

Presencia de *Clostridium perfringens* en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica

Andrea Gutiérrez, María del Mar Gamboa, Evelyn Rodríguez, María Laura Arias

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CIET.

RESUMEN. En Costa Rica existe una gran cantidad de servicios de alimentación pública distribuidos a lo largo del país y son muchas las personas que consumen alimentos en ellos diariamente. El *Clostridium perfringens* es una bacteria asociada a un cuadro de toxiinfección alimentaria relacionado, principalmente, con la ingesta de productos cárnicos mantenidos por largo tiempo a temperaturas por debajo de 70°C. El objetivo de este estudio fue evaluar los servicios de alimentación pública que utilizan baños de maría para mantener este tipo de preparaciones calientes, con el fin de establecer la presencia de *C. perfringens* en carne cocinada de res; además de evaluar la capacidad enterotoxigénica de las cepas aisladas.

Se analizaron 81 muestras de carne cocinada de res provenientes de 27 establecimientos de alimentación pública ubicados en el Cantón Central de San José. Se utilizó la metodología descrita por Labbé y Harmon para el aislamiento de esta bacteria en 10g de muestra. Además, se determinó la capacidad enterotoxigénica de las cepas mediante una prueba de aglutinación reversa pasiva con látex de la casa Oxoid. De los 27 servicios de alimentación pública analizados, ocho (30%) resultaron positivos en los tres muestreos realizados, nueve (33%) resultaron positivos en una o dos ocasiones, y diez (37%) dieron negativos en todas las ocasiones. Esto implica que en 17 (63%) de los establecimientos se aisló la bacteria por lo menos una vez. De las 81 muestras de preparaciones a base de carne analizadas, 37 (46%) fueron positivas por *C. perfringens*. Por otro lado, las temperaturas de mantenimiento de los alimentos variaron entre 56 y 82°C, con un promedio de 68,7°C. De las 37 cepas identificadas como *C. perfringens*, se encontró que 12 (32%) resultaron positivas para enterotoxina.

Se concluye que la presencia de *C. perfringens* en platillos hechos a base de carne de res y mantenidos en baños de maría representa un riesgo importante para la salud pública, así como que la temperatura de mantenimiento de los alimentos es crítica para la multiplicación de esta bacteria.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, enterotoxina, servicios de alimentación pública, baño de maría, carne.

INTRODUCCION

En Costa Rica existe una gran cantidad de servicios de alimentación pública distribuidos a lo largo del país y son muchas las personas que consumen alimentos en ellos, princi-

SUMMARY. Presence of *Clostridium perfringens* in meat based preparations from public food services in San Jose, Costa Rica.

In Costa Rica there are a large number of public food services distributed along the country, where a considerable number of people eat daily. *Clostridium perfringens* is a bacteria associated with foodborne illness related, especially, to meat products kept for long time at temperatures under 70°C. The aim of this study was to evaluate the public food services that use water baths for keeping food hot in order to establish the presence of *C. perfringens* in cooked bovine meat dishes and to evaluate the enterotoxigenic capacity of the strains isolated.

81 samples of cooked bovine meat plates coming from 27 public food services, located in the Central County of San José were analyzed. The methodology described by Labbe & Harmon for the isolation of *C. perfringens* was used in 10g of sample. Also, the enterotoxigenic capacity of the strains was evaluated using the passive-reverse-latex-agglutination assay from Oxoid. From the 27 public food services analyzed, eight (30%) were positive in the three samplings done, nine (33%) were positive in one or two occasions, and ten (37%) were negative all times. This implies that in 17 (63%) of the establishments studied, the bacteria was isolated at least once. From the 81 preparations studied, 37 (46%) were positive for the bacteria. The temperatures at which food was kept varied from 56 to 82°C, with an average of 68,7°C. From the 37 strains identified as *C. perfringens*, 12 (32%) were positive for enterotoxin.

In conclusion, the presence of *C. perfringens* in bovine meat dishes, maintained in water baths, represents an important risk for public health, and the temperature at which the preparation is kept is critical for the multiplication of the bacteria.

Key words: *Clostridium perfringens*, enterotoxin, public food services, waterbath, meat.

palmente por cercanía al trabajo y por su bajo costo. Por otro lado, Costa Rica es un país altamente consumidor de carnes, tal y como se describe en un estudio efectuado en el Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos (CITA), donde se indica que en el 97,9% de los hogares costarricenses se

consume algún tipo de carne (1). También, en nuestro país se ha demostrado que en las carnes crudas se encuentra frecuentemente *Clostridium perfringens* (2). Esta bacteria es considerada la tercera causa de toxiinfección alimentaria en Estados Unidos y la segunda causa en Canadá e Inglaterra (3).

