b</sup>
C	<i>C. perfringens</i>	$7.4 \times 10^4$	$6.3 \times 10^5$	$8.8 \times 10^5$	$8.3 \times 10^7$
	No especificado	$10^5$	$10^5$	$10^5$	$10^6 - 10^7$
D	<i>C. perfringens</i>	$1.2 \times 10^8$	$1.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^8$
	No especificado	$10^5$	$10^5$	$10^5$	$10^6 - 10^7$
E	<i>C. perfringens</i>	$4.7 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$
	No especificado	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
F	<i>C. perfringens</i>	$3.0 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$
	No especificado	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^7 - 10^8$
G	<i>C. perfringens</i>	$7.3 \times 10^6$	$7.4 \times 10^6$	$8.3 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$
	No especificado	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
H	<i>C. perfringens</i>	$1.0 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$
	No especificado	$10^8 - 10^9$	$10^5$	$10^5$	$10^8 - 10^9$
I	<i>C. perfringens</i>	$1.8 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	ND <sup>c</sup>
	No especificado	$10^7 - 10^8$	$10^3$	$10^3$	
J	<i>C. perfringens</i>	$1.8 \times 10^9$	$1.9 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	ND
	No especificado	$10^8 - 10^9$	$10^7 - 10^8$	$10^7 - 10^8$	
K	<i>C. perfringens</i>	$6.8 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$6.2 \times 10^7$	ND
	No especificado	$10^8 \times 10^9$	$10^5$	$10^5$	
L	<i>C. perfringens</i>	$3.2 \times 10^6$	$2.1 \times 10^6$	$4.2 \times 10^6$	ND
	No especificado	$10^7 - 10^8$	$10^6$	$10^5$	
M	<i>C. perfringens</i>	$3.4 \times 10^5$	$3.5 \times 10^6$	$4.3 \times 10^5$	ND
	No especificado	$10^3$	$10^3$	$10^3$	

a  $2.4 \times 10^6$  produjeron halos opacos

b  $3.5 \times 10^6$  " "

c ND- no determinado

d  $3.0 \times 10^6$  produjeron halos opacos

Tabla Núm. 13

PERDIDA DE VIABILIDAD DE C. perfringens EN ALIMENTOS  
ALMACENADOS EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE GLICEROL.

Alimento	Reducción en cuentas después de 4 semanas.			
	4°C <sup>a</sup>		-55 a -60°C	
	Núm. <sup>b</sup>	SI <sup>d</sup>	Núm.	SI
N	3.0	0.6	0.2	0.2
O	ND <sup>c</sup>	ND	2.6	1.1
P	1.7	1.0	0.2	0.2
Q	1.9	0.8	0.4	0.4
R	1.8	1.3	0.6	0.2
S	4.8	1.6	0.5	0.2
T	2.0	1.6	0.6	0.6

a - temperatura almacenamiento

b - almacenado en un recipiente con hielo seco.

ND<sup>c</sup> - No determinado.

d - 0.2 - no hubo pérdida sensible.

Tabla Núm. 14

ENUMERACION DE C. perfringens A PARTIR DE ALGUNOS  
ALIMENTOS EN TSC sin YH y OPSP

Alimento	Organismo	Cuenta (células /g)	
		TSC sin YH	OPSP
N	<u>C. perfringens</u>	$5.6 \times 10^6$	$5.7 \times 10^9$
	No especificado	$10^7 - 10^8$	$10^9$
P	<u>C. perfringens</u>	$2.6 \times 10^2$	$2.8 \times 10^3$
	No especificado	$10^6 - 10^7$	$10^7$
Q	<u>C. perfringens</u>	$3.8 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$
	No especificado	$10^6$	$10^9$
R	<u>C. perfringens</u>	$9.0 \times 10^7$	$8.2 \times 10^7$
	No especificado	$10^5$	$10^9$
S	<u>C. perfringens</u>	$6.4 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$
	No especificado	$10^5$	$10^9$
T	<u>C. perfringens</u>	$2.8 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$
	No especificado	$10^4 - 10^5$	$10^9$

Tabla 13 y 14 Hauschild y Hilsheimer (1974)

ALIMENTOS UTILIZADOS PARA LA ENUMERACION DE C. perfringens.

Designación	Alimento	Incubación
A	Barbacoa de pollo	18 h a 22°C
B	" " "	" " " 30°C
C	Pollo	" " " 30°C
D	Res asada	" " " 35°C
E	Res en salsa	" " " 20°C 4.5 h a 46°C
F	Pollo "chow mein"	" " " " " "
G	Pastel de carne	" " " " " "
H	" " en salsa	" " " " " "
I	Res en salsa	" "
J	Pavo en salsa	" "
K	Res en salsa	" "
L	Pavo en salsa	" " " " " "
M	Goulash hungaro	" " " " " "
N	Barbacoa de pollo	" " " 30°C
O	Pavo en salsa	" " " "
P	Barbacoa de puerco	" " " "
Q	Pavo en salsa	" " " 20°C " "
R	Res asada	" " " " " "
S	Res en salsa	" " " " " "
T	Puerco en salsa	" " " " " "

Hauschild, Hilsheimer (1974)

Tabla Núm.15

Número de colonias presuntivas confirmadas como *C. perfringens*.

		Método			
Laboratorio	Ejemplo	A	B	C	D
Be	1	6	10	7	10
	2	10	10	10	9
	3	9	10	9	10
	4	10	10	8	7
	5	10	10	10	6
	6	10	9	10	10
	7	9	10	9	9
	8	2	4	5	7
	9	9	10	9	10
	10	8	10	10	10
	11	10	10	10	10
	12	10	9	10	10
		8.6	9.3	8.9	8.9
Co	1	10	10	10	10
	2	10 <sup>b</sup>	10	10 <sup>c</sup>	10
	3	10	10	10	10
	4	10	9	8	10
	5	6	10	9	9
	6	0	1	1	10
	7	0	0	0	10
	8	10	10	10	10
	9	10	10	10	10
	10	10	10	10	10
	11	10	10	10	10
	12	10	10	10	10
		8.0	8.3	8.2	9.9
Ot	1	10	10	10	6
	2	10	9	10	10
	3	10	10	10	7
	4	10	10	10	10
	5	10	10	10	10
	6	10	10	10	1
	7	10	10	10	6
	8	10	10	10	10
	9	9	10	9	9
	10	9	10	10	3
	11	10	10	10	6
	12	7	4	10	2
		9.6	9.4	9.9	6.7

Tabla Núm.15

Laboratorio	Ejemplo	Método			
		A	B	C	D
Sy	1	7	9	7	10
	2	6	7	4	9
	3	10	9	10	9
	4	9	8	9	5
	5	10	10	8	9
	6	10	10	10	10
	7	9	9	9	9
	8	8	8	6	10
	9	9	7	9	9
	10	9	10	10	8
	11	9	10	10	10
	12	8	9	10	10
		8.7	8.8	8.5	9.0
WA	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10

Hauschild et al.(1977)

Tabla Núm.16

## CUENTAS NO ESPECIFICAS

Laboratorio	Ejemplo	Cuentas más altas por alguno de los 4 métodos	Mayor porcentaje			
			Método			
			A.	B	C	D
Be	3	$1.5 \times 10^7$	100	80	3	6
	5	$3 \times 10^6$	100	9	0	0
	8	$1.3 \times 10^7$	100	0	0	25
	10	$2. \times 10^4$	100	86	5	5
	12	$2.0 \times 10^3$	100	5	5	5
			100	34	1	5
Co	2	$7.2 \times 10^7$	100	1	1	69
	3	$1.0 \times 10^8$	100	1	1	0
	5	$2.5 \times 10^7$	100	4	4	0
	6	$7.8 \times 10^5$	100	1	13	0
	7	$3.2 \times 10^6$	100	0	0	0
	8	$8.1 \times 10^4$	100	1	1	6
	9	$2.6 \times 10^6$	100	4	4	2
	10	$2.6 \times 10^8$	100	0	0	2
	11	$1.0 \times 10^8$	100	0	0	15
	12	$1.1 \times 10^8$	100	0	0	0
			100	1	1	2
			100	0	0	16
Ot	2	$3.0 \times 10^5$	100	5	5	77
	3	$2.0 \times 10^5$	60	0	0	100
	4	$1.7 \times 10^8$	1	0	0	100
	5	$1.4 \times 10^5$	100	43	7	23
	6	$4.7 \times 10^7$	13	0	0	100
	7	$3.2 \times 10^8$	11	0	0	100
	8	$3.0 \times 10^8$	0	0	0	100
	9	$4.7 \times 10^8$	2	2	2	100
	10	$5.6 \times 10^8$	5	2	2	100
	11	$2.5 \times 10^8$	100	4	4	32
	12	$7.8 \times 10^8$	13	1	1	100
			42	4	0	79
Sy	1	$3.6 \times 10^4$	39	100	0	0
	3	$3.0 \times 10^7$	100	4	4	4
	5	$4.5 \times 10^7$	100	89	76	0
	12	$4.0 \times 10^4$	100	1	2	2
			85	48	19	0

Tabla Núm.16

Laboratorio	Ejemplo	Cuentas más altas por alguno de los 4 métodos	Mayor porcentaje			
			Método			
			A	B	C	D
Wa	1	$5 \times 10^8$	100	0	0	28
	2	$1 \times 10^9$	100	0	0	2
	3	$7.1 \times 10^6$	51	0	0	100
	4	$3.8 \times 10^7$	100	2	3	21
	5	$1 \times 10^8$	1			
	6	$3 \times 10^7$	100	0	0	43
	8	$2.0 \times 10^6$	10	14	50	100
	9	$3 \times 10^5$	100	1	1	7
	10	$5.2 \times 10^5$	100	0	0	21
	11	$2.9 \times 10^7$	100	0	0	48
	12	$3.4 \times 10^7$	100	0	0	41
				78	2	5

Hauschild et al. (1977)

Tabla Núm.17

CUENTAS CONFIRMADAS DE C. perfringens.

Laboratorio	Ejemplo	Cuentas más altas por alguno de los 4 métodos	Mayor Porcentaje			
			Método			
			A	B	C	D
Be	1	$8.1 \times 10^7$	55	100	75	75
	2	$3.2 \times 10^7$	100	75	97	53
	3	$1.8 \times 10^8$	89	100	100	94
	4	$5.6 \times 10^5$	100	89	88	54
	5	$1.6 \times 10^5$	94	62	100	37
	6	$2.1 \times 10^7$	86	100	57	57
	7	$3.7 \times 10^6$	89	70	100	59
	8	$1.8 \times 10^7$	17	78	100	61
	9	$5.4 \times 10^7$	69	100	83	74
	10	$9.0 \times 10^4$	91	100	71	51
	11	$4.9 \times 10^4$	100	94	37	18
	12	$6.6 \times 10^6$	100	97	76	58
			82	89	82	58
Co	1	$2.2 \times 10^5$	77	55	100	68
	2	$3.1 \times 10^8$	42	55	68	100
	3	$1.1 \times 10^8$	65	84	100	80
	4	$5.4 \times 10^8$	52	57	70	100
	5	$5.0 \times 10^7$	50	80	100	66
	8	$8.0 \times 10^4$	100	90	92	81
	9	$1.7 \times 10^7$	94	94	100	6
	10	$1.5 \times 10^8$	67	100	93	87
	11	$7.2 \times 10^7$	78	100	94	62
	12	$7.0 \times 10^5$	80	100	81	40
			70	82	90	69
	Ot	1	$7.1 \times 10^5$	89	72	100
2		$1.5 \times 10^6$	67	80	100	80
3		$7.4 \times 10^6$	86	78	100	53
4		$7.8 \times 10^6$	100	79	97	63
5		$2.6 \times 10^6$	77	77	100	50
6		$3.0 \times 10^6$	100	53	67	87
7		$2.4 \times 10^8$	83	100	96	88
8		$2.6 \times 10^8$	85	62	69	100
9		$4.9 \times 10^8$	49	76	86	100
10		$4.4 \times 10^8$	73	66	100	1
11		$1.8 \times 10^8$	67	67	100	47
12		$8.6 \times 10^8$	58	50	100	10
		78	72	93	61	

