

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA
DE ESPORULACION DE CUATRO CEPAS DE
Clostridium perfringens TIPO A

T E S I S

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

POR

M.V.Z. NATALIA CERUTTI PEREYRA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

JUNIO, 2001

TM
QR119
.C4
2001
c.1



1080124378

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE
ESPORULACIÓN DE CUATRO CEPAS DE *Clostridium*
perfringens TIPO A**

TESIS

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

POE

M.V.Z. NATALIA CERUTTI PEREYRA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L., MÉXICO.

JUNIO DEL 2001



M

119

.C4

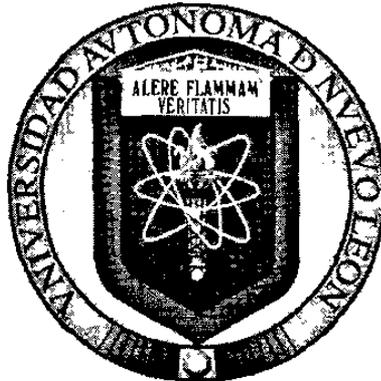
2 1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE
ESPORULACIÓN DE CUATRO CEPAS DE *Clostridium*
perfringens TIPO A**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

POR

M.V.Z. NATALIA CERUTTI PEREYRA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L., MÉXICO.

JUNIO DEL 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE
ESPORULACIÓN DE CUATRO CEPAS DE *Clostridium perfringens*
TIPO A**

Tesis

presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en
Ciencias con Especialidad en Microbiología por:

M.V.Z. Natalia Cerutti Pereyra

COMISIÓN DE TESIS


Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Presidente


Dra. Maribel Gómez Treviño
Secretario


Dr. José Santos García Alvarado
Vocal

DEDICATORIA

*Para Flor, mi hermana mayor. Por que te admiro, porque te quiero y porque te extraño en cada día
lejos.*

*Para Papá y Mamá. Por ser el mejor ejemplo de amor, abrazos y sonrisas. Porque no me caben las
palabras para agradecer una vida feliz, libre y completa.*

Mis tres más grandes amores por creer siempre en mí.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mis asesores, la Dra. Norma Heredia y el Dr. Santos García, por aceptarme en su equipo de trabajo, por compartir Amherst conmigo y por permitirme aprender de ustedes.

A la Dra. Maribel Gómez porque además de ser mi maestra, me ofreció su valiosa amistad y ayuda cuando la necesité.

Al Dr. Ronald Labbé de la Universidad de Massachusetts, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y de su casa (I'll never forget your kindness and the opportunity to work next to you, thank you doctor).

Al Dr. Luis Galán Wong y a su asistente Cristina Franco, por ser siempre tan amables, por echarme la mano y por permitirme robarles un poquito de su tiempo con mis broncas, gracias.

A los que fueron mis maestros en estos años en la facultad de Ciencias Biológicas por compartir sus conocimientos conmigo, en especial a la Dra. Licet Villarreal, al Dr. Carlos Hernández Luna, a la Dra. Katiushka Arévalo, a la Dra. Lilia Morales, al Dr. Mario Vallarta, al Dr. Rahim Fouroughbarack, a la Dra. Leticia Hauad, al Dr. Hugo Luna, al Dr. Benito Pereyra y al Dr. Roberto Mercado porque además de conocimientos, me llevo un bonito recuerdo de ellos.

A los que fueron mis compañeros de laboratorio, Queta, Jehú, César, Gerardo, Susana, Mirna, Lalo, Sharlli, Ginebra, Perla, Alicia, Adrián, porque con algunos hubo amistad y con otros no, pero nunca me negaron su ayuda en los muchos momentos que me trabé, gracias.

A mis dos "alumnas", compañeras y amigas, Genoveva y Ángeles por permitirme compartir con ustedes un poquito de lo que sé y por ser tan lindas siempre conmigo, y principalmente ¡por aguantarme!.

Y sobre todo a Lupita, por ser mi gran amiga, compañera de clases, laboratorio, tareas, desveladas, pláticas y cigarritos y, a Marco, el hermano peruano que me dio una amistad súper especial que nunca voy a olvidar.

No quiero dejar de mencionar a mis compañeros de clases, que además de eso me dieron su amistad y sus porras, Miriam, Ruby, Ivonne, Luis, Marco y Víctor.

A mis amiguísimos de la escuela con los que no compartí clases, pero sí buenos momentos (fiestas) y charlas, y que hicieron que mis estudios de maestría fueran una de las etapas más divertidas de mi vida, a mis hermanitos Eduardo y Saúl, a Gwendy, Clara, Rayito, Nayma, Brenda, Cynthia, Claudia, Karla, Karina y Omar.

Y a mis amigos, de siempre, que nunca dejaron de apoyarme durante este largo proceso de los estudios de maestría, a Rosy, Aleyda, Miguel, Alex, Perla, Coco, Graciela, Claudia, Iliana, Diego, Lili y Pilar (mi hermanita española).

Gracias Fer, por haber compartido casi tres años de estudios y de nuestras vidas, gracias por ayudarme a aprender tantas cosas y porque también este trabajo es tuyo.

A mi gran amiga Tutí, por confiar SIEMPRE en mí más de lo que nadie, ni yo misma, he confiado. Gracias por enseñarme tantas cosas, por darme tanto sin cansarte, por tu eterno hombro para llorar y por tu risa. Gracias por tu enorme, incondicional y hermosa amistad.

A Jorge por ser, por estar, por compartir, por tanta felicidad, por el presente y por el futuro.

Gracias a todos y cada uno de ustedes porque de una forma u otra, forman ya parte de mi vida, de mi crecimiento, de lo que soy. Que Dios los bendiga así como me bendijo a mí por ponerlos en mi camino.

RESUMEN

Clostridium perfringens fue reconocido como una importante causa de enfermedad de origen alimentario desde los años 40's y 50's. Esta bacteria produce 2 enfermedades humanas que pueden ser transmitidas por alimentos: la intoxicación alimentaria y la enteritis necrótica. La intoxicación alimentaria producida por *C. perfringens* es debida a una enterotoxina que se produce durante la esporulación del microorganismo en el intestino delgado después de la ingestión de un gran número de células vegetativas. La toxina es liberada durante la esporulación. Es por esto que el estudio del proceso de esporulación es de vital importancia. En estudios recientes se ha demostrado que *C. perfringens* tiene la capacidad de esporular satisfactoriamente bajo las mismas temperaturas que son óptimas para su crecimiento. Sin embargo, el rango de temperatura óptima de esporulación aún no ha sido estandarizado. Es por esto que el presente trabajo tuvo como finalidad determinar dichas temperaturas y comprobar la siguiente hipótesis: el rango de temperaturas óptimas de crecimiento de *C. perfringens* coincide con el rango de temperaturas óptimas para la esporulación. Para lo anterior se utilizaron 4 cepas de *C. perfringens*, dos enterotoxigénicas (FD-1041 y H-3) y dos no enterotoxigénicas (ATCC-3624 y FD-1). Éstas se activaron y, posteriormente, cultivaron en medio de esporulación Duncan-Strong (reemplazando el almidón por rafinosa para las

cepas enterotoxigénicas), y se incubaron a diferentes temperaturas. Después de incubarlos por 5-8 hrs se observaron frotis de los cultivos al microscopio de contraste de fases, para determinar el porcentaje de esporulación de cada cepa. Finalmente, a las 24 hrs de incubación, se realizaron plaqueos en agar nutritivo para contar las colonias. Los resultados mostraron que la cepa FD-1041 (enterotoxigénica) tuvo la temperatura más favorable para la esporulación a los 45°C, coincidiendo con nuestra hipótesis. Sin embargo, ésta fue capaz de esporular a temperaturas desde los 30°C hasta los 50°C. De la cepa H-3, a pesar de ser enterotoxigénica como la anterior, se observó una mayor sensibilidad a las temperaturas más extremas, es decir, no esporuló a temperaturas menores de 37°C ni mayores de 45°C, aunque también su temperatura óptima de esporulación fue a los 45°C, pero con un menor grado de esporulación que la anterior. Por otro lado, las cepas no enterotoxigénicas (ATCC-3624 y FD-1), mostraron sus niveles máximos de esporulación a los 37°C, llegando a esporular hasta a 25°C, pero sin tolerar la temperatura más alta probada (50°C).

ABSTRACT

Clostridium perfringens was first recognized as an important cause of foodborne disease in the 1940s and 1950s. This organism produces two quite different human diseases that can be transmitted by food, i.e., *C. perfringens* type A food poisoning and necrotic enteritis. The enterotoxin that causes the symptoms of the illness is synthesized when the ingested cells sporulate in the small intestine. Enterotoxin is released during sporulation. In recent studies has been showed that *C. perfringens* has the ability to sporulate satisfactorily under its optimal growth temperatures. However, the optimal sporulation temperature limits have not been established yet. Consequently, the purpose of this work was to determine the optimal sporulation temperatures and to prove the following hypothesis: the *C. perfringens* optimal sporulation temperature limits are similar to those of growth.

We used four *C. perfringens* strains, two enterotoxigenic (FD-1041 and H-3), and two nonenterotoxigenic strains (ATCC-3624 and FD-1). These were maintained as sporulated stock cultures in cooked meat medium at 20°C. We activated the strains in thioglycolate medium at 75°C/15'. After an incubation at 37°C/16h, 40 µl of the vegetative culture were inoculated in Duncan-Strong medium (replacing starch with raffinose for the enterotoxigenic strains). After an incubation at 37°C/5-8h, samples of the cultures were observed at the phase-contrast microscope to determine the sporulation percentage of each strain. Finally, after a 24h incubation under anaerobic conditions, the number of viable spores was determined by plate count.

Our results indicated that the enterotoxigenic strains had their optimal sporulation temperature at 45°C like its growth temperature. FD-1041 was able to sporulate from 30 to 50°C. H-3 strain, in spite of its ability to produce enterotoxin (like FD-1041), had a higher sensibility to temperatures above 37°C and over 45°C, and a lower spore production. On the other hand, nonenterotoxigenic strains (ATCC-3624 and FD-1), showed their higher sporulation levels at 37°C, but having, anyway, very high levels of spore production at 40 and 45°C. They were able to sporulate at temperatures from 25°C to 45°C.

INDICE

	pg.
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice	V
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Antecedentes	9
Hipótesis y Objetivos	38
Material y Método	39
Resultado	40
Discusión	45
Conclusiones	50
Bibliografía	51

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales originadas por el consumo de alimentos contaminados ocasionan importantes problemas socioeconómicos en todo el mundo. Entre los principales contaminantes de alimentos se encuentran bacterias, hongos, parásitos, virus y sustancias químicas, siendo las primeras las que causan un mayor número de enfermedades.

Entre las bacterias más comúnmente involucradas en la causalidad de estas enfermedades a nivel mundial, se incluye a *Salmonella Typhi* y no Typhi, *Shigella* (*Sh. flexneri*, *Sh. dysenteriae* y *Sh. sonnei*), *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* (Todd, E.C.D., 1978; Kumate, J. y A. Isibasi, 1986).

A *C. perfringens* anteriormente se le relacionaba principalmente con la gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial), sin embargo, fue reconocido como una importante causa de enfermedad de origen alimentario desde los años 40s y 50s a partir de los trabajos realizados por Knox, McDonald, McClung y Hobbs (McClane, B.A., 1997).

Clostridium perfringens es una bacteria anaerobia, gram positiva, formadora de esporas que causa diversos problemas clínicos en humanos como: mionecrosis clostridial, intoxicación alimentaria, enterocolitis necrotizante de infantes, enteritis necrótica (García-Alvarado, J.S., 1990; Wada, A. et al, 1996) y diarrea infecciosa asociada con la administración de antibióticos (Borrielo, S.P., et al, 1984; Larson, H.E. y S.P. Borrielo, 1988), y se le ha asociado con el síndrome de muerte fulminante infantil

(Murrel, T.G.C. et al, 1987), entre otros. Además, causa problemas de importancia veterinaria como la mionecrosis clostridial, enterotoxemia por *C. perfringens* tipo A, enteritis hemorrágica aguda entre otras (Blood, H., 1988). *C. perfringens* es posiblemente la bacteria patogénica más ampliamente distribuida en el ambiente.

