

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



*DETECCION DE Clostridium perfringens ENTEROTOXIGENICO
Y NO ENTEROTOXIGENICO EN HECES FECALES DE UNA
POBLACION MEXICANA UTILIZANDO
UNA SONDA DE ADN*

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA.

POR

MARIA MANUELA VELA FRANCO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

OCTUBRE 1997

TM

Z53

FCE

199

V45



1020120830

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**DETECCION DE *Clostridium perfringens* ENTEROTOXIGENICO Y NO
ENTEROTOXIGENICO EN HECES FECALES DE UNA POBLACION
MEXICANA UTILIZANDO UNA SONDA DE ADN**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
POR

MARIA MANUELA VELA FRANCO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. Octubre 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETECCION DE *Clostridium perfringens* ENTEROTOXIGENICO Y NO
ENTEROTOXIGENICO EN HECES FECALES DE UNA POBLACION
MEXICANA UTILIZANDO UNA SONDA DE ADN

POR

María Manuela Vela Franco

APROBADA

COMISION DE TESIS



Dra Norma L. Heredia Rojas

Presidente



Dr. J. Santos García Alvarado

Secretario



M C Licet Villarreal Treviño

Vocal

**DETECCION DE *Clostridium perfringens* ENTEROTOXIGENICO Y NO
ENTEROTOXIGENICO EN HECES FECALES DE UNA POBLACION
MEXICANA UTILIZANDO UNA SONDA DE ADN**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y la co-dirección del Dr. José Santos García Alvarado. La investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DEDICATORIA

A mi hija Emelina, que ha sido la mayor bendición que he recibido.

A mi esposo que durante esta trayectoria me brindó siempre su amor, apoyo y paciencia.

A mis padres que me dieron la vida y muchas otras cosas.

A mi tía Conchis que siempre ha sido como una madre.

A mis abuelos, por su cariño y consejos.

A mis hermanos que siempre me dieron su cariño y ayuda.

A todos mis sobrinos por ser adorables.

A todos mis tíos especialmente a mi tío Arturo y Mague, que siempre me trataron como a una hija.

A todos mis familiares y amigos

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo institucional y económico que me brindó en la realización de este trabajo de investigación

A la Dra. Norma L. Heredia y al Dr. José Santos García , por haber aceptado asesorarme en el desarrollo de dicho trabajo.

A la M C Licet Villarreal por el apoyo que me dio en la obtención de este grado académico.

A todos los compañeros del laboratorio de Bioquímica Microbiana por su valiosa colaboración en la escritura de este trabajo.

Al Dr Peter Feng por habernos proporcionado la sonda que utilizamos en esta investigación.

Al M.C. Roberto Mercado Henandez, al Dr Rafael Castro Franco y al Dr. Mohammad H. Badii Zabeh por su valiosa participación en el análisis estadístico de este trabajo

A todos los amigos, compañeros y alumnos que colaboraron en la recolección de muestras para la realización de esta investigación

A nuestro Señor Jesucristo que me prestó vida y me dió fortaleza en esta tarea.

INDICE DE CONTENIDO

Titulo	I
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Indice de contenido.....	VI
Lista de tablas	VIII
Lista de abreviaturas.....	X
Resumen.....	XII
Introduccion	1
Antecedentes.....	4
Epidemiología de enfermedades causadas por <i>C. perfringens</i>	4
Aislamiento, identificación y enumeración de <i>C. perfringens</i>	6
Detección de cepas enterotoxigénicas de <i>C. perfringens</i>	7
Hipotesis	9
Objetivos	9
Material y método.....	10
Muestras.....	10
Muestreo preliminar	10
Recuperación, aislamiento y enumeración de esporas de <i>Clostridium</i> sp	11
Identificación y enumeración confirmatoria de <i>C. perfringens</i>	12
Detección del gen que codifica para la enterotoxina de <i>C. perfringens</i>	12
Hibridación en colonia	13
Fijación del ADN a la membrana	13
Hibridación del ADN	14
Detección colorimétrica	14
Marcaje del oligonucleótido con digoxigenina	15
Estimación de la eficiencia del marcaje del oligonucleótido	16

Análisis estadístico.....	18
Resultados	19
Análisis preliminar.....	19
Tamaño de la muestra	21
Análisis completo	21
Enumeración e identificación	21
Análisis de varianza.....	23
Detección del gen	25
Discusion.....	36
Conclusiones	38
Literatura citada	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Valores de F, obtenidos en análisis de varianza de estudio preliminar.....	20
Tabla 2.- Medias numéricas de esporas de <i>C. perfringens</i> en heces fecales, obtenidas en análisis preliminar.....	20
Tabla 3.- Distribución de muestras analizadas en base al número de esporas de <i>C. perfringens</i>	22
Tabla 4.- Número de individuos en los que se recuperó <i>C. perfringens</i>	22
Tabla 5.- Valores de F, obtenidos en análisis de varianza.....	23
Tabla 6.- Medias numéricas de esporas de <i>C. perfringens</i> correspondientes a los diferentes grupos de individuos analizados.....	24
Tabla 7.- Análisis de parámetros por niveles de cada factor obtenidos en prueba de SAS.....	25
Tabla 8.- Individuos positivos para el gen de la enterotoxina de <i>C. perfringens</i>	26
Tabla 9.- Características de los individuos portadores de cepas de <i>C. perfringens</i> potencialmente enterotoxigénicas.....	27
Tabla 10 - Número y porciento de aislados positivos para el gen de la enterotoxina de <i>C. perfringens</i>	28
Tabla 11.- Características de los individuos analizados (muestras 1 a 30).....	29
Tabla 12.- Características de los individuos analizados (muestras 31 a 60).....	30
Tabla 13.- Características de los individuos analizados (muestras 61 a 90).....	31

Tabla 14.- Características de los individuos analizados (muestras 91 a 120).....	32
Tabla 15 - Características de los individuos anlizados (muestras 121 a 150).....	33
Tabla 16.- Características de los individuos analizados (muestras 151 a 180).....	34
Tabla 17 - Características de los individuos analizados (muestras 181 a 200).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
°C	Grados centigrados
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
dig	Digoxigenia
d ATP	Desoxiadenin-trifosfato
d UTP	Desoxiuridil-trifosfato
EDTA	Acido etilen-amino-tetra-acético
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
kDa	Kilodalton(es)
M	Molaridad
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
μ	Micrómetro(s)
μl	Microlitro(s)
N	Normalidad
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
pH	Logaritmo recíproco de la concentración del ión hidrógeno

pmol

picomol(es)

%

Por ciento

SDS

Dodecil-sulfato de sodio

Tris-HCL

Tris-hidoximetil-aminometano

RESUMEN

Clostridium perfringens es una bacteria con forma de bacilo, gram positiva, anaerobia, esporulada, termófila, con un tiempo de generación muy corto (7 - 8 min). Algunas cepas de este microorganismo son productoras de una enterotoxina responsable de enfermedades gastrointestinales en el hombre, tales como la intoxicación alimentaria, diarreas crónicas, etc.

A pesar de la alta frecuencia con que se presentan problemas gastrointestinales en la población mexicana y de que muy probablemente muchos son provocados por *C. perfringens*, en nuestro país se desconoce la incidencia del microorganismo en heces fecales de personas sanas, por lo cual consideramos importante cuantificar las esporas del microorganismo y además determinar la presencia de cepas productoras de enterotoxina en heces fecales de humanos sanos.

Para este estudio se analizaron 200 muestras de heces fecales de individuos sin enfermedad que viven en los municipios del área metropolitana de Monterrey, realizándose un muestreo estratificado no proporcional. Los resultados de enumeración de esporas y algunas características de cada individuo como: localidad, edad, y sexo, se sometieron a un análisis de varianza para determinar si alguna de estas variables influía de manera significativa sobre el número de esporas.

Dicho análisis estadístico con un grado de confiabilidad del 95%, mostró que los valores de esporas presentaron una distribución normal, obteniéndose una media numérica para la población en un rango de 5×10^3 a 14×10^3 esporas/g de heces fecales. Este valor no fue afectado de manera significativa por ninguna de las variables consideradas. Se encontró que el 27% de los individuos analizados presentaron cifras de esporas mayores de 10^5 por g, siendo los ancianos y los residentes de Santa Catarina los que presentaron con mayor frecuencia cifras altas

Para determinar las cepas productoras de enterotoxina se hizo la detección del gen que codifica para la enterotoxina, mediante la técnica de hibridación de ADN a los aislados de *C. perfringens*. De las 200 muestras que se analizaron se aislaron 312 cepas del microorganismo, sometiéndose 225 a la prueba de hibridación; el gen se encontró en 9 aislados (4.0%), que fueron obtenidos a partir de 8 muestras, donde se analizaron 113 individuos. Determinándose que el 7.0% de la población analizada fue portadora de cepas que presentan el gen, correspondiendo en su mayoría a los residentes de Santa Catarina y a los ancianos.