Cuando los alimentos se mantienen a una temperatura de 43 a 45°C, las formas vegetativas de esta bacteria pueden multiplicarse rápidamente, debido a que ésta es la temperatura óptima para su crecimiento. Incluso la bacteria puede reproducirse en alimentos mantenidos en baños de maría que están a una temperatura por encima de 50°C, alcanzándose altos números en un corto período de tiempo (3). El consumo de más de 10^6 - 10^7 UFC/g de formas vegetativas está asociado a un cuadro de toxiinfección, el cual se debe a la producción y liberación de una enterotoxina como consecuencia de la esporulación de la bacteria en el intestino. Se trata de una proteína termosensible, con un peso molecular de 35 317 Daltons y un punto isoeléctrico de 4,5 (4) y la dosis oral necesaria para causar los síntomas de toxiinfección en humanos es de 8 a 10 ug (5). Esta enterotoxina afecta directamente el epitelio intestinal e inhibe el transporte de glucosa; el cuadro diarreico y los intensos dolores abdominales se producen de 6 a 12 horas después de ingerir el alimento contaminado y generalmente, se resuelven en menos de 24 horas (4).

La carne y los productos cárnicos son los alimentos que más se asocian con el cuadro de toxiinfección producido por esta bacteria, debido a la necesidad de la bacteria de consumir 13 diferentes aminoácidos los cuales no puede sintetizar y que se encuentran en la carne (6).

Dado el gran número de brotes diarreicos asociados a *C. perfringens* descritos a nivel mundial y al alto consumo de carnes en Costa Rica, se ha considerado importante hacer un estudio representativo en los servicios de alimentación que utilizan baños de maría para establecer la presencia de *C. perfringens* en carne cocinada de res. Se pretende además, evaluar la capacidad enterotoxigénica de las cepas aisladas, con el fin de establecer el riesgo de contraer una toxiinfección alimentaria.

MATERIALES Y METODOS

Muestras analizadas

Se muestreó, en tres ocasiones diferentes, 27 servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José que utilizan baños de maría para conservar los alimentos preparados. Se recolectaron 81 muestras de carne cocinada de res independientemente de su preparación: en picadillos, en salsas, en trozos, molida, etc. Las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas estériles y transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Investigación de Bacteriología Anaerobia de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; fueron analizadas en un máximo de dos horas después de su recolección. Además, se registró la temperatura de los alimentos en el baño de maría en el momento de tomar

la muestra de carne mediante el uso de un termómetro de campo.

Metodología

Se utilizó el método descrito por Labbé y Harmon (7) para el aislamiento de *C. perfringens* en 10 gramos de muestra. Las muestras fueron preenriquecidas por 24 h a 35°C en tubos con 5 ml de caldo peptona-levadura (peptone-yeast, PY) prerreducidos (8). A partir de los tubos que presentaron turbiedad y producción de gas, se rayó una asada en agar SPS (sulfito-polimixina-sulfadiazina) que se incubó en anaerobiosis por 24 h a 35°C. Las colonias bacterianas aisladas, incluyendo negras y blancas, fueron inoculadas en tubos de carne picada (chopped meat, CM) prerreducidos (8) y se colocaron en baño de maría a 44°C por una hora aproximadamente. Cada tubo positivo (crecimiento y gas), se inoculó en agar Yema de Huevo Sangre (agar yema de huevo + 5% sangre desfibrinada) el cual fue incubado en anaerobiosis por 24 h a 35°C.

Como cepa control se utilizó durante el estudio un cultivo de *C. perfringens* (ATCC 13124).

Identificación de las cepas

Las pruebas bioquímicas para la confirmación de la bacteria se realizaron en medios prerreducidos e incluyeron movilidad, producción de indol, hidrólisis de esculina y de gelatina, hidrólisis y pH de almidón, reducción de nitratos, digestión de carne, fermentación de arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melibiosa, ribosa, sacarosa, salicina, trealosa y xilosa; la determinación de lecitinasa y lipasa se realizó en agar yema de huevo, siguiendo la metodología descrita por Holdeman et al (8).

Se utilizó el programa de computación "Sistema de Identificación Biológica" para la identificación final de las especies aisladas (9). Este programa compara el resultado de cada una de las pruebas que se realizaron a las cepas aisladas con los resultados de las bacterias contenidas en una base de datos. Se consideraron como *C. perfringens* todas aquellas cepas cuyos índices de similitud fueran mayores de 0,90 y éstas se reportaron como positivas en 10g.

Prueba de detección de la enterotoxina

Para realizar las pruebas de detección de la enterotoxina de *C. perfringens* se utilizó una prueba de aglutinación reversa pasiva con látex de la casa Oxoid, la cual es capaz de detectar menos de 2ng/ml de enterotoxina, según las recomendaciones del Center for Disease Control (CDC) (10). Como medio de esporulación se utilizó el medio Duncan-Strong modificado, incubado por 96 horas en anaerobiosis.