La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* tipo A está entre las enfermedades gastrointestinales humanas más comunes. Ésta es producida al ingerir alimentos contaminados con un gran número de células vegetativas, que esporularán y producirán la enterotoxina en el intestino (Labbé, R.G., 1989). Los síntomas asociados con esta intoxicación son diarrea y dolor abdominal severo los cuales son mediados por una enterotoxina producida solamente durante la esporulación del microorganismo en el intestino delgado después de la ingestión de alimento contaminado (Kim, S., R.G. Labbé y S. Ryu, 2000).

La temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo es de 43 a 46°C (Labbé, R.G., 1989). Además, como ya se mencionó, este microorganismo tiene la habilidad de producir esporas, las cuales pueden sobrevivir a temperatura elevadas (Heredía, N.L. et al 1997). Esto podría favorecer la supervivencia del microorganismo aún en los alimentos ya cocidos.

Aunque muchas especies de *Bacillus* y *Clostridium* esporulan satisfactoriamente en sus temperaturas óptimas de crecimiento, dos reportes indicaron que *C. perfringens* era incapaz de esporular en su temperatura óptima de crecimiento (Kim, C.H. et al, 1967; Labbé, R.G. y C.L. Duncan, 1974). Dichos experimentos fueron llevados a cabo usando el medio de esporulación (Duncan-Strong) con almidón como la principal fuente de carbohidratos. Sin embargo,

recientemente se encontró que muchas cepas enterotoxigénicas (ENT+) no eran capaces de hidrolizar el almidón a temperaturas menores a 43°C y que el microorganismo no podía crecer bien bajo estas condiciones (García-Alvarado, J.S. et al, 1992). Además del almidón, muchos otros carbohidratos y sustancias han mostrado que colaboran con la esporulación y la producción de enterotoxinas de *C. perfringens* a 37°C (Heredia, N.L. et al, 1991; Labbé, R.G. y L.L. Nolan, 1981; Labbé, R.G. y D.K. Rey, 1979; Sacks, L.E., 1983). Ha sido demostrado también que a 32, 37 y 43°C *C. perfringens* crece bien sustituyendo el almidón por rafinosa como fuente de carbohidratos en el medio de cultivo, cuando se trata de cepas toxigénicas (García-Alvarado, J.S. et al 1992). Sin embargo, a pesar de que sabemos que *C. perfringens* es capaz de esporular satisfactoriamente a estas temperaturas (las óptimas de crecimiento) aún no se ha determinado cuál es su temperatura óptima de esporulación.

Por esto en el presente trabajo se probaron diferentes temperaturas (desde las mínimas hasta las máximas) que podría tolerar el microorganismo para saber con precisión cuál es la temperatura en la que, en condiciones de laboratorio, hay una mayor producción de esporas. Además, se modificó el medio Duncan-Strong de la misma forma que en los estudios realizados por García-Alvarado (1990), sustituyendo el almidón por rafinosa en el caso de las cepas enterotoxigénicas, para evaluar su comportamiento en cada una de las temperaturas probadas y compararlo con el de las cepas no enterotoxigénicas incubadas con almidón. Esto con el fin de que en estudios posteriores que se pudieran llevar a cabo acerca de la esporulación y/o la producción de la enterotoxina se cuente con estos datos para facilitarlos. Y, por otro

lado, para poder evaluar los riesgos de contaminación y proliferación en los alimentos, teniendo en cuenta las fuentes de carbono de los alimentos en cuestión y su relación con las temperaturas de cocción y/o mantenimiento dependiendo de la cepa.

ANTECEDENTES

DESCRIPCIÓN

Clostridium perfringens fue reconocido por primera vez como una importante causa de enfermedades transmitidas por alimentos en los años 40's y 50's a raíz del trabajo realizado por Knox y McDonald. Se sabe que *C. perfringens* actualmente causa dos diferentes enfermedades en humanos que pueden ser transmitidas por alimentos, la intoxicación alimentaria producida por *C. perfringens* tipo A y la enteritis necrótica (también conocida como Darmbrand o Pig-Bel), siendo la primera de mayor frecuencia, tanto en sociedades industrializadas, como en las no industrializadas (McClane, B.A., 1997).

Características de *C. perfringens*

C. perfringens es una bacteria gram-positiva, en forma de bacilo, encapsulada, inmóvil, de tamaño variable, que causa un amplio espectro de enfermedades en humanos y animales, produce alrededor de trece toxinas diferentes (McClane, B.A., 1997), incluyendo la α -toxina, la β -toxina, la ϵ -toxina, la θ -toxina, la κ -toxina, la λ -toxina, la ι -toxina, la μ -toxina y la sialidasa. Los aislados individuales pueden ser divididos en 5 tipos, de la A a la E, basados en las toxinas que producen (Rood, J.I., 1998).

Además de dicha habilidad para producir toxinas activas en el tracto gastrointestinal, *C. perfringens* posee algunas otras características que contribuyen

significativamente con su habilidad de causar enfermedades de origen alimentario. Esta bacteria tiene un rango de crecimiento de 15 a 52°C, y puede soportar temperaturas hasta de 60°C por varias horas (Labbé, R.G., 1989). Su temperatura óptima de crecimiento (TOC) se sitúa en un rango de 43 a 46°C (Kim, C.H., R. Cheney, y M. Woodburn, 1967; Labbé, R.G. y C.L. Duncan, 1974). Dentro de estos rangos las cepas pueden mostrar un tiempo de generación de 8.8 min., sin embargo, se han reportado tiempos de generación de hasta 7.1 min. (Willardsen, R.R. et al., 1978). Los tiempos de generación de *C. perfringens* son de los más bajos reportados para las bacterias, por lo que se le debe dar la debida atención para la buena conservación de los alimentos debido a dicha capacidad (Labbé, R.G., 1989). Además, bajo ciertas condiciones que aún no han sido completamente esclarecidas, *C. perfringens* formará esporas que son altamente resistentes a estreses ambientales como el calor, la desecación y la radiación.

Los estudios citológicos acerca del proceso de esporulación de *C. perfringens* han sido limitados en el pasado por el hecho de que el microorganismo esporula muy pobremente en la mayoría de los medios de laboratorio. Un medio fue descrito por Ellner (1956) en el cual la esporulación de *C. perfringens* se llevaba a cabo rápida y cuantitativamente. Sin embargo, en estudios posteriores se diseñaron otros tipos de medios donde se encontró que la presencia de carbohidratos era necesaria para un abundante crecimiento y altos niveles de esporulación. La mayoría de los medios complejos utilizados para estudiar la esporulación de este microorganismo contenían almidón como principal fuente de carbohidratos. El uso de almidones solubles resultaba en una mayor esporulación que la que se lograba con el uso de almidón de

papa y maíz. Así, el medio Duncan y Strong (DS) ha sido el más ampliamente utilizado para la esporulación de *C. perfringens* (García-Alvarado, J.S., M.A. Rodríguez, R.G. Labbé, 1992).

C. perfringens es parte de la microflora del suelo, y muchos reportes han revelado la diseminación de este microorganismo en alimentos crudos y procesados. Sin embargo, la mayor parte de estos aislados son cepas no enterotoxigénicas. En investigaciones recientes se ha sugerido que solamente un 6% de todos los aislados de *C. perfringens* acarrean el gen (*cpe*) que codifica para la enterotoxina (Kim, S., R.G. Labbé y S. Ryu, 2000).

La prevalencia de las enfermedades causadas por este microorganismo se ve favorecida por el hecho de que *C. perfringens* es la bacteria patógena más ampliamente distribuida en el medio ambiente, su hábitat principal es el suelo y el contenido intestinal del hombre y animales (Smith, L.D.S., y B.L. Williams, 1984).

Las cepas del tipo A, que son las principales productoras de la enterotoxina, han sido encontradas en la mayor parte de las muestras de suelo o de materia fecal de diferentes animales en donde se ha buscado (Labbé, R.G., 1989). Las cepas de otros tipos parecen ser parásitos obligados principalmente de animales domésticos y ocasionalmente del hombre, y raramente se les aísla del suelo (Smith, L.D.S., 1984).

C. perfringens se considera una bacteria anaerobia porque no produce colonias en placas de agar continuamente expuestas al aire. Sin embargo, esto no representa un impedimento para la habilidad de esta bacteria de causar enfermedades alimentarias porque es capaz de tolerar cierta exposición al aire y, comparada con

otros anaerobios, requiere solamente cantidades modestas de reducciones en el potencial de oxido-reducción (E_h) para crecer.

Influencia de la temperatura sobre las células vegetativas y la esporulación

La temperatura a la cual una bacteria es incubada tiene un marcado efecto en su crecimiento. Las células vegetativas de *C. perfringens* son de alguna forma tolerantes al calor. Aunque no son verdaderos termófilos, las células vegetativas de *C. perfringens* tienen una temperatura óptima de crecimiento muy alta (43 a 45°C) y puede continuar creciendo a temperaturas de 50°C., sin embargo, las células vegetativas de *C. perfringens* no son particularmente tolerantes a la refrigeración ni al congelamiento. En contraste con las células vegetativas, las esporas son considerablemente más resistentes al frío. La intoxicación alimentaria puede producirse si esporas viables presentes en alimentos refrigerados o congelados son inducidas a germinar mientras estos alimentos son calentados para servirse (McClane, B.A., 1997). Además, como se ha mencionado anteriormente, la resistencia al calor de las esporas de *C. perfringens* puede contribuir claramente con la habilidad del microorganismo para causar intoxicaciones alimentarias por permitirle sobrevivir a una cocción incompleta de los alimentos.

Al cocinar un alimento contaminado con *C. perfringens* es posible eliminar a las células vegetativas de la bacteria, pero algunas esporas pueden sobrevivir y con el tratamiento con calor (choque térmico) aplicado a la comida son "activadas" para germinar. Es decir, el cocimiento incompleto de los alimentos no sólo puede fallar al librarlos de las esporas de *C. perfringens*, sino que puede facilitar el desarrollo de una

intoxicación alimentaria, porque el calentamiento (por ej. a 70 a 80°C por 20 min.) es una excelente forma de inducir la germinación de las esporas de *C. perfringens* (McClane, B.A., 1997). Las propiedades de resistencia al calor de las esporas dependen tanto de factores ambientales como genéticos. Con respecto a los primeros, el medio en el cual una espora de *C. perfringens* es calentada, influencia claramente su resistencia al calor. En un medio relativamente protegido como el medio de carne cocida, muchas esporas de *C. perfringens* sobrevivirán a la ebullición por una hora o más. Por otro lado, se ha establecido que la termorresistencia de las esporas de *C. perfringens* varía considerablemente dependiendo de la cepa. Por otro lado, el calentamiento disminuye el potencial de óxido-reducción, provocando un ambiente más propicio para la germinación y multiplicación del microorganismo (García-Alvarado, J.S., 1990).

Se ha reportado que el choque térmico puede jugar un papel muy importante en la germinación de las esporas que contaminan el alimento. Barnes y otros (1963), reportaron que sin un choque térmico previo sólo germinaba alrededor de un 3% de las esporas presentes en la carne cruda, pero casi todas germinaban después de que la carne había sido calentada (Ando, Y. et al., 1985). El nitrito de sodio, un agente curante de carnes, también inducía la germinación de esporas de este microorganismo y de otros anaerobios (Labbé, R.G., 1970).

Las esporas de algunas cepas de *C. perfringens* poseen una considerable termorresistencia y son útiles para determinar los criterios térmicos para controlar a las bacterias formadoras de esporas en la industria alimentaria y farmacéutica. Las

condiciones ambientales durante la esporulación influyen las propiedades de resistencia de las esporas (McClane, B.A., 1997).

En 1990 se conocía poco acerca de los factores que influenciaban la termorresistencia de las esporas de *C. perfringens*. Ando y Tsuzuki (1983) reportaron que una carga de cationes intercambiable jugaba un importante papel en la protección del sistema de germinación de las esporas de *C. perfringens* del daño térmico. El pH y la capacidad amortiguadora del medio de esporulación de *C. perfringens* afectaban el número de esporas que eran formadas.