INTRODUCCION

Clostridium perfringens también conocido como *C. welchii* es una bacteria de forma bacilar, grampositiva, anaerobia, termófila, esporulada, capsulada, inmóvil, con un tiempo de generación muy corto (7 - 8min). Esta es considerada como una de las bacterias patógenas más ampliamente distribuidas, presentándose en suelo, aire, alimentos, microflora intestinal del hombre y de la mayoría de los animales (Smith, L.D.S. and L.V. Holdeman, 1968) Las cepas de este microorganismo han sido clasificadas en 5 tipos (A - E) en base a la producción de 4 exotoxinas (alfa, beta, epsilon e iota), las cepas del tipo A son las más importantes como causantes de enfermedades en humanos (Smith, L.D.S and B.L. Williams, 1984); y pueden estar presentes en suelo (Duncan, C.L., et al 1968; Labbé, R.G., 1989)

Las cepas de *C. perfringens* de los tipos B al E en su mayoría no se encuentran en el suelo y son parásitos obligados de animales domésticos, en los que pueden ocasionar enfermedades como la disentería del cordero, enterotoxemia en cerdos, cabras, corderos y vacas (Labbé, R.G., 1989)

Desde hace más de cien años a *C. perfringens* se le ha considerado el agente causal de la gangrena gaseosa y de varias enfermedades veterinarias. En 1940 se le relacionó por primera vez con intoxicaciones alimentarias por Knox y Mac Donald en Inglaterra y McClung en E.U.A. (Hobbs, P., 1979). Posteriormente en 1968 se descubrió que existían cepas de este microorganismo que producían una enterotoxina responsable de enfermedades gastrointestinales en humanos (Duncan, C.L., et al. 1968)

Una de las enfermedades más frecuente es la intoxicación alimentaria, la cual ocurre al ingerir alimentos contaminados con altos números del microorganismo, el cual esporula y produce la enterotoxina en el intestino delgado. Posteriormente cuando la espora queda libre, la enterotoxina es liberada. Esta toxina se ha encontrado que reconoce receptores específicos presentes en la membrana de las células del borde de cepillo, en la región del ileon del intestino delgado, donde provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana de las células intestinales, lo que ocasiona un aumento en el flujo de agua y sodio hacia el lumen intestinal, así como falta de absorción de glucosa, desencadenándose la sintomatología de la enfermedad (Wnek, A.P. and B.A. McClane, 1989).

Dicha enfermedad se ha visto que se presenta de 6 a 20 h después de la ingestión del alimento contaminado y consiste en una diarrea profusa, acompañada de dolor abdominal en la que rara vez se presentan mareos y vómito (McClane, B.A., *et al.* 1988; Uemura, T., 1978; McDonel, J. and B. McClane, 1979). Esta enfermedad puede ocasionar la muerte en individuos débiles y de edad avanzada (Labbé, R.G., 1989; Shandera, W.X., 1983).

Se ha determinado que la enterotoxina es una proteína constituida por una sola cadena de 320 aminoácidos, con un peso molecular de 35 kDa, un punto isoeléctrico de 4.3, sensible al calor, antigénica, causante de eritemas en piel de cerdos y conejos, que tiene acción sobre células Vero. (Yotis, W.W. and C. Costantinoplas, 1975, McClane, B.A., *et al.* 1988, Duncan, C.L., *et al.* 1969; Hauschild, A.H.W., 1970; Alouf, E., *et al.* 1984).

Las cepas de *C. perfringens* productoras de enterotoxina también han sido asociadas a una colitis que se caracteriza por diarreas infecciosas crónicas con duración de 9 a 10 días, las cuales no tienen relación con intoxicaciones alimentarias.

Dicha enfermedad se presenta principalmente en ancianos tratados con antibióticos tales como benzilpenicilina, amoxycilina y trimetoprim. sin embargo, en algunos pacientes no tratados también se ha detectado, encontrándose cifras de esporas iguales o mayores a 10^9 por g de heces fecales. Debido a que las cepas de *C. perfringens* responsables de esta enfermedad se han aislado del medio ambiente y de manos de pacientes enfermos, se ha sugerido que el microorganismo puede llegar a comportarse como un agente infeccioso constante (Borriello, S.P., *et al.* 1984 and Borriello, S.P., *et al.* 1985).

Dado que se ha determinado que *C. perfringens* es un residente normal en flora intestinal, se ha pensado que posiblemente se requieran ciertas condiciones que le permitan colonizar el intestino delgado del individuo y así poder esporular produciendo la enterotoxina y por consecuencia la diarrea (Uemura, T., 1978). Entre estos factores se han mencionado una dieta alimenticia pobre en fibra, presencia de sales biliares, terapia con antibióticos y el consumo de sustancias químicas que son capaces de estimular la esporulación del microorganismo, como la cafeína (Benno, Y., *et al.* 1989; Labbé, R.G. and L.L. Nolan, 1981; Borriello, S.P., *et al.* 1984; Heredia, N.L., *et al.* 1991). Se ha determinado que algunos antibióticos pueden eliminar parte de la flora normal del intestino, permitiendo que el número de *C. perfringens* se eleve, además de que estimulan la esporulación del mismo y por consecuencia la producción de la enterotoxina (Borriello, S.P., *et al.* 1985).

Además las cepas del tipo A productoras de enterotoxina han sido asociadas con el síndrome de muerte súbita de infantes. Se ha sugerido que la enterotoxina actúa mediante un proceso bioquímico en cascada que altera el control respiratorio, provocando la muerte en infantes inmunológicamente vulnerables (Lindsay, J.A., *et al.* 1993).

ANTECEDENTES

Epidemiología de enfermedades causadas por *C. perfringens*:

En 1980 *C. perfringens* llegó a ocupar el segundo lugar como el causante de intoxicaciones alimentarias bacterianas en E.U.A. (Shandera, W.X., 1983)

En un estudio sobre la incidencia del microorganismo en personas sanas realizado en E.U.A., se reportaron cuentas de 10^3 a 10^5 esporas por gramo de heces fecales. Se ha determinado que la bacteria se establece a partir de los 6 meses de edad. Por otro lado, cuando el estudio se realizó a enfermos se encontraron valores de 10^6 hasta 10^8 o más esporas por g de heces fecales (Harmon, S M., *et al.* 1986; Hauschild, A.H.W. and R. Hilsheimer, 1974). Para ancianos sin enfermedad se han reportado niveles que varían entre 10^5 a 10^7 esporas por g (Stringer, M.F., 1981; Yamagishi, T., *et al.* 1976; Jackson, S.G., *et al.* 1986). Estas cifras elevadas determinadas en ancianos han sido correlacionadas con la presencia de enteritis en individuos de edad avanzada (Jackson, S.G., *et al.* 1986).

En Canadá, *C. perfringens* ha llegado a ocupar el segundo lugar como el causante de enfermedades alimentarias bacterianas (Labbé, R.G., 1991). En estudios realizados en este país se han reportado cuentas iguales o mayores de 10^6 esporas por g de heces fecales en individuos enfermos (Hauschild, A. H. W., 1975).

Por otra parte, en Inglaterra este microorganismo se reportó como el causante del 10 al 28% de las intoxicaciones alimentarias que se registraron en 1980 (Hepner, E., 1980).

Se han realizado investigaciones en Japón, en donde se ha reportado el aislamiento de cepas de *C. perfringens* productoras de enterotoxina, de alimentos, heces fecales de animales y de humanos sanos (Yasukawa, A., *et al.* 1975; Sunagawa, H., *et al.* 1987). Además se han encontrado cifras altas del microorganismo en el intestino de ancianos sin enfermedad, que recibieron una dieta alimenticia baja en fibra (Benno, Y., *et al.* 1989). En un estudio donde se analizaron 80 muestras de heces fecales provenientes de manipuladores de alimentos, se encontró que 46 presentaron el microorganismo, además se detectó que 5 de ellos contenían cepas enterotoxigénicas. En este estudio se logró el aislamiento de 55 cepas de *C. perfringens* de las cuales 7 fueron enterotoxigénicas (Saito, M., 1990). Además Sunagawa y colaboradores en 1987 analizaron las heces fecales de 434 personas sanas, donde determinaron la presencia de cepas enterotoxigénicas solamente en 20 de las muestras, obteniéndose también que un 3.5% de los aislados resultaron ser capaces de producir la enterotoxina *ex vivo*.

Existen reportes de Inglaterra en los que se determinó el gen que codifica para la enterotoxina, en aislados de *C. perfringens* provenientes de alimentos y heces fecales de personas con intoxicación alimentaria. En ellos se encontró que un 57% de los aislados presentaron dicho gen (Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1990).

Por otro lado en Holanda se tienen reportes en los que se determinó que el 6% de los aislados de *C. perfringens* de heces fecales de animales sin enfermedad, fueron portadores del gen que codifica para la enterotoxina (Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1989).

Aislamiento, identificación y enumeración de *C. perfringens*:

Desde 1953 Hobbs y colaboradores utilizaron el medio de Agar Sangre Soya Tripticasa (TSB) para recuperación y enumeración de *C. perfringens* a partir de heces fecales de humanos. Después en 1965 se formuló el medio de Triptona Sulfito Neomicina (TSN) para lograr un aislamiento selectivo del *C. perfringens* (Marshall, R. S., *et al.* 1965). Más tarde en 1969 se propuso la enumeración del microorganismo en heces fecales de pacientes enfermos para confirmar si él era el responsable en brotes de intoxicación alimentaria (Sutton, R. G. A., 1969). Hauschild en 1975 reportó que era preferible la enumeración de esporas, ya que éstas eran más estables que las células vegetativas. En 1971 Harmon y otros usaron el medio de Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC) para la recuperación de *C. perfringens*. En 1982 Mead y colaboradores probaron el medio (TSC) para analizar productos cárnicos, observando que una alta proporción de los aislados correspondieron a la bacteria. Otro medio que se elaboró para el aislamiento de este microorganismo fue el de Oleandomicina Polimixina

Sulfadiacina *Perfringens* (OPSP), sin embargo éste resultó menos selectivo que el TSC (Handford, P.M. and J.J. Cavett, 1973).