Tabla Núm.17

Laboratorio	Ejemplo	Cuentas más altas por alguno de los 4 métodos	Mayor porcentaje			
			Método			
			A	B	C	D
Sy	1	$7.0 \times 10^3$	66	100	79	33
	2	$1.4 \times 10^7$	69	79	63	100
	3	$6.8 \times 10^8$	91	82	100	87
	4	$3.5 \times 10^6$	89	100	86	31
	5	$5.9 \times 10^4$	81	100	92	78
	6	$5.3 \times 10^6$	83	83	26	100
	7	$1.6 \times 10^8$	88	100	100	81
	8	$2.0 \times 10^8$	85	95	80	100
	9	$9.4 \times 10^7$	100	69	95	84
	10	$1.7 \times 10^7$	94	100	82	59
	11	$2.6 \times 10^6$	65	37	100	13
	12	$2.4 \times 10^5$	100	88	92	83
			84	86	83	71
Wa	1	$9.8 \times 10^5$	76	96	100	93
	2	$1.2 \times 10^6$	63	58	100	53
	3	$2.2 \times 10^7$	91	100	100	68
	4	$1.8 \times 10^6$	67	100	55	67
	5	$1.4 \times 10^6$	86	100	100	30
	6	$6.7 \times 10^6$	60	45	100	66
	7	$2.9 \times 10^8$	100	41	66	62
	8	$2.1 \times 10^8$	100	67	62	100
	9	$1.1 \times 10^5$	91	100	55	45
	10	$5.1 \times 10^5$	55	92	100	69
	11	$10.7 \times 10^7$	95	77	86	100
	12	$6.8 \times 10^7$	100	72	76	76
			82	79	83	69

Hauschild et. al. (1977)

Be - Berlin

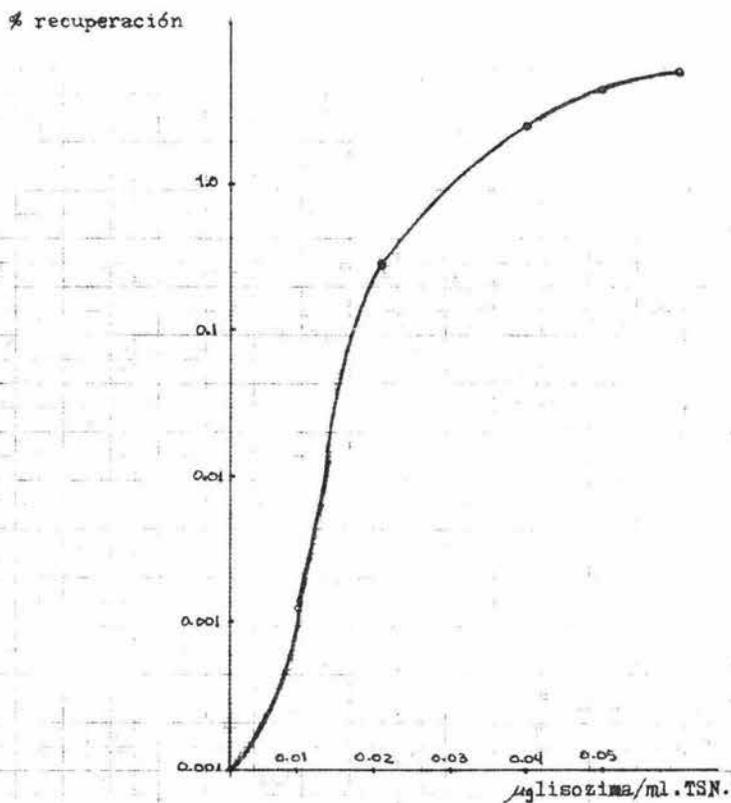
Co - Colindale

Ot - Ottawa

Sy - Sydney

Wa - Washington

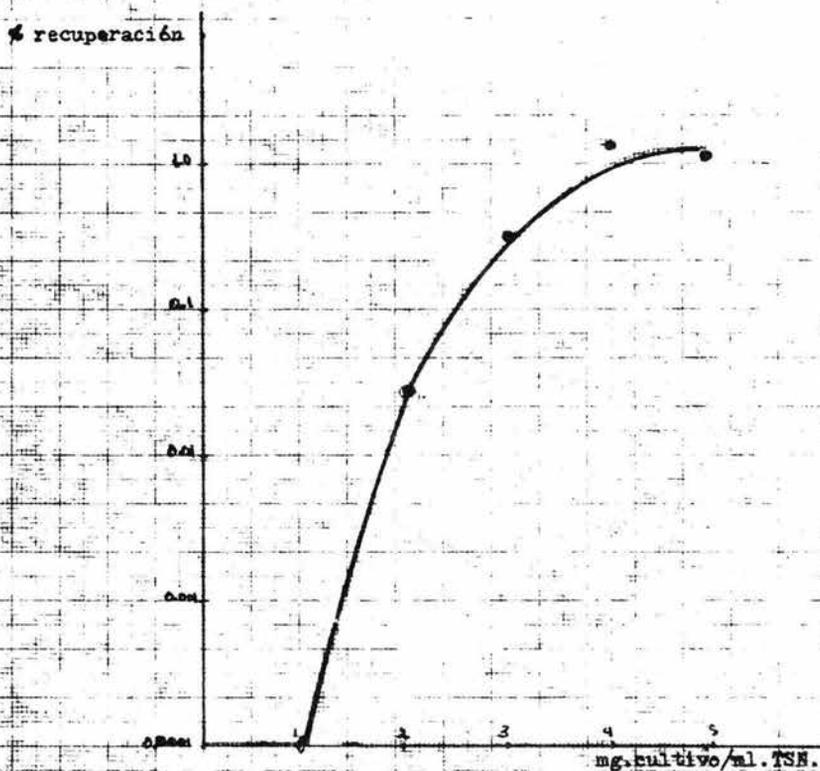
FIGURA "A"



Efecto de la concentración de lisozima en la recuperación de esporas de *C. perfringens*, afectadas térmicamente.

Duncan, Labbe, Reich. (1972)

FIGURA "B".

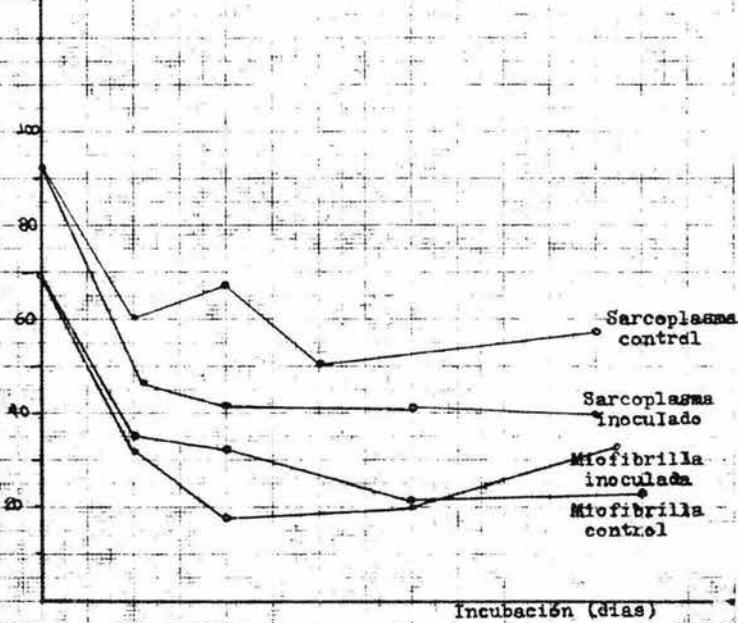


Efecto del fluido sobrenadante de *C. perfringens*  
ATCC 3624 que contiene una proteína inactivadora para  
la recuperación de esporas térmicamente afectadas.  
Duncan, Labba, Reich (1972)

Cambios en el contenido protéico de sarcoplasma y miofibrillas durante la incubación.

Gráfica Núm. 1

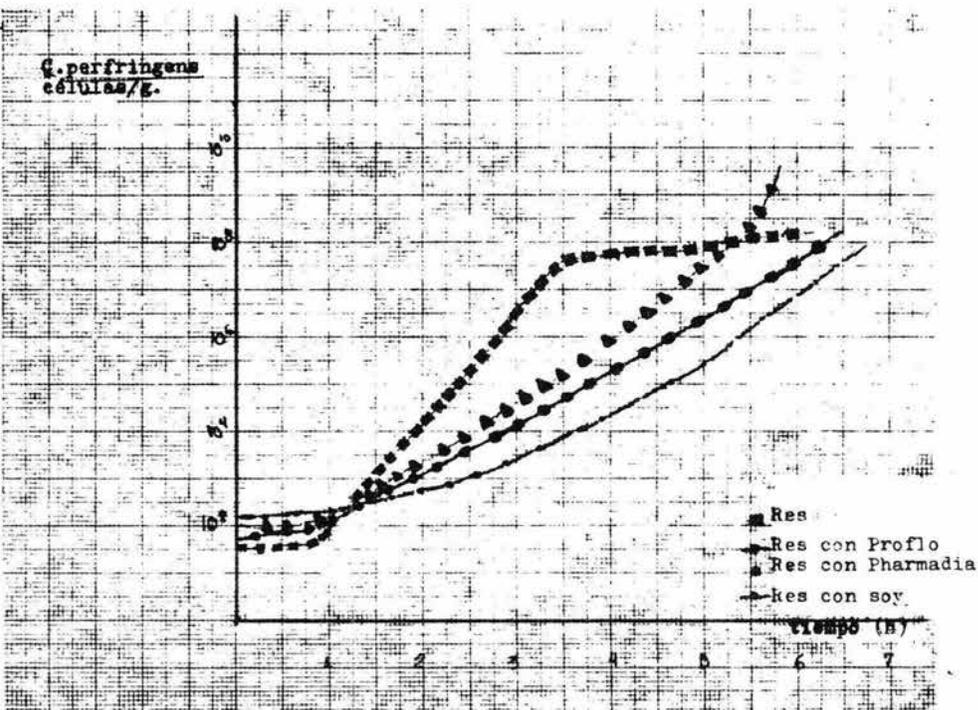
Proteínas  
(mg/g músculo)



Haydock, Pearson y Prins (1976)

Crecimiento típico de *C. perfringens* (ATCC 3624 a 45°C)  
en un medio de res y res con proteínas vegetales.

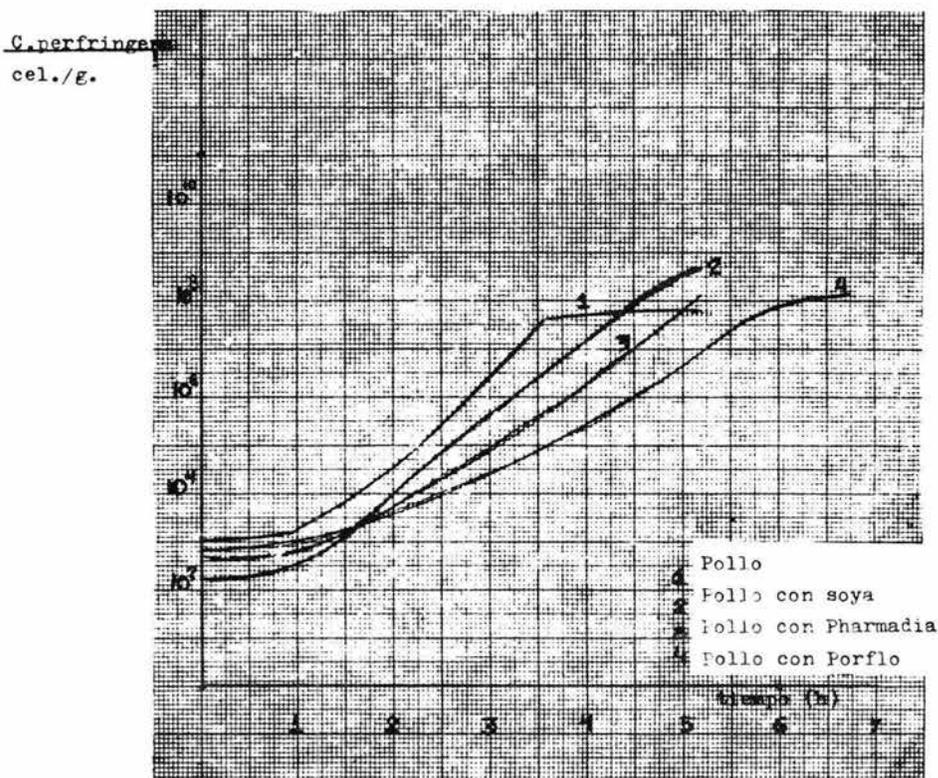
Gráfica Núm. 7



Kokocza y Stevenson (1976)

Crecimiento típico de *C. perfringens* (ATCC 3624 a 45°C)  
 en un medio de pollo y pollo con proteínas vegetales.

