

***Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica**

Evelyn Rodríguez, María del Mar Gamboa y Pablo Vargas

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales,
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Con el fin de establecer el riesgo de contraer una toxicoinfección alimentaria por la ingestión de carne contaminada con *Clostridium perfringens*, se analizaron 8 plantas procesadoras de carne en Costa Rica, utilizando la técnica del Número Más Probable por gramo (NMP/g). *C. perfringens* se aisló en 29 (88%) de 33 muestras de suelos aledaños a las plantas (promedio NMP/g $6,7 \times 10^2$), en 70 (93%) de 75 intestinos de animales sacrificados (promedio NMP/g 3×10^4), en 42 (55%) de 76 carnes en canal (promedio NMP/g $2,2 \times 10^4$) y en 30 (61%) de 49 carnes procesadas o molidas, listas para su expendio (promedio NMP/g 8×10^3). Adicionalmente se evaluó la presencia de esta bacteria en 10 expendios del Area Metropolitana de Costa Rica, aislándose en 15 (75%) de 20 muestras de carne molida y en 28 (36%) de 78 muestras de carne en trozo (promedio NMP/g $1,9 \times 10^3$ y $7,5 \times 10^2$, respectivamente). Al analizar 35 muestras de carne cocida en 32 restaurantes que utilizan baños termorregulables (temperatura promedio 82°C) sólo una fue positiva por *C. perfringens* (NMP/g 4, temperatura 72°C). De un total de 1121 cepas aisladas, 250 se seleccionaron al azar para evaluar la producción de enterotoxina. Sólo 3 cepas (1,2%) fueron positivas, probablemente porque la mayoría de las cepas silvestres no son productoras de esta toxina, aunque pueden llegar a producirla como resultado de choques térmicos repetidos. Los resultados de este trabajo señalan la necesidad de adoptar medidas preventivas adecuadas y altos estándares sanitarios en la industria procesadora de carne en Costa Rica, para minimizar el riesgo de toxicoinfecciones alimentarias causadas por *C. perfringens*, debido a su amplia distribución y al peligro potencial para la salud del hombre.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, plantas procesadoras de carne, carnes crudas, carnes cocidas, suelos, expendios de carnes, restaurantes, enterotoxina.

SUMMARY. *Clostridium perfringens* in raw and cooked meats and its relation with the environment in Costa Rica. The presence of *Clostridium perfringens* in eight slaughter houses from Costa Rica was analyzed using the Most Probable Number (MPN) technique, in order to assess the risk of acquiring a food borne intoxication due to consumption of contaminated meat. *C. perfringens* was detected in 29 (88%) out of 33 soil samples collected from the slaughter house surroundings (average $6,7 \times 10^2$ MPN/g), as well as in 70 (93%) out of 75 intestinal contents of slaughtered animals (average 3×10^4 MPN/g), in 42 (55%) out of 76 samples of slaughtered meat (average $2,2 \times 10^4$ MPN/g) and in 30 (61%) out of 49 retail meats (average 8×10^3 MPN/g). In addition, the presence of this bacterium was evaluated in ten retail meat markets located in the Metropolitan Area of Costa Rica, where it was isolated from 15 (75%) out of 20 samples of ground meat and from 28 (36%) de 78 stew meat samples (average $1,9 \times 10^3$ and $7,5 \times 10^2$ MPN/g, respectively). Only one out of 35 samples of cooked meat obtained from 32 restaurants that utilize heated water baths (average temperature of 82°C) was positive for *C. perfringens* (4 MPN/g, temperature 72°C). Out of 1121 bacterial isolates obtained, 250 were evaluated for enterotoxigenicity. Only 3 (1,2%) of these tested positive for enterotoxin production, probably because most wild strains are not toxin producers, even though they can be induced to produce it as a result of repeated thermal shocks. The present results urge the adoption of adequate preventive measures and high sanitary standards in the meat processing industry in Costa Rica, in order to minimize the risk of food-borne intoxications caused by *C. perfringens*, due to its widespread distribution and potential human health hazard.

Key words: *Clostridium perfringens*, slaughter houses, raw meat, cooked meat, soils, meat markets, restaurants, enterotoxin.