Posteriormente en 1987 Harmon y Kautter compararon cuatro diferentes medios para enumeración de esporas de *C. perfringens* en heces fecales de humanos, donde determinaron que el medio más convincente fue el TSC. La mayoría de los medios para aislamiento de *C. perfringens*, se basan en la habilidad del microorganismo para reducir el sulfito a sulfuro, dando lugar a la formación de colonias negras (Shaidi, S.A. and A.R. Ferguson, 1971).

Para confirmar la identidad de los aislados, ya desde 1976 se había sugerido la realización de pruebas de movilidad, fermentación de lactosa, hidrólisis de gelatina y reducción de nitratos (Harmon, S. M , 1976).

Detección de cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens*:

Actualmente en investigaciones epidemiológicas de brotes de intoxicación alimentaria se pueden utilizar, tanto la detección del gen que codifica para la enterotoxina, como los ensayos serológicos que determinan la producción de la enterotoxina *ex vivo* (Birkhead, G., *et al.* 1988; Notermans, S., *et al.* 1984; Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1990).

Sin embargo en relación con los ensayos serológicos como el análisis inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) hay reportes donde se comenta, que se pueden presentar resultados positivos falsos. debido a una falta de especificidad (Berry. P. R., *et al.* 1988; Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1990).

Otra objeción para utilizar los ensayos serológicos era que se requería que los aislados esporularan *ex vivo* y que produjeran niveles detectables de la enterotoxina. Sin embargo se ha afirmado que el 40% de las cepas de *C. perfringens* que presentaban el gen para la enterotoxina, no presentaron capacidad para esporular *ex vivo*, por lo cual no producen la enterotoxina en el laboratorio dando resultados negativos falsos, cuando se hacen determinaciones mediante ensayos serológicos (Kokai-Kun, J.F., *et al.* 1994). Debido a lo anterior, las sondas de ADN específicas para la detección del gen se consideraron más confiables, porque solamente se requería de cultivos con células vegetativas (Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1990). Además el gen que codifica para la producción de la enterotoxina está altamente conservado, por lo que se ha considerado que la hibridación del ADN es un método adecuado y confiable para la identificación de cepas de *C. perfringens* potencialmente productoras de enterotoxina (Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1990 ; Kokai-Kun, J F., *et al.* 1994).

Las técnicas que se han reportado como adecuadas para detectar dicho gen son: el PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), la utilización de una sonda marcada con digoxigenina o la sonda radiactiva (Saito, M., 1992; Tschirdewahn, B.S., *et al.* 1991; Van Damme-Jongsten, M., *et al.* 1990).

Debido a que no existen datos epidemiológicos que nos indiquen la incidencia de *C. perfringens* en nuestro medio, en este trabajo pretendemos analizar este aspecto, a fin de ayudar al conocimiento de la patogenicidad de las enfermedades que éste ocasiona.

HIPOTESIS

- 1.-En la población del área metropolitana de Monterrey, existen individuos sin enfermedad aparente que son portadores de cepas de *Clostridium perfringens* que presentan el gen de la enterotoxina.
- 2.-Los ancianos presentan los niveles más elevados de esporas de *C. perfringens* en sus heces fecales.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar el número de esporas de *C. perfringens* en heces fecales de humanos sin enfermedad aparente, que viven en el área metropolitana de Monterrey, N.L.
- 2,- Determinar si existen diferencias significativas entre los valores de esporas presentados por los diferentes grupos de individuos según su edad, sexo y municipio del que son residentes.
- 3.- Detectar la presencia del gen que codifica para la enterotoxina mediante la prueba de hibridación de ADN, en las cepas de *C. perfringens* aisladas de la población antes mencionada.

MATERIAL Y METODO

Muestras:

Se realizó un muestreo estratificado no proporcional en el que se analizaron 200 muestras de heces fecales de individuos sin enfermedad aparente, a estas muestras se les determinó el número de esporas de *C. perfringens* por g. Los individuos muestreados son residentes de los municipios de Monterrey, San Nicolas, Guadalupe, San Pedro, y Santa Catarina, N L.

Para este estudio se tomaron en cuenta las siguientes características para cada individuo: edad, sexo y localidad, esto con el propósito de determinar si alguna de éstas variables tenía efecto significativo sobre el número de esporas del microorganismo.

Muestreo preliminar:

La población se dividió arbitrariamente en 4 grupos en base a la edad. Infantes (0 a 12 años), adolescentes (13 a 18), adultos (19 a 59) y ancianos (60 o más). El muestreo consistió en el análisis de 30 muestras por grupo, según la recomendación de Cochran W.G (1954) de utilizar 30 muestras como número mínimo por grupo, seleccionando 6 por municipio; por lo que en primera instancia fueron analizados 120 individuos.

Las muestras de heces fecales se mantuvieron congeladas hasta que fueron analizadas. Además se utilizaron como controles las siguientes cepas de *C. perfringens* FD -1041, NCTC-8239, NCTC-8798, FD -1 y ATTC -3624

La metodología comprendió tres secciones:

- 1) Recuperación, aislamiento y enumeración del microorganismo.
- 2) Identificación de *C. perfringens*.
- 3) Detección del gen que codifica para la enterotoxina de *C. perfringens*.

1).- Recuperación, aislamiento y enumeración de esporas de *Clostridium sp*:

Se pesó 1 g de heces fecales, al cual se le añadieron 9 ml de solución salina al 0.85% estéril (dilución 10^{-1}). Este se sometió a un choque térmico a 75 °C por 15 min. Posteriormente se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-5} . Estas fueron inoculadas en la superficie de placas con agar selectivo Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC, Difco), por el método de Miles y Misra, (1938). Este consistió básicamente en dejar caer una gota (25µl) de cada dilución en la superficie del agar. Después de que las gotas se absorbieron (aproximadamente 30 min.), se añadió una capa del mismo agar sobre la superficie del medio, la cual se dejó solidificar. Posteriormente las placas se incubaron a 43°C por 24 a 48 h bajo condiciones de anaerobiosis por el método de Gas-pack (BBL).

Después del tiempo de incubación, las colonias típicas (negras) fueron contadas determinándose el número de esporas del microorganismo por g de muestra. Se seleccionaron 5 colonias de cada muestra, las cuales se almacenaron a temperatura ambiente, como cultivos esporulados en medio de carne cocida.

2).- Identificación y enumeración confirmatoria de *C. perfringens*:

La confirmación de *C. perfringens* se hizo de la siguiente manera: a partir de los aislados que se presumía que fueran *Clostridium sp.* se tomó una alícuota que se inoculó en caldo tioglicolato recién preparado el cual se incubó a 37°C por 16 h. A partir de estos cultivos se inocularon medios para realizar las pruebas de movilidad, reducción de nitratos, producción de indol, hidrólisis de la gelatina y fermentación de la lactosa. Los medios utilizados fueron reducidos antes de inocularse, y posteriormente se incubaron por 24 - 48 h a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis.

Las cepas que mostraron movilidad-negativa, nitritos-positivo, indol-positivo, gelatinasa-positivo y lactosa-positivo, se identificaron como *C. perfringens*. Los valores de las enumeraciones presuntivas de esporas obtenidos en el punto anterior se corrigieron, según el número de aislados identificados como *C. perfringens* para cada muestra.

3) - Detección del gen que codifica para la enterotoxina de *C. perfringens*:

La detección se realizó mediante hibridación del ADN utilizando una sonda (oligonucleótido) de 40 bases con la siguiente secuencia: 5'ATGCTTAGTAACAATTTAAATCCAATGGTGTTCGAAAATG3'. correspondiente a una región del gen de la enterotoxina de *C. perfringens* (Van Damme-Jongsten, M., *et al* 1990). Dicho oligonucleótido fue donado por el Dr. Peter Feng de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de E.U A en Washington, D C . E U.A.

Hibridación en colonia:

Se les practicó la prueba de hibridación de ADN por duplicado a 225 aislados de heces fecales identificados como *C. perfringens*.

Las cepas de referencia que se utilizaron como controles fueron las siguientes: controles positivos (productoras de la enterotoxina): FD 1041, NCTC 8239 y NCTC 8798. Controles negativos: FD 1 y ATTC 3624.