RESULTADOS Y DISCUSION

Costa Rica carece de información estadística respecto al número de casos de diarrea que se dan anualmente por *C.*

perfringens, pero los datos obtenidos en este análisis permiten corroborar la importancia de esta bacteria en nuestro medio. De los 27 servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José analizados, ocho (30%) resultaron positivos en los tres muestreos realizados, nueve (33%) resultaron positivos en una o dos ocasiones y diez (37%) dieron negativos en todas las ocasiones. Esto implica que en 17 (63%) de los establecimientos se aisló la bacteria por lo menos una vez.

Debido a que la muestra es estadísticamente representativa y tomada al azar, se puede inferir, por medio de la prueba estadística "Presencia de intervalo para mediciones" (11), que la verdadera proporción de establecimientos del Cantón Central de San José en los que está presente esta bacteria varía entre 44% y 82%, con un 95% de confianza, lo cual representa un riesgo importante para la salud. La presencia de *C. perfringens* en un alimento no lo hace responsable de causar enfermedad alimentaria, a menos que el alimento sea mantenido en condiciones que le permitan reproducirse hasta alcanzar la dosis infectante. No obstante, el tiempo de generación de esta bacteria es corto, por lo que si su almacenamiento es prolongado e inadecuado, en poco tiempo se pueden generar grandes cantidades de formas vegetativas, alcanzándose esta dosis (12).

Como ocurre con la mayoría de enfermedades de origen alimentario, la presencia de *C. perfringens* en los alimentos representa un riesgo potencial dependiendo de los controles de tiempo y temperatura que se tengan antes del consumo de éstos (13). Con frecuencia el enfriamiento del alimento después de su cocción suele ser inapropiado, con períodos superiores a 12 horas entre la preparación y el consumo; así mismo, también hay un inadecuado recalentamiento del mismo antes de ingerirlo (14,15).

De las 81 muestras de preparaciones a base de carne analizadas, 37 (46%) fueron positivas para *C. perfringens*. Utilizando la prueba estadística antes mencionada, se puede inferir que la verdadera proporción de muestras de carne en las que está presente esta bacteria oscila entre 35% y 57%, con un 95% de confianza.

Labbé informa que en general, la incidencia de *C. perfringens* en carnes de pollo y res cruda es cercana a un 50% (3). También, Hall y Angelotti encontraron que el 43% de muestras de carne de res en Estados Unidos presentaban contaminación con *C. perfringens* (16). En un estudio previo en Costa Rica, la incidencia de *C. perfringens* en carnes molidas crudas fue de un 69%, valor considerado elevado comparado con estudios similares (2).

El porcentaje de positividad obtenido en este trabajo puede justificarse basándose en varias razones, entre ellas se puede citar la alta contaminación presente en las carnes crudas nacionales, contaminación cruzada ya sea con utensilios o con las manos de los manipuladores, deficiencias de higiene, ineficientes controles de tiempo y temperatura durante la cocción del producto, la temperatura de mantenimiento de las preparaciones de carne en baños de maría y al hecho de que se

haya trabajado con colonias negras y blancas, aisladas a partir del SPS. A pesar de que las colonias típicas de *C. perfringens* en este medio se describen como negras, se ha demostrado que muchas cepas no son capaces de reducir el sulfito, razón por la cual aparecerán de color blanco (7).

La temperatura a la que se mantienen los alimentos después de su cocción es crítica, pues la multiplicación de las formas vegetativas de *C. perfringens* dependerá de ésta. En el presente estudio, la menor temperatura determinada fue de 56°C, y la mayor de 82°C, con un promedio de 68,7°C y una desviación estándar de 7,8°C. El promedio de las temperaturas de las muestras positivas por *C. perfringens* fue de 61,8°C, mientras que el de las muestras negativas fue de 74,6°C. Estos datos concuerdan con Anderson et al. quienes señalan que entre 70 y 80°C se destruirán la mayoría de las células vegetativas de *C. perfringens* que pudieran estar presentes (17). Igualmente, Labbé recomienda que la temperatura interna mínima del alimento debe ser 75°C en preparaciones a base de carne al momento de servir los alimentos, para evitar las toxiinfecciones (3).

Al evaluar la capacidad de producción de la enterotoxina a partir de las 37 cepas identificadas como *C. perfringens*, se encontró que 12 (32%) resultaron positivas, lo que permite inferir que la verdadera proporción de cepas enterotoxigénicas oscila entre 17% y 48%, con un 95% de confianza. También, de las 81 muestras analizadas, 15% resultaron positivas por cepas enterotoxigénicas, lo cual permite inferir un ámbito de positividad que oscila entre 7 y 23%, con un 95% de confianza.