INTRODUCCION

Clostridium perfringens es un bacilo Gram positivo, esporulado y anaerobio, capaz de crecer rápidamente a 45°C y cuyo principal hábitat es el suelo y los intestinos de humanos y de animales (1). Se ha comprobado que esta especie causa una variedad de enfermedades de diferente severidad (2-4) entre las que se encuentran las de origen alimentario, en virtud de la producción de una enterotoxina, que es una de las 13

toxinas producidas por *C. perfringens* (2,3).

En muchos países, incluso de alto nivel sanitario, más de la mitad de todos los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por los alimentos son causados por carne y productos cármicos (5) que son los que más se asocian con la toxicoinfección producida por *C. perfringens*, pues ofrecen condiciones ideales para su desarrollo. Unas pocas bacterias pueden sobrevivir después de la cocción de los alimentos y si las condiciones ambientales lo permiten, se multiplican

hasta llegar a la dosis infectante (6). Cuando las células vegetativas llegan al intestino y esporulan, producen la enterotoxina que es la responsable del cuadro clínico, una toxicoinfección caracterizada por náuseas, diarrea, dolor y gases abdominales, 6 a 12 horas después de haber ingerido los alimentos contaminados (1,6).

En estudios previos en Costa Rica (7,8), se informó la presencia de *C. perfringens* en un 37% de las muestras de suelo y en un 46% de las carnes cocidas, pero se desconoce la prevalencia de esta bacteria en la flora intestinal de los animales. A fin de establecer una relación entre la presencia de *C. perfringens* en el ambiente y la carne lista para consumo, se decidió realizar un estudio integral en plantas procesadoras de carne, que incluyó muestreos en los suelos aledaños, en los intestinos de los animales sacrificados, en la carne en canal, en la carne procesada o molida lista para su expendio y en la carne cocida mantenida en baños termorregulables en los restaurantes. Finalmente se determinó el porcentaje de cepas de *C. perfringens* productoras de enterotoxina, para establecer el riesgo de contraer una intoxicación alimentaria por la ingestión de carne.

METODOS

Muestras

Se muestrearon, en dos ocasiones diferentes, 8 plantas procesadoras de carne de ganado vacuno, 3 de las cuales eran del área metropolitana y 5 del área rural. En cada visita se tomaron muestras provenientes de 5 animales (intestino y carne en canal) y 5 muestras de carne molida o en trozos si hubiese disponible. En total se analizaron 200 muestras de animales distribuidas así: 75 de contenido intestinal, 76 de carne en canal y 49 de carne molida o en trozos; se recolectaron además 33 muestras de suelos aledaños a las plantas procesadoras. Adicionalmente, se adquirieron 98 muestras de carne cruda en 10 expendios del Área Metropolitana: 20 de carne molida y 78 de carne en trozo. Finalmente, en 32 restaurantes, se tomaron 35 muestras de carne cocida, mantenidas calientes en baños termorregulables. Todas las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas estériles, transportadas a temperatura ambiente al laboratorio (9) y analizadas en un tiempo no mayor a las 6 horas de su recolección.

Metodología

Para la determinación del NMP se siguió la metodología de Morera *et al.* (10) que utiliza los principios descritos en Peeler *et al.* (11), Rhodehamel y Harmon (12) y Smith y Williams (9) para optimizar esa determinación. Así, se tomaron 25 g de cada muestra que se diluyeron en 225 mL de agua peptonada estéril (0,1%); se prepararon diluciones decimales (hasta 10^{-5}) que fueron enriquecidas por triplicado, en tubos con carne picada y 10 mL de caldo infusión de

cerebro-corazón suplementado (CICC), prerreducidos antes de esterilizar (PRAS) y mantenidos con atmósfera anaerobia de CO_2 y N_2 (13). Después de incubar a 45°C por 24 h (9), a partir de cada tubo con crecimiento y burbujas de gas se inocularon placas de Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS), que se incubaron en jarra de anaerobiosis a 45°C por 24 h. Las colonias bacterianas aisladas, incluyendo tanto negras como blancas, fueron inoculadas en tubos de CICC-PRAS (con atmósfera anaerobia de CO_2 y N_2) que se incubaron en baño a 45°C por 4-5 h; a partir de aquellos tubos con crecimiento y burbujas de gas se inocularon placas de Agar Sangre (AS), que fueron incubadas en jarras de anaerobiosis a 45°C por 24 h.