La hibridación del ADN consistió en tres etapas:

a).- Fijación del ADN a la membrana.-

Las cepas de *C. perfringens* fueron inoculadas en caldo tioglicolato reciente, el cual se incubó a 37°C por 16 a 18 h para obtener un crecimiento abundante

Posteriormente se depositaron 50 µl de cada uno de los cultivos en una cámara Dot blot (Minifold I, Schleicher & Schuell Keene, NH) la cual contenía una membrana de nylon con poro de 0.45µ. El sistema fue conectado al vacío, dejándose secar por 20-30 min. Posteriormente fue colocada sobre papel filtro (Whatman No. 1) impregnado con solución desnaturalizante (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M y SDS al 0.1%) por 15 min, donde las células fueron lisadas, a continuación se pasó a una superficie con solución de neutralización (Tris-HCl 1.0 M y NaCl 1.5 M) por 5 min. Después la membrana fue transferida a un papel filtro impregnado con una solución reguladora de citratos 2X (0.3 M, pH 7 con NaCl 3 M) por 15 min.

Inmediatamente después fue fijado el ADN, sometiendo la membrana a 120°C por 30 min. Durante este tiempo la membrana se mantuvo húmeda por inmersión en solución de citratos 2X. Para remover los restos celulares que quedaron unidos a la membrana,

ésta se sumergió en solución de lavado (amortiguadora de citratos 3X con SDS al 0.1%) manteniéndola en agitación y a una temperatura de 68°C por 2 h.

b).- Hibridación del ADN.-

La membrana se colocó en 20 ml de solución de prehibridación [solución reguladora de citratos (5X) con (N-lauroilsarcosina al 0.1% y SDS al 0.2%)] donde se mantuvo sumergida por 2h a 68°C en agitación. Posteriormente se transfirió a una placa con 20 ml de solución de hibridación (solución de prehibridación más 1pmol por ml del oligonucleótido marcado en el extremo 3' con digoxigenina), donde se cubrió completamente manteniéndose en agitación a 56°C por 4-6 h

Una vez concluido este tiempo, la membrana se sometió a una serie de lavados de astringencia para eliminar el oligonucleótido que no hibridizó con el gen, estos consistieron en lo siguiente: lavado con amortiguador de citratos (2X con SDS al 0.1%) en 2 ocasiones con agitación constante a temperatura ambiente por 5 min, después se lavó 2 veces en solución de lavado amortiguadora de citratos (0.5X con SDS al 0.1%) con agitación a 56°C por 15 min.

c).- Detección colorimétrica.-

Se utilizó el sistema comercial (Genius, Bohering-Mannheim, 1995), el cual consistió en lo siguiente: la membrana fue equilibrada colocandose en una solución reguladora de lavado (Acido maléico 0.1 M pH7.5 con NaCl 0.15 M, y Twin 20 al 0.3%) donde se mantuvo por 1 min a temperatura ambiente. Después fue colocada en

solución de bloqueo (al 1% disuelto en solución reguladora de ácido maléico 0.1M) por 60 min con agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente la membrana se transfirió a una solución de conjugado (6 μ l de anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina y diluida en 30 ml de solución de bloqueo) en agitación y a temperatura ambiente por 30 min.

La membrana fue lavada en dos ocasiones en solución de lavado de ácido maléico a temperatura ambiente en agitación por 15 min en cada ocasión. Finalmente se colocó en solución reguladora de detección (Tris-HCl 0.1M pH 9.5 con NaCl 0.1M) por 2 min a temperatura ambiente. Por último se transfirió a 10 ml de solución reveladora [45 μ l de nitroazul tetrasolío, 35 μ l de 5-bromo 4-cloro 3 indolil-fosfato diluidos en 10 ml de regulador de detección] manteniéndose a temperatura ambiente en la obscuridad por varias horas, hasta observar una coloración azul - violeta en las reacciones positivas (cepas que presentaban el gen). Cuando se observó bien definida la reacción de color, se lavó la membrana en agua bidestilada.

Marcaje del oligonucleótido con digoxigenina

El marcaje de la sonda de ADN se realizó utilizando el hapteno digoxigenina, el cual se incorporó al extremo 3' del oligonucleótido por medio de una transferasa terminal, la cual adicionó el complejo digoxigenina-11-dUTP, sistema comercial (Genius, Boehringer-Mannheim, 1995).

El procedimiento fue como sigue: se marcaron dos oligonucleótidos, uno proporcionado por el sistema comercial (control +), así como el nuestro (utilizado en

prueba). Para lo cual se añadieron los reactivos en el orden y cantidad especificados en la siguiente tabla:

Reactivo	Olignucleótido	Olignucleótido
	Experimental	Control
	Volumen	Volumen
Solución Reguladora 5X	4µl	4µl
Solución de CoCl ₂	4µl	4µl
DIG- dUTP	1µl	1µl
Olignucleótido exp.	9µl (100 pmol)	-----
Olignucleótido control	-----	5µl. (100 pmol)
dATP	1µl	1µl
Transferasa terminal	1µl	1µl
Agua bidestilada y estéril	aforar a 20 µl	4µl

Posteriormente se incubaron a 37°C por 15 min en un baño con hielo y finalmente se añadió 1µl de EDTA (0.2 M) para detener la reacción del marcaje.

Estimación de la eficiencia del marcaje del olignucleótido

Para realizar dicha estimación, fue requerido el olignucleótido control ya marcado además de una serie de reactivos del sistema (Genius) de detección

1 -Se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-4} del oligonucleótido control en solución para dilución de ADN, obteniéndose las siguientes concentraciones del oligonucleótido:

Directo - 5.0 pmol / μ l

10^{-1} -0.5 pmol / μ l

10^{-2} -0.05 pmol / μ l

10^{-3} - 5.0 fmol / μ l

10^{-4} - 0.5 fmol / μ l

2.-El oligonucleótido experimental ya marcado también fue diluido (10^{-1} a 10^{-5}) de la misma manera que el control.

3 -Se depositó 1 μ l de cada dilución en una membrana de nylon

4.-Se fijó el ácido nucleico a la membrana calentando a 80 °C por 30 min.

5 -Posteriormente se humedeció la membrana en solución amortiguadora de lavado por 1 min.

6.-La membrana se depositó en solución de bloqueo por 5 min a temperatura ambiente.

7.-Después fue incubada con anti-DIG- fosfatasa alcalina diluida en solución de bloqueo, por 10 min a temperatura ambiente.

8.-Se lavó dos veces la membrana en solución de lavado a temperatura ambiente por 5 min.

9.-Posteriormente se incubó en regulador de detección por 2 min y finalmente se depositó en solución de detección donde se mantuvo en la oscuridad por 30 a 60 min.

10.-La reaccion de color fue bloqueada lavando la membrana con agua bidestilada por 5 min.

11 -Se estimó la concentración de la sonda (experimental) comparando la intensidad del color que esta desarrolló, con el que desarrollaron las diferentes diluciones del oligonucleótido control.

Análisis estadístico:

Los resultados del muestreo preliminar se sometieron a un análisis de varianza (significancia 0.05%), tomando en cuenta las características de edad, sexo y localidad como variables independientes y el número de esporas del microorganismo como variable dependiente.

En base a los resultados preliminares se determinó la existencia de estratos y el número de muestra óptimo para este estudio. Posteriormente se obtuvieron y analizaron las muestras restantes que fueron requeridas. Finalmente se sometieron todos los resultados (las cifras de esporas) y las características de cada individuo a un análisis de varianza.

Además se realizó también un análisis de variables categóricas de SAS (1990); tomándose como variables independientes la edad y el sexo y como variable dependiente el número de esporas. donde también se consideró la interacción de edad y sexo.

RESULTADOS

1) Análisis preliminar

Se realizó un muestreo preliminar, en el cual se analizaron 120 muestras: 30 de infantes, 30 de adolescentes, 30 de adultos y 30 de ancianos. Las cifras de esporas del microorganismo por gramo de muestra que se obtuvieron se transformaron a valores logarítmicos (base diez), los cuales fueron sometidos a un análisis de varianza

El análisis de varianza nos dió los siguientes resultados:

- a) Los valores de esporas mostraron una distribución normal en la población, determinándose que no existían estratos.
- b) Las medias numéricas de esporas que se obtuvieron para los diferentes grupos no fueron estadísticamente diferentes entre si, ya que los valores de F (Fisher) obtenidos no fueron mayores que los de F de tablas (tabla 1). Sin embargo, las medias de esporas de los grupos no fueron muy semejantes (tabla 2). En general, los valores de los parámetros estadísticos que se obtuvieron para la población fueron los siguientes: se obtuvo una media de 9.8×10^3 , una varianza de 4.7×10^2 , y una desviación estandar de **43.1**

Tabla 1 Valores de F (fisher) obtenidos en análisis de varianza (0 5º) de estudio preliminar

Variables	Grado libertad	Varianza	Fc	Ft
Edad				
entre grupos	3	1.7	0.65	8.5
dentro grupos	116	2.6		
Localidad				
entre grupos	4	4.2	1.6	2.4
dentro grupos	115	2.6		
Sexo				
entre grupos	1	2.5	0.95	25.4
dentro grupos	118	2.6		

Fc, valor fisher calculado, Ft, valor fisher de tabla.

Tabla 2.- Medias numéricas de esporas de *C. perfringens* /g de heces fecales, obtenidas en el análisis preliminar.