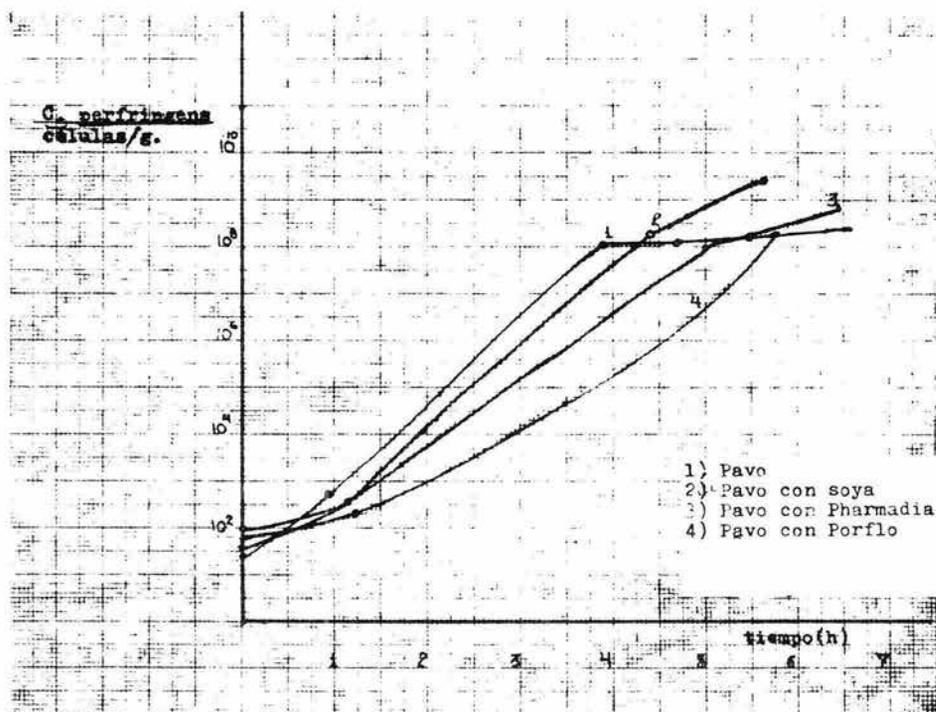
Gráfico No. 3



Kokoczká y Stevenson (1976)

Crecimiento Típico de *C. perfringens* (ATCC 3624 a 45°C)  
en un medio de pavo y pavo con proteínas vegetales.

Gráfica Num. 4



Kokcska y Stevenson (1976)

## IV. IMPORTANCIA SANITARIA

### 4.1. - HIGIENE DURANTE LA PRODUCCION DE CARNE.

La comida de origen animal es vehículo en potencia y medio óptimo para crecimiento de microorganismos patógenos para los consumidores, especialmente en México donde no existen los requerimientos higiénicos necesarios durante el proceso y el almacenado. - Por otro lado, excepto en el caso de carne enlatada, no existe un proceso de calentamiento del alimento antes de su distribución. Por lo tanto es de suma importancia tomar medidas higiénicas durante dicho proceso.

La higiene de la producción de carne debe empezar con la -- prevención de enfermedades en la crianza y engorda de las manadas. Es importante tener cuidado en la transportación de éstas a los rastros. Debe evitarse la tensión de los animales y los establos deberán limpiarse regularmente y desinfectarse.

En los últimos días la transportación de carne ha aumentado y las distancias son también mayores, por lo que es importante tomar medidas estrictas.

Durante el proceso es muy importante la absoluta separación de las vísceras abdominales del resto del cuerpo. Este problema podrá ser optimamente resuelto si los cueros y visceras son transportados directamente de la carcasa del animal a otro piso.

Las medidas profilácticas durante la producción de carne consisten en la mecanización del rastro, tanto como sea posible, desde que se quita el cuero del animal, hasta la división de la carcasa y el transporte automático de la misma. Todo ésto minimiza el contacto de la carne con manos, ropa y herramientas de los trabajadores.

Las manos y herramientas transmiten enormes cantidades de microorganismos de los abdómenes, cueros y heces a las carcasas que originalmente no contenían nada de contaminantes.

Para evitar lo anterior se deben instalar unidades de limpieza y desinfección lo más cerca posible de las áreas de trabajo que deben contar con agua caliente y desinfectantes.

Cada corte hecho en la carne incrementa la posibilidad de contaminación y multiplicación de microorganismos. Las investigaciones demuestran que la multiplicación depende en forma proporcional del número de cortes. En muchos países el almacenamiento de trozos de carne congelada está prohibido.

Un paso esencial en la prevención de intoxicaciones es la inspección regular de las plantas procesadoras. Un método objetivo es el análisis bacteriológico cualitativo y cuantitativo de productos semiterminados.

#### 4.2. - HIGIENE PERSONAL

Las manos son uno de los medios de transporte más importantes para la diseminación de bacterias. Es muy difícil, si no imposible, quitar los microorganismos presentes en ellas con los métodos que normalmente efectuamos para lavarnos las manos. Estas deberán ser lavadas con abundante jabón y enjuagadas de preferencia con agua caliente que sea agua corriente. Los recipientes en donde se lavan manos y utensilios para comer son excelentes fuentes de microorganismos y muchas veces son los responsables de las enfermedades gastrointestinales.

Las uñas deberán mantenerse cortas y preferentemente sin barniz, ya que éste podría ocultar los reservorios de microorganismos existentes entre uñas y dedos. Se han aislado de este sitio microorganismos contaminantes de alimentos provenientes de nariz, piel e intestino.

Los jabones en forma líquida o en polvo presentan ventajas sobre las pastillas, ya que cuando éstas pasan de mano en mano quedan en sus superficies microorganismos que serán transportados por las personas que las utilizaron. Existen jabones antisépticos cuyo uso prolongado reduce en gran parte la flora bacteriana de las manos y por lo tanto la distribución de agentes contaminantes. Por lo difícil que es alterar o quitar la flora microbiana se puede decir que, lavarse las manos, no significa necesariamente que las manos esten exentas de microorganismos.

Las personas que manejan alimentos, además, están en contacto directo con los utensilios y equipo donde éstos se preparan, por tanto la higiene de este material es también de suma importancia, ya que puede ser contaminado o bien ser el medio directo de contaminación de las manos.

El uso de guantes se recomienda para el manejo de alimentos congelados y cuando existe una inmersión prolongada de las manos en aguas que contienen detergentes o bien sustancias que a la larga causan daños en la piel.

Se han llevado al cabo pruebas en Inglaterra, que indican que los guantes no representan una gran ventaja sobre las manos desnudas, a menos que sean lavados aquellos frecuentemente tanto por afuera como por adentro.

Para secarse las manos, lo ideal son las toallas de papel desechables, o bien toallas de tela individuales, ya que si son usadas por muchas personas se convertirán en excelentes intercambiadores de microorganismos.

Es imposible suponer que los pequeños establecimientos callejeros cuenten con todo lo necesario, pero al menos deberán tener agua corriente y detergentes para el lavado no sólo de las manos, sino también de los utensilios que son usados por un sinnúmero de personas, ya que éste es uno de los mejores medios para adquirir una enfermedad gastrointestinal.

Es, por lo tanto, importante recordar que la comida no deba ser tocada con las manos más de lo absolutamente necesario.

Es también importante tratar de evitar ciertos hábitos, no sólo por parte de las personas que manejan el alimento sino también por las que lo consumen; por ejemplo: el hecho de toser o estornudar enfrente de los alimentos es una forma de dispersar microorganismos de nariz, boca y garganta. Se debe evitar también el hábito de mojar con saliva los dedos cuando se ha de separar un papel de otro para que un alimento sea empacado, ya que la saliva es un vehículo directo de contaminación. Es importante, también, no introducirse los dedos en la nariz, pues aquí se depositan una gran cantidad de microorganismos patógenos y algunos como C. perfringens que aumentan debido a la contaminación ambiental.

Las personas que manejan alimentos deben tener pañuelos — absolutamente limpios, pues éstos pueden contener millones de bacterias. Los pañuelos desechables son preferibles a los de tela.

En cuanto al pelo, deberá estar limpio, y de preferencia las personas cuya actividad es la de manejar alimentos deberán usar gorros, ya sea de tela o plástico para evitar que así se contaminen los alimentos.

Deberá estar prohibido fumar para cualquier persona que esté en contacto directo con alimentos, pues además de que el tabaco puede ser fuente de contaminación, los fumadores tienden a ensalivarse los dedos cuando se quitan el cigarro de los labios, o bien cuando sacan pequeñas porciones de tabaco que quedan en la boca, si no es que las escupen en el suelo o sobre el material con el cual trabajan.

Respecto a la ropa, deberá ser preferentemente de colores claros y cambiarse constantemente, de manera que siempre pueda estar limpia. Los establecimientos grandes deberán contar con cuartos adecuadamente limpios, para que las personas que van a trabajar con los alimentos puedan cambiarse la ropa, o bien ponerse una bata de trabajo, que al igual que la ropa deberá ser de color claro.

En los rastros o en los sitios donde se maneja carne, no solamente se deberá contar con un cuarto de este tipo, sino además con regaderas, pues la sangre es un medio rico para el desarrollo de microorganismos no solamente saprófitos sino parásitos también.

En los pequeños establecimientos, en la mayoría de los casos no se podrá contar con un cuarto para cubrir esta necesidad, pero las personas que trabajen en él también deberán estar limpias, el pelo oculto y la ropa de colores claros, de preferencia blanca.

Estas formas de prevenir la contaminación de alimentos por microorganismos patógenos y especialmente por C. perfringens no resolverán ninguna situación para prevenir enfermedades si además no se toman en cuenta los siguientes factores:

#### 4.3. - ENFRIAMIENTO.

Un enfriamiento lento de los alimentos, del tipo de la carne-roja, aves, mariscos, etc., llevará a la multiplicación de bacterias patógenas y alcanzará niveles considerables de microorganismos que originen enfermedades gastrointestinales.

Las bajas temperaturas (dependiendo de su intensidad) afectarán a los microorganismos en distintas formas, conforme la temperatura baja, la actividad bacteriana descenderá de la misma manera, por lo que los alimentos para desarrollo de este tipo de bacterias, C. perfringens, deberán permanecer a temperaturas bajas, para prolongar su vida en anaquel y mantenerlos en buenas condiciones.

Durante las pruebas que se han llevado al cabo con C. perfringens se observó que no hubo crecimiento durante 6 días a  $6.5^{\circ}\text{C}$  y por lo tanto no deberá existir ningún desarrollo de éste a temperaturas un poco menores de los  $15^{\circ}\text{C}$ .

En los grandes establecimientos, donde se almacena carne, los congeladores deberán permanecer a temperaturas menores de  $-18^{\circ}\text{C}$  con lo cual la mayoría de los microorganismos morirán y los psicrófilos se desarrollarán lentamente, dependiendo de las condiciones del almacenamiento.

Las esporas de C. perfringens no se verán afectadas con la congelación y podrán germinar cuando la carne se encuentre en un medio apropiado para que ésto se efectue, pero las toxinas que formen en el alimento no producirán ningún daño al hombre, pues sólo las formadas en el intestino serán las causantes de la enteritis.

En toda cocina casera o de fábrica deberá existir un refrigerador y cuando el tamaño del lote de carne lo amerite deberá existir un cuarto a bajas temperaturas que cuente con estantes de metal para que la carne quede lo suficientemente separada, de tal manera que exista una circulación de aire frío libre entre paquete y paquete de alimento.

Entre las cocinas y los cuartos fríos deberá existir una estancia, de tal manera que cuando estos últimos sean abiertos no entre directamente el aire a una mayor temperatura.

La temperatura de los refrigeradores y de los cuartos fríos deberá verificarse periódicamente y estar 4°C., de esta manera no existirá la posibilidad de desarrollo de C. perfringens.

El enfriamiento rápido de las carnes cocinadas es una de las mejores maneras de evitar el desarrollo de C. perfringens, ya que así no existirá ni el tiempo ni la temperatura óptimas para su reproducción.