Otras condiciones ambientales que pueden ejercer una influencia sobre la termorresistencia de las esporas bacterianas son la presencia y concentración de varios cationes, edad del cultivo, la presencia de etanol y los diferentes medios de esporulación. En un estudio realizado por Craven (1990) se mostró que con diversos amortiguadores cubriendo el rango de pH de 7.0 a 8.5, las esporas de *C. perfringens* se inactivaban, pero no se dañaban por el incremento del calor a medida que el pH inicial del medio de esporulación se incrementaba. Dependiendo del amortiguador, la resistencia se incrementó para las esporas crecidas en un medio con un pH de 9.0.

A medida que el pH inicial del medio de esporulación fue incrementado, la resistencia a la inactivación a 95°C o 105°C de las esporas cosechadas, se incrementó también. Se sugirió que las proteínas del choque térmico, que aparecen en las esporas de *B. subtilis* en respuesta a un incremento en la temperatura, podrían ser las que ayudaban a incrementar la termoestabilidad de las esporas.

Los resultados de este estudio demostraron que el incremento del pH inicial del medio de esporulación podía aumentar sustancialmente la resistencia a la

inactivación térmica de las esporas cosechadas, sin un aumento notable en la resistencia al daño de la spora, resultante del daño al sistema de germinación (Craven, S.E., 1990).

La termotolerancia inducible por calor ha sido descrita en varios organismos eucariotes y procariotes. Este es un fenómeno donde la supervivencia celular a temperaturas letales es aumentada significativamente por un corto pretratamiento a temperaturas subletales. Durante el procesamiento de ciertos alimentos, las bacterias contaminantes podrían ser expuestas a condiciones subletales. *C. perfringens* representa un peligro significativo para los consumidores de alimentos que han sido sometidos a procesamientos inadecuados o han sido mal manejados en algún punto antes de su consumo. Estos eventos pueden ser afectados por los mecanismos de supervivencia de la bacteria. Las altas temperaturas de crecimiento de *C. perfringens* y la posibilidad de una tolerancia adquirida hacen a este microorganismo importante para la seguridad de los alimentos. En un estudio realizado en nuestro laboratorio se determinó el grado de termorresistencia conferido a *C. perfringens* por un choque térmico (exposición a una temperatura subletal), la cinética de su desarrollo y su duración.

Los resultados indicaron que un choque térmico incrementaba la termotolerancia subsecuente de las células vegetativas. Por ejemplo, después del choque térmico, la D_{55} de la cepa 1041 se incrementó de 5 a 10 min. La termotolerancia adquirida fue dependiente de la cepa y mantenida por 2 h después del tratamiento de choque térmico.

Además, el choque térmico aplicado durante el proceso de esporulación resultó en esporas con una termotolerancia incrementada. Por otro lado, cuando el choque térmico era aplicado a la tercera hora de incubación, las esporas resultantes de ambas cepas (FD-1041 y FD-1) eran más sensibles al calor que el control. Esto podría ser debido a una interferencia en etapas específicas de la esporulación (Heredia, N.L. et al, 1997).

Otros factores

El crecimiento de las células de *C. perfringens* en los alimentos es afectado por otros factores además de la temperatura, incluyendo los niveles de a_w , E_h , pH y posiblemente la presencia de agentes curantes.

El nivel de a_w más bajo que soportan las células vegetativas de *C. perfringens* para crecer es de 0.93 a 0.97, dependiendo del soluto utilizado para controlar la a_w del medio (McClane, B.A., 1997).

Como ya se ha mencionado, en relación con otros anaerobios, *C. perfringens* no requiere ambientes extremadamente reducidos para crecer. Si el E_h no es lo suficientemente bajo como para iniciar el crecimiento, entonces *C. perfringens* modificará el E_h de su ambiente circundante (produciendo moléculas reductoras como ferredoxina) para producir condiciones óptimas para el crecimiento. El E_h de muchos alimentos comunes (carne cruda o *gravies*, por ejemplo) es lo suficientemente bajo como para permitir el crecimiento de *C. perfringens* (McClane, B.A., 1997).

Su crecimiento también es sensible a pHs extremos, teniendo su crecimiento óptimo a pH de 6 a 7 (estos pHs son comúnmente encontrados en los productos

cárnicos que normalmente sirven de vehículos para el microorganismo) y se ha observado una severa inhibición del crecimiento a pHs de ≤ 5 y ≥ 8.3 (McClane, B.A., 1997).

Uno de los papeles más importantes que juegan los factores preservadores como el pH, la a_w y posiblemente los agentes curantes en el control de los niveles de *C. perfringens* en los alimentos, es el de inhibir el crecimiento de las esporas en germinación (McClane, B.A., 1997).

Toxinas

Mientras que se conocen por lo menos 13 tipos de toxinas que son expresadas por *C. perfringens*, individualmente, una célula de *C. perfringens* es capaz de producir sólo un subset definido de estas toxinas. Esto será la base para clasificar a los aislados de *C. perfringens* en 5 tipos (A-E), dependiendo de su habilidad para expresar 4 (alfa, beta, epsilon y iota) de las 13 (tabla).

Tipo de <i>C. perfringens</i>	Toxinas producidas			
	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

(McClane, B.A., 1997)

Cada enfermedad de origen alimentario causada por *C. perfringens* está asociada con un tipo distinto de *C. perfringens*. La enteritis necrótica es causada por el tipo C, siendo la ϵ -toxina producida por este tipo el factor de virulencia primario

involucrado con esta enfermedad. La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* es causada por el tipo A (McClane, B.A., 1997).

En la siguiente tabla se encuentra una breve descripción de las toxinas más conocidas de *C. perfringens*

Toxina	Actividad de la toxina	Comentarios
<i>Gamma</i>	Letal	Se infirió su existencia a partir de discrepancias en estudios de neutralización de filtrados de cultivos tóxicos por varios preparados de antitoxinas; probablemente no importante en la producción de enfermedades
<i>Delta</i>	Hemolisina <i>in vitro</i>	Activa sólo en eritrocitos de ungulados; producida por algunas cepas tipo B y C
<i>Eta</i>	Letal	Igual que la toxina gamma
<i>Teta</i>	Hemolisina; letal y necrotizante en animales de laboratorio	Producida por la mayoría de las cepas de todos los tipos; responsable de la zona interna de hemólisis en agar sangre
<i>Kappa</i>	Colagenasa	Se cree que contribuye al ablandamiento de los músculos en la mionecrosis; producida por los 5 tipos
<i>Lambda</i>	Proteasa	Producida por la mayoría de las cepas de tipo B y E, y algunas del tipo D
<i>Miu</i>	Hialuronidasa	Probablemente sin mayor significancia en la producción de enfermedades; producida por la mayoría de las cepas tipo A y B, y algunos tipos de C y D
<i>Niu</i>	Desoxirribonucleasa	Producida por cepas de todos los tipos excepto del tipo B en casos de enteritis necrótica; probablemente sin importancia de la producción de enfermedades.

(Cato, E.P., W.L. George y S.M. Finegold, 1986. Manual Bergey's).

El mecanismo de acción de la enterotoxina de *C. perfringens* no ha sido elucidado de manera precisa, pero se conoce un proceso ordenado que involucra la unión de la enterotoxina a un receptor en la superficie de las células de los mamíferos y la formación de un pequeño complejo; la inserción del complejo de la enterotoxina dentro de la membrana; la formación de un gran complejo conteniendo la enterotoxina, y los cambios resultantes de permeabilidad en la célula (Rood, J.I., 1998).

La enterotoxina es una proteína termolábil (Duncan, C.L. y D.H. Strong, 1969) formada por una cadena polipeptídica (Duffy, L.K. et al., 1982), con una estructura 80% plegada y 20% enrollada al azar (Granum, P.E. y O. Harbitz, 1985). Está compuesta por 309 aminoácidos y tiene un peso molecular de 34.262 kDa y un punto isoeléctrico de 4.5 (Yotis, W.W. y N. Catsimpoolas, 1975).

ENFERMEDADES

C. perfringens causa diversos problemas clínicos en humanos como: mionecrosis clostridial, intoxicación alimentaria, enterocolitis necrotizante de infantes, enteritis necrótica (García-Alvarado, J.S., 1990; Wada, A. et al, 1996), diarrea infecciosa asociada con la administración de antibióticos (Borriello, S.P., et al, 1984; Larson, H.E. y S.P. Borriello, 1988), y se le ha asociado con el síndrome de muerte fulminante infantil (Murrel, T.G.C. et al, 1987), entre otros. Además, causa problemas de importancia veterinaria como la mionecrosis clostridial, enterotoxemia por *C. perfringens* tipo A, enteritis hemorrágica aguda en terneros y bóvidos adultos, clostridiosis intestinal equina, enterotoxemia por *C. perfringens* tipos B y C en corderos, terneros, cerdos y potros y enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D (riñón pulposo) en corderos, ovejas adultas, cabras y terneros (Blood).

Recientemente, el espectro epidemiológico de la enfermedad se ha expandido hasta incluir casos esporádicos de diarrea, diarrea asociada con antibióticos y diarrea en hogares geriátricos (Wada, A. et al, 1996). Un número importante de las diarreas causadas por *C. perfringens* se presenta en pacientes que han recibido tratamientos con antibióticos como penicilina, co-trimoxazol y cefuroxina (Borriello, S.P. et al, 1984).

Intoxicación por alimentos

C. perfringens es una fuente común de intoxicación alimentaria en humanos, siendo responsable de un 10% de los brotes de etiología identificada en EE.UU. Después de la ingestión de alimento contaminado conteniendo células vegetativas, los síntomas son causados por la producción de una potente enterotoxina (CPE) producida por células en esporulación en el tracto gastrointestinal (Zhao, Y. y S.B. Melville, 1998).

C. perfringens es ubicuo en el ambiente. Por ejemplo, este organismo es comúnmente encontrado en el suelo (a niveles de 10^3 a 10^4 UFC/g), alimentos (el 50% de la carne cruda o congelada contiene *C. perfringens*), polvo, y en el tracto intestinal de humanos y animales domésticos (las heces humanas típicamente contienen 10^3 a 10^6 células de *C. perfringens* por gramo). Se ha reportado que la bacteria puede esporular en productos cárnicos como la carne de res, pollo, pavo, atún, etc., donde pueden alcanzar niveles tan altos como los que se obtienen en los medios de cultivo artificiales (Naik, H.S. y C.L. Duncan, 1977; Craven, S.E., 1980). La esporulación además de favorecer la supervivencia del microorganismo, puede ser fuente de contaminación para otros alimentos. Esta distribución tan amplia de *C. perfringens* siempre ha sido considerada como la primera explicación de la prevalencia de la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* tipo A, sin embargo, en dos estudios independientes de grandes cantidades de aislados de *C. perfringens* a partir de animales y otras fuentes ambientales han sugerido que menos del 5% de todos estos aislados poseen el gen *cpe*, el cual es considerado esencial para producir los síntomas de dicha intoxicación.

Saito utilizó pruebas serológicas modernas, altamente sensibles y específicas para analizar heces animales y humanas, así como alimentos, para buscar la presencia de aislados de *C. perfringens* positivos a CPE (enterotoxina de *C. perfringens*). Esta investigación mostró que mientras que las células de *C. perfringens* son comunes en carne de aves, de puerco y mariscos, solamente algunos de los aislados de mariscos fueron enterotoxigénicos. Sin embargo, la carne de res y de aves no debe ser excluida como reservorio potencial de aislados de *C. perfringens* positivos a CPE (McClane, B.A., 1997).