Variables	Grupos	Individuos analizados	Media X 10 ³ (esporas/g)
Edad	Infantes	30	6.9
	Adolescentes	30	5.3
	Adultos	30	15.3
	Ancianos	30	16.2
Municipio	San Nicolás	24	1.8
	Monterrey	24	20.9
	Guadalupe	24	10.2
	Sta. Catarina	24	16.4
	San Pedro	24	13.8
Sexo	Hombres	51	6.6
	Mujeres	69	13.1
	Población total	120	9.8

2) Tamaño de la muestra

En base a los resultados preliminares obtenidos en el análisis de varianza, se determinó el número de muestra óptimo requerido, el cual fuera representativo de la población; esto se realizó utilizando la fórmula de Taylor (1961) En base a esto se estimó que el tamaño de muestra, debería ser de 200 individuos

3) Análisis completo

Se colectaron y analizaron las 80 muestras restantes realizándose un muestreo estratificado no proporcional. en donde se analizaron en total 50 infantes, 46 adolescentes, 58 adultos y 46 ancianos, residentes en los 5 municipios estudiados del área metropolitana.

a) Enumeración e identificación - El número de esporas de *Clostridium* por g de heces fecales se determinó mediante la metodología ya descrita. Los valores de esporas que obtuvimos fluctuaron de menos de 400 hasta 21.3×10^6 (tabla 3), se determinó que un 27.0% de las muestras analizadas presentaron cifras de esporas mayores de 10^5

Tabla 3 - Distribución de muestras analizadas en base al número de esporas de *C. perfringens*

Variables	Grupos	# de muestras	(# de Esporas g de muestra X 1000)			
			0 1-10	10 01-100	100.01-1000	Mayor de 1000
Edad	Infantes	50	31	8	9	2
	Adolescentes	46	22	11	10	3
	Adultos	58	37	7	5	9
	Ancianos	46	24	6	8	8
Municipio	San. Nicolás	74	45	14	10	5
	Monterrey	38	20	6	10	2
	Guadalupe	33	20	5	4	4
	Sta Catarina	28	14	3	7	4
	San Pedro	27	15	4	1	7
	Población total	200	114	32	32	22

#, número; g, gramo.

Finalmente de un total de **200** muestras (tablas 11 a 17) analizadas se logró aislar al microorganismo de **126** de ellas, obteniéndose **312** aislados de *C. perfringens* (tabla 4).

Tabla 4.- Número de individuos en los que se recuperó *C.perfringens*.

Grupos	Individuos analizados	Individuos de los que se recuperó el microorganismo.	Aislados identificados del microorganismo
Poblacion total	200	126	312
Infantes	50	29	73
Adolescentes	46	33	80
Adultos	58	34	83
Ancianos	46	30	76

b) Análisis de varianza

Los valores de esporas de las 200 muestras se sometieron a un análisis de varianza (0.05%), obteniéndose lo siguiente:

I) Los valores de los números de esporas presentes en las heces fecales de la población mostraron una distribución normal, por lo que no existieron estratos en la misma

II) Las medias numéricas de esporas no mostraron diferencia significativa (tabla 5)

Los ancianos y los individuos del sexo femenino presentaron las medias numéricas de esporas más altas (tabla 6).

Tabla 5 - Valores de F (fisher) obtenidos en análisis de varianza

VARIABLES	Grado de libertad	Varianza	Fc	Ft
Edad				
entre grupos	3	2.05	0.83	8.5
dentro de grupos	196	2.46		
Localidad				
entre grupos	4	0.21	0.08	5.6
dentro de grupos	195	2.5		
Sexo				
entre grupos	1	3.01	1.22	3.89
dentro de grupos	198	2.45		

Fc, valor fisher calculado; Ft, valor fisher de tabla

Tabla 6 - Medias numericas de esporas de *C. perfringens* correspondientes a los diferentes grupos de individuos analizados.

Variables	Grupos	# de muestras analizadas	# de esporas g hf (rango)	Media
Edad	Infantes	50	-400 - 2.5 x 10 ⁶	5.1 x 10 ³
	Adolescentes	46	-400 - 3.9 x 10 ⁶	9.3 x 10 ³
	Adultos	58	-400 - 10.7 x 10 ⁶	5.2 x 10 ³
	Ancianos	46	-400 - 21.3 x 10⁶	13.4 x 10³
Municipio	San Nicolas	74	-400 - 7.5 x 10 ⁶	6.4 x 10 ³
	Monterrey	38	-400 - 7.0 x 10 ⁶	6.7 x 10 ³
	Guadalupe	33	-400 - 21.3 x 10⁶	7.9 x 10 ³
	Sta. Catarina	28	-400 - 8.3 x 10 ⁶	9.7 x 10³
	San Pedro	27	-400 - 10.7 x 10 ⁶	8.3 x 10 ³
Sexo	Hombres	86	-400 - 8.3 x 10 ⁶	5.3 x 10 ³
	Mujeres	114	-400 - 21.3 x 10⁶	9.5 x 10 ³
	Poblacion total	200	-400 - 21.3 x 10 ⁶	7.4 x 10³

#, número; g, gramo; hf, heces fecales

III) Los valores de los parámetros estadísticos que se obtuvieron para la población analizada fueron: Una media general de 7.4×10^3 , con una varianza de 2.8×10^2 y una desviación estandar de 36.9

Con respecto al análisis de variables categóricas de SAS (1990), se analizó la variable dependiente número de esporas tomándose los valores nominales (0, 0.33, 0.66, y 1), que representaron cifras de esporas bajas ($0-10^4$), moderadas ($10001-10^5$), altas ($100001- 10^6$) y muy altas (mayor de 10^6), respectivamente. Se encontró que la edad y el sexo no presentaron diferencia significativa ($P= 0.2888$ y $P= 0.3599$). La combinación de ambas variables también fue no significativa ($P= 0.5626$). Sin embargo

los resultados mostraron cierta tendencia cuando se analizó cada factor por separado para los diferentes niveles, en donde los infantes presentaron valores de esporas que estaban por debajo de la media, los adolescentes valores mayores a los de la media, para la población adulta se obtuvieron cuentas por abajo de la media, mientras que los ancianos presentaron valores que rebasaron la media numérica de esporas. Con respecto al sexo, se determinó que el sexo masculino presentó en general valores de esporas bajos, en tanto que el femenino arrojó cifras altas (tabla 7).

Tabla 7 Análisis de parámetros por niveles de cada factor obtenidos en prueba de SAS.

Variables	Niveles	Valor del parámetro
Edad	0 - 12 años	-0 06
	13 - 18 años	0 02
	19 - 59 años	-0 02
	60 o más	0 08
Sexo	Masculino	-0 02
	Femenino	0 02

d) Detección del gen

La determinación del gen que codifica para la enterotoxina de *C. perfringens* se realizó a los aislados de 113 individuos, determinándose que solamente 8 individuos presentaron cepas del microorganismo portadoras del gen, correspondiendo al 7.0 % de las muestras analizadas. De ellas se encontró que 4 de las muestras fueron de individuos de Santa Catarina, lo que correspondió al 23.5% de los individuos

muestreados en Santa Catarina, en relación a la edad. 4 muestras correspondieron a ancianos obteniéndose que el 13.7% de estos presentaron cepas del microorganismo potencialmente productoras de enterotoxina, finalmente con respecto al sexo se encontró que 5 muestras fueron del sexo masculino y 3 del femenino (tabla 8).

Tabla 8.- Individuos positivos para el gen de la enterotoxina de *C. perfringens*

Variables	Grupos	Individuos analizados	I. de los que se recuperó el M.O.	I. a los que se realizó p/hib	I (+) para el gen de enterotoxina	% individuos (+) para el gen
Edad	Infantes	50	29	26	1	3.8
	Adolescentes	46	33	27	0	---
	Adultos	58	34	31	3	9.6
	Ancianos	46	30	29	4	13.7
Municipio	San Nicolás	74	47	42	3	7.1
	Monterrey	38	23	18	1	5.5
	Guadalupe	33	23	22	0	---
	Sta Catarina	28	17	17	4	23.5
	San Pedro	27	16	14	0	---
Sexo	Masculino	86	48	42	5	11.9
	Femenino	114	78	71	3	4.2
	Población total	200	126	113	8	7

I, individuos; p, prueba; hib. hibridación, (+), positivo; %, por ciento

Además determinamos que las 8 muestras que presentaron cepas portadoras del gen, todas arrojaron cifras de esporas altas rebasando valores de 10^5 esporas por g de muestra (tabla 9).

Tabla 9 - Características de los individuos que fueron portadores de cepas de *C. perfringens* potencialmente productoras de enterotoxina

Edad (años)	Sexo	Localidad	# de esporas g h f	# de aislados	# de <i>C. perfringens</i>	# de cepas (+) gen
1	m	S.N.	5.6×10^7	5	5	1
20	f	S.N.	20.8×10^7	5	3	1
32	m	S.C.	83.1×10^5	5	5	1
55	f	S.C.	1.2×10^5	4	3	1
62	m	S.N.	5.6×10^5	5	4	1
69	f	M	5.6×10^5	4	4	1
70	m	S.C.	9.5×10^5	5	2	1
90	m	S.C.	31.6×10^5	4	4	2

#, número; g, gramo, h.f., heces fecales, (+). positivas, m, masculino; f, femenino, S.N., San Nicolas, S.C., Sta. Catarina; M, Monterrey

El número de aislados de *Clostridium perfringens* a los que se les practicó la prueba de hibridación del ADN, fue de 225 de los cuales solamente 9 presentaron el gen, determinándose que solamente el 4.0% de los aislados analizados resultaron ser potencialmente productores de la enterotoxina de *C. perfringens* (tabla 10).