En México, la mayoría de los vehículos transportadores de carne no cuentan con sistema de refrigeración y la carne permanece a temperatura ambiente por algunas horas, además, las condiciones sanitarias del vehículo muchas veces no son las adecuadas, todo esto junto trae como consecuencia no solamente el desarrollo de C. perfringens sino que, algunas veces puede ocurrir la descomposición total del alimento.

Un gran número de carnicerías de México, no solamente no cumplen con los mínimos requisitos de una higiene adecuada, sino que además no cuentan con un sistema apropiado de refrigeración. Solamente un pequeño refrigerador donde está la carne que es mostrada al público consumidor, y la restante permanece por varias horas sin condiciones adecuadas de higiene y temperatura.

La incidencia de microorganismos patógenos en alimentos, será mayor en verano, aunque las enfermedades gastrointestinales se presenten todo el año. El almacenamiento en frío adecuado ayudará a reducir esta incidencia.

#### 4. 4. - PREPARACION DEL ALIMENTO Y RESISTENCIA AL CALOR DE LAS ESPORAS.

Cuando una carne fresca se come inmediatamente después -- de que ha sufrido una cocción, no podrá ser responsable de intoxicaciones causadas por células vegetativas de C. perfringens. A pesar de ésto las esporas producidas por este microorganismo son resistentes al calor y sobreviven a la cocción dando como resultado -- un gran número de células bacterianas cuando el almacenamiento -- del alimento se hace por un período largo.

Durante la cocción de un trozo de carne, las temperaturas -- altas en un pequeño período de tiempo son la mejor manera de inhibir el desarrollo de microorganismos.

Los métodos que se consideran seguros para no permitir el -- desarrollo de microorganismos son:

- a) la cocción en ollas de presión.
- b) asado
- c) fritura

Se han hecho estudios comparativos sobre la cocción de carne, en especial de pollo, y se ha encontrado que los rayos infrarrojos de alta frecuencia, estufas de microondas y asado son métodos -- que destruyen las células vegetativas.

De una buena eliminación de microorganismos obtenida después de la cocción dependerá el estado de la carne, además todo el beneficio alcanzado durante la cocción del alimento no servirá de nada si se manipula en forma poco higiénica y no se enfría inmediatamente en un refrigerador.

Todas estas precauciones podrán tener un resultado negativo

contra C. perfringens, si no se toma en cuenta que sus esporas so breviven a la cocción.

Esto, como se ha mencionado anteriormente, puede prevenirse si se enfría la carne rápidamente y las condiciones bajo las cuales se almacena son higiénicas, ésta es, sin duda alguna, la mejor medida que se puede tomar para prevenir una intoxicación de C. perfringens por alimentos.

C. perfringens es un microorganismo anaeróbico, por lo tanto no se desarrolla en presencia de  $O_2$ , y la carne cocinada será un mejor medio para su crecimiento, ya que el  $O_2$  se pierde durante la cocción. Además el calor durante ésta es un factor que ayuda a la germinación de las esporas. Los trozos de carne gruesa son particularmente dañinos, ya que las esporas en el interior encuentran condiciones favorables de anaerobiosis y de una lenta penetración de calor.

## V ESPORAS Y TOXINAS.

Entre la multitud de agentes germinantes de esporas bacterianas existen 2 de ellos que son líticos por naturaleza: las enzimas líticas excretadas por algunos bacilos y la lisozima.

Los compuestos conocidos excretados por esporas germinadas son: amino ácidos, peptidos, aminoazúcares, Ca y á. dipicolínico. Se cree que cuando la lisozima esta asociada a la lisis de la espora, hay excreción de al menos un tipo de estos compuestos, pudiendo ser los aminoazúcares o hexosaminas. Estas últimas se piensa que forman parte de la capa cortical de la espora, también compuesta -- por mureína , un mucopéptido similar a los encontrados en las paredes de las células vegetativas.

A pesar de que el comportamiento de ambos agentes germinativos es similar, se trata de 2 proteínas distintas.

Para que estos compuestos actúen como agentes germinantes, las esporas deben ser pretatadas con compuestos como urea y mer--captoetanol o bien ácido tioglicólico, éstos rompen las uniones que forma el S con la membrana de la espora, permitiendo a la lisozima entrar y atacar al mucopéptido de la corteza.

Si además del tratamiento con mercaptoetanol y urea se expo--ne a las esporas a un tratamiento alcalino, se ha demostrado que -- se destruye un nuevo componente de la membrana de la espora, -- permitiendo una mejor entrada de la lisozima.

Esta idea de sistemas líticos asociados a esporas fué expresada por primera vez por Strange y Dark. Supuestamente en el proceso de germinación normal, la enzima lítica es activada de alguna manera y sale de la espora para atacar la corteza de ésta, dando co--mo resultado la germinación. (9)

Es muy importante, por tanto, poder determinar la presencia de esporas de C. perfringens en los alimentos, pues durante la cocción de éstos se dañan o eliminan las membranas de las esporas, - siendo este camino el mejor para que se lleve al cabo una germinación, y por tanto un desarrollo del microorganismo productor de toxinas.

La resistencia térmica que presentan las esporas de C. perfringens depende del tipo de cepa y del tratamiento a que se sometan para eliminarlas, es decir, el tiempo y la temperatura a que se sometan durante el proceso.

Durante los primeros experimentos el número de esporas que se registraba no incluía a las esporas lábiles, por lo que Adams (1973) desarrolló un nuevo método donde sometía éstas a un tratamiento a ultratemperatura ( UHT ) adicionando después del proceso la lisozima, para obtener una mayor recuperación de las esporas. A partir de células vegetativas obtuvo una suspensión de esporas (  $10^7$ - $10^9$ /ml) que activaba llevándolas a una temperatura de (75-80°C.) -- enfriando rápidamente y por último aplicaba el tratamiento UHT (80-135°C.) Durante este tratamiento las capas exteriores son atacadas o eliminadas, como ya se mencionó anteriormente, dejando la capa de mureína fácilmente atacable por la lisozima. Por esto es que se cree que la capa es el sustrato de la enzima lítica.

Los resultados obtenidos en este experimento fueron:

- 1) La resistencia térmica de las esporas no necesariamente indica una adaptación al calor.
- 2) Algunas cepas producen esporas más resistentes que otras, e inclusive la cepa 8798 de C. perfringens produce esporas más resistentes que las formadas por C. botulinum.
- 3) Se sugiere que las esporas en algunos alimentos deben ser más resistentes que en otros, ya que cuando fueron analizadas en un regulador de fosfatos presentaron una mayor resistencia térmica.

4) Se necesita la presencia de lisozima para una mayor recuperación de esporas, y por lo tanto una mayor formación de colonias. (1)

Sobre este mismo problema, Duncan, Habbe y Reich (1972) hicieron otro experimento usando una preparación de esporas y encontraron que la lisozima no actúa directamente a nivel del aparato germinativo, además, que el uso de esta enzima produce una aparente reversibilidad del daño térmico. La ausencia de células vegetativas y de material de las paredes del esporangio eliminaba la posibilidad de competencia del sustrato para la lisozima, dando como resultado una acción directa sobre las esporas utilizando una concentración menor de ella. Por último se encontró también que si se lleva al cabo un tratamiento de lisozima anterior al térmico no se altera la dependencia de la spora por la enzima. Este último punto no está publicado.

Otros investigadores, Cassier y Sebald (1972) encontraron otro tipo de proteína lítica a la que llamaron "proteína iniciadora", presente en el fluido sobrenadante de la cepa ATCC 3624 de *C. perfringens*, que podía iniciar la germinación reemplazando a las enzimas líticas inactivadas.

Al igual que estos científicos, Donald, Labbe y Reich (1972) encontraron la misma proteína iniciadora, demostrando que tenía un efecto similar al de la lisozima, o sea una aparente reversibilidad en el daño producido por el calor. En este experimento el sistema lítico de las esporas era inactivado por un tratamiento térmico o bien por un tratamiento alcalino.

Después de que las esporas fueron sometidas a uno u otro tratamiento, solamente un pequeño porcentaje de ellas permaneció viable, sin embargo después de la adición de 0.01 mg/ml de lisozima,

para el caso de tratamiento térmico se recuperaron del 6-8 % de las esporas que aparentemente estaban muertas, y con la adición de -- 0.01 mg/ml de lisozima para el 2o. tratamiento se recuperaron del 90 al 95 %.

Al igual que la lisozima, el efecto de la proteína iniciadora - depende de la concentración y del tiempo de incubación. Por ejemplo, la máxima recuperación de esporas alteradas por proceso térmico que puede ser obtenido por la adición de la proteína iniciadora - fue del 2 % en comparación con el 8 % para la lisozima.

Aparentemente el tratamiento térmico no solamente inactiva - el sistema normal de germinación, sino que también bloquea otras - funciones celulares necesarias para el crecimiento de las células. - Con el tratamiento alcalino solamente se afecta el sistema normal - de germinación. Esto se puede observar por el número de células recuperadas. (9)

Como una evidencia de que la lisozima actúa directamente sobre el mucopéptido que forma la corteza de la espora, se determinó el efecto de ésta en esporas afectadas térmicamente y tratadas con - azul alciano. Esta sustancia forma un compuesto por saturación - del sustrato. La germinación por la enzima fue severamente inhibida cuando las esporas se pretrataron con el azul, indicando así - la acción directa de la lisozima en el mucopéptido.

El sitio de acción de la proteína iniciadora es también el mucopéptido de la corteza.

Temperaturas y pH óptimos para lisozima y proteína iniciadora

	T opt	pH opt
Lisozima	60°C	10
P. iniciadora	50°C	9

Actualmente se están haciendo investigaciones sobre las alte-

raciones producidas por calor y álcalis en las capas permeables de la espora y del sistema lítico enzimático que funciona durante la germinación (figuras A y B)

Se han elaborado otros estudios sobre esporas analizando la influencia de distintos azúcares en la formación de aquellas.

Se hicieron comparaciones preliminares entre glucosa, lactosa, maltosa, manosa y sacarosa, encontrándose pequeñas variaciones en los patrones de crecimiento y en la habilidad para producir gas cuando los microorganismos se cultivaron en medios basales suplementados con estos compuestos.

La interacción aparente entre los monosacáridos, las incubaciones variables y la reducción de sulfatos sugiere una variación en el potencial redox y esto es de gran importancia, pues constituye una de las mayores defensas contra anaerobios. La multiplicación se llevará al cabo dentro de los tejidos cuando el valor del potencial redox descienda. Sin embargo, en este experimento no se hicieron medidas del potencial. (33)

Los productos que sufren una degradación química o microbiológica durante el almacenamiento contendrán productos hidrolizados como ribosa o glucosa. Dependiendo del grado de fermentación de estos azúcares, variará el valor del potencial redox, y de este cambio se obtendrá una buena o mala germinación de esporas y por tanto un incremento o decremento de células vegetativas. Actualmente se están llevando a cabo algunos estudios sobre este punto.

Basándose en un constituyente de las esporas de C. perfringens, el ácido dipicolínico, Tabor, Mac Gee y Holland (1976) elaboraron otro experimento. Este nuevo método se desarrolló ya que estos científicos sostenían que el tratamiento térmico consumía gran cantidad de tiempo y no permitía llegar a ninguna conclusión en el caso de las especies como C. perfringens, C. ramosum, C. botuli-

num, que esporulan en poca cantidad y algunas de sus cepas son lábiles.

Este método desarrollado para la cuantificación de DPA en esporas es preciso, cuantitativo y de rápida realización.

Otros métodos relacionados con la identificación de DPA fueron desarrollados anteriormente, como ejemplo está el de aislamiento y determinación espectrofotométrica de DPA libre o bien DPA formando algún complejo con metales, sin embargo son laboriosos, consumen tiempo y son poco sensibles en la escala de los nanogramos.

El método que presentan dichos investigadores es una cromatografía 1000 a 5000 veces más sensible que las técnicas desarrolladas anteriormente. Aunque el experimento no se hizo en especial para C. perfringens se trabajó con algunas de sus cepas además de otros Clostridia. (33)

La recuperación de DPA a partir de bacterias fue determinada por la adición de cantidades conocidas ( $100 \text{ ng} - 25 \mu\text{g}$ ) de DPA comercial. Esta cantidad es idéntica a las alícuotas de 0.1 ml de un ejemplo de C. bifermentans que contenía  $88.8 \mu\text{g}$  de DPA/ml de cultivo lavado. Este dato corresponde al pico más alto del estándar interno y su intersección con el eje de las "y" corresponde a la concentración de DPA más elevada en los ejemplos bacterianos.