Identificación de cepas

Las cepas provenientes de colonias típicas en AS, con morfología y tinción de Gram compatibles con *C. perfringens* fueron identificadas bioquímicamente de acuerdo con la metodología y pruebas recomendadas (14,15), incluyendo determinación de movilidad, licuefacción de gelatina, reducción de nitratos, producción de indol, de lecitinasa y fermentación de lactosa y salicina.

Detección de enterotoxigenicidad

Se escogieron 250 cepas provenientes de todos los tipos de muestras (suelos, contenido intestinal, carnes crudas en canal, en trozos, en expendios y carnes cocidas) a las que se les determinó su capacidad de producir enterotoxina. Esto se realizó utilizando la prueba de aglutinación reversa pasiva (Oxoid[®]) empleando como medio para la esporulación el caldo Duncan Strong modificado (15), que se incubó en anaerobiosis por 96 h. Se utilizó la cepa enterotoxigénica *C. perfringens* UCR-A-89 como control positivo.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS para Windows y se compararon los datos mediante la prueba de χ^2 de Pearson, con un nivel de significancia de 99% ($p < 0,01$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Tal y como ha sido descrito previamente (10), no sólo cepas provenientes de colonias negras en agar SPS confirmaron ser *C. perfringens*, sino que colonias blancas (no típicas) resultaron ser *C. perfringens*. En este estudio, 1121 cepas fueron identificadas como *C. perfringens*, de las cuales 792 (71%) provenían de colonias negras y 329 (29%) de colonias blancas. Por otra parte, de un total de 1254 colonias negras analizadas, 462 (37%) no correspondieron a *C. perfringens*. Estos datos ratifican la necesidad de realizar pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *C. perfringens* o bien, utilizar otros medios selectivos más específicos para su aislamiento.

Suelos

C. perfringens se ha encontrado en la mayoría de muestras de suelo en las que se le ha buscado específicamente (9). En este estudio fue posible aislarlo en 29 de las 33 muestras de suelos aledaños a las plantas procesadoras de carne (88%), con un NMP/g de tierra que varió de $1,3 \times 10^1$ a $3,6 \times 10^3$ (promedio: $6,7 \times 10^2$, Tabla 1). Esta frecuencia resultó ser mayor a la descrita para la Meseta Central (37%) (7), probablemente porque en ese estudio previo, a diferencia del presente, se empleó una metodología que favoreciera a los clostridios esporulados y *C. perfringens* no siempre esporula (6,9).

TABLE 1
Número Más Probable (NMP) de *Clostridium perfringens* por gramo en suelos aledaños a plantas procesadoras de carne, Costa Rica

Plantas procesadoras*	Muestras +/-total	NMP/g
1	5/5	$1,4 \times 10^1$
2	2/4	$1,6 \times 10^1$
3	2/4	$1,3 \times 10^1$
4	4/4	$3,9 \times 10^2$
5	4/4	$5,8 \times 10^2$
6	4/4	$3,6 \times 10^3$
7	4/4	$8,0 \times 10^1$
8	4/4	$1,5 \times 10^2$
	T=29/33 (88%)	X= $6,7 \times 10^2$

*1-3:urbanas, 4-8:rurales. T: total de muestras positivas.
X: promedio NMP/g.

La certeza de que *C. perfringens* sea un habitante normal de los suelos aledaños a las plantas procesadoras de carne representa un factor de riesgo para la contaminación del producto, especialmente en las plantas rurales, que cuentan con infraestructura muy limitada y generalmente deficiente.

Plantas procesadoras

C. perfringens es habitante normal de intestinos de animales en cantidades variables según la especie y aún dentro de la misma especie (9). En este estudio se analizaron 200 muestras de animales recién sacrificados: 75 de contenido intestinal, 76 de carne en canal y 49 de carne en trozo o molida (Tabla 2).