En este estudio también se encontró que aproximadamente el 6% de las heces de manejadores de alimentos presumiblemente sanos contenían algunos aislados de *C. perfringens* enterotoxigénicos. Por otro lado, aunque en el estudio de Saito no se encontraron aislados enterotoxigénicos en aves, porcinos ni bovinos, en otro estudio reciente se encontraron en una variedad de animales (incluyendo animales para consumo). Sin embargo, aún con estos resultados es prematuro afirmar que los animales representan un reservorio significativo para los aislados positivos a CPE que causan la intoxicación alimentaria en humanos, a partir de que nuevos hallazgos sugieren que el gen *cpe* es originado de plásmido en los aislados animales pero es cromosomal en los aislados de intoxicaciones alimentarias en humanos (McClane, B.A., 1997).

En las estadísticas CDC (Centers for Disease Control) de 1973-1987, la carne de res y de pollo continuaba con sus roles tradicionales como los alimentos más comunes que servían como vehículo en los Estados Unidos. La carne de res causó casi el 30% de todos los brotes de la intoxicación durante este periodo, seguido por la

carne de pavo y pollo a la par con el 15% aproximadamente. Estas estadísticas también indicaron que la comida mexicana que contenía carne estaba surgiendo como importante vehículo para dicha intoxicación (McClane, B.A., 1997).

Otros factores

La intoxicación por *C. perfringens* tipo A casi siempre resulta del abuso de la temperatura durante la cocción, enfriamiento y almacenamiento de los alimentos. La CDC reporta (en Estados Unidos) que un almacenamiento o temperaturas de almacenamiento incorrectos, contribuyeron en un 97% de los brotes recientes de la intoxicación, mientras que el cocimiento incorrecto fue la causa en el 65% de los brotes. Otros factores importantes que contribuyen con la intoxicación incluyen equipo contaminado y una pobre higiene del personal, los cuales fueron involucrados en un 28 y 26% de los casos respectivamente. Como se mencionó anteriormente, la importancia del abuso de las temperaturas en esta intoxicación no es sorprendente dada la relativa termotolerancia de las células vegetativas de *C. perfringens* y particularmente, de la alta termotolerancia de sus esporas. Además, el cocimiento incompleto promueve esta enfermedad incrementando las tasas de germinación de las esporas presentes en los alimentos; después del cambio de estas esporas en células vegetativas, *C. perfringens* pueden multiplicarse rápidamente (McClane, B.A., 1997).

Signos y síntomas

Estos síntomas se desarrollan de 8 a 24 horas después de la ingestión de alimentos contaminados y usualmente se resuelve espontáneamente dentro de las siguientes 12 a 24 horas. Las víctimas de la intoxicación sufren típicamente diarrea y cólicos abdominales severos; el vómito, las náuseas y la fiebre no son comúnmente asociados con esta intoxicación (McClane, B.A., 1997). La ingestión de la enterotoxina preformada podría resultar en una sintomatología más severa que incluiría vómito y dolor de cabeza (Craven, S.E., L.E. Blakenship y J.L. McDonel, 1981).

La toxi-infección alimentaria puede ocurrir al ingerir el alimento contaminado con uno o una combinación de los siguientes factores: a) celular vegetativas (entre 4×10^9 y 6×10^9); b) células en esporulación y/o, c) enterotoxina (García Alvarado, J.S., 1990). Generalmente la toxi-infección alimentaria aparece después de 2 a 12 hrs de haberse ingerido el alimento. Sin embargo, en muchos casos la sintomatología aparece sólo dos horas después de la ingestión del producto contaminado (Robinson, J.A. y M.O. Messer, 1969; Sanders, S. Y R.H. Hutchenson, 1974; Robertson, J.M. et al, 1977). Esto ha sugerido que las células en esporulación o la enterotoxina preformada en el alimento pueden jugar un papel muy importante en la rápida aparición de los síntomas (Naik, H.S. y C.L. Duncan, 1977; Craven, S.E., 1980).

Patogenia

Un calentamiento, almacenamiento, o recalentamiento inadecuado de la carne o de alimentos que contengan carne, da lugar a la germinación de las esporas contaminantes de *C. perfringens* y al rápido crecimiento de las células vegetativas

resultantes. La ingestión de estos alimentos contaminados da lugar a una infección del tracto gastrointestinal. Muchas de las células vegetativas probablemente mueren cuando se ven expuestas a la acidez del estómago, pero si el vehículo está suficientemente contaminado, algunas de las células vegetativas sobreviven al paso a través del mismo y entran en el intestino delgado, donde se multiplican y esporulan. Cuando esto sucede y se libera la enterotoxina, ésta actúa sobre las células epiteliales del tracto gastrointestinal causando una pérdida de fluidos y electrolitos. A diferencia de las enterotoxinas del cólera y de *E. coli*, la CPE no afecta los niveles de AMPc. La enterotoxina es citotóxica, dañando las células epiteliales intestinales a nivel de las vellosidades (Rood, J.I., 1998). Una vez liberada en el lumen intestinal, la CPE rápidamente se une a receptores en la superficie de la membrana de las células de borde de cepillo de las células epiteliales del intestino. Entonces, el complejo receptor-CPE parece formar un poro, dando lugar a la pérdida de solutos y a una eventual muerte celular (Zhao, Y. y S.B. Melville, 1998). La evidencia indica que es este daño tisular intestinal inducido por la CPE lo que ocasiona la pérdida de fluidos (clínicamente manifestada por diarrea) (McClane, B.A., 1997). La enfermedad es usualmente autolimitante y en individuos saludables se resuelve en uno o dos días. Los pacientes geriátricos o debilitados pueden ser afectados más severamente. No todos los aislados de *C. perfringens* pueden causar intoxicación porque no todos ellos portan el gen *cpe* y, en consecuencia, no tienen la habilidad de producir la enterotoxina (Rood, J.I., 1998).

A nivel histológico, el íleon muestra descamación de las células epiteliales de las vellosidades intestinales. El "borde de cepillo" en el intestino pierde su

configuración plegada, y grandes cantidades de membranas celulares y contenido citoplasmático se pierden en el lumen intestinal (McDonel. J. et al 1978).

Susceptibilidad

Mientras que la tasa de mortalidad en esta intoxicación es baja, la muerte es más prevalente en individuos debilitados o ancianos afectados con esta enfermedad (McClane, B.A., 1997).

De enero a agosto de 1993 en el Hospital Geriátrico Metropolitano de Tokio, se cultivaron 69 muestras fecales de 58 pacientes geriátricos que presentaban cuadros de anorexia, diarrea y/o vómito para aislar *C. perfringens*. Se obtuvieron 60 aislados de *C. perfringens* de 49 de los 58 pacientes muestreados, donde 52 de 43 pacientes resultaron positivos a la enterotoxina (Wada, A. et al, 1996).

Epidemiología

Dentro de los brotes de enfermedades de origen alimentario causadas por bacterias, el 93% de los brotes y 94% de los casos reportados (de 1973 a 1987), fueron causadas por los siguientes siete patógenos: *B. cereus*, *Campylobacter*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Salmonella*, *Shigella* y *S. aureus* (Bean, N.H. y P.M. Griffin, 1990).

La intoxicación alimentaria producida por *C. perfringens* tipo A se encuentra anualmente entre las enfermedades producidas por alimentos más comunes en los Estados Unidos y Europa. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los casos no se reportan, hay estadísticas oficiales que muestran significativamente la prevalencia e impacto de esta intoxicación. Se ha estimado que actualmente existen 652,000 casos

de esta intoxicación en los Estados Unidos, con un promedio de 7.6 muertes por año y costos anuales de 123 millones de dólares (McClane, B.A., 1997). Sin embargo, la proporción de brotes causados por *C. perfringens* ha decrecido con el tiempo, de un 12% de los brotes en 1973-75 a un 3% en 1985-87. A pesar de estos datos, durante el periodo del estudio realizado por Bean y Griffin (1990), no se sabía con claridad si este decremento era real o era una disminución en el número de veces que las confirmaciones de laboratorio fueron enviadas por brotes sospechosos.

Según una recopilación de datos de la CDC (Centers for Disease Control, EE UU), la proporción de brotes de enfermedades de origen alimentario causados por bacterias, en los cuales los alimentos implicados fueron preparados en establecimientos comerciales o institucionales, se incrementó de un 63% en 1973-75 a un 80% en 1985-87. Esta tendencia fue observada para *C. perfringens*, *Salmonella*, *Shigella* y *S. aureus* (Bean, N.H. y P.M. Griffin, 1990). Este patrón epidemiológico resulta por al menos dos factores. Primero, las grandes instituciones y ciertos tipos de establecimientos comerciales, generalmente preparan comidas anticipadamente y después las guardan para servirla más tarde (permitiendo el posible crecimiento de *C. perfringens*). Segundo, tomando en cuenta los síntomas relativamente suaves de la mayoría de los casos de la intoxicación por *C. perfringens* tipo A, solamente cuando un número significativo de personas se enferman simultáneamente con síntomas de diarrea, es cuando las autoridades de salud pública pueden llegar a investigar, identificar y reportar esta enfermedad. Esta intoxicación puede ocurrir en cualquier época del año pero es ligeramente más común en los meses de verano, posiblemente

porque las altas temperaturas del ambiente facilitan el abuso en las temperaturas de los alimentos durante el enfriamiento y el almacenaje (McClane, B.A., 1997).

Por otro lado, la proporción de brotes y casos con un vehículo conocido asociados con carne de res fue decreciendo paulatinamente durante un periodo de 15 años (1973-1987). Sin embargo, la carne de res sigue siendo uno de los vehículos más frecuentes para enfermedades de origen alimentario. Durante este periodo, se reportaron 51 brotes (en Estados Unidos) asociados con la carne de res, 23 con comida mexicana, 19 con pavo y 9 con pollo, entre otros. La cantidad de muertes ocasionadas por intoxicaciones por esta bacteria fueron 12. Las temperaturas inadecuadas de almacenamiento fueron el factor más frecuentemente reportado relacionado con *C. perfringens* (97%) y *B. cereus* (94%). Otros factores importantes incluyeron una cocción inadecuada (65%), el uso de equipo contaminado (28%) y una pobre higiene del personal (26%) (Bean, N.H. y P.M. Griffin, 1990).

ESPORULACIÓN

Ésta es la habilidad, de ciertos organismos y bajo ciertas condiciones, de pasar por cambios morfológicos y fisiológicos progresivos que terminan en la formación de estructuras latentes. Estas estructuras incluyen a las endosporas, las cuales son producidas en su mayoría por los géneros gram-positivos, formadores de esporas *Bacillus* y *Clostridium*, entre otros.

La emergencia de una célula vegetativa a partir de la espora tiene lugar solamente cuando las condiciones fisiológicas son favorables.



Las esporas son formas de vida latentes capaces de sobrevivir por periodos prolongados pero están dotadas con la capacidad de restablecer rápidamente el crecimiento vegetativo. La reiniciación del crecimiento vegetativo sigue a una estimulación por algún factor ambiental. Existen dos etapas en este proceso. Primero, el estado latente se pierde en pocos minutos en una serie de reacciones degradativas colectivamente llamadas *germinación*. En la presencia de nutrientes adecuados, la germinación es seguida por una fase que dura alrededor de una hora durante la cual la espora germinada gradualmente se desarrolla en una célula vegetativa. Este proceso se conoce como *crecimiento*. Durante este periodo, se van perdiendo gradualmente componentes específicos de la espora (Dawes I, 1980).

En un cultivo de bacterias formadoras de esporas, los factores fisiológicos y ambientales pueden afectar hasta el punto de detener en crecimiento vegetativo, y entonces, después de varias horas, una espora intracelular, llamada "endospora", aparece en cada célula. Todos los eventos que dan lugar a la conversión de una célula vegetativa en espora se definen como *esporogénesis*. Aquellas etapas de la esporogénesis que conciernen sólo a la síntesis y ensamblaje de los componentes de la espora son definidas como *esporulación*. El producto final, la espora latente, difiere citológica, fisiológica y bioquímicamente de la célula vegetativa. Dentro estas

diferencias se podrían mencionar las siguientes: en las esporas podemos encontrar ácido dipicolínico que ocupa del 5 al 15% del peso seco de la spora, altos niveles de metales divalentes y compuestos S-S que en las células vegetativas no se encuentran. Además, las esporas tienen poco agua o carecen de ella (Dawes, I, 1980).