Tabla 10 - Numero y porciento de aislados positivos para el gen de la enterotoxina de

C. perfringens.

Variables	Grupos	# de muestras	M de las que se recuperó el M.O.	Numero de <i>C.perfringens</i> identificados	# de aislados p/hibri	Aislados (+)/gen	% aislados (+) gen
Edad	Infantes	50	29	73	47	1	2.1
	Adolescentes	46	33	80	57	0	---
	Adultos	58	34	83	59	3	5
	Ancianos	46	30	76	62	5	8
Municipio	San Nicolás	74	47	127	77	3	3.8
	Monterrey	38	23	51	37	1	2.7
	Guadalupe	33	23	51	42	0	---
	Sta Catarina	28	17	43	38	5	13.1
	San Pedro	27	16	40	31	0	---
Sexo	Masculino	86	48	126	80	6	7.5
	Femenino	114	78	186	145	3	2
	Población total	200	126	312	225	9	4

#, número; M, muestras; M.O., microorganismo; p, prueba; hibri., hibridación; (+), positivos; %, porciento.

Tabla 11 - Características de los individuos analizados.

Muestra	Sexo	Edad (años)	Localidad	Numero de esporas	Gen de la enterotoxina
1	m	2	SN	-4.0×10^{-1}	(--)
2	m	24	SN	-4.0×10^{-1}	(--)
3	m	20	SC	-4.0×10^2	(--)
4	f	24	SP	1.3×10^6	(A)
5	m	1	SN	5.6×10^5	(P)
6	f	22	SN	1.9×10^4	(--)
7	f	19	M	6.0×10	(A)
8	m	18	SN	-4.0×10^2	(--)
9	f	36	M	2.8×10^3	(A)
10	f	56	SN	-4.0×10^{-1}	(--)
11	m	14	M	-4.0×10^2	(--)
12	f	39	SC	-4.0×10^2	(--)
13	m	21	SN	3.9×10^4	(A)
14	f	23	M	3.9×10^2	(--)
15	f	17	SN	-4.0×10^2	(--)
16	f	18	SN	-4.0×10^2	(--)
17	f	20	M	-4.0×10^2	(--)
18	m	20	M	1.8×10^4	(A)
19	f	68	SN	1.8×10^4	(A)
20	m	33	G	-4.0×10^2	(--)
21	f	28	G	2.3×10^6	(A)
22	m	1	M	-4.0×10^2	(--)
23	m	19	M	3.6×10^5	(A)
24	m	9	G	3.9×10^3	(A)
25	f	18	SN	3.9×10^4	(A)
26	m	2	SN	3.9×10^4	(A)
27	m	10	M	1.5×10^6	(A)
28	m	6	G	3.9×10^4	(--)
29	f	2	SN	3.9×10^3	(A)
30	m	4	SN	3.9×10^3	(A)

f, femenino. m, masculino; SN, S Nicolas, M, Monterrey, G, Guadalupe, SC, S Catarina, SP, S Pedro, (P), presente; (A), ausente, (--), no determinado

Tabla 12 - Características de los individuos analizados.

Muestra	Sexo	Edad (años)	Localidad	Número de esporas	Gen de la enterotoxina
31	f	10	G	-4.0×10^2	(--)
32	f	9	G	-4.0×10^2	(--)
33	f	34	G	1.6×10^3	(A)
34	m	6	SN	-4.0×10^2	(--)
35	f	11	M	3.9×10^4	(--)
36	m	21	SN	-4.0×10^2	(--)
37	m	2	M	-4.0×10^2	(--)
38	f	4	M	-4.0×10^2	(--)
39	m	20	M	-4.0×10^2	(--)
40	f	19	SN	-4.0×10^2	(--)
41	m	60	SN	-4.0×10^2	(--)
42	f	2	G	-4.0×10^2	(--)
43	f	6	G	4.7×10^3	(A)
44	m	8	M	7.9×10^5	(--)
45	f	44	M	-4.0×10^2	(--)
46	f	17	M	6.4×10^5	(A)
47	m	36	M	1.0×10^2	(--)
48	m	24	M	1.0×10^2	(--)
49	m	15	SN	1.4×10^3	(A)
50	f	21	SC	1.4×10^6	(A)
51	m	2	SC	1.0×10^3	(--)
52	f	46	SP	-4.0×10^2	(--)
53	m	15	M	3.9×10^4	(--)
54	f	15	M	6.0×10^3	(A)
55	m	78	SN	-4.0×10^2	(--)
56	f	75	SN	1.8×10^4	(A)
57	f	19	SP	2.3×10^4	(A)
58	m	64	SN	7.9×10^5	(A)
59	m	13	SN	3.9×10^3	(--)
60	m	10	G	3.9×10^5	(A)

f, femenino, m, masculino, SN, S. Nicolás, M, Monterrey; G, Guadalupe; SC, S. Catarina, SP, S. Pedro; (P), presente, (A), ausente, (--), no determinado.

Tabla 13 - Características de los individuos analizados.

Muestra	Sexo	Fdad (años)	Localidad	Numero de esporas	Gen de la enterotoxina
61	f	13	M	1.9×10^7	(--)
62	f	4	SC	7.9×10^2	(A)
63	f	63	M	1.5×10^5	(A)
64	f	2	SC	7.9×10^7	(A)
65	f	23	SC	1.9×10^7	(A)
66	m	13	G	3.9×10^2	(A)
67	f	21	G	3.9×10^3	(A)
68	f	25	G	4.7×10^3	(A)
69	f	69	M	5.6×10^5	(P)
70	m	65	SN	-4.0×10^2	(--)
71	f	79	M	3.6×10^5	(A)
72	f	62	M	3.9×10^2	(A)
73	f	40	SN	2.1×10^3	(A)
74	f	75	G	2.2×10^4	(A)
75	m	18	SC	1.0×10^5	(A)
76	m	13	G	-4.0×10^2	(--)
77	f	65	M	-4.0×10^2	(--)
78	f	44	G	2.2×10^3	(A)
79	m	17	M	1.0×10^6	(A)
80	m	6	G	1.9×10^4	(A)
81	m	13	G	6.0×10^4	(A)
82	m	17	M	1.1×10^4	(A)
83	m	60	SP	-4.0×10^2	(--)
84	f	12	SC	2.1×10^5	(A)
85	f	1	SC	5.2×10^5	(A)
86	f	2	SC	-4.0×10^2	(--)
87	f	76	M	4.7×10^5	(A)
88	m	32	SC	8.3×10^6	(P)
89	f	1	SC	-4.0×10^2	(--)
90	f	51	SC	2.0×10^6	(A)

f, femenino; m, masculino, SN, S Nicolás, M, Monterrey, G, Guadalupe, SC, S Catarina; SP, S Pedro, (P), presente, (A), ausente, (--), no determinado.

Tabla 14 - Características de los individuos analizados.

Muestra	Sexo	Ldad (años)	Localidad	Número de esporas	Gen de la enterotoxina
91	f	69	SC	-4.0×10^2	(--)
92	f	55	SC	1.2×10^5	(P)
93	m	18	SC	6.4×10^4	(A)
94	f	14	G	2.3×10^5	(A)
95	m	60	G	7.9×10^9	(A)
96	f	16	G	1.9×10^2	(A)
97	f	15	SC	1.2×10^5	(A)
98	m	13	G	8.7×10^4	(A)
99	m	62	G	-4.0×10^2	(--)
100	m	70	SC	9.5×10^5	(P)
101	m	90	SC	3.23×10^6	(P)
102	f	67	SC	1.0×10^6	(A)
103	f	19	SP	1.0×10^7	(--)
104	m	18	SP	-4.0×10^2	(--)
105	m	12	SC	-4.0×10^2	(--)
106	m	13	SC	-4.0×10^2	(--)
107	f	69	G	1.8×10^3	(A)
108	f	71	G	2.1×10^7	(A)
109	f	68	G	-4.0×10^2	(--)
110	m	13	SC	-4.0×10^2	(--)
111	f	25	SP	-4.0×10^2	(--)
112	f	23	SP	-4.0×10^2	(--)
113	m	69	SC	-4.0×10^2	(--)
114	f	1	SP	1.9×10^4	(A)
115	f	70	SC	1.5×10^4	(A)
116	m	18	SP	1.5×10^3	(--)
117	m	18	SP	-4.0×10^2	(--)
118	f	8	SP	-4.0×10^2	(--)
119	f	10	SP	1.9×10^4	(A)
120	f	2	SP	-4.0×10^2	(--)

f, femenino, m, masculino, SN, S. Nicolas; M, Monterrey; G, Guadalupe; SC, S. Catarina, SP, S. Pedro; (P), presente, (A), ausente; (--), no determinado