El NMP/g de contenido intestinal fue muy similar en los animales de diferentes plantas (promedio: $3,0 \times 10^4$), excepto en la planta #1, donde los animales son mantenidos en ayuno por 24 horas y probablemente las variaciones que pueda sufrir la flora normal intestinal no favorecen a *C. perfringens*. Un 93% de las muestras de contenido intestinal fueron positivas por *C. perfringens*, lo que concuerda con lo informado por Smith y Williams, Miserez y col. y Netherwood y col. (9,16,17). Además, es importante señalar que *C. perfringens* puede llegar a causar enfermedades en animales, tales como diarreas, enterotoxemias, y tiflocolitis (16,18,19).

TABLE 2
Número Más Probable (NMP) de *Clostridium perfringens* por gramo de contenido intestinal de animales y de carne cruda provenientes de plantas procesadoras de carne, Costa Rica

Plantas*	Intestino		Carne canal		Carne trozo o molida	
	Muestras +/-total	NMP/g	Muestras +/-total	NMP/g	Muestras +/-total	NMP/g
1	7/10	8,6	1/10	7	6/10	5
2	10/10	$4,4 \times 10^4$	4/10	$3,0 \times 10^1$	-	-
3	7/9	$1,0 \times 10^4$	0/10	-	3/8	$3,2 \times 10^1$
4	10/10	$2,3 \times 10^4$	6/10	$1,4 \times 10^1$	5/12	$3,5 \times 10^1$
5	10/10	$7,0 \times 10^4$	6/10	$3,4 \times 10^4$	7/10	$3,4 \times 10^4$
6	7/7	$3,3 \times 10^4$	7/7	$1,1 \times 10^5$	-	-
7	9/9	$3,8 \times 10^4$	9/9	$7,5 \times 10^3$	9/9	$2,9 \times 10^2$
8	10/10	$1,2 \times 10^4$	9/10	$5,4 \times 10^3$	-	-
	T=70/75 (93%)	X= 3×10^4	T=42/76 (55%)	X= $2,2 \times 10^4$	T=30/49 (61%)	X= $8,0 \times 10^3$

*1-3:urbanas, 4-8:rurales.
T: total de muestras positivas.

Teóricamente, el proceso de destace del animal está diseñado para que el contenido intestinal no entre en contacto con la carne en canal. El animal recién sacrificado es suspendido de sus patas en el canal, desprovisto del cuero y cabeza y eviscerado. A pesar de esto, los resultados de la carne en canal demostraron la presencia de *C. perfringens* en el 55% de las muestras, con un promedio de NMP/g de carne en muestras positivas de $2,2 \times 10^4$ (Tabla 2). De acuerdo con las condiciones en que se mantenga la carne, ese nivel de contaminación podría aumentar, pues *C. perfringens* encuentra en la carne el pH, los aminoácidos y otros factores de crecimiento que le favorecen. Tomando en consideración únicamente las plantas procesadoras del área rural, el porcentaje de carnes en canal positivas por *C. perfringens* fue 74%, lo cual es más alarmante pues en muchas de estas plantas no hay facilidades para refrigerar la carne. Ya que *C. perfringens* puede sobrevivir y multiplicarse muy rápidamente en microambientes con moderada cantidad de oxígeno (1,9), el problema de contaminación podría ser aún mayor.

El porcentaje de muestras de carne molida o en trozos positivas por *C. perfringens* fue mayor (61%) que el de la carne en canal (55%) ($p < 0,01$) con un NMP/g que varió desde 5 hasta $3,4 \times 10^4$ (Tabla 2). En algunos casos el NMP/g de las muestras de carne molida o en trozo pudo haber disminuido, en comparación con los de la carne en canal, ya que *C. perfringens* es sensible a las temperaturas de refrigeración, especialmente en condiciones de aerobiosis (9,20). El aumento en el número de muestras positivas puede deberse a varios factores: mayor manipulación de la carne molida o en trozos, contaminación cruzada entre la materia prima contaminada y las piezas de carne de buena calidad, higiene deficiente en el sitio de preparación de la carne y condiciones de tiempo y temperatura antes de refrigerar la carne que puedan favorecer la multiplicación de *C. perfringens* (6,9).

