ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION
Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

Vol. 49 N° 3, 1999

# Determinación de *Clostridium perfringens* en embutidos de carne de cerdo del Area Metropolitana de Costa Rica

*Jéssica Morera, Evelyn Rodríguez, María del Mar Gamboa*

Universidad de Costa Rica, Costa Rica

**RESUMEN.** Se aisló *C. perfringens* en 44% de 75 muestras de embutidos de carne de cerdo (chorizo, salchichón y mortadela) provenientes de cinco plantas procesadoras del Area Metropolitana de Costa Rica y se obtuvo el número más probable (NMP) por gramo de alimento antes y después de la identificación bioquímica de las cepas aisladas; éste varió desde menos de 3 hasta más de $2.4 \times 10^5$. Existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p<0.005$) que respaldan la necesidad de utilizar pruebas bioquímicas para la confirmación de la presencia de *C. perfringens* en un alimento. Se aisló *C. perfringens* en el 92% de las muestras de chorizo, en el 28% de las de mortadelas y en el 12% de las de salchichón. Todas las muestras positivas fueron analizadas en busca de al menos una cepa enterotoxigénica, utilizando la prueba de aglutinación reversa pasiva en látex; de las 66 cepas probadas, 5 (8%) fueron enterotoxigénicas y correspondieron al chorizo y mortadela de una planta procesadora y al chorizo de otra. Los resultados de este estudio demuestran que los embutidos, y no sólo las carnes no procesadas, son importantes como factores de riesgo de toxiinfección alimentaria por *C. perfringens*.
**Palabras clave:** *Clostridium perfringens*, embutidos, enterotoxina, identificación bioquímica, NMP/g.

**SUMMARY. *Clostridium perfringens* in pork sausages from the Metropolitan Area, Costa Rica.** The presence of *C. perfringens* was analized in 75 samples of pork sausages (chorizo, salchichon and bologna), obtained from five processing plants located in the Metropolitan Area of Costa Rica. Previously and after the biochemical identification of the strains, the most probable number (MPN) of *C. perfringens* per gram of food was determined and it varied from less than 3 to more than $2,4 \times 10^5$. There were significant statistical differences ($p<0.005$) that support the need of employing biochemical tests for confirming *C. perfringens* in a given food. *C. perfringens* was present in 92% of the chorizos, in 28% of the bolognas and in 12% of the salchichon. Every positive sample was tested looking for at least one enterotoxigenic strain, using the reverse passive agglutination latex test; 8% of the tested strains were enterotoxigenic and corresponded to chorizo and bologna from one processing plant and chorizo from another plant. The results obtained in this study show that pork sausages, and not just not processed meats, are important as risk factors for food intoxication by *C. perfringens*.
**Key words:** *Clostridium perfringens*, sausages, enterotoxin, biochemical identification, MPN/g.

## INTRODUCCION

*Clostridium perfringens* es un bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio, cuyo hábitat principal es el suelo y el intestino de humanos y animales. Produce una variedad de enfermedades en el hombre (1), entre las que se incluye una toxiinfección alimentaria, asociada con el consumo de alimentos que contienen más de $10^5$ UFC/g (2). Las células vegetativas llegan al intestino y al esporular producen una enterotoxina (CPE) (1-3) que es una proteína de 35 317 daltons, termosensible, cuya dosis oral en seres humanos es de 8 a 10 µg (4,5). Típicamente, el cuadro clínico, caracterizado por náuseas, diarrea, calambres y gases abdominales, se presenta 6 a 12 horas después de haber ingerido los alimentos contaminados y se resuelve 12 a 24 horas después (1). En individuos inmunocomprometidos, puede desarrollarse deshidratación severa, que puede llevar a coma y muerte. Los alimentos que con más frecuencia se relacionan con este cuadro son la carne y los productos cárnicos, ya que el contenido intestinal del propio animal puede contaminarlos durante su procesamiento en el matadero (1,6); además, esta bacteria requiere 13 aminoácidos diferentes que no puede sintetizar y que se encuentran en la carne (7).

*C. perfringens* ocupa el segundo o tercer lugar como patógeno alimentario en países industrializados (8,9). En Costa Rica se desconoce la verdadera importancia de este patógeno, pero siendo un país con alto consumo de carnes (10), se sospecha que es responsable de numerosos brotes diarreicos. Con el fin de determinar si los embutidos (y no sólo las carnes) son importantes factores de riesgo de toxiinfección por *C. perfringens*, en este estudio se pretende determinar el número más probable por gramo de embutido (NMP/g) así como establecer si algunas de las cepas aisladas son productoras de enterotoxina; esto con el fin de determinar el riesgo real de contraer una intoxicación alimentaria por *C. perfringens*.

## MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 75 muestras de embutidos (25 de chorizo, 25 de salchichón y 25 de mortadela) obtenidas a partir de cinco

plantas procesadoras del Area Metropolitana de Costa Rica. Las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas estériles, transportadas a temperatura ambiente al laboratorio (1) y analizadas antes de 6 horas. Para la determinación del NMP se siguió la metodología de Peeler et al. (11) y Rhodehamel y Harmon (12) y las recomendaciones de Smith (1) para optimizar esa determinación, empleando un medio de enriquecimiento y la temperatura ideal para *C. perfringens*. Así, se tomaron 25 g de alimento que se diluyeron en 225 ml de agua peptonada estéril (0.1%); se prepararon diluciones decimales (hasta $10^{-5}$) y se enriquecieron por triplicado, en tubos con 10 ml de caldo infusión de cerebro y corazón, con glucosa y carne picada (CICC) pre-reducidos antes de esterilizar (PRAS) a 45°C por 24 h (1,13). A partir de cada tubo con crecimiento y gas se inoculó Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS) (1), que se incubó en anaerobiosis, a 45°C por 24 h. Las colonias bacterianas aisladas, incluyendo negras y blancas, se inocularon en tubos de CICC-PRAS que se incubaron en baño a 45°C por 4-5 h; aquellos con crecimiento y gas se rayaron en placas de Agar Sangre (AS), incubadas en anaerobiosis a 45°C por 24 h.

Tomando en cuenta esta información (crecimiento en agar SPS a 45°C, producción de gas en 4-5 h a 45°C, colonias típicas en AS y morfología y tinción de Gram compatibles con *C. perfringens*) se determinó el NMP (presuntivo) de *C. perfringens* por gramo de alimento.

El NMP (confirmado) de *C. perfringens*, por gramo de alimento se determinó identificando bioquímicamente cada cepa de acuerdo con la metodología y pruebas recomendadas por Post (13,14) que incluyen movilidad, reducción de nitratos, licuefacción de gelatina y fermentación de lactosa y salicina.

Todas las muestras positivas de *C. perfringens* fueron analizadas en busca de al menos una cepa enterotoxigénica. Una muestra se consideró como negativa para *C. perfringens* enterotoxigénico si ninguna de las cepas de esa muestra produjo CPE. La determinación de la enterotoxina se realizó utilizando la prueba de aglutinación reversa pasiva con látex (15), utilizando como control positivo de cepa de *C. perfringens* UCR A-89 y como medio promotor de esporulación el medio Duncan Strong modificado (15), en el que se sustituye el almidón por rafinosa e incubando en anaerobiosis por 72 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se demostró la presencia de *C. perfringens* en 33 (44%) de las 75 muestras analizadas. Los NMP de *C. perfringens* por gramo de alimento (presuntivo y confirmado) de todas las muestras positivas se pueden apreciar en la Tabla 1; en 14 muestras (42%) hubo variación entre el NMP/g presuntivo y el confirmado, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p<0.005$, $\alpha = 0.05$) por prueba de hipótesis de comparaciones apareadas (16). Se aislaron en total 136 cepas de las cuales 116 (85%) confirmaron su identificación como *C. perfringens*. De acuerdo con las recomendaciones de la FDA (Food and Drug Administration) (12), el crecimiento en medios selectivos con morfología colonial típica, la tinción de Gram y la demostración del rápido crecimiento y actividad metabólica a 45°C, son pruebas suficientes para la identificación presuntiva de *C. perfringens* y ésta es sólo suficiente para propósitos muy generales. Algunas especies de *Clostridium* ocasionalmente aisladas de alimentos tales como *C. paraperfringens, C. baratii, C. absonum* y *C. sardiniense,* pueden presentar características similares a *C. perfringens* y sólo pueden diferenciarse mediante pruebas bioquímicas. Por esta razón, este procedimiento, aunque puede resultar laborioso y de mayor costo, es necesario siempre que se requiera afirmar que un alimento tiene *C. perfringens* o que se quiera relacionar con un brote de toxiinfección (12).