Se analizaron algunas especies de Clostridia con 20 a  $90 \mu\text{g}$  de DPA por ml de cultivo, que se lavaron al menos 7 veces.

El procedimiento es sensible en una amplia escala de concentraciones de DPA, desde  $100 \text{ ng}$  hasta  $100 \mu\text{g}$ . Este método requiere de solamente 15 minutos y se obtienen los resultados 1.5 h después de haber obtenido el cultivo.

La mayoría de las especies de Clostridia son difíciles de identi

ficar, ya que pierden rápidamente su habilidad para retener el cristal violeta, no es fácil evidenciar sus esporas y no producen ác. butírico como producto final del metabolismo.

Actualmente no existe ningún medio de cultivo óptimo para la estimulación de la producción de esporas de todas las cepas. La determinación de DPA en todas las especies de Clostridium y Bacillus que se analizaron indica que la determinación del ácido se puede hacer tanto en bacterias formadoras de esporas como en no formadoras.

La técnica puede ser usada tanto en alimentos como en pruebas clínicas, ahorrándose así mucho tiempo para la identificación tentativa de las especies, y además la identificación de nanogramos de DPA. Este punto es sumamente importante para la identificación de esporas en alimentos, con lo cual, además, se podría llevar al cabo un estudio taxonómico.

Numerosos estudios se han hecho acerca de los factores que afectan la producción de toxinas y esporas. La elaboración de muchas de las toxinas producidas por este microorganismo o cualquier otro tipo de Clostridia ocurre durante el crecimiento, o sea antes de la esporulación.

Sebald y Cassier (1973) han demostrado que no existe relación directa entre la habilidad de C. perfringens para formar toxinas y su habilidad para esporular; sin embargo, Labbe y Duncan han hecho algunos experimentos y encontrado la correlación directa entre la formación de la toxina responsable de la intoxicación por alimentos producida por C. perfringens y la esporulación. Estos mismos investigadores han encontrado evidencias de que la enterotoxina producida es un componente estructural de la membrana de la espora que se sobreproduce solamente en ciertas cepas. (23)

Los resultados de estos experimentos, al variar el pH y la temperatura, se pueden observar en las gráficas siguientes:

Grafica 1. - El medio usado fué el DS para esporulación, no hubo una vigilancia continua de pH excepto por el regulador de fosfatos inicial. Los niveles de enterotoxinas se determinaron a intervalos de 3 h, habiendo encontrado la mayor actividad específica de enterotoxina a las 6 h. El decremento de esta actividad coincide con el decremento de células esporuladas. Esto ocurrió porque hubo una lisis en el esporangio que trajo como resultado la salida de enterotoxinas. El incremento en la turbiedad es el resultado de un aumento de células vegetativas.

Grafica 2. - En esta parte del experimento si hubo una regulación de pH; manteniéndolo en un valor de 5.5, no se observó esporulación ni formación de enterotoxinas. No se previó el desarrollo de células vegetativas para este valor de pH.

Gráfica 3. - Se hizo una comparación entre un medio regulado a pH 6 y otro medio sin regulación de pH. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Regulación pH 6	pH sin regular
Tiempo en horas de:		
aparición de células esporuladas	3	2
aparición de esporas termoresistentes	5	4

Gráfica 4. - Cuando el pH se mantuvo a un valor de 7, se obtuvieron resultados similares a los encontrados en el medio donde no hubo regulación de pH, o sea, similares a los que aparecen en la gráfica número 1.

Actualmente se están llevando al cabo algunas investigaciones sobre el incremento de turbiedad que tuvo lugar en ambos medios a las 12 h.

También se hicieron experimentos sobre toxinas y esporas en

medios donde el pH era mayor de 8, pero no se mencionan aquí, — ya que estos valores no pueden existir en alimentos que puedan ser ingeridos.

Gráfica 5. - En esta gráfica se observa el efecto de la temperatura -- sobre la producción de enterotoxinas y esporas.

Se encontró que la temperatura óptima para la formación de enterotoxinas es 37°C. pudiendo ser evidenciada desde los 25°C. - Existe un decremento de éstas entre los 43-47°C. Los mismos ejemplos obtenidos con las mismas temperaturas pueden observarse para el caso de esporas termorresistentes.

Las temperaturas óptimas para la producción de toxinas y de esporas de C. perfringens están por debajo de las temperaturas de crecimiento.

Los resultados encontrados demuestran que en alimentos con un pH un poco ácido y con elevado contenido de proteínas, como -- puede ser una carne, (pH 5.5) se podría producir un incremento de células vegetativas, mientras que a un pH 6, en este mismo ali- - mento, habrá formación de enterotoxinas y producción de esporas.

Los valores de pH donde se producen estos fenómenos son su- mamente peligrosos para la salud, ya que la ingestión de un gran - número de esporas traerá como consecuencia la formación de toxi- - nas en el intestino y por lo tanto la enfermedad llamada enteritis, - o bien otro tipo de enfermedades más peligrosas debidas a la produc- ción de otras toxinas del mismo microorganismo.

Duncan, junto con sus colaboradores (1977), ha llevado a ca- bo algunos experimentos para la identificación rápida de la enteroto- xina, las 2 últimas han sido purificadas por electroforesis en gel - de policrilamida y el más reciente, específico, rápido y sensible es-

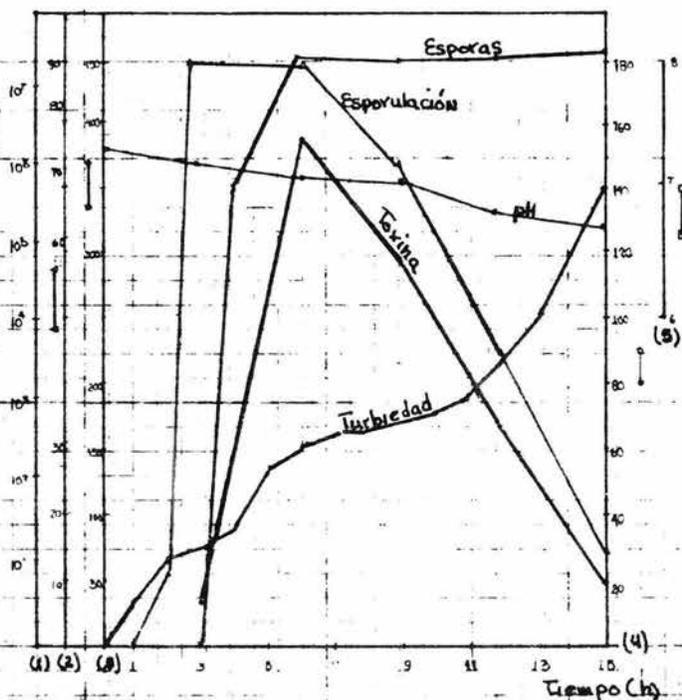
el de la cuantificación e identificación de la proteína por inmuno-  
electroforesis ; apareciendo precipitaciones perfectamente claras en  
las áreas de reacción entre la enterotoxina y el anticuerpo después  
de 30 min. Se observaron reacciones específicas cuando se utiliza-  
ron extractos de pollo en salsa, pavo en salsa, res, pavo, pollo y  
cerdo.

Usando este método la identificación de la enterotoxina tipo A  
fué de  $0.2\mu\text{g/ml.}$ , ésto representa una sensibilidad mayor que en --  
cualquiera de las otras técnicas mencionadas. (11)



Cambios de algunas propiedades de *C. perfringens* NCTC 8798, en un medio DS, con un pH sin regular.

Figura 1.

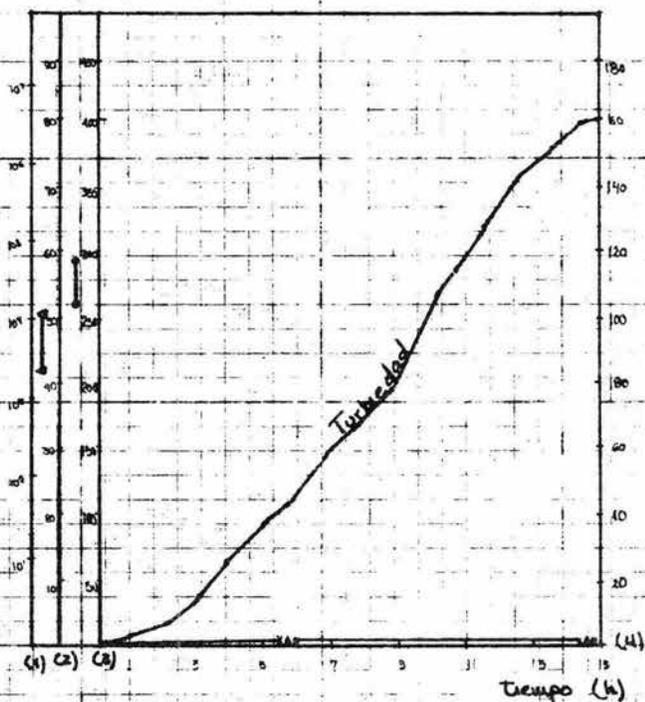


- (1) esporas termorresistentes
- (2) % esporulación
- (3) toxina/mg. proteína
- (4) unidades Klett.
- (5) pH.

Labbe y Duncan (1974)

Cambios de algunas propiedades de *C. perfringens* NCTC 8798, en un medio DS con un pH 5.5

Figura 2.

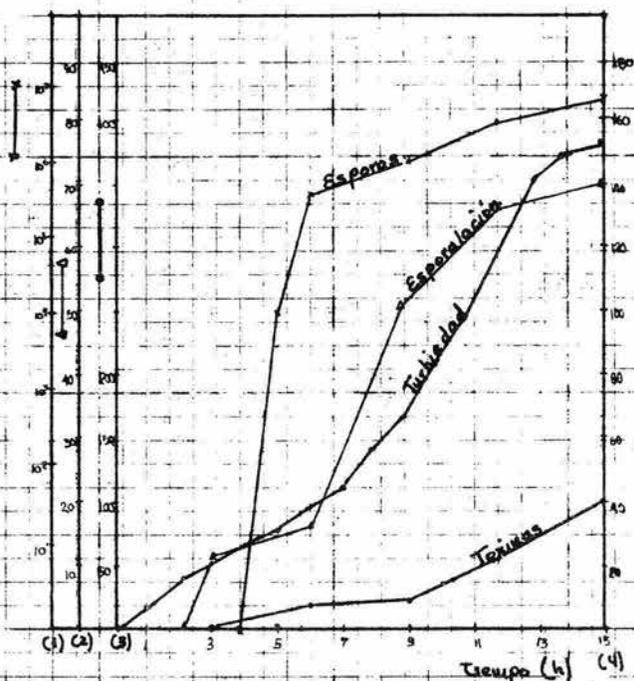


- (1) esporas termorresistentes
- (2) % esporulación
- (3) mg toxina/mg. proteína
- (4) unidades Klett

Labbe y Duncan (1974)

Cambios de algunas propiedades de *C. perfringens* NCTC 8798 en un medio DS, con un pH 6.0

Figura 3.

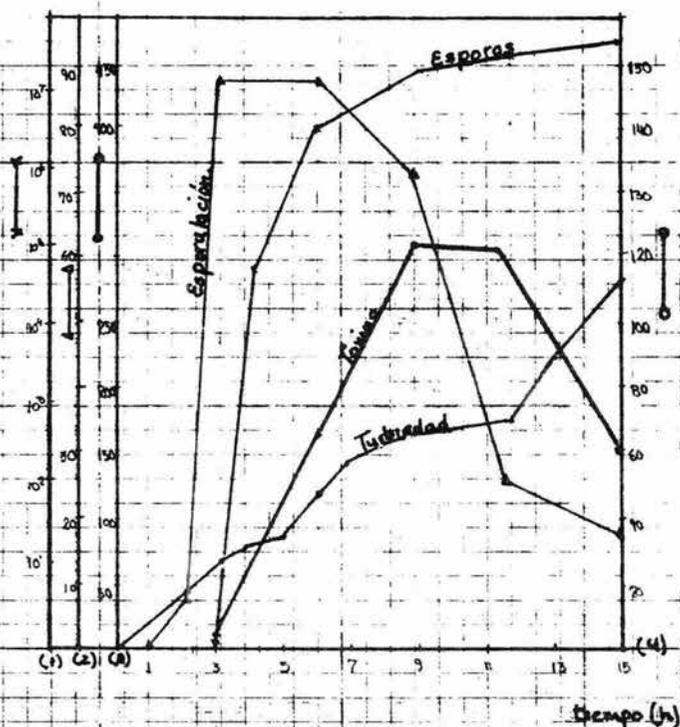


- (1) esporas termorresistentes
- (2) esporulación
- (3) toxina/mg. proteína
- (4) unidades Klett

Labbe y Duncan, (1974)

Cambios de algunas propiedades de *C. perfringens* NCTC 8798, en un medio DS, con un pH 7.