Tabla 15 - Características de los individuos analizados

Muestra	Sexo	Edad (años)	Localidad	Número de esporas	Gen de la enterotoxina
121	f	2	SP	3.4×10^3	(A)
122	m	3	SP	3.0×10^5	(A)
123	f	18	SP	8.9×10^4	(A)
124	f	62	SP	-4.0×10^2	(--)
125	f	60	SP	8.9×10^3	(A)
126	f	19	SP	7.9×10	(A)
127	m	17	SP	3.6×10	(A)
128	f	60	SP	2.5×10	(A)
129	f	19	SP	1.8×10^6	(A)
130	f	61	SP	-4.0×10^2	(--)
131	f	17	SP	-4.0×10^2	(--)
132	f	90	SP	4.1×10^6	(A)
133	m	5	SN	-4.0×10^2	(A)
134	f	20	SN	-4.0×10^2	(--)
135	f	65	SN	-4.0×10^2	(--)
136	f	60	G	1.1×10^6	(A)
137	f	13	G	-4.0×10^2	(--)
138	f	46	G	-4.0×10^2	(--)
139	f	80	M	7.2×10^6	(A)
140	m	1	G	-4.0×10^2	(--)
141	m	2	SN	1.9×10^4	(A)
142	m	63	SN	1.9×10^3	(A)
143	f	5	SN	9.5×10^3	(A)
144	m	17	SN	1.3×10^3	(--)
145	m	62	SN	5.6×10^5	(P)
146	f	38	SN	-4.0×10^2	(--)
147	m	13	SN	8.9×10^5	(A)
148	m	6	SN	-4.0×10^2	(--)
149	f	21	SN	4.7×10^5	(A)
150	f	63	G	1.0×10^3	(A)

f, femenino, m, masculino, SN, S Nicolás, M, Monterrey, G, Guadalupe, SC, S Catarina, SP, S Pedro. (P) presente, (A), ausente, (--), no determinado

Tabla 16 - Características de los individuos analizados

Muestra	Sexo	Edad (años)	Localidad	Número de esporas	Gen de la enterotoxina
151	f	18	SN	7.9×10^4	(A)
152	f	62	SN	1.2×10^4	(A)
153	f	22	SN	3.9×10^4	(A)
154	m	64	M	-4.0×10^2	(--)
155	m	15	SN	3.9×10^0	(A)
156	m	74	M	-4.0×10^2	(--)
157	m	50	SN	-4.0×10^2	(--)
158	f	46	SN	1.0×10^3	(--)
159	f	13	SN	2.3×10^4	(A)
160	m	1	SN	-4.0×10^2	(--)
161	m	3	SN	-4.0×10^2	(--)
162	f	20	SN	2.0×10^6	(P)
163	m	4	SN	4.8×10^2	(A)
164	f	1	SN	1.0×10^4	(A)
165	f	61	SN	2.3×10^3	(A)
166	f	15	SN	3.4×10^5	(--)
167	m	16	SN	1.2×10^5	(A)
168	f	60	SN	1.3×10^4	(--)
169	f	1	SN	8.3×10^5	(A)
170	m	14	SN	-4.0×10^2	(--)
171	f	17	SN	1.1×10^6	(A)
172	f	20	SN	-4.0×10^2	(--)
173	m	11	SN	3.0×10^6	(A)
174	f	85	SN	-4.0×10^2	(--)
175	f	19	SN	7.9×10^3	(A)
176	f	65	SN	1.5×10^3	(A)
177	m	1	SN	-4.0×10^2	(--)
178	f	24	SN	9.1×10^3	(A)
179	m	13	SN	-4.0×10^2	(--)
180	m	23	G	8.3×10^5	(A)

f, femenino, m, masculino; SN, S. Nicolas; M, Monterrey, G, Guadalupe, SC, S. Catarina, SP, S. Pedro, (P), presente, (A), ausente. (--), no determinado.

Tabla 17 - Características de los individuos analizados

Muestra	Sexo	Ldad (años)	Localidad	Numero de esporas	enterotoxina
181	m	16	SN	2.8X10 ⁷	(A)
182	m	18	M	1.0X10 ⁷	(A)
183	m	1	M	3.6X10 ⁴	(A)
184	f	47	M	1.9X10 ¹	(A)
185	m	19	SC	7.9X10 ³	(A)
186	f	25	SN	6.3X10 ³	(A)
187	f	45	SN	4.0X10 ²	(--)
188	f	67	SN	7.5X10 ⁶	(--)
189	m	13	SN	4.0X10 ⁷	(--)
190	f	2	SN	7.9X10 ⁵	(A)
191	m	16	SN	1.0X10 ⁵	(A)
192	m	35	SN	6.0X10 ⁴	(A)
193	m	21	SN	4.0X10 ²	(--)
194	f	36	M	4.0X10 ²	(--)
195	f	1	M	4.0X10 ²	(--)
196	f	68	SN	7.9X10 ³	(A)
197	f	70	SC	4.0X10 ²	(--)
198	f	40	SP	4.0X10 ²	(--)
199	f	18	G	3.9X10 ⁷	(A)
200	m	1	M	4.0X10 ²	(--)

f, femenino, m. masculino, SN, S Nicolas; M, Monterrey; G, Guadalupe; SC, S Catarina; SP, S Pedro; (P), presente, (A), ausente, (--), no determinado

DISCUSION

Con respecto a la presencia de *C. perfringens* en heces fecales de humanos sin enfermedad, nosotros determinamos la presencia del microorganismo en cifras considerablemente altas, incluso en infantes menores de un año, a pesar de que está reportado que el microorganismo empieza a establecerse como flora normal del intestino a partir del sexto mes de edad (Harmon, S.M., *et al.* 1986). El 73% de los individuos analizados presentaron cifras de 10^2 a 10^5 esporas por g de heces fecales en donde se obtuvo una media general de 7.4×10^3 . Estos valores son similares a los reportados para poblaciones sin enfermedad, de E.U.A. y Canadá, en donde se reporta una incidencia de 10^3 a 10^4 o hasta 10^5 esporas por g (Harmon, S.M., *et al.* 1986; Hauschild, A.H.W and R. Hilsheimer, 1974). Sin embargo un 27% de la población analizada arrojó cifras de esporas superiores a 10^5 , a pesar de que valores de 10^6 o más son presentados por individuos con enfermedades gastrointestinales por *C. perfringens*. También determinamos que los ancianos presentaron las cifras de esporas más altas, lo cual concuerda con los valores de 10^5 a 10^7 esporas /g que se reportan para poblaciones de ancianos sanos en E.U.A. y Japón (Stringer, M.F., 1981 and Yamagishi, T., *et al.* 1976), sin embargo no determinamos una diferencia significativa de la media numérica de esporas de ancianos, al compararla con las otras medias que presentó la población.

Según el análisis de varianza, las variables consideradas (edad, sexo y localidad) no afectaron significativamente el número de esporas, sin embargo las medias numéricas que se determinaron para los diferentes grupos no fueron muy

semejantes. Probablemente alguna otra variable, que no tomamos en cuenta, sí pudiera ejercer algún efecto sobre el número de esporas.

Ahora en relación al análisis de variables categóricas de SAS los efectos de edad y sexo así como la interacción de ambos resultaron ser no significativos, sin embargo los valores mostraron cierta tendencia, observándose que los infantes presentaron valores menores a los de la media general. Esto posiblemente pudo deberse a que en los infantes el microorganismo tarda en establecerse como parte de la flora intestinal, además del cuidado y asepsia con que son alimentados; en tanto que los adolescentes mostraron cifras mayores a las de la media, esto en parte pudo deberse a que en ellos el microorganismo ya está bien establecido como parte de su flora intestinal y además a que a esta edad no se tiene un cuidado adecuado en la higiene personal así como en su alimentación. Los adultos por el contrario mostraron valores menores a los de la media, lo cual puede explicarse a que ellos tienen prácticas más adecuadas, además de que su sistema inmunológico está bien desarrollado. Por otro lado los ancianos presentaron las cifras más altas de esporas quizá debido a que sus defensas inmunológicas ya no estén funcionando al cien por ciento y su higiene puede no ser muy buena.

Por otra parte, en relación a la presencia del gen que codifica para la enterotoxina de *C. perfringens*, determinamos el gen en aislados de individuos sanos de diferente edad, sexo y municipio. En este análisis encontramos que el 7% de las muestras analizadas resultaron ser portadoras de cepas positivas para el gen. Este porcentaje resultó ser superior al reportado para poblaciones de Japón donde se ha determinado un 4.6% (Sunagawa, H., *et al* 1987). También observamos que los

porcientos mas altos de individuos portadores de cepas potencialmente enterotoxigénicas correspondieron a los ancianos, a individuos del sexo masculino y a los residentes en Sta Catarina. Además determinamos que todos los individuos que presentaron aislados de *C. perfringens* positivos para el gen, también arrojaron números de esporas mayores de 10^5 , esto nos puede indicar que casi siempre que esta presente el gen, también el microorganismo se presenta en cifras elevadas, lo que predispone a un mayor riesgo de contraer infecciones intestinales por *C. perfringens* en estos individuos. Sin embargo cifras elevadas de esporas del microorganismo no siempre se ven asociadas a la presencia del gen, ya que nosotros encontramos cifras de esporas altas en muchos individuos que no presentaron el gen. Por último en relación al porcentaje de aislados positivos para el gen nosotros determinamos que un 4% resultó positivo, este valor es ligeramente superior al reportado para aislados de poblaciones sanas de Japón donde se ha reportado un 35% (Sunagawa, H , et al 1987)

CONCLUSIONES

En general en este estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

1) La población humana sin enfermedad aparente correspondiente al área metropolitana de Monterrey, presentó una media de 7.4×10^3 esporas de *C. perfringens* por g de muestra de heces fecales. Las variables edad, sexo y localidad no

ejercieron un efecto significativo sobre el número de esporas. Sin embargo los ancianos presentaron las cifras más altas de esporas del microorganismo.