TABLA 1
Número más probable (NMP) de *C. perfringens* por gramo de alimento (presuntivo y confirmado) en las muestras positivas

| Planta | Producto | NMP/g | |
|---|---|---|---|
| | | Presuntivo* | Confirmado** |
| A | Chorizo | 4 | 4 |
| | | 2,3 x 10 | 2,3 x 10 |
| | | 2,3 x 10 | 2,3 x 10 |
| | | 1,5 x 10 | 1,5 x 10 |
| B | Chorizo | $7,5 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^2$ |
| | | $2,3 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^2$ |
| | | $3,9 \times 10^2$ | 4,3 x 10 |
| | | $7,5 \times 10^2$ | $3,9 \times 10^2$ |
| | | $4,3 \times 10^2$ | 4,2 x 10 |
| C | Chorizo | $2,3 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^2$ |
| | | $2,3 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^2$ |
| | | $2,3 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^2$ |
| | | 1,1 x 10 | 1,1 x 10 |
| | | $3,0 \times 10^2$ | 1,5 x 10 |
| D | Chorizo | $1,5 \times 10^2$ | $1,5 \times 10^2$ |
| | | $1,5 \times 10^2$ | 7,5 x 10 |
| | | 9,3 x 10 | 2,1 x 10 |
| | | 7,5 x 10 | 7,5 x 10 |
| | | 9,3 x 10 | 4,3 x 10 |
| | Salchichón | 7 | 7 |
| | | 2,3 x 10 | 2,3 x 10 |
| | | 2,3 x 10 | 2,3 x 10 |
| | Mortadela | $4,3 \times 10^3$ | $4,3 \times 10^3$ |
| | | $2,3 \times 10^3$ | $2,3 \times 10^3$ |
| | | $7,5 \times 10^2$ | $4,3 \times 10^2$ |
| | | $\geq 2,4 \times 10^5$ | $\geq 2,4 \times 10^5$ |
| | | 2,3 x 10 | 2,3 x 10 |
| E | Chorizo | $2,3 \times 10^2$ | 1,1 x 10 |
| | | 2,1 x 10 | <3 |
| | | 9,3 x 10 | 1,1 x 10 |
| | | 9,3 x 10 | 3 |
| | | 9,3 x 10 | 4 |
| | Mortadela | 4 | 4 |
| | | 4,3 x 10 | 4,3 x 10 |

* Crecimiento en SPS, crecimiento y gas en BHI-PRAS a 45°C en menos de 5 horas, morfología colonial y tinción de Gram compatible con *C. perfringens*.

** Identificación bioquímica.

En este estudio se demostró no sólo que cepas provenientes de colonias negras en agar SPS no confirmaron ser *C. perfringens*, si no que colonias blancas en ese medio resultaron ser *C. perfringens*. Esto confirma la necesidad de utilizar otros medios selectivos, más específicos para esta bacteria.

De las 25 muestras de chorizo, 23 (92%) contenían *C. perfringens*, aunque el NMP/g en todas ellas estuvo por debajo de la dosis infectante que es $\geq 10^5$ (2). Siete (28%) de las 25 muestras de mortadela, procedentes de dos plantas productoras fueron positivas por *C. perfringens*. En este tipo de alimento se encontró la muestra con el NMP/g más alto ($\geq 2{,}4 \times 10^5$) así como el promedio de NMP/g más alto ($\geq 4{,}9 \times 10^4$). Este dato es importante, pues la mortadela usualmente se consumo sin un tratamiento térmico previo; además si las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas, el número de bacterias puede aumentar y con ello, aumenta el riesgo de toxiinfección.

Con respecto a las muestras de salchichón, se aisló *C. perfringens*, en 3 (12%) de las 25 muestras analizadas, todas provenientes de una sola planta, con un promedio de NMP/g muy bajo (1,1 x 10). Aunque el NMP/g en estas muestras en y otras de chorizo y mortadela es bajo, es importante señalar que estos alimentos se utilizan para preparar comida china, picadillos, leguminosas y salsas, que forman parte de platillos preparado en grandes cantidades en sodas y restaurantes. Las esporas presentes podrían sobrevivir a las temperaturas de cocción, germinar y si estos alimentos son mantenidos a temperaturas que faciliten su crecimiento, rápidamente se podría alcanzar la dosis infectante, pues el tiempo de generación de esta bacteria puede ser tan corto como 7 minutos (1).