Figura 4

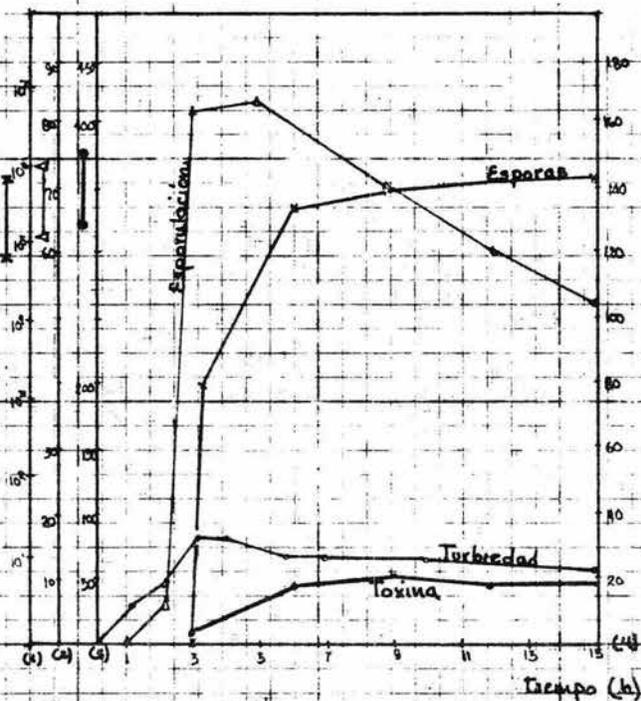


- 1) esporas termorresistentes
- 2) % esporulación
- 3)  $\mu\text{g}$  toxina/mg. proteínas
- 4) unidades Klett

Duncan y Labbe (1974)

Cambios de algunas propiedades de *B. pterifera* NCTC 8798 en un medio DS con un pH 8.

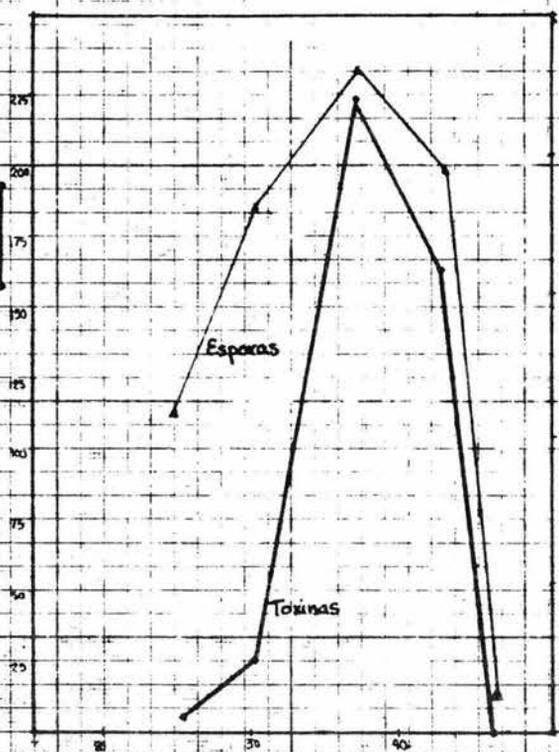
Figura 5



- (1) esporas termorresistentes.
- (2) esporulación
- (3) toxina/mg. proteína
- (4) unidades Klett

Duncan y Labbe. (1974)

Máximos niveles de formación de enterotoxina y esporas termorresistentes formadas por *C. perfringens* NCTC 8798 en un medio DS, a varios valores de temperatura.



Duncan y Labbe, (1974)

## VI INHIBICION DE C. perfringens

La acción inhibitoria contra los Clostridia, que resulta del calentamiento de un medio microbiológico con nitritos, fué reportado por primera vez por Perigo. Varios investigadores demostraron que después del proceso de calentamiento se requería de una cantidad - 20 veces menor de nitritos, también que una reducción de pH incrementaba la capacidad inhibitoria de los nitritos sin necesidad de que se llevara a cabo ningún proceso térmico, y esto sucedía cuando los nitritos eran esterilizados junto con el medio. Dos investigadores, - Riha y Solberg (1975) concluyeron que el efecto Perigo no se debía únicamente a la adición de los nitritos, sino que a partir de éstos - se formaba un complejo responsable de dichos efectos. (30)

Turker y Solberg (1975) diseñaron un experimento para evaluar todas las combinaciones del medio de tioglicolato con nitritos, - cisteína y iones ferroso y férrico. Este medio es similar al usado - originalmente por Perigo. Los resultados se encuentran en las tablas 1 y 2.

El crecimiento de las células vegetativas de C. perfringens no fué inhibido en el medio de tioglicolato por ninguna combinación de aquellos compuestos, ni con los tratamientos que aparecen en las - mismas tablas. Fué independiente del tamaño del inóculo y se llevó a cabo en un pH  $6.7 \pm 0.1$

En la tabla 2 puede observarse que siempre que se combinaron  $\text{NaNO}_2$  y el medio de tioglicolato antes de la esterilización, existió inhibición, tanto para células vegetativas como para esporas a - todos los niveles de pH investigados.

Van Rooi (1975) sugirió que la sal negra Rousino era el agente responsable de la inhibición en el efecto Perigo. Esta sal so-

lamente se forma en presencia de iones ferrosos, sin embargo, en el experimento número 10 de la tabla 2 puede observarse la inhibición en presencia de iones férrico. Aunque a algunos valores de pH, el ión ferroso se oxidara a férrico por la presencia de HONO -- que se formaría a partir de  $\text{NaNO}_2$ , esta razón no explicaría los resultados a otros valores de pH llevados al cabo en el experimento. -- Es, por tanto, factible que los iones férrico también formen un inhibidor, como puede verse en los experimentos 9 y 10 de la misma tabla.

La acción del inhibidor, que se supone se forma a partir de los compuestos mencionados anteriormente, aun no se ha probado, pues no se conoce su estereoisomería.

Al igual que los investigadores anteriores, Steven y Tannenbaum (1975) hicieron un experimento donde se trató de encontrar -- al inhibidor de C. perfringens. Se prepararon soluciones en donde los nitritos se encontraban en concentraciones de 50-200 g/ml.

Cuando al medio de tioglicolato se le añadieron 200 g, de --  $\text{NO}_2$  se inhibía el crecimiento de C. perfringens aun sin proceso -- térmico. Con 50 g solamente ocurría la inhibición cuando el medio era esterilizado junto con el nitrito.

Para determinar qué constituyentes del medio estaban envueltos en este fenómeno se hicieron distintos grupos de compuestos -- que se esterilizaban y después eran añadidos al medio. La identificación de los compuestos se puede observar en la Tabla 3. Para -- identificar las sales y a. a. específicos, se hicieron soluciones que -- contenían 19 a. a. y 5 sales minerales, o bien 18 a. a. y 6 sales minerales; las soluciones se esterilizaban junto con  $\text{NaNO}_2$ , después -- se mezclaban con el medio y se inoculaban para probar su capacidad de inhibición (tabla 4 y 5). De los datos obtenidos puede pensar se que la inhibición es causada por la formación de un compuesto -- tóxico y no por la degradación de algún nutriente. (26)

Para determinar si el inhibidor era activo en carne, se preparó el primero a partir de los compuestos de que se cree esta formado y se añadió a un medio normal de crecimiento suplementado con medio de carne. El inhibidor fue inactivo en todos los casos (tabla 6), lo cual nos indica que el compuesto no actúa de igual forma en productos de carne curada, Van Rooi (1975) sugiere que la actividad del inhibidor no se manifiesta debido a que existe un tipo de adsorción en la proteína de la carne.

Se han llevado a cabo también algunos experimentos para evaluar la inhibición por nitritos en función del pH, cantidad de inóculo y calor. La conclusión final fue la misma que la de los científicos anteriormente mencionados, o sea, que se formaba un compuesto inhibidor.

De los resultados en la tabla 7 puede concluirse que la inhibición por nitritos es mucho más efectiva a valores bajos de pH.

Esto podría deberse a la presencia de  $\text{HNO}_2$  en el medio, ya que parece ser que es un factor importante para la inhibición de C. perfringens en los medios que no están esterilizados.

El efecto del inóculo sobre la inhibición por nitritos puede observarse en la tabla 8, a la concentración de  $10^6$  cel/ml las cepas 58325 y 580 toleraron el nitrito a un nivel equivalente al inóculo de  $10^2$  cel/ml. Esto demuestra que el nivel de concentración de esporas es un factor importante en la descomposición de carnes curadas, y también es una consideración importante cuando la inhibición de células vegetativas se quiere hacer por dicha sal. (3)

La diferencia en los niveles de inoculación quizá pueda explicar muchas de las discrepancias que aparecen en la literatura, con respecto a la tolerancia de nitritos por microorganismos, bajo condiciones similares.

Puede suponerse que calentando un medio de crecimiento microbiano que contenga nitritos se produce un potente inhibidor. Esto podrá ser de gran importancia en carnes curadas y enlatadas que reciban un tratamiento térmico corto para poder conservar sus características organolépticas. El tratamiento podría ser suficiente para reducir la tolerancia de nitritos por Clostridia a un nivel menor que la cantidad legalmente permitida, 200 ppm.

Otro inhibidor de C. perfringens, C. botulinum, Salmonella, etc. es el ác. ascórbico y sus sales. Estos compuestos se usan en alimentos comercialmente preparados para prevenir la descomposición. El ácido ha sido añadido a medios de cultivo para un aislamiento selectivo de lactobacilos y Clostridia catalasa negativos.

Para probar la potencia de la sal como inhibidor, se hizo un experimento con salchichas que aún no estaban curadas, y el resultado (tabla 9) fué que el nivel de C. perfringens declinó por debajo de niveles observables en todos los ejemplos, independientemente de la presencia o ausencia de sorbato de potasio. No se hizo el experimento en ningún otro tipo de carne, por lo que sería interesante poder observar si se tienen los mismos efectos en diferentes alimentos cárnicos.

Hobbs, en algunos datos no publicados, obtenidos en su laboratorio, indica que las células vegetativas de C. perfringens logran sobrevivir 6 días en carne cruda inmersa en 22 % de NaCl y que las esporas pueden germinar en 5% de esta misma sal. No existen más detalles sobre el trabajo. Sin embargo, se llevó al cabo una investigación para obtener un poco más de datos definitivos del efecto de las sales en el crecimiento y la resistencia térmica de este microorganismo.

Se prepararon 4 soluciones que contenían las siguientes concentraciones: 7.5 % (peso/vol) NaCl, 3700 ppm NaNO<sub>3</sub> y 370 ppm NaNO<sub>2</sub> hasta 17% NaCl, 23,000 ppm NaNO<sub>2</sub>. Se inocularon las solu-

ciones con medio mililitro de un cultivo de esporas de 5 cepas de C. perfringens y todo se mantuvo a 3°C. La temperatura es similar a la que se usa en los almacenes de carne cruda.

Cuatro de las cinco cepas sobrevivieron como mínimo 48 h - en todas las soluciones preparadas. En cuanto a las esporas el 50% de ellas permaneció viable por lo menos 35 días en una solución -- que contenía 21.5 % NaCl , 1800 ppm NaNO<sub>3</sub> y 1200 ppm NaNO<sub>2</sub>.

Otra de las pruebas se llevó al cabo para determinar el efecto de las sales y la resistencia al calor. Los cultivos sobrevivieron 30 minutos como mínimo, a 100°C. en presencia de 6% NaCl, 30,000 ppm de NaNO<sub>2</sub> a 2,000 ppm NaNO<sub>3</sub> y también a 80°C. por lo menos 6 h en una combinación de 10% NaCl, 3,000 ppm NaNO<sub>3</sub> y 1,000 -- ppm NaNO<sub>2</sub>.