La spora madura contiene varias capas. La cubierta más externa que rodea la spora es llamada *exosporium* que es una capa delgada y delicada. Por debajo del *exosporium* descansan varias capas llamadas *cubiertas de la spora*. Éstas están compuestas por varias capas laminadas de proteína, cada una de aproximadamente 2.0 a 2.5 m μ de grosor. Debajo de ésta se localiza una delgada membrana que separa la cápsula de la spora de un área de baja densidad electrónica. Ésta área, llamada *cortex*, ocupa aproximadamente la mitad del volumen de la spora. Es un componente específico de la spora. En ella se localiza el ácido dipicolínico, los polímeros mucopéptidos y el calcio. Todo esto hace que las esporas posean una marcada resistencia a rayos UV y X, al calor, a solventes orgánicos y químicos, y a la desecación (Dawes, I. 1980).

La esporogénesis se inicia por factores externos como: cambios en los niveles de pH, de aireación, de temperatura, de nutrientes, de cationes, de las fuentes de nitrógeno y carbono disponibles. La esporogénesis ocurre tanto masivamente al final del crecimiento vegetativo como a bajas frecuencias en cultivos exponenciales (Dawes, I, 1980).

Este conjunto de cambios se inicia como una respuesta a una de las siguientes deficiencias nutricionales: a) disminución en el medio de cultivo de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo de rápido metabolismo: las células vegetativas se

multiplican en el medio de cultivo, hasta que se reduce la concentración de uno de los nutrientes necesarios para el crecimiento, esto es reconocido por la célula como un signo para iniciar la esporulación (García-Alvarado, J.S., 1990); b) falta de un aminoácido esencial: la disminución súbita de uno o más aminoácidos en el medio de cultivo puede provocar una respuesta severa que implica el cese de síntesis de proteína y de RNA, y se provoca también una inhibición en la producción de (p)ppGpp y en la actividad de la IMP deshidrogenasa, resultando en una disminución de nucleótidos de guanina que conduce al inicio de la esporulación (Freese, E., 1981) y, c) inhibición directa de la síntesis de nucleótidos de guanosina: la decoinina, un inhibidor de la síntesis de GMP fue capaz de promover la esporulación de *C. perfringens* (Sacks, L.E., 1980). La cafeína, que inhibe la vía de las purinas, también mostró la inducción de la esporulación en *C. perfringens* (Labbé, R.G. y L.L. Nolan, 1981, 1987).

Para estudiar la esporulación de *C. perfringens* se ha reportado el diseño de varios medios de cultivo (Ellner, P.D., 1956; Kim, C.H., R. Cheney y M. Woodbury, 1967; Duncan, C.L. y D.H. Strong, 1968; Ting M.N. y D.Y.C. Fung, 1972; Gyobu, Y. y H. Kodama, 1976; Sacks L.E. y P.A. Thompson, 1978; Tortora, J.C.O., 1984; Phillips, K.D., 1986; Harmon, S.M. y D.A. Kauttler, 1986; Utshijima, T., A. Sugitani y Y. Ozaki, 1987). La gran mayoría de estos medios están formulados principalmente por peptonas y almidón. El mas empleado de todos es el formulado por Duncan y Strong (1968), también conocido como medio DS.

La esporulación en esta bacteria y la producción de enterotoxina se pueden llevar a cabo dentro de un rango de pH de 6.0 a 8.5, con un óptimo cerca de la neutralidad (Labbé, R.G. y C.L. Duncan, 1974).

Transformación de la espora latente en célula vegetativa

Tres procesos secuenciales son los responsables de la transformación de una espora en una célula vegetativa: (a) la *activación*, que condiciona a la espora a germinar en un ambiente apropiado, (b) la *germinación*, proceso irreversible que resulta en la pérdida de las características típicas de una espora latente, y (c) el *crecimiento*, en el cual son sintetizadas nuevas clases de proteínas y estructuras dando lugar a la conversión de la espora en una nueva célula vegetativa.

1) Activación.

Es un proceso reversible que condiciona a la espora a germinar en un ambiente apropiado y se da por calor u otro tratamiento. Todavía se consideran estructuras latentes que conservan las características de las esporas.

2) Germinación.

Es un proceso irreversible que resulta de un gran número de eventos simultáneos que tienen lugar poco después de la exposición de las esporas activadas a estimulantes específicos. Ésta está acompañada por el hinchamiento de la espora, la ruptura o absorción de la cápsula de la espora y la pérdida de un número de sus propiedades fisiológicas típicas. Así, hay una pérdida de la resistencia a estreses ambientales, pérdida de la refractabilidad, aumento de la permeabilidad, liberación de los

componentes de la espora (ácido dipicolínico, calcio, péptidos) y un aumento de la actividad metabólica.

3) Crecimiento.

En esta etapa, las proteínas y las estructuras de la célula vegetativa son sintetizadas *de novo*. Se considera hasta el momento de la división celular y el retorno al crecimiento vegetativo.

Cambios morfológicos y bioquímicos durante la formación de esporas

La secuencia de cambios morfológicos que resultan en la formación de una espora ha sido dilucidada por microscopía electrónica y es similar para todas las especies de *Bacillus* y *Clostridium* que han sido examinadas. Aunque el proceso es continuo, es conveniente dividirlo en etapas definidas por Ryter y representadas por números romanos. Las bacterias en crecimiento (vegetativas) son designadas a la etapa 0. La etapa I fue originalmente identificada como una condensación de los dos núcleos de las células vegetativas para formar un filamento axial simple de cromatina. La etapa II muestra la compleción de un septo formado por la invaginación de la membrana y el crecimiento hacia un polo de la célula. Durante la etapa III, en la que se lleva a cabo la formación de un protoplasto libre de la célula madre. Esto se realiza por el hinchamiento del septo de la espora hacia dentro del citoplasma, seguido por los movimientos de los puntos de adhesión de los extremos del septo hacia el polo de la célula madre. La etapa IV es la deposición de la pared celular de la célula germinal primordial y la corteza entre las membranas del protoplasto de la espora. La deposición de la cubierta de la espora alrededor de la corteza define la etapa V, y la

etapa VI es la “maduración” de la espora, al tiempo que ésta desarrolla sus propiedades de resistencia características. Durante la etapa VII, la célula madre se lisa y libera la espora completada (Diff) .

Las actividades bioquímicas que aparecen durante la esporulación pueden o no, ser necesarias y específicas para el proceso. Éstas pueden ser divididas en varias clases funcionales en un intento para categorizar este problema. (i) Aparición de componentes que no ocurre durante el crecimiento y se encuentran sólo en células esporulantes y que son aparentemente necesarios para la formación de esporas. Ejemplos de esto pueden ser los peptidoglicanos de la corteza (que difieren estructuralmente de aquellos de la pared celular) y las proteínas de la cubierta de la espora. (ii) Cambios en la función vegetativa que son necesarios para la esporulación. (iii) Efectos secundarios disparados por la secuencia primaria de eventos durante la esporulación, pero que no pueden por sí mismos jugar un papel importante en el proceso. (iv) Cambios que resultan de la caída nutricional utilizados para iniciar la esporulación pero que no están conectados con la esporulación. Ejemplos son el incremento en las actividades de la α -amilasa y arginasa. (v) La aparición de los componentes que pueden ser requeridos durante la subsecuente germinación de la espora completada pero que no tienen otro papel en la formación de la espora (Piggot, P.J. y J.G. Coote, 1976).

En las observaciones realizadas por Smith (1956) se concluyó que el ciclo de esporulación de *C. perfringens* involucraba cuatro diferentes etapas citológicas. Primera, una porción terminal de la cromatina de las células vegetativas forma el núcleo de la espora en formación. Esto no se vuelve obvio hasta las tres horas

después de que las células vegetativas fueron introducidas en el medio de esporulación. La espora en formación se mantiene localizada en una posición terminal extrema hasta la maduración. Segunda, una vez que la espora esta formada, se alarga considerablemente y se enquistas. Tercera, posterior al enquistamiento el esporangio (que había tomado una forma elipsoidal) empieza a contraerse, causando el desplazamiento de la espora a una posición mas centrada. El esporangio se contrae progresivamente hasta que, finalmente, en la cuarta etapa, la membrana citoplasmática del esporangio parece envolver la pared de la espora por un proceso de laminación. Así, la pared de la espora madura esta compuesta de dos capas (Smith, A.G. y P.D. Ellner, 1956).

La esporulación y la formación de la enterotoxina

Una de las características más importantes de *C. perfringens*, desde el punto de vista médico, es su capacidad para producir la enterotoxina, ya que ésta es la causa de las enfermedades gastrointestinales provocadas por este microorganismo. Esta proteína se sintetiza y acumula intracelularmente durante la esporulación de la bacteria (García-Alvarado, J.S., 1990). Sin embargo, la CPE no es secretada por las células en esporulación, sino que es liberada al intestino cuando la célula madre es lisada durante la liberación de la nueva espora. Los aislados de *C. perfringens* producen factores regulatorios que dan lugar a una expresión de CPE asociada a la esporulación. La síntesis de CPE parece empezar rápidamente después de la inducción de la esporulación y después progresivamente aumenta en las siguientes 6 a 8 horas de esporulación (McClane, B.A., 1997).

Tanto la síntesis de la enterotoxina como la de las proteínas de las capas de la cubierta de la espora se inician dentro de los primeros eventos de la esporulación y son codificadas por un RNA mensajero estable (Labbe, R.G. y C.L. Duncan, 1977).

Duncan *et al* (1972), haciendo estudios con cepas mutantes de *C. perfringens*, reportaron que la enterotoxina es un producto de uno de los genes específicos de la esporulación. Así, la esporulación y la producción de la enterotoxina en esta bacteria mantienen una relación fisiológica muy estrecha. Además, las cantidades de enterotoxina que pueden causar un problema intestinal solo se producen durante la esporulación del microorganismo (Strong, D.H., C.L. Duncan y G. Perna, 1971; Labbe, R.G., 1980).

Para comprobar esto, en 1972, Duncan *et al* encontraron evidencia genética que asociaba la esporulación con la síntesis de CPE en una cepa positiva a la enterotoxina (NCTC 8798). Los mutantes bloqueados en la fase 0 de la esporulación fueron incapaces de expresar la CPE, mientras que mutantes bloqueados en las etapas III, IV y V continuaron haciéndolo, pero en cantidades menores (Zhao, Y. y S.B. Melville, 1998).

El grado de termorresistencia de las esporas depende de las condiciones que imperan en el ambiente durante la formación de las esporas; de igual manera influirán las condiciones en que se mide esa capacidad (García-Alvarado, J.S., 1990).

El almidón como constituyente de los medios de cultivo, ha sido el carbohidrato más extensamente utilizado para hacer estudios tanto de la esporulación como de la producción de la enterotoxina. Se ha demostrado además, que la fuente de obtención y el método de preparación de este carbohidrato tienen influencia en la

producción de esporas y de enterotoxina, y que el almidón soluble es mejor para esos fines que el extraído de papa o maíz (Labbe, R.G. et al, 1976). El empleo de otros carbohidratos como la rafinosa, mejora la producción de esporas y de enterotoxina de algunas de las cepas que se han estudiado (Labbe, R.G. y D.K. Rey, 1979).

Para muchas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, la temperatura óptima de esporulación es muy similar a la óptima de crecimiento (Williams, O.B. y W.J. Robertson, 1953; Warth, A.D. 1978). Sin embargo, para *C. perfringens* se ha reportado que la temperatura óptima para la esporulación y la producción de enterotoxina es de 37°C, la cual está muy por debajo de su óptima de crecimiento que es de 43 a 46°C. Además, se ha reportado que a esta última temperatura, la esporulación y la producción de la enterotoxina ocurre en muy bajas proporciones o no es detectable (Kim, C., R. Cheney y M. Woodburn, 1967; Labbe, R.G. y C.L. Duncan, 1974; Rey, C.R., H.W. Walker y P.L. Rohrbaugh, 1975).