El menor porcentaje de muestras positivas de salchichón (12%) y mortadela (28%) con respecto al chorizo (92%), concuerda con la gran manipulación que se requiere para su elaboración y con el hecho de que no es precocinado ni contiene preservantes.

En todas las plantas procesadoras analizadas se encontró *C. perfringens* en al menos uno de sus productos; en las plantas A, B y C sólo en chorizo, en la planta E en chorizo y mortadela, y en la planta D en los tres tipos de embutidos investigados. Este hallazgo es evidencia de contaminación con suelos o materia intestinal, por lo que es altamente probable que otros microorganismos enteropatógenos también estén presentes. Esto sugiere que existen fallas importantes en el control de calidad de las plantas estudiadas y que es necesario un sistema de vigilancia más estricto del control de calidad que toda planta procesadora de alimentos debe aplicar.

Se analizaron para enterotoxina un total de 66 cepas, de las cuales 5 (8%) fueron enterotoxigénicas, 4 correspondieron a muestras de chorizo provenientes de las plantas D y E y la última a una muestra de mortadela proveniente de la planta E. Este bajo porcentaje de cepas enterotoxigénicas es congruente con la literatura, que menciona que aproximadamente el 5% de todos los aislamientos de *C. perfringens* expresan el gen de la enterotoxina (17). Sin embargo, la cepas que no expresan este gen pueden llegar a producir la enterotoxina como resultado de choques térmicos repetidos (2), situación que podría darse si las esporas sobreviven a las temperaturas que permitan su germinación y multiplicación posterior.

Los resultados de este estudio muestran que los embutidos y no sólo las carnes no procesadas, como tradicionalmente se ha considerado (18), son importantes como factores de riesgo de toxiinfección alimentaria por *C. perfringens*, especialmente si las condiciones de cocción y mantenimiento antes de su consumo son inadecuadas.

## REFERENCIAS


1. Smith LDS & Williams BL. *Clostridium perfringens*. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. C.C. Thomas Publisher, Illinois, 1984; p. 101-136.
2. Meer RR, Sorger JC & Park DL. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. Rev Environ Contam Toxicol 1997;150:75-74.
3. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. Clin Mecrobiol Rev 1990;3:77-81.
4. Kokai-Kun JF & McClane BA. Detection analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin. Infect Immun 1997;65:1014-1022.
5. Skjelkvale R & Uemura T. Experimental diarrhea in human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. J Appl Bacteriol 1977;43:281-286.
6. Miwa N, Nishina T, Kubo S & Atsumi M. Nested Polymerase Chain Reaction for detection of low levels of enterotoxigenic. *Clostridium perfringens* in animal faces and meat. J Vet Med Sci 1996;58:197-203.
7. Boyd M, Logan M & Tytell A. The growth requirements of *Clostridium perfringens* BPK6K. J Biol Chem 1948;174:1013-1025.
8. Labbé R. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Clostridium perfringens* . J Assoc Official Analytical Chem 1991;74:711-714.
9. Cornillot E, Saint-Joanis B, Daube G, Katayana S, Granum P, Canard B & Cole St. The enterotoxin gene (cpe) of *Clostridium perfringens* can be chromsomal or plasmid borne. Mol Microbiol 1995;15:639-647.
10. Aguilar F. El consumo de productos cárnicos en Costa Rica. San José. Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos, 1993.
11. Peeler JT, Houghtby GA & Rainosek AP. The most probable number techique. In: Vanderzant M & V Splittstoesser. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd, APHA, 1992;p. 105-120.
12. Rhodehamel J & Harmon SM. *Clostridium perfringens* . In Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. AOA International. 8 th. ed. Gaithersburg 1995;p. 1601-16051.
13. Holdeman L, Cato E & Moore W. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksbury, 1977, 156p.
14. Post DE. Food-borne pathogens. Monograph N° 4 Oxoid. England. 45 p.

15. Labbé R & Harmon SM. *Clostridium perfringens* : In: Vanderzant M & V Splittstoesser. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd. ed. APHA, 1992;p. 623-635.
16. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. México D.F. 1990; 667p.
17. Czeczulin JR, Collie RE & McClane BA. Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B and C isolates of *C. perfringens* . Infect. Immun 1996;64:3301-3309.
18. Johnston R & Tompin R. Meat and Poultry. In: Speck ML (ed). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C. 1984;p. 611-623.

Recibido: 02-12-1998
Aceptado:27-05-1999