A las carnes frescas se les añadió una solución de sales cuya concentración final fue de 3 % NaCl, 500 ppm NaNO<sub>3</sub> y 200 ppm NaNO<sub>2</sub>. Estas son las cantidades máximas permisibles que se pueden encontrar en carnes curadas. Los resultados del experimento -- pueden verse en la tabla 10 y son similares para las otras 4 cepas.

A los jamones enteros se les dieron dos tipos de tratamiento: por salmueras y ahumado, variándose la concentración de sales y -- tiempo de ahumado. Para todos los casos, C. perfringens sobrevivió a ambos procesos. Tanto el exudado del jamón como las salmueras donde se llevó al cabo el curado, contenían una cuenta mayor -- que la carne, pudiendo deberse ésto a que fue sometida a 2 procesos de curado.

Ya que las esporas maduras son las que comunmente se encuentran formando parte de la contaminación del ambiente, podría -- suponerse que son las que deben ser usadas en los estudios relacionados con la supervivencia de C. perfringens en alimentos.

Aunque existen diferencias definidas en la tolerancia térmica de las distintas cepas de C. perfringens, hubo solamente pequeñas diferencias en el efecto de las sales usadas sobre las cepas en los niveles encontrados en las carnes comerciales donde no solamente sobreviven, sino que también se desarrollan. Esta habilidad para reproducirse en las carnes y derivados que ingerimos diariamente, sólo nos indica la necesidad de precauciones sanitarias, no solamente en su almacenamiento, sino durante todo el proceso que sigue la carne antes de llegar a la mesa.

TABLA 1

Componentes que no producen un efecto inhibitorio en <i>C. perfringens</i> <sup>a</sup> .	
TRATAMIENTO	COMPONENTE
Calentamiento separado.	Cys, FeSO <sub>4</sub> , FeCl <sub>3</sub> , NaNO <sub>2</sub>
Calentamiento separado seguido de mezclas de soluciones.	NaNO <sub>2</sub> + FeSO <sub>4</sub> NaNO <sub>2</sub> + FeSO <sub>4</sub> + Cys
Mezcla de soluciones seguida de calentamiento.	Cys + FeSO <sub>4</sub> Cys + FeCl <sub>3</sub> Cys + NaNO <sub>2</sub> FeSO <sub>4</sub> + NaNO <sub>2</sub> FeCl <sub>3</sub> + NaNO <sub>2</sub>
Añadido al medio de tioglicolato seguido de calentamiento.	Cys, FeSO <sub>4</sub> , FeCl <sub>3</sub> + Cys + FeSO <sub>4</sub> , Cys + FeCl <sub>3</sub> .

a: Los componentes fueron esterilizados solos o en las combinaciones adecuadas y después añadidos al medio de tioglicolato esterilizado, o añadidos antes de que éste fuera sometido al proceso térmico.

Asan y Solberg (1976)

TABLA 2

Tasa de crecimiento en el número total de ensayos para células vegetativas y esporas de *C. perfringens* ATCC 3624.

Exp.	Medio	Células vegetativas			Esporas	
		pH <sup>b</sup> 6.7	6.3	6.3	6.7	6.3
1	(FTM) <sup>c</sup>	56/56	53/32	20/20	20/20	20/20
2	(FTM + NaNO <sub>2</sub> ) <sup>c</sup>	2/24	1/12	1/14	1/20	0/20
3	(FTM + (NaNO <sub>2</sub> ) <sup>c</sup>	4/4	ND <sup>d</sup>	8/8	6/6	6/6
4	(FTM + NaNO <sub>2</sub> + Cys) <sup>c</sup>	0/8	ND	ND	ND	ND
5	(FTM + NaNO <sub>2</sub> + FeSO <sub>4</sub> ) <sup>c</sup>	0/4	ND	0/4	ND	ND
6	(FTM + NaNO <sub>2</sub> + FeCl <sub>3</sub> ) <sup>c</sup>	0/8	ND	0/4	ND	ND
7	(FTM + NaNO <sub>2</sub> + Cys + FeSO <sub>4</sub> ) <sup>c</sup>	0/24	0/18	0/12	0/18	0/20
8	(FTM + NaNO <sub>2</sub> + Cys + FeCl <sub>3</sub> ) <sup>c</sup>	0/16	0/12	0/8	0/6	0/6
9	(FTM)+(NaNO <sub>2</sub> +Cys+FeSO <sub>4</sub> ) <sup>c</sup>	24/24	0/12	0/8	17/20	0/20
10	(FTM) <sup>c</sup> +(NaNO <sub>2</sub> +Cys+FeCl <sub>3</sub> ) <sup>c</sup>	16/16	0/10	0/6	6/6	0/6

b-pH de inoculación

ND<sup>d</sup> - No se hizo.

c - Componentes calentados a 121°C por 15 min.

Asan y Solberg (1976)

TABLA 3

Identificación de los componentes necesarios para la formación del inhibidor.			
Exp.	Comp. <sup>a</sup> esterilizados con NaNO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	Comp. <sup>a</sup> esterilizados por filtración.	Crecimien to.
1	a.a, min, pp, vit, asc (medio de crecimiento completo).		-
2	a.a, min, vit, asc	p.p	-
3	" " pp "	vit	-
4	" " " vit	asc	-
5	" vit " "	min	+
6	asc " " "	a.a	+
7	" min a.a	vit, pp	-
8	vit " "	asc "	-
9	p.p " "	" vit	-
10	" vit "	asc min	+
11	" "	" " vit	+
12	" "	" " " pp	+
13	min	" " " a.a	+
14	a.a min	" " "	-
15		" " " " " (medio de crecimiento completo)	+

<sup>a</sup>: a.a - amino ácidos  
 min - minerales  
 pp - bases  
 vit - vitaminas  
 asc - ac ascórbico  
<sup>b</sup> 50 mg/ml

TABLA 4

Inhibición de <i>C. perfringens</i> en presencia de cisteína, FeSO <sub>4</sub> y NaNO <sub>2</sub> esterilizados.			
Exp.	Comp. esterilizados con NaNO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	Comp. esterilizados por filtración	Crecimiento
16	Todos los a.a excepto Cys Todos los min excepto FeSO <sub>4</sub> pp, vit, asc.	Cys, FeSO <sub>4</sub>	+
17	Cys, FeSO <sub>4</sub>	a.a remanentes, min, pp, vit, asc.	-
18	Cys, FeSO <sub>4</sub>	Todos los a.a, pp, - vit, asc (medio de -- crecimiento completo)	-

b 50 mg/ml

Moran, Tannenbaum y Archer (1975)

TABLA 5

Inhibición de <i>C. perfringens</i> en presencia de bajos niveles de nitritos calentados con Cys y FeSO <sub>4</sub> .			
Exp.	Comp. esterilizados con NaNO <sub>2</sub>	Comp. esterilizados por filtración	Crecimiento a - varios niveles de NaNO <sub>2</sub> <sup>b</sup> .
			0    10    30
19	Cys, FeSO <sub>4</sub>	a.a, min, pp, vit, asc (medio completo).	+    -    -
20		a.a, min, pp, vit, asc (medio completo).	+    +    +

b Estas concentraciones de nitritos fueron durante la esterilización, las concentraciones finales en el experimento 19 fueron la mitad de estos valores.

Moran, Tannenbaum y Archer (1975)

TABLA 6

Crecimiento de *C. perfringens* en un medio de carne tratado por un método que forma un inhibidor en un medio sintético.

Exp.	Comp. esterilizados	Comp. esterilizados por filtración.	Crecimiento
21	Medio de carne	Cys, FeSO <sub>4</sub> , 50mg/ml de NaNO <sub>2</sub>	+
22	Medio de carne, Cys, FeSO <sub>4</sub> , 50mg/ml de - NaNO <sub>2</sub>		+
23	Medio de carne, 50mg/ml de Na NO <sub>2</sub>		+

La mezcla de Cys, FeSO<sub>4</sub> y No<sub>2</sub><sup>-</sup> fue primero calentada para formar el inhibidor de - Perigo, y después se añadió al medio de carne esterilizado.

Moran, Tannenbaum y Archer (1975)

TABLA 7

La concentración más alta de  $\text{NaNO}_2$  que permite crecimiento y la más baja que lo previene. Experimento para siete cepas de *C. perfringens* después de una inhibición a 43°C por 72 h.

NaNO <sub>2</sub> (ppm)								
Esterilización por filtración					Autoclave			
pH 7.2		6.3			7.2		6.3	
Cepa	Crec.	No Crec.	Crec.	No Crec.	Crec.	No Crec.	Crec.	No Crec.
8797	600	800	160	180	25	50	10	20
1362	1000	1500	200	250	25	50	8	10
BP6K	1000	1500	90	100	10	25		
8235	1000	1500	200	250	50	75	10	20
8237	1000	1500	200	250	50	75	8	10
S-80	1000	1500	250	400	50	75	10	20
S-88	600	800	60	80	25	50	0	2

Riha y Solberg (1975)

TABLA 8

Distintas concentraciones de  $\text{NaNO}_2$  que permiten e inhiben el crecimiento de 6 cepas de C. perfringens. pH = 6.3

Inóculo		$\text{NaNO}_2$ (ppm)			
		Filtrado Esterilizado		Filtrado en autoclave	
Cepa	Org. viable/ml	Cre. <sup>a</sup>	No Crec. <sup>a</sup>	Crec.	No Crec.
8797	$40^2$	160	180	10	20
	$10^6$	800	1000	100	150
1362	$10^2$	200	250	8	10
	$10^6$	1000	1500	75	100
8235	$10^2$	200	250	10	20
	$10^6$	1000	1500	300	300
8237	$10^2$	200	250	8	16
	$10^6$	1000	1500	300	300
S-80	$10^2$	250	400	10	20
	$10^6$	1000	1500	300	300
S-88	$10^2$	60	80	0	2
	$10^6$	600	800	25	50

a) El crecimiento fue evaluado visualmente después de 3 días de incubación a - 43°C.

TABLA 9

Efecto del sorbato de potasio en el crecimiento microbiano en salchichas de puerco - (27°C).

Tiempo	Sin inocular		<u>Salmonella</u>		<u>C. perfringens</u>		<u>C. botulinum</u>	
	Con Sorb.	Sin Sorb.	Con Sorb.	Sin Sorb.	Con Sorb.	Sin Sorb.	Con Sorb.	Sin Sorb.
0	$3.2 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$	$3.8 \times 10^1$	$3.2 \times 10^1$	$3.2 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	$7.2 \times 10^3$	$7.2 \times 10^3$
1	$1.2 \times 10^7$	$3.2 \times 10^4$	$3.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	30	30	$1.5 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$
2	$6.9 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7$	$6.3 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	30	30	$2.4 \times 10^4$	$5.3 \times 10^3$
4					300	300		
5	$7.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$1.1 \times 10^7$	$3.0 \times 10^4$				
7					3000	3000	$3.5 \times 10^7$	$3.5 \times 10^6$
10							$5.6 \times 10^6$	$9.1 \times 10^7$
17							$1.3 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$

Christiansen, Shaparis y Bolin (1974)

Tabla 10

Supervivencia de esporas de <i>C. perfringens</i> en procedimientos de curados simulados.			
Inóculo	Substrato	Cuenta de esporas <sup>a</sup>	% supervivencia
Medio	Carne + salmuera	4500	0.1
	Salmuera	2280	30.0
Disco	Carne + salmuera	70	39.0
	Salmuera	850	64.0
Medio A	Carne + salmuera	4500	0.1
	Salmuera	1800	4.0
Disco A	Carne + salmuera	850	0.4
	Salmuera	850	3.0

Las concentraciones finales en jamón y salmuera fueron:  
3% NaCl, 0.05% NaNO<sub>3</sub>, y 0.02% NaNO<sub>2</sub>.

a: Número de esporas añadidos por gramo de carne o ml de salmuera.

Gough y Alford (1965)

## VII. - CONCLUSION.

Las estadísticas del año 1974, indican que el índice de mortalidad por enfermedades intestinales es elevado, perteneciendo el número mayor de defunciones a la población menor de 1 año y después a la de 1 a 4 años. Esto se debe en su mayor parte, sin duda alguna, a la higiene inadecuada con que se manejan los alimentos antes de ser procesados.