Sin embargo, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, se observó que el medio DS con almidón no producía un crecimiento satisfactorio de las cepas a 46°C comparado con el que se obtenía a 37°C. Además, se mostró que cuando se sustituía el almidón del medio por rafinosa, se obtenía a 46°C un crecimiento mucho mayor y se podían observar esporas maduras (García-Alvarado, J.S., 1990).

Esto se debe a que el almidón es hidrolizado por una α -amilasa producida por el microorganismo. Ha sido demostrado que en algunas especies de bacterias y levaduras, la temperatura de crecimiento puede afectar la secreción de amilasa y así la hidrólisis del almidón. Así se demostró que la habilidad para crecer y esporular de este microorganismo en este medio es dependiente de la actividad de una amilasa en cada

cepa. También se mostró que la incapacidad de las cepas enterotoxigénicas para esporular a 46°C es debida a que carecen de una amilasa extracelular funcional (García-Alvarado, J.S., 1990).

Con todos los anteriores antecedentes, consideramos que el estudio de los fenómenos relacionados con la esporulación de *C. perfringens* sigue siendo muy importante. En trabajos previos al presente, se mencionan varias temperaturas de esporulación donde se considera que *C. perfringens* esporula satisfactoriamente. En este trabajo se pretende determinar la temperatura óptima de esporulación para cuatro cepas diferentes de *C. perfringens*: dos productoras de la enterotoxina y dos que no la producen. Además, sobre la base de los resultados obtenidos en los trabajos de García-Alvarado (1990), las cepas enterotoxigénicas se probarán con medio de esporulación Duncan-Strong (DS) utilizando rafinosa (en lugar del almidón) como fuente de carbohidratos.

HIPÓTESIS

La temperatura óptima de crecimiento de C. perfringens es similar a su temperatura óptima de esporulación.

OBJETIVO

Determinar la temperatura óptima de esporulación de 4 cepas de C. perfringens.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas

Se utilizaron cuatro cepas de *Clostridium perfringens*: la FD-1041 y la H-3, que son cepas enterotoxigénicas y, la ATCC-3624 y la FD-1 que son no enterotoxigénicas. Éstas se mantuvieron en medio de carne cocida según Robertson (Willis, A.T., 1960) como cultivo esporulado de reserva y se conservaron en congelación a -20°C.

Inoculación y esporulación

Las cepas se activaron inoculando una alícuota del medio de reserva en tubos con 10 ml de caldo tioglicolato e inmediatamente después se sometieron a un choque térmico de 75°C por 15 min. a fin de estimular la germinación de las esporas. Posteriormente, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C por 16 hrs. Después de la incubación, fueron transferidos 40 µl al medio de esporulación (1%) en tubos con 4 µl de medio DS con almidón para las cepas no enterotoxigénicas y con rafinosa para las enterotoxigénicas. Las temperaturas de incubación probadas fueron las siguientes: 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50 y 55°C. Después de 5 a 8 hrs de incubación se tomó una alícuota y se determinó el porcentaje de esporulación en un microscopio de contraste de fases. Al término de las 24 hrs de incubación se realizaron plaqu coastos con agar nutritivo (1.5% peptona, 1% extracto de levadura y 1.5% agar) poniendo las placas a incubar en condiciones de anaerobiosis (95% de CO₂ y 5% de N) durante 24 hrs a 37°C. Todos los experimentos se realizaron por duplicado al menos con tres repeticiones cada uno.

RESULTADOS

Se midieron dos parámetros: el porcentaje de esporulación a las 6-8 h, mediante observaciones en el microscopio de contraste de fases, y la cantidad de esporas viables determinado por cuentas de colonias (UFC) después de 24 h de cultivo en condiciones de anaerobiosis. Estas colonias se formaban a partir de cada espora germinada.

Analizando las cepas por separado, encontramos que las dos cepas enterotoxigénicas, FD-1041 y H-3, tuvieron comportamientos similares. La primera, tuvo su máxima producción de esporas (3.07×10^7) a 45°C. Y la segunda, también mostró su máxima esporulación a la misma temperatura, pero en menor cantidad (1.84×10^3). Ambas muestran una alta tasa de esporulación (Figs. 1 y 2) a los 37°C, un ligero decremento a los 40°C y, máximo a los 45°C. Posteriormente se pudo observar que la cepa FD-1041 todavía siguió esporulando a 50°C, deteniéndose este proceso a 55°C. En el caso de la cepa H-3, sólo llegó a esporular a 37, 40 y 45°C, con las otras temperaturas no se observó crecimiento (Fig. 2).

En cuanto a los porcentajes de esporulación, la cepa FD-1041 mostró una esporulación más rápida a 37°C, donde a las 8 h de incubación ya había alcanzado un 80% de esporulación, mientras que a otras temperaturas como a los 40°C, a las 6 h de incubación todavía no se podían observar células en esporulación (0%). A la temperatura de máxima esporulación, 45°C, a las 7 h se observó apenas un 2% de esporulación, al igual que a 30°C. A temperaturas extremas (20, 25 y 55°C), no se observó esporulación entre las 6 y 8 h. La cepa H-3 mostró unos porcentajes de esporulación muy bajos en comparación con las otras cepas, donde a las únicas

temperaturas donde pudimos observar esporulación a la 6-8 h, fueron a 37°C (5%) y a 45°C (1%) (Tabla).

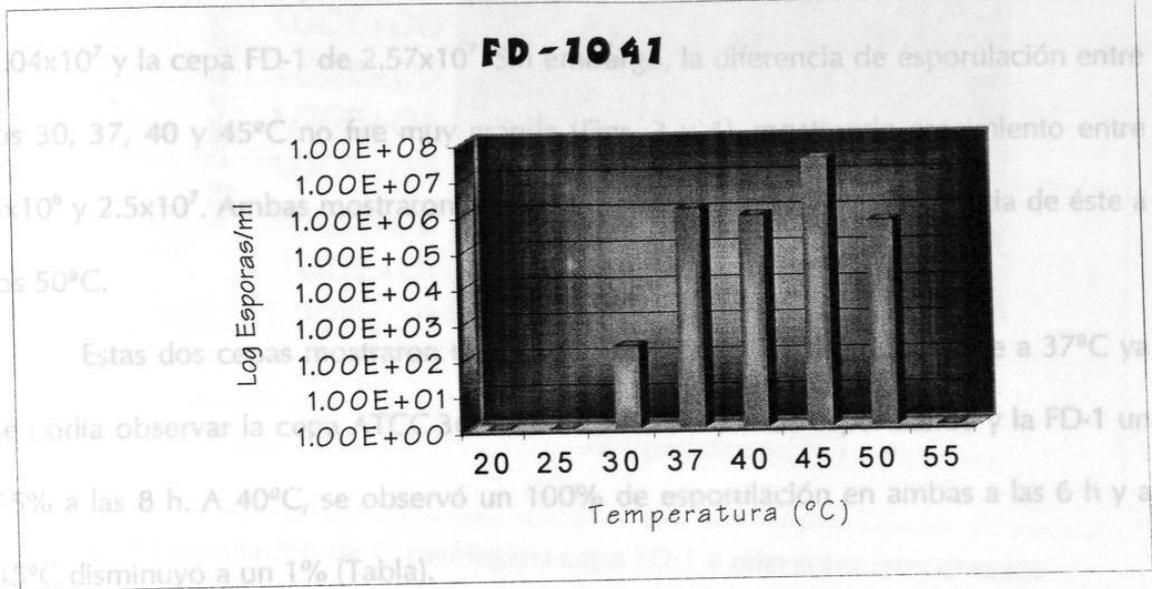


Fig. 1. Esporulación de *C. perfringens* cepa FD-1041 a diferentes temperaturas

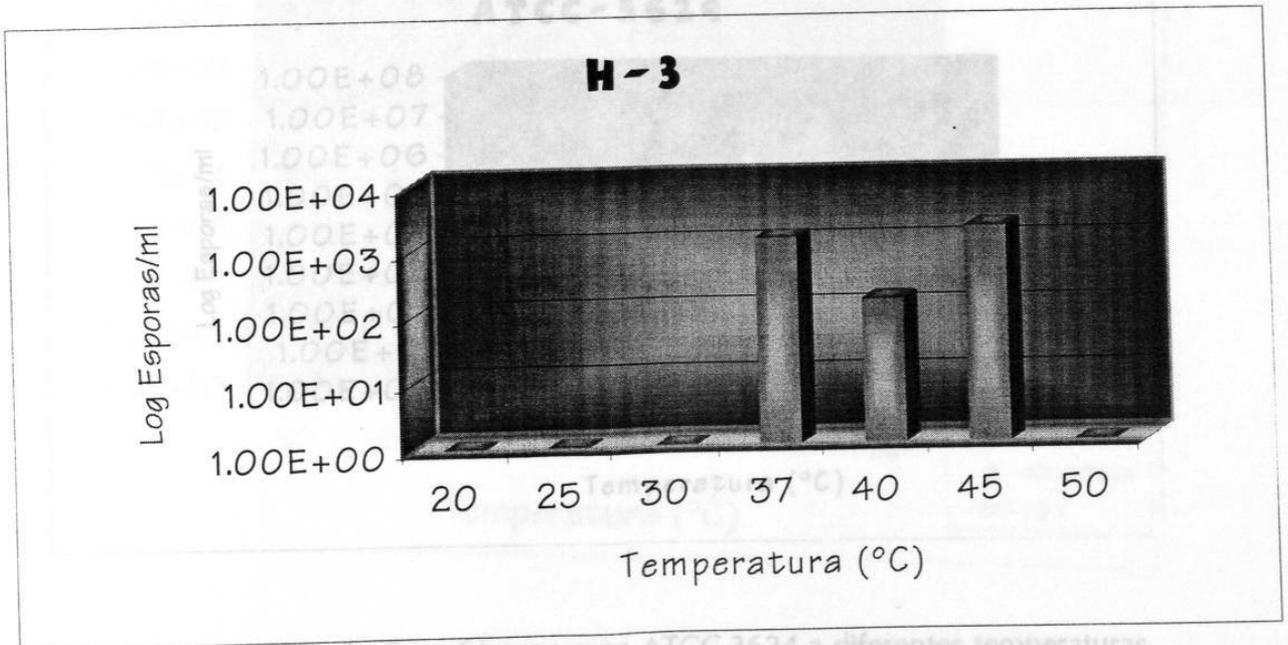


Fig. 2. Esporulación de *C. perfringens* cepa H-3 a diferentes temperaturas

Por otro lado, la esporulación de las cepas no enterotoxigénicas, también fue muy similar entre sí, pero a diferencia de las cepas enterotoxigénicas, las primeras tuvieron su máxima esporulación a los 37°C. La cepa ATCC-3624 tuvo conteos de 2.04×10^7 y la cepa FD-1 de 2.57×10^7 . Sin embargo, la diferencia de esporulación entre los 30, 37, 40 y 45°C no fue muy grande (Figs. 3 y 4), mostrando crecimiento entre 3×10^6 y 2.5×10^7 . Ambas mostraron crecimiento desde los 25°C y la ausencia de éste a los 50°C.

Estas dos cepas mostraron una esporulación más rápida debido que a 37°C ya se podía observar la cepa ATCC-3624 con 100% de células esporulando y la FD-1 un 75% a las 8 h. A 40°C, se observó un 100% de esporulación en ambas a las 6 h y a 45°C disminuyó a un 1% (Tabla).