Este alto porcentaje de cepas enterotoxigénicas aisladas puede deberse a que se haya trabajado con las denominadas "cepas de cocina", las cuales son cepas con la información genética para sintetizar la toxina, que han sido expuestas repetitivamente a esporulaciones y choques térmicos, por lo cual expresan dicha información. Las cepas silvestres de *C. perfringens* por lo general son enterotoxina negativas ya que aún cuando pueden acarrear la información genética de esta toxina, no la expresan (18,19).

Las modificaciones incluidas en la prueba de detección de enterotoxina, que incluyen el uso de un medio que favorece la esporulación, como es el Duncan Strong modificado con rafinosa, la incubación en anaerobiosis y el aumento del tiempo de incubación hasta 96 horas, pueden haber permitido detectar un mayor número de cepas enterotoxigénicas, ya que la esporulación a nivel del laboratorio es indispensable para la producción y detección de la enterotoxina y es uno de los puntos que mayor dificultad presenta *C. perfringens*, como se cita en diversos trabajos (19,20).

Según se desprende de este estudio, la temperatura a la que se encuentran los alimentos influye con la presencia de *C. perfringens*, (índice de correlación biserial = 0,82) y en menor grado con la presencia de cepas enterotoxigénicas (índice de correlación biserial = 0,49), lo cual permite suponer que gran cantidad de las cepas aisladas corresponden a "cepas de cocina".

Con el fin de reducir los factores de riesgo que favorecen la presencia y multiplicación de *C. perfringens* en los servicios de alimentación pública, es indispensable introducir varias modificaciones, entre las que se pueden incluir la adecuada desinfección de las superficies de contacto de manera que la cadena repetitiva de esporulación y tratamiento térmico de las cepas sea interrumpida, introducir controles de tiempo y temperatura durante la cocción y almacenamiento de los alimentos preparados, asegurar que la temperatura de los baños de maría sea superior a los 70°C, educar al personal que prepara y manipula este tipo de productos, y en un corto tiempo implementar el sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) con el fin de asegurar la inocuidad de los alimentos.

REFERENCIAS

1. Aguilar F. El consumo de productos cárnicos en Costa Rica. San José. Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos, 1993.
2. Montoya M. Estudio de la calidad microbiológica de la carne molida de res que expende el distrito primero de la provincia de Alajuela. Tesis de licenciatura. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, 1995.
3. Labbé R. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Clostridium perfringens*. J Assoc. Official Analytical Chem. 1991;74: 711-714.
4. Kokai-kun JF & McClane BA. Detection analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin. Infect Imm. 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. Boyd M, M Logan & Tytell A. The growth requirements of *Clostridium perfringens* BPK6K. J Biol Chem. 1948;174:1013-1025.
7. Labbé R & Harmon S. *Clostridium perfringens*: In: Vanderzant M & V Splittstoesser. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd. Ed. APHA, 1992.
8. Holdeman L, Cato E & Moore W. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, 1977.
9. Rodríguez E, Jiménez F y Ureña F. Programa de computación para la identificación biológica aplicada al género *Clostridium*. Rev Biol Trop. 46: XV, 1997.
10. Dowell V & Hawkins T. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC Laboratory Manual, Department of Health and Human Services, HHS Publication CDC 81-8272, Center for Disease Control, Atlanta, 1981.
11. McNemar Q. Psychological Statistics. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1962.
12. Meer R, Songer J & Park D. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. Rev Environ Contam Toxicol. 1997;150: 75-94.
13. Bean N, Griffin P, Goulding J & Ivey C. Foodborne outbreaks, five year summary, 1983-1987. J Food Prot. 1990;53:711-728.
14. Bryan FL. Risk of practices and procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. J Food Prot. 1988;51:663-673.
15. Ryan M, Wall P, Gilbert R, Griffin M & Rowe B. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. Commun Dis. Rep CDR Rev. 1996;6:179-183.
16. Hall H & Angelotti R. *Clostridium perfringens* in meat and meat productis. Appl Microbiol. 1965;13:352-357.
17. Anderson A, Ronner U & Granum P. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? Int. J. Food Microbiol. 1995;28:145-155.
18. Granum PE. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. Int J Food Microbiol. 1990;10:101-112.
19. Cornillot E, Granum P, Saint Joanis B, Daube G, Katayama S, Carand B & Cole S. The enterotoxin gene (cpe) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. Mol Microbiol. 1995;15: 639-647.
20. Báez L & Juneja V. Nonradioactive colony hybridization assay for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef. Appl Environ Microbiol. 1995;61:807-810.

Recibido: 05-11-1998

Aceptado: 09-04-1999