2) El 27% de los individuos analizados presentaron valores de esporas mayores de 10^5 por g de muestra.

3) El 70% de las muestras analizadas presentó cepas positivas para el gen de la enterotoxina, y todas estas muestras arrojaron cifras altas de esporas (más de 10^5).

4) Los porcentos más altos de individuos portadores de cepas potencialmente enterotoxigénicas los presentaron los ancianos, individuos del sexo masculino y los residentes en Sta. Catarina.

5) El 4.0% de los aislados de *C. perfringens* analizados por la prueba de hibridación resultó positivo para el gen

6) La detección de cifras elevadas de esporas de *C. perfringens* en humanos sin enfermedad, no está necesariamente asociada a la presencia de cepas enterotoxigénicas.

LITERATURA CITADA

Alouf, E., F. Fehrenbach and H. Freer. 1984. Bacterial protein toxins. Academic Press, C Publishers London

Benno, Y., K. Endo and T. Mizutani. 1989. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1100 - 1105.

Berry, P.R., J. Rodhouse, S. Hughes, B.A. Bartholomew and R.J. Gilbert. 1988. Evaluation of ELISA, RPLA and Vero cell assays for detecting *C. perfringens* enterotoxin in fecal specimens. *J. Clin. Pathol.* **41**: 458-461.

Birkhead, G., R.L. Vogt, E.M. Heun, J.T. Snyder and B.A. McClane. 1988. Characterization of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning by quantitative fecal enterotoxin measurement. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 471-474.

Borriello, S.P., H.E. Larson, A.R. Welch, F. Barclay, M.F. Stringer and B.A. Bartholomew. 1984. Enterotoxigenic *C. perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* **1**: 305-307.

Borriello, S.P., F.E. Barcelay, A.R. Welch, M.F. Stringer and G.N. Watson. 1985. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *C. perfringens*. *J. Med. Microbiol.* **20**: 363-372.

Duncan, C.L., H. Sugiyama and D.H. Strong. 1968. Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **95**: 1560.

Duncan, C L and D H Strong 1969. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbit by cell-free products of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. **100**: 86-94.

Handford, P M and J.J. Cavett 1973 A Medium for the detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in foods J Sci Food Agricul **24**: 487

Harmon, S.M . D A. Kautter and J T Peeler 1971. Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens* Appl Microbiol. **22**. 688-692.

Harmon, S M. 1976. Collaborative study of an improved method for the enumeration and confirmation of *Clostridium perfringens* in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **59**: 606-612.

Harmon, S.M.. D.A. Kautter and C.L. Hatheway. 1986. Enumeration and characterization of *Clostridium perfringens* spores in the feces of food poisoning patients and normal controls. J Food Protect. **49**: 23-28.

Harmon, S. M and D.A Kautter 1987. Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in human feces: comparison of four culture media. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**: 994-996.

Hauschild, A.H.W. 1970. Erythematous activity of the cellular enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. Can. J. Microbiol. **16**: 651-654.

Hauschild, A H W and R. Hilsheimer. 1974 Evaluation and modification of media for enumeration of *Clostridium perfringens* Appl. Microbiol. **27**. 78-82.

Hauschild, A.H.W 1975. Criteria and procedures for implicating *Clostridium perfringens* in food borne outbreaks Can J. Publ Health **66**: 388-392

- Hepner, E. 1980. Food poisoning and *Salmonella* infections in England and Wales, 1976-1978. *Public Health London* **94**: 337-349.
- Heredia, N.L., R.G. Labbe, M.A. Rodriguez, and J.S. Garcia. 1991. Growth, sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A in the presence of bile salts. *FEMS Microbiology Letters*, **84**: 15-22.
- Hobbs, B., M. Smith, C. Oakley, G. Warrock and J. Cruickshank. 1953. *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg* **51**: 75-101.
- Hobbs, P. 1979. Food borne infections and intoxications. Academic Press, New York. pp.131-171
- Jackson, S.G., D.A. Yip-Chuck, J.B. Clark and M.H. Brodsky. 1986. Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring, enteritis among elderly, chronic care psychiatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 748-751.
- Kokai-Kun, J.F., J.G. Songer, J.R. Czczulin, F. Chen, B.A. and McClane. 1994. Comparison of western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2533-2539
- Labbe, R.G. and L.L. Nolan. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. *Infect. Immun.* **34**: 50-54.
- Labbe, R.G. 1989. *Clostridium perfringens*. M.P. Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York- Basel. pp. 191-233.
- Labbe, R.G. 1991. *Clostridium perfringens*. *J. Assoc. Anal. Chem.* **74**: 711-714.

Lindsay, J A., A.S. Mach and M.A. Wilkinson. 1993. *Clostridium perfringens* Type A Cytotoxic-Enterotoxin(s) as triggers for death in the sudden infant death syndrome: development of a toxico-infection hypothesis. *Curr. Microbiol.* **27**: 51-59.

Marshall, R S , J.F Steenbergen and L S McClung 1965. Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens* *Appl Microbiol.* **13** 559-563.

McClane, B A., A.P. Wnek, K.I. Hulkower and P.C. Hanna. 1988. Divalent cation involvement in the action of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin: early events in enterotoxin action are divalent cation independent. *J. Biol. Chem.* **263**: 2423-2435.

McClane, B.A., P.C. Hanna and A.P. Wnek. 1988. *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Microb. Pathog* **4**: 317-323

McDonel J. and B. McClane 1979. Binding versus biological activity of *Clostridium perfringens* enterotoxin in Vero cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **87**: 497-504.

Mead, G., B Adams, T. Roberts and J Smart. 1982. Isolation and identification methods for food poisoning organisms Academic. Press, London, pp. 99-110.

Miles, A.A. and S.S. Misra 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.* **38**: 732-749.

Notermans, S., C. Heuvelman, H Beckers and T. Uemura. 1984 Evaluation of the ELISA as tool in diagnostic *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Zentralbl.Bakteriol. Hyg. Abt. Orig.* **179**: 225-234

Saito, M. 1990. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, food, and the natural environment in Japan. *J. Food Protect.* **53**: 115-118.

Saito, M , M. Matsumoto and M Funabashi 1992 Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin gene by polymerase chain reaction amplification procedure. Int. J. Food Microbiol. **17**: 47-55

Shahidi, S A and A R Ferguson. 1971. New quantitative, qualitative and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. **21**: 500-506.

Shandera, W X 1983. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. J. Infect. Dis **147**: 167-170.

Smith, L.D S. and L.V. Holdeman. 1968. The pathogenic anaerobic bacteria. Springfield, Illinois. pp 203.

Smith, L. and B.L. Williams. 1984. The pathogenic anaerobic bacteria. Springfield, Illinois. pp 101-134.

Stringer, M.F 1981. Studies on *Clostridium perfringens* food poisoning Ph D thesis, University of London

Sunagawa, H., K. Takeshik, K. Kameyama and Y. Ando. 1987. Incidence of *Clostridium perfringens* and human feces and enterotoxin production and espore germination of the isolate. J Food Hyg. Soc. J. **28**: 119-124.

Sutton, R.G.A. 1969. The pathogenesis and epidemiology of *Clostridium welchii* food poisoning PhD. Thesis. University of London.

Sutton, R.G.A., A.C. Ghosh and B.C. Hobbs. 1971. Isolation and enumeration of *Clostridium welchii* from food and faeces. Ed.) S and B In isolation of anaerobes,

Society for Appl Bacteriol Technical Series No 5. London and New York. Academic Press. pp 39-47

Tschirdewahn, B S K Wernaus and F Untermann 1991 The presence of enterotoxigenic *C perfringens* strains in faeces of various animals Int. J Food Microbiol **14** 175-178

Uemura, T 1978 Incidence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in healthy humans in relation to the enhancement of enterotoxin production by heat treatment. J. Appl. Bacteriol **44** 411-419

Van Damme-Jongsten, M. K Wernars and S Notermans. 1989 Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene Antonie Van Leeuwenhoek. J Microbiol **56** 181-190

Van Damme-Jongsten M J Rodhouse R J Gilbert and S Notermans. 1990. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from outbreaks of food poisoning. J Clin Microbiol **28**: 131-133

Wnek, A.P and B.A McClane 1983 Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000 Mr complex in mammalian membranes. Infect. Immun. **57**: 574-581.

Yamagishi, T., T Serikawa R Morita, S Nakamura and S Nishida 1976. Persistent high numbers of *Clostridium perfringens* in the intestines of Japanese aged adults. Japanese J. Microbiol. **20**: 397 - 403.

Yasukawa, A., Y. Okada, T Kitase and S. Miyamoto. 1975 Distribution of enterotoxin producing strains of *Clostridium perfringens* type A in human beings, food, and soil. J. Food Hyg. Soc. Japan **16** 313-317.

Yotis, W.W. and C. Costantinoplas. 1975. Scanning isoelectric focusing and isotachopheresis of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. **39**. 147-154.