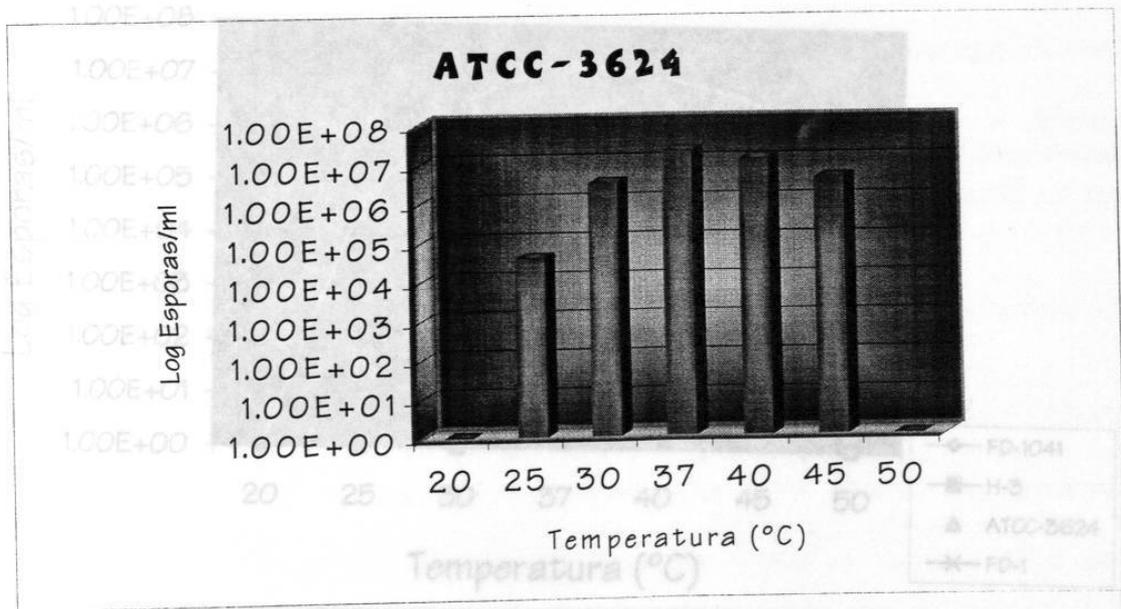


Fig. 3. Esporulación de *C. perfringens* cepa ATCC-3624 a diferentes temperaturas

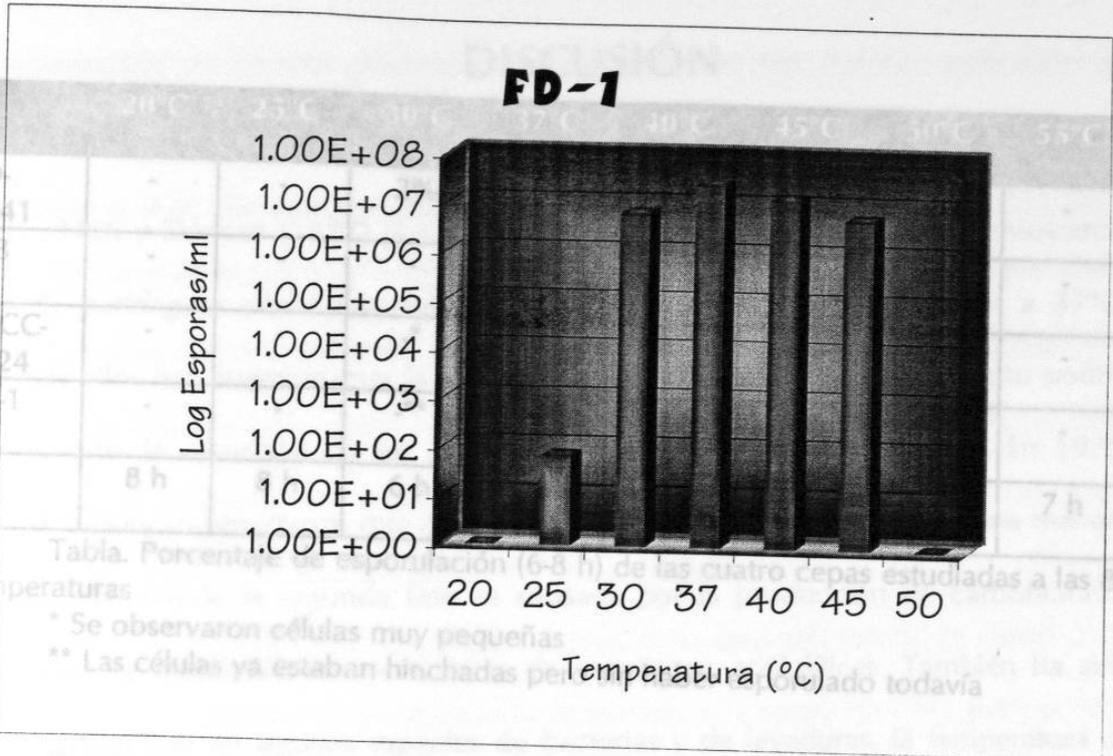


Fig. 4 Esporulación de *C. perfringens* cepa FD-1 a diferentes temperaturas

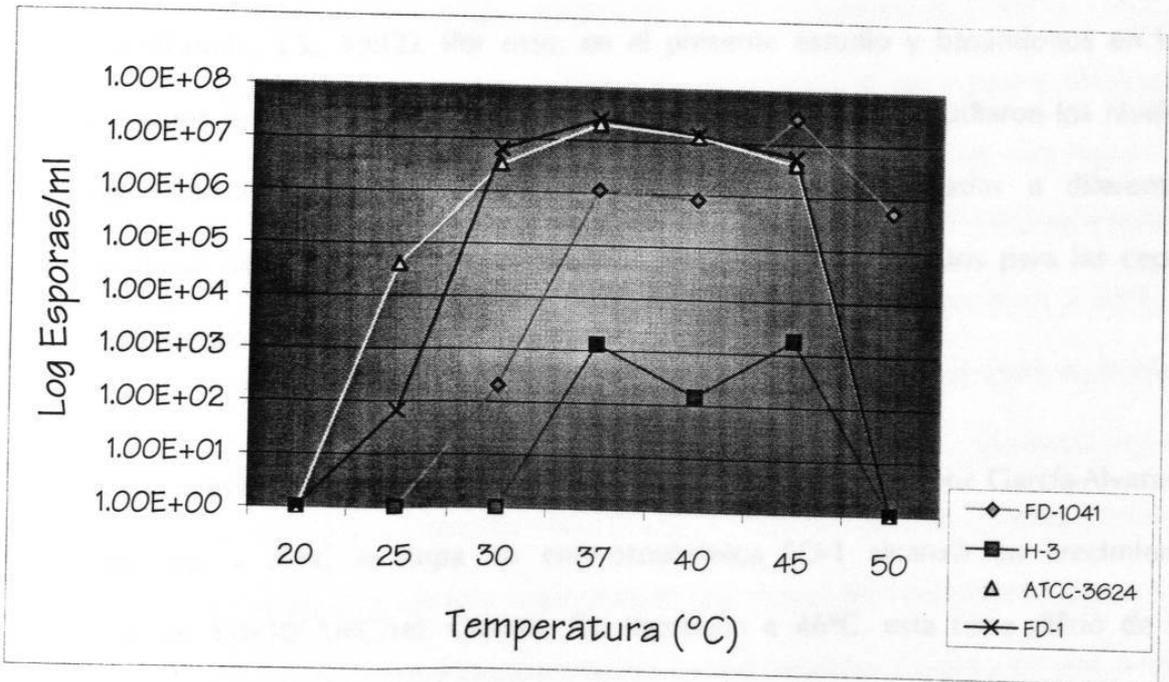


Fig. 5 Gráfica comparativa de los niveles de esporulación de las cuatro cepas estudiadas

	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	55°C
FD-1041	-	-	2%	80%	-	2%	-	-
H-3	-	-	-	5%	-	1%	-	-
ATCC-3624	-	-	*	100%	100%	1%	-	-
FD-1	-	-	**	75%	100%	1%	-	-
	8 h	8 h	6 h	8 h	6 h	7 h	7 h	7 h

Tabla. Porcentaje de esporulación (6-8 h) de las cuatro cepas estudiadas a las 8 temperaturas

* Se observaron células muy pequeñas

** Las células ya estaban hinchadas pero sin haber esporulado todavía

DISCUSIÓN

Naik y Duncan (1977) por una parte, y Craven (1980) por otra, demostraron que *C. perfringens* podía esporular y producir enterotoxina en alimentos a 37°C, además ellos han sugerido que la ingestión de la toxina junto con el alimento podría incrementar la severidad de los síntomas de la toxi-infección alimentaria. En 1975, Labbé y Duncan reportaron que en el medio DS *C. perfringens* crecía de una manera bifásica; en donde la segunda fase es causada por la producción de carbohidratos rápidamente metabolizados resultantes de reacciones amilolíticas. También ha sido demostrado que en algunas especies de bacterias y de levaduras, la temperatura de crecimiento puede afectar la secreción de amilasa y así, la hidrólisis del almidón (García-Alvarado, J.S., 1992). Por esto, en el presente estudio y basándonos en los experimentos llevados a cabo por García-Alvarado en 1990, se estudiaron los niveles de esporulación de las cepas de *C. perfringens* ya mencionadas a diferentes temperaturas pero utilizando rafinosa como fuente de carbohidratos para las cepas enterotoxigénicas.

En nuestros resultados pudimos corroborar los obtenidos por García-Alvarado previamente: a 37°C la cepa no enterotoxigénica FD-1 alcanzó un crecimiento máximo de 3.0×10^7 UFC/ml. Cuando fue incubada a 46°C, esta cepa difirió de las enterotoxigénicas probadas en que el cultivo mostró niveles de crecimiento, producción de esporas e hidrólisis del almidón que fueron similares a los obtenidos a 37°C. Sin embargo, a 46°C, el máximo crecimiento fue obtenido más rápidamente y la

concentración de almidón disminuyó más rápidamente que a 37°C. Otra cepa no enterotoxigénica, ATCC 3624, también creció, esporuló e hidrolizó el almidón tanto a 37 como a 46°C. Sin embargo, los niveles de esporulación fueron menores a 46 que a 37°C (García-Alvarado, J.S., 1992). Se ha sugerido que esto podía deberse a una hidrólisis más rápida del almidón, resultando en carbohidratos de cadena corta, como la maltosa o la maltotriosa (resultado de la hidrólisis del almidón) que pudieron haber inhibido el proceso de esporulación (García-Alvarado, J.S., 1992). Las cepas enterotoxigénicas tuvieron curvas similares entre sí, pero hubo una diferencia importante en la cantidad de esporas viables. Esto probablemente se debió a que existen ciertas diferencias genéticas que capacitan a la cepa FD-1041 para producir mayor cantidad de esporas y subsecuentemente mayor cantidad de enterotoxina.

A diferencia de los estudios realizados por García-Alvarado (1990 y 1992), en el nuestro, probamos una mayor cantidad de temperaturas para poder observar el comportamiento hacia la temperatura de las cuatro cepas, desde las más bajas hasta las más altas toleradas por *C. perfringens*. Vimos que ninguna de las cuatro cepas fue capaz de esporular a 20°C y sólo las no enterotoxigénicas esporularon a 25°C. Sin embargo, al someterlas a temperaturas extremas de 50°C, la única cepa en la que se pudieron detectar esporas termorresistentes fue la FD-1041 (enterotoxigénica), coincidiendo con los resultados hallados por García-Alvarado (1990), donde se muestra que las esporas de esta cepa poseen una mayor termorresistencia que ATCC-3624 y FD-1 que también fueron probadas en ese estudio. Lo anterior nos confirma una vez más el riesgo que puede traer consigo un alimento (rico en rafinosa) que no es debidamente procesado y donde hay malos manejos en las temperaturas de

cocción y almacenamiento. Pero por otro lado, al saber que la ausencia de una amilasa extracelular funcional en las cepas enterotoxigénicas podría impedir la formación de la enterotoxina en alimentos que son manejados a altas temperaturas y que contienen almidón como carbohidrato primario (García-Alvarado, J.S., 1992).

La rafinosa es un trisacárido compuesto por galactosa, glucosa y fructosa unidos por enlaces α , mismos enlaces del almidón (Sigma-Aldrich Co., 2000). Este carbohidrato no se utiliza tan extensivamente en los medios para esporulación debido a su alto costo, mucho mayor, por cierto, que el almidón. Sin embargo, en el estudio realizado por García-Alvarado (1990), se probaron primero otros carbohidratos más sencillos como la maltosa y la glucosa, debido a que éstos eran el resultado del almidón al hidrolizarse. Se comprobó que también promovían el crecimiento de las cepas a 43 y 46°C, aunque la producción de esporas fue muy escasa. Esto pudo ser debido a que los carbohidratos de fácil metabolismo como la glucosa y la maltosa pueden llegar a reprimir la esporulación de las cepas como sugieren Elmerich y Aubert (1975).