Expendios

Los resultados de las 98 muestras de carne cruda adquiridas en los lugares de expendio no son muy diferentes a los encontrados en las plantas procesadoras. El 75% de las muestras de carne molida y el 36% de la carne en trozos dio resultados positivos por *C. perfringens*, con un NMP/g que varió de 4 a $1,1 \times 10^4$ (Tabla 3).

A pesar de que algunas de las condiciones de transporte y almacenamiento de la carne no son favorables para *C. perfringens*, que muere rápidamente a temperaturas de refrigeración (9) y en aerobiosis, los datos anteriores son preocupantes, especialmente si se considera que probablemente el abastecimiento de las carnicerías muestreadas (del Area Metropolitana) provenga de los mataderos también del Area Metropolitana, que fueron los de mejor calidad bacteriológica. Aunque lo ideal hubiera sido

muestrear en carnicerías del área rural la carne proveniente de las plantas procesadoras rurales, este seguimiento no fue posible debido a que estas plantas en su mayoría, lo que brindan es el servicio de destace de los animales y la carne es distribuida de acuerdo con la demanda, en la misma área rural, Area Metropolitana o incluso, otras áreas rurales.

TABLA 3
Número Más Probable (NMP) de *Clostridium perfringens* por gramo de carne cruda proveniente de expendios del Area Metropolitana, Costa Rica

Expendios	Carne molida		Carne en trozo	
	Muestras +/total	NMP/g	Muestras +/total	NMP/g
1	4/4	6,5	0/6	-
2	-	-	8/10	$1,4 \times 10^3$
3	1/2	$1,1 \times 10^4$	3/7	$4,0 \times 10^2$
4	2/2	$8,7 \times 10^1$	6/8	$4,3 \times 10^3$
5	1/2	9	2/7	$1,4 \times 10^1$
6	2/2	$7,3 \times 10^3$	0/8	-
7	2/2	$5,6 \times 10^2$	5/8	$1,2 \times 10^3$
8	1/2	4	3/8	4
9	0/2	-	1/8	4
10	2/2	9,5	0/8	-
	T=15/20 (75%)	X= $1,9 \times 10^3$	T=28/78 (36%)	X= $7,5 \times 10^2$

T: total de muestras positivas.

X: promedio NMP/g.

Restaurantes

Únicamente una de las 34 muestras de carne cocida mantenidas en baños termostáticos de restaurantes fue positiva por *C. perfringens*, con un NMP/g de alimento igual a 4. Estos resultados, muy satisfactorios desde el punto de vista de salud pública, se explican por la temperatura de mantenimiento que se detectó en los baños, que en promedio fue de 82°C y varió desde 55°C a 95°C . Durante el proceso de cocción de los alimentos mueren las células vegetativas de *C. perfringens* pero no sus esporas; si las condiciones de temperatura no son favorables no se da la germinación de esas esporas y su posterior multiplicación hasta niveles que permitan llegar a la dosis infectante. En un estudio anterior Gutiérrez *et al.* (8) habían encontrado *C. perfringens* en un 46% de las muestras de carne cocida con un promedio de temperatura de mantenimiento de los baños termostáticos de $68,7^\circ\text{C}$. Dichos establecimientos fueron oportunamente notificados e instruidos acerca de la importancia de mantener la temperatura de los baños por encima de 75°C . Afortunadamente tales indicaciones aunadas a campañas de prevención y capacitación del Ministerio de Salud y la

Universidad de Costa Rica han sido exitosas. Aunque la frecuencia de *C. perfringens* en carnes cocidas es baja, la vigilancia epidemiológica no se debe disminuir, pues la materia prima a partir de la cual se preparan las carnes cocidas a menudo está contaminada.