Para el caso específico de la carne, la falta de higiene empieza desde los rastros. En general puede decirse que los locales donde se lleva a cabo la matanza son insalubres. Durante el tiempo que dura el sacrificio, los locales permanecen con sangre, heces fecales y pelos, manteniéndose así durante varias horas; tiempo en el cual C. perfringens prolifera de tal manera que alcanza a provocar una intoxicación.

A simple vista podría suponerse que los animales sacrificados no tocan el suelo, ya que permanecen colgados invariablemente durante todo el proceso, pero puede observarse que con el gran movimiento que se desarrolla dentro del local se levantan pelos y polvos que en la mayoría de las veces provienen de las heces fecales y la sangre, y que son focos de contaminación. Por otro lado, las personas que manejan este alimento no cuentan, en la mayoría de los casos, ni siquiera con ropa adecuada para el tipo de trabajo y permanecen con una evidente falta de higiene, siendo excelentes transportadores de microorganismos de un animal a otro.

Después de que los animales son desviscerados, es importante separar las vísceras de la canal para su procesamiento, evitando así una posible contaminación. En México algunos rastros cuentan ya con un local separado para desviscerar, sin embargo, el problema de higiene que se presenta es similar, ya que

las condiciones poco sanitarias de los suelos y las personas que la boran son las mismas. A pesar de que existe agua corriente todo el tiempo del proceso, no es ello una solución suficiente para mantener limpios los locales.

Una vez terminada la matanza los rastros son lavados con agua sin que se lleve a cabo una desinfección, de tal manera que las fuentes de contaminación permanecen latentes hasta un nuevo proceso.

Las canales de los animales salen colgadas hacia los andenes donde las esperan los vehículos que las transportarán a los obradores y expendios de carne. En general la higiene de los vehículos deja mucho que desear, a simple vista puede observarse que no son lavados continuamente, las temperaturas desarrolladas dentro del lapso de transporte crean un campo propicio al crecimiento de microorganismos patógenos, pues no cuentan con los sistemas de refrigeración requeridos. Y así continúa el traslado del alimento en condiciones desfavorables hasta llegar a manos del consumidor.

Generalizando pueden dividirse a los expendios de carne de la Ciudad de México en 2 grupos:

- 1) Los que cuentan con la higiene adecuada en los locales, refrigeradores, almacenes del alimento y personal.
- 2) Los que no cuentan con una higiene adecuada, que son la mayoría; aquí existen insectos como moscas, cucarachas e inclusive pudieron observarse roedores. No cuentan con sistemas de refrigeración apropiados y los lugares donde permanece la carne antes de su venta son verdaderamente insalubres.

En lo que toca a la obtención de alimentos a partir de carne, grandes cantidades son cocinadas de muy diversas formas en restaurantes, fábricas y escuelas, donde el tiempo entre cocción e inges-

ción es algunas veces de varias horas, siendo el período ideal para el desarrollo de C. perfringens y de otros patógenos.

Sin tomar en cuenta la buena o mala higiene de las personas que preparan los alimentos en las cocinas y del local en sí, el grado de contaminación que ha alcanzado la carne hasta este momento, aunado al tiempo mencionado que transcurre entre cocción e ingestión, son suficientes para que se ingiera un gran número de células que causaran enteritis por C. perfringens, y en algunos casos culminará en la muerte.

Uno de los hechos que más nos llamó la atención y que no debiera escapar a los encargados de supervisar este tipo de lugares, es que no efectúan análisis de anaerobios. Se atribuye ésto al exceso de población, ya que la premura para despachar la carne impide hacer los mencionados análisis que consumirían varias horas.

Considerando además que el producto se consume de cualquier manera, ya que es de primera necesidad, se han incluido dentro de este trabajo algunos tipos de análisis que permitirían identificar en el menor tiempo posible a C. perfringens.

Otro capítulo ha sido dedicado a establecer medidas higiénicas y por lo tanto de superación personal de las personas que laboran en estos establecimientos, creando en ellos conciencia del mal que producen en los consumidores y en si mismos al ignorar estas medidas.

Es así, de suma importancia, crear métodos higiénicos que permitan proteger la salud del consumidor, aún cuando representen pérdidas de tiempo y ganancias en los que se dedican al comercio de alimentos. La presencia de una persona capacitada para el trabajo podría reducir al mínimo gastos superfluos, desperdicios, logrando el control higiénico general y beneficio para el pueblo, al hacer llegar el producto en condiciones óptimas al consumidor.

VIII.- Bibliografia.

- 1) Adams, D.M. 1973. "Inactivation of Clostridium perfringens Type A -- Spores at Ultrahigh Temperatures". Appl. Microbiol. 26 (3): 282-287 .
- 2) Angelotti, R., Hall, H. et al. 1961. "Quantitation of Clostridium perfringens in Foods". Appl. Microbiol. 10 : 193-199 .
- 3) Asan, T. y Solberg, M. 1975. "Inhibition of Clostridium perfringens - by Heated Combinations of Nitrite, Sulfur and Ferrous or Ferric Ions". Appl. Microbiol. 31: 49-54 .
- 4) Barach, J.T., Adam, D.M. et al. 1972. "Repair of Heat-Injured Clostridium perfringens Spores During Outgrowth". Appl. Microbiol. 30 (5): 873-875 .
- 5) Center of Disease Control. Brachman, P.S., Taylor, E.J. et al. 1972. "Food Poisoning in the U.S.A.", the Microbiological Safety of Food. - pp. 143-151. Academic Press. London and New York.
- 6) Hygien-Mikrobiol. Institut. Brodhage, H. y Anderhub, B. 1973. "Hygiene in Catering". The Microbiological Safety of Food. pp. 47-53. Academic Press. London and New York .
- 7) Clifford, W., Anellis, A. et al. 1974. Evaluation of Media, Time and - Temperature of Incubation and Method of Enumeration of Several Strains of Clostridium perfringens Spores". Appl. Microbiol. 27: 784-792 .
- 8) Duncan, Ch. y Strong, H. 1969. "Ileal Loop Fluid Accumulation and - Production of Diarrhea in Rabbits by Cell-free Products of Clostridium perfringens". J. Bacteriol. 100 (1): 86-94.
- 9) Duncan, Ch., Labbe, R. et al. 1972. "Germination of Heat and Alkali-Altered Spores of Clostridium perfringens Type A by Lysozyme and an - Initiation Protein". J. Bacteriol. 109 (2): 550-559 .

- 10) O'Leary, V. y Solberg, M. 1976. "Effect of Sodium Nitrite Inhibition in Intracellular Thiol Groups and on the Activity of Certain Glycolytic Enzymes in Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 31: 208-212.
- 11) Enders, G. y Duncan, Ch. 1977. "Preparative Polyacrilamide Gel -- Electro-phoresis Purification of Clostridium perfringens Enterotoxin". Infect. Immun. 17 (2): 425-429.
- 12) Emswiler, B., Pierson, C. et al 1973. "Comparative Study of Two Methods for the Detection of Clostridium perfringens in Ground Beef". -- Appl. Microbiol. 33 (3): 735-737.
- 13) Agricultural Research Service. Gough, B. y Alford, J. 1973. "Effect of Curing Agents on the Growth and Survival of Food Poisoning -- Strains of Clostridium perfringens". The Microbiological Safety of -- Food, pp. 92-99. Academic Press. London and New York.
- 14) Hauschild, A. Gilbert, R. et al 1977. "ICMSF Methods studies VIII. -- Comparative Study for the Enumeration of Clostridium perfringens in Foods". Can. J. Microbiol. 23: 884-892.
- 15) Hall, W., Witzeman, J.S. y Jones, R. 1969. "The Detection and Enumeration of Clostridium perfringens in Foods". J. Food Sci. 34: 212-214.
- 16) Hall, W. Angelotti, R. et al 1962. "Characteristics of Clostridium perfringens strains associated with Food and Food-Borne Disease". J. Bacteriol. 85: 1094-1103.
- 17) Hapchuk, L., Pearson, A. y Price, J. 1976. "Action of Clostridium perfringens Organisms on Porcine Muscle". J. Food Sci. 41: 1042-1046.
- 18) Hauschild, A. y Hilsheimer. 1974. "Enumeration of Food Borne Clostridium perfringens in Egg Yolk-Free Tryptose-Sulfite-Cyclocerine Agar". Appl. Microbiol. 27 (3): 521-526.

- 19) Veterinar-Bakteriologisches Institut. Hess, E. 1973. "Hygiene During Meat Production". The Microbiological Safety of Food. pp. 3-8. Academic Press. London and New York.
- 20) Food Hygiene Laboratory. Hobbs, B.C. 1973. "Food poisoning in England and Wales". The Microbiological Safety of Food". pp. 129-142. Academic Press. London and New York.
- 21) Kokoszka, P.J. y Stevenson, K. E. 1976. "Effect of Cottonseed and - Soy Products on the Growth of Clostridium perfringens". J. Food Sci. 41: 1361-1363.
- 22) Labbe, R. y Duncan, Ch. 1977. "Spore Coat Protein and Enterotoxin - Synthesis in Clostridium perfringens". J. Bacteriol. 131 (2): 713-715.
- 23) Labbe, R. y Duncan, Ch. 1974. "Sporulation and Enterotoxin Production of Clostridium perfringens Type A. under Conditions of Controlled pH and Temperature". Can. J. Microbiol. 20: 1493-1501.
- 24) Lillard, H. 1971. "Ocurrence of Clostridium perfringens in Broiler Processing and Further Processing Operations". J. Food Sci. 36: 1008-1010.
- 25) Mead, G. 1968. "Growth and Sporulation of Clostridium welchii in - - Breast and Leg Muscle of Poultry". Appl. Bacteriol. 32: 86-95.
- 26) Moran, D. , Tannenbaun, S. et al. 1975. "Inhibitor of Clostridium perfringens Formed by Heating Sodium Nitrite in a Chemically Defined Medium". Appl. Microbiol. 20 (5): 838-843.
- 27) Naik, H. y Duncan, Ch. 1977. "Rapid Detection and Quantitation of - Clostridium perfringens Enterotoxin by Counterimmunoelectrophoresis". Appl. Microbiol. 34 (2): 125 - 128.

- 28) Hauschild, A., Niilo, L. y Doward, J. 1971. "The Role of Enterotoxin in Clostridium perfringens type A enteritis". Can. J. Microbiol. 17: 987-991.
- 29) Department of Epidemiology and Preventive Medicine. Riemann, H. 1973. "Means and Methods". The Microbiological Society of Food. - pp 121-126. Academic Press. London and New York.
- 30) Riha, W. y Solberg, M. 1975. "Clostridium perfringens Inhibition by Sodium Nitrite as a Function of pH Inoculum Size and Heat. J. Food Sci. 40: 439-442.
- 31) Riha, W. y Solberg, M. 1971. "Chemically Defined Medium for the - Growth of Clostridium perfringens". Appl. Microbiol. 22 (4): 738-739.
- 32) Shaidi, S. y Ferguson, A. 1971. "New Quantitative, Qualitative and Confirmatory Media for Rapid Analysis of Food for Clostridium perfringens". Appl. Microbiol. 21 (3): 500-506.
- 33) Tabor, M., Mac Gee, J. et al. 1976. "Rapid Determination of Dipicolinic Acid in the Spores of Clostridium sp. by Gas-Liquid Chromatography". Appl. Microbiol. 31: 25-28.
- 34) Tompkin, R., Christiansen, A. et al. 1976. "Effect of Potassium Sorbate on Salmonellae, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Clostridium botulinum in Cooked and Uncured Sausage". Appl. Microbiol. 28 (2) 262-264.
- 35) Buchanan, R.E y Gibbons, N.E. ed al. 1974. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>a</sup> ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. U.S.A.
- 36) Frobisher, H. et al. 1974. "Fundamentals of Microbiology". 9<sup>th</sup> ed. W. Saunders Co. Philadelphia, London, Toronto.

- 37) Finegold, M., Rosenblatt, J. et al. 1971. "Anaerobic Infections". — Up John Co. Kalamazoo, Michigan U.S.A.
- 38) Hobbs, B.C. 1974. "Food Poisoning and Food Hygiene". 3<sup>d</sup> ed. Edward Arnold Ltd. London, Great Britain.
- 39) Pelczar, M. y Reid, R. 1969 "Microbiology. 3<sup>d</sup> ed. Mc Graw Hill Book New York U.S.A.
- 40) Wintrobe, T. et al. 1971. "Harrison's Principles of Internal Medicine. 7<sup>th</sup> ed. Mc. Graw Hill. New York U.S.A.