En general se pudo observar en estas cepas que la temperatura en la que había mayor cantidad de esporas viables fue a 45°C, como lo planteamos en nuestra hipótesis, es decir, una temperatura similar a su temperatura óptima de crecimiento.

Con los resultados presentados en este trabajo podemos destacar dos perspectivas importantes. Primero, la temperatura óptima que se encontró para una alta esporulación en el medio DS con rafinosa, 45°C, es una temperatura que se alcanza con frecuencia en los meses de verano en varios estados de la República, incluyendo a Nuevo León. Esto es importante si, como ya lo mencionamos

anteriormente, muchos alimentos después de cocinarse, se enfrían a temperatura ambiente durante un largo periodo, otros, los de tipo buffette, en muchos casos se mantienen a temperaturas alrededor de los 40 y 50°C por muchas horas. En estas condiciones de temperatura se podría favorecer la proliferación rápida de *C. perfringens* en un periodo muy corto, en el cual las células pudieran iniciar o terminar la esporulación con la consiguiente producción o liberación de la enterotoxina en el alimento (García-Alvarado, 1990). Además, con este estudio pudimos demostrar que si *C. perfringens* se encuentra en un medio rico en almidón (tubérculos, granos, semillas, etc.), las cepas que pueden ser capaces de esporular en las temperaturas mencionadas, son las que no producen la enterotoxina, así, serían incapaces de causar enfermedad. Pero por otro lado, vemos que la rafinosa sí es hidrolizada y aprovechada por el microorganismo, entonces se debe tener precaución con ciertos alimentos que poseen rafinosa como el frijol. A causa de esta leguminosa y de las carnes (otro potencial portador de *C. perfringens*), la comida mexicana se considera potencialmente riesgosa en los estudios realizados por el CDC en los Estados Unidos, debido a que el común "chilli", cuyo principal ingrediente es el frijol, se ha visto involucrado en brotes de la intoxicación alimentaria producida por este microorganismo (Bean, N.H. y P.M. Griffin, 1990).

El segundo aspecto importante se enfoca a la investigación. *C. perfringens* es un microorganismo que ha sido ampliamente estudiado en relación con su capacidad para causar enfermedades o intoxicaciones de origen alimentario y del que se sigue investigando. Los factores que ocasionan mas preocupación son, además de su velocidad de crecimiento, su capacidad para producir esporas y fuertes toxinas. Por

esto, si se conoce su temperatura óptima de esporulación, podemos utilizarla para producir importantes cantidades de toxinas en el laboratorio para su estudio y utilización en la investigación.

A partir de los datos surgidos de este trabajo, sería interesante hacer, como siguiente paso, una investigación de lo descrito aquí pero directamente aplicado a los alimentos, es decir, probar las diferentes temperaturas en varios alimentos que son considerados importantes vectores de el microorganismo para observar su comportamiento y ver si, efectivamente, son capaces de causar enfermedad.

CONCLUSIONES

1. Las temperaturas óptimas de esporulación de *C. perfringens* son similares a sus temperaturas óptimas de crecimiento.
2. La cepa H-3 a pesar de ser enterotoxigénica, no produce grandes cantidades de esporas.
3. De las cepas estudiadas, la que implica un mayor riesgo es la FD-1041, porque es enterotoxigénica, porque produce grandes cantidades de esporas y porque es capaz de esporular a temperaturas de hasta 50°C en un medio propicio.

LITERATURA CITADA

1. Ando, Y., T. Tsuzuki, H. Sunagawa y S. Oka. 1985. Heat Resistanse, Spore Germination and Enterotoxigenity of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.*, 29 (4):317.
2. Barnes, E., J. Despaul y M. Ingram. 1963. The Behaviour of a Food-Poisoning Strain of *Clostridium perfringens* in Beef. *J. Appl. Bacteriol.*, 26:415.
3. Bean, N. H. y P. M. Griffin. 1990. Foodborne Disease Outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, Vehicles and Trends. *J. Food Prot.*, 53(9):804-817.
4. Borrielo, S. P., A. R. Welch, H. E. Larson, F. Barclay, M. F. Stringer y B. Bartholomew. 1984. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a Possible Cause of Antibiotic-Associated Diarrhoea. *Lancet*, 1:305.
5. Craven, S. E. 1990. The Effect of the pH of the Sporulation Environment on the Heat Resistance of *Clostridium perfringens* Spores. *Curr. Microbiol.*, 22: 233-237.
6. Dawes, I., J. Mandelstam y K. McQuillen. 1980. *Biochemistry of Bacterial Growth*. 3ª edición. Ed. John Wiley & Sons. New York-Toronto.
7. Duffy, L. K., J. L. McDonel, B. A. McClane y A. Kurosky. 1982. *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin: Characterization of the Amino-Terminal Region. *Infect. Immun.*, 38(1):386.
8. Duncan, C. L. y D. H. Strong. 1969. Experimental Production of Diarrhea in Rabbits with *Clostridium perfringens*. *Can. J. Microbiol.*, 15:765.
9. Ellner, P. 1986. A Medium Promoting Rapid Quantitative Sporulation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 71:495.
10. Elmerich, C. y J. P. Aubert. 1975. Involment of Glutamine Synthetase and the Purine Nucleotide Pathway in Repression of Bacterial Sporulation. Pp: 385. En: Gerhardt, P., R.N. Costilow y Sadoff (edi). *Spores VI*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. García-Alvarado, J. S. 1990. Estudio sobre algunos eventos metabólicos relacionados con la producción de enterotoxina y la esporulación de *Clostridium perfringens* tipo A a su temperatura óptima de crecimiento. Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Nuevo León, México.

12. García-Alvarado, J. S., M. A. Rodríguez y R. G. Labbé. 1992. Influence of Elevated Temperature on Starch Hydrolysis by Enterotoxin-Positive and Enterotoxin-Negative Strains of *Clostridium perfringens* Type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(1):326-330.
13. García-Alvarado, J. S., R. G. Labbé y M. A. Rodríguez. 1992. Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A at 37 and 43°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(4): 1411-1414.
14. Ingram, M., 1969. Sporeformers as Food Spoilage Organisms. En: *The Bacterial Spore*. Gould, G.W. y A. Hurst (Edi.). Academic Press. London-New York.
15. Gould, G. W. 1969. *The Bacterial Spore*. Academic Press. London-New York.
16. Granum, P. E. y O. Harbitz. 1984. A Circular-Dichroism Study of the Enterotoxin from *Clostridium perfringens* Type A. *J. Food Biochem.*, 9:137.
17. Heredia, N. L., R. G. Labbé, M. A. Rodríguez y J. S. García-Alvarado. 1991. Growth, Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A in the Presence of Human Bile Salts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 84:15-22.
18. Heredia, N. L., G. A. García, R. Luévanos, R. G. Labbé, J. S. García-Alvarado. 1997. Elevation of the Heat Resistance of Vegetative Cells and Spores of *Clostridium perfringens* Type A by Sublethal Shock. *J. Food Prot.*, 60(8): 998-1000
19. Hoeniger, J. E. M., P. E. Stuart and S. C. Holt. 1968. Cytology of Spore Formation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 96(3): 1818-1833.
20. Kalfon, A., J. F. Charles, C. Bourguin and H. De Barjac. 1984. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an Electron Microscope Study of Crystal-like Inclusion Biogenesis and Toxicity to Mosquito Larvae. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 893-900.
21. Kim, C. H., R. Cheney, y M. Woodburn. 1967. Sporulation of *Clostridium perfringens* in a Modified Medium and Selected Foods. *Appl. Microbiol.*, 15(4):871.
22. Kim, S., R. G. Labbé and S. Ryu. 2000. Inhibitory Effects of Collagen on the PCR for Detection of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(3): 1213-1215.
23. Labbé, R. G. 1989. *Clostridium perfringens*, pp: 191-233. En: M.P. Doyle (ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York.

24. Labbé, R. G. y C. L. Duncan. 1974. Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A under Conditions of Controlled pH and Temperature. *Can. J. Microbiol.*, 20:1493.
25. Labbé, R. G. y C. L. Duncan. 1975. Influence of Carbohydrates on Growth and Sporulation of *Clostridium perfringens* Type A. *Appl. Microbiol.*, 29(3):345.
26. Labbé, R. G., E. Somers y C. L. Duncan. 1976. Influence of Starch Source on Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(3):345.
27. Labbé, R. G. y L. L. Nolan. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Formation by Caffeine and Theobromine. *Infect. Immun.*, 34: 50-54.
28. Labbé, R. G. y D. K. Rey. 1979. Raffinose Increases Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:589.
29. Larson, H. E. y S. P. Borrielo. 1988. Infectious Diarrhea Due to *Clostridium perfringens*. *J. Infec. Dis.*, 157(2):390.
30. Leningher, A. L. 1991. *Principios de Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona.
31. López, J. M., C. L. Marks and F. Freese. 1979. The Decrease of Guanine Nucleotides Initiates Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 587: 238-252.
32. McClane, B. A. 1997. *Clostridium perfringens*. En Doyle, M., L. R. Beuchat, T. J. Montrille (edi.). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press.
33. Murrel, T. G. C., B. G. Ingham, J. R. Moss y W. B. Taylor. 1987. A Hypothesis Concerning *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin (CPE) and Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). *Med. Hypotheses*, 22: 401.
34. Naik, H. S. y C. L. Duncan. 1977. Enterotoxin Formation in Foods by *Clostridium perfringens* Type A. *J. Food Safety*, 1:7.
35. Piggot, P. J. and J. G. Coote. 1976. Genetic Aspects of Bacterial Endospore Formation. *Bacter. Rev.*, 40(4): 908-962.
36. *Reactivos y Productos Químicos para Investigación en Ciencias de la Vida 2000*. Sigma-Aldrich.

37. Rey, C. R., H. W. Walker y P. L. Rohrbaugh. 1975. The Influence of Temperature on Growth, Sporulation, and Heat Resistance of Spores of Six Strains of *Clostridium perfringens*. *Milk Food Technol.*, 38(8): 461.
38. Rood, J. I., 1998. Virulence Genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52:333-360.
39. Sacks, L. E. 1983. Influence of Carbohydrates on Growth and Sporulation of *Clostridium perfringens* in a Defined Medium with or without Guanosine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 1169-1175.
40. *Sleepecky, R.A. Ecology of Bacterial Spore Formers.
41. Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. 4th Edition. USA.
42. Todd, E. C. D., 1978. Foodborne Diseases in Six Countries -A Comparison-. *J. of Food Prot.*, 41(7):559.
43. Wada, A., Y. Masuda, M. Fukayama, T. Hatayema, Y. Yanagawa, H. Watanabe y T. Inamatsu. 1996. Nosocomial Diarrhoea in the Elderly Due to Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.*, 40(10):767-771.
44. Warth, A. D. 1978. Relationship between the Heat Resistance of Spores and the Optimum and Maximum Growth Temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.*, 134(3): 699.
45. Willardsen, R. R., F. F. Busta, C. E. Allen y L. B. Smith. 1978. Growth and Survival of *Clostridium perfringens* During Constantly Rising Temperatures. *J. Food Sci.*, 43: 470.
46. Williams, O. B. y W. J. Robertson. 1953. Studies on Heat Resistance. VI. Effect of Temperature of Incubation at which Formed on Heat Resistance of Aerobic Thermophilic Spores. *J. Bacteriol.*, 67:377.
47. Yotis, W. W. y N. Catsimpoolas. 1975. Scannig Isoelectric Focusing and Isotachopheresis of *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, 39:147.
48. Youngman, P., P. Zuber, J. B. Perkins, K. Sandman, M. Igo, R. Losick. 1985. New Ways to Study Developmental Genes in Spore-Forming Bacteria. *Science*, 228: 285- 291.
49. Zhao, Y. y S. B. Melville. 1998. Identification and Characterization of Sporulation-Dependent Promoters Upstream of the Enterotoxin Gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 150 (1): 136-142.