Análisis de enterotoxigenicidad

Aunque menos del 5% de las cepas aisladas de *C. perfringens* tienen el gen que codifica para la enterotoxina (*cpe*) (4,21), son una causa importante de muchas enfermedades entéricas humanas y veterinarias (2-3,16-19). En este estudio se determinó la producción de la enterotoxina de *C. perfringens* en una muestra de 250 cepas (de un total de 1121) provenientes de todos los tipos de muestras analizadas. Únicamente 3 cepas (1,2%) fueron positivas, probablemente debido a que en su mayoría las cepas provienen de su ambiente natural, como lo es el suelo o los intestinos. Estos datos concuerdan con otras investigaciones que señalan que las cepas silvestres por lo general, no son productoras de enterotoxina (17,21,22). Sin embargo, es importante señalar que las cepas enterotoxina negativas, pero *cpe* positivas pueden llegar a activar el gen como resultado de choques térmicos repetidos (6), que pueden darse durante la cocción y mantenimiento de los alimentos y llegar a causar un problema de origen alimentario. Además, más recientemente, las cepas de *C. perfringens cpe* positivas también han sido implicadas en otras enfermedades gastrointestinales, tales como, diarrea asociada a antibióticos, diarrea esporádica (4) y enfermedad gastrointestinal en animales (16-19).

Los datos de este estudio demuestran la amplia distribución de *C. perfringens* en el ambiente y ponen de manifiesto el peligro potencial que representa para la salud del hombre y de los animales.

REFERENCIAS

- Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3:66-98.
- Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annu Rev Microbiol 1998; 52:333-360.
- Rood JI, Cole ST. Molecular Genetics and Pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol Rev 1991; 55:621-648.
- Collie RE, Kokai-Kun JF, McClane BA. Phenotypic characterization of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from non-foodborne human gastrointestinal diseases. Anaerobe 1998; 4:69-79.
- Hatakka M. Microbiological quality of hot meals served by airlines. J Food Prot 1998; 61:1052-1056.
- Meer RR, Songer JG, Park DL. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. Rev Environ Contam Toxicol 1997; 150:75-94.
- Rodríguez E, Gamboa MM, Fernández B. Clostridios mesófilos en tierras de la Meseta Central de Costa Rica. Rev Biol Trop 1993; 41:365-369.
- Gutiérrez A, Gamboa MM, Rodríguez E, Arias ML. Presencia de *Clostridium perfringens* en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica. Arch Latinoam Nutr 1999; 49:275-278.
- Smith LDS, Williams BL. *Clostridium perfringens*. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. CC Thomas Publisher, Illinois 1984:101-136.
- Morera J, Rodríguez E, Gamboa MM. Determinación de *Clostridium perfringens* en embutidos de carne de cerdo del Área Metropolitana de Costa Rica. Arch Latinoam Nutr 1999; 49:279-282.
- Peeler JT, Houghtby, Rainosek AP. The most probable number technique. In: Vanderzant M, Splittstoesser V, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3rd ed, A PHA 1992:105-120.
- Rhodehamel J, Harmon SM. *Clostridium perfringens*. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. AOA International 8th ed, Gaithersburg 1995:1601-1651.
- Holdeman L, Cato E, Moore W. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg 1977.
- Post DE. Food-borne pathogens. Monograph #4 Oxoid England.
- Labbé R, Harmon SM. *Clostridium perfringens*. In: Vanderzant M, Splittstoesser V, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3rd ed, A PHA 1992:623-635.
- Miserez R, Frey J, Buogo C, Capaul S, Tontis A, Burnens A, Nicolet J. Detection of alpha-and epsilon-toxigenic *Clostridium perfringens* type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). Lett Appl Microbiol 1998; 37:382-386.
- Netherwood T, Chanter N, Mumford JA. Improved isolation of *Clostridium perfringens* from foal faeces. Res Vet Sci 1996; 37:147-151.
- Donaldson MT, Palmer JE. Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. J Am Vet Med Assoc 1999; 215:358-361.
- Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gibert M, Gerber H, Straub R. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J Clin Microbiol 1999;37:358-361.
- Trinh S, Biolat V, Reysset G. Growth response of *Clostridium perfringens* to oxidative stress. Anaerobe 2000;6:233-240.
- Czeczlin 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.
- Granum PE. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. Int J Food Microbiol. 1990;10:101-112.
- 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.

Recibido: 21-05-2001

Aceptado: 07-03-2002