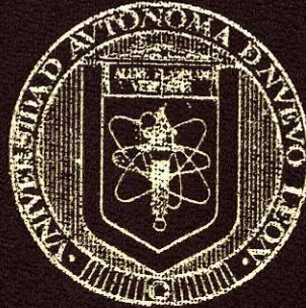


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCION DE *Clostridium perfringens*  
ENTEROTOXIGENICO EN CARNE MOLIDA  
EXPENDIDA EN EL AREA METROPOLITANA  
DE MONTERREY, N. L. POR DOT-BLOT

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TITULO DE  
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA

JEHU HERNANDEZ MORON

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MAYO DE 1999

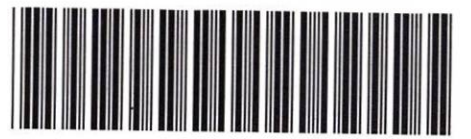
TL

TS1975

.H4

1999

c.1



1080092528

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Detección de *Clostridium perfringens* enterotoxigénico  
en carne molida expandida en el área metropolitana  
de Monterrey N.L. por Dot-Blot.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el título de  
Químico Bacteriólogo Parasitólogo

PRESENTA

Jehú Hernández Morón

San Nicolás de los Garza N.L.

Mayo de 1999

TL

T51975

.H4

1999



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
E INMUNOLOGÍA

Detección de *Clostridium perfringens* enterotoxigénico  
en carne molida expandida en el área metropolitana  
de Monterrey N.L. por Dot-Blot.

P O R

Jehú Hernández Morón

APROBADA

Comisión de tesis




Dra. Norma Laura Heredia Rojas

DIRECTOR DE TESIS



Dr. José Santos García Alvarado

SECRETARIO



Dra. Marivel Gómez Treviño

VOCAL

**Detección de *Clostridium perfringens* enterotoxigénico  
en carne molida expendida en el área metropolitana  
de Monterrey N.L. por Dot-Blot.**

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Hereda Rojas y la asesoría del Dr. José Santos García Alvarado.**

**Esta investigación formó parte del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAYCIT) de la U.A.N.L.**

## *D e d i c a t o r i a*

*A mi madre, en quien siempre encontré un gran apoyo espiritual, y quien fue un ejemplo de entereza aún en situaciones difíciles*

*A mi padre, quien ha sido un ejemplo de persistencia, me mostró a base de sacrificios su deseo de la superación de mi persona y quien me dio la libertad de elegir mi futuro*

*A mis hermanos, que de alguna forma me muestran su cariño cuando vuelvo a casa*

*A mis sobrinos, Raúl Isai y Jehú Samaniel, que simplemente son adorables*

*A mi tío Abel, quien en toda mi formación académica y hasta este momento me mostró su incondicional apoyo.*



## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y al Dr. José Santos García Alvarado por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus consejos y atenciones los cuales me ayudaron a realizar este trabajo.

A la M.C. María Manuela Vela Franco, quien dedicó de su valioso tiempo en compartirme de sus conocimientos para la realización de este trabajo y cuyos consejos aprecio profundamente.

A la I. A. Ma. Guadalupe Rojas Verde por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de este trabajo.

Al Dr. Rafael Castro Franco por su importante apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

A la QBP Lilia Graciela Miranda Velásquez, quien como Jefe del Departamento de Bioquímica, me permitió realizar parte del trabajo práctico en su laboratorio.

A la Dra. Marivel Gómez Treviño por su amable trato y disposición y quién tuvo a bien la revisión de la escritura de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, quienes siempre impidieron que el trabajo en él fuera rutinario.

Y sobre todo a Dios, por darme la vida hasta hoy, y la sabiduría para finalizar esta meta en mi vida.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

Página de título .....	I
Dedicatoria .....	IV
Agradecimientos .....	V
Índice de contenido .....	VI
Lista de tablas .....	VIII
Lista de abreviaturas .....	IX
Resumen .....	X
Abstract .....	XI
Introducción .....	I
Antecedentes .....	3
Generalidades .....	3
Enfermedades causadas por <i>C. perfringens</i> .....	4
Esporulación de <i>C. perfringens</i> .....	7
Detección de <i>C. perfringens</i> .....	7
Hipótesis .....	12
Objetivos .....	13
Material y métodos .....	14
Cepas de <i>C. perfringens</i> .....	14
Activación .....	14
Muestreo .....	15

Aislamiento .....	15
Confirmación .....	16
Detección de <i>C. perfringens</i> enterotoxigénico .....	16
Análisis estadístico .....	20
<b>Resultados .....</b>	<b>21</b>
Aislamiento de <i>C. perfringens</i> .....	21
Confirmación de <i>C. perfringens</i> .....	22
Detección del gen que codifica para la enterotoxina .....	22
Discusión .....	25
Conclusiones .....	30
Literatura citada .....	31

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de muestras positivas para *C. perfringens* mediante la técnica del Número mas probable.

Tabla 2. Porcentaje de muestras de *C. perfringens* confirmadas bioquímicamente.

Tabla 3. Muestras con *C. perfringens* que contiene el gen que codifica para la enterotoxina y su procedencia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Colección de Cultivos "Tipo" Americano (American Type Culture Collection).
°C	Grados centígrados
dig	Digoxigenina
g	Gramo
h	Hora(s)
μ	Micra(s)
μl	Microlitro(s)
ml	Mililitro(s)
min	Minuto(s)
M	Molar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NMP	Número mas probable
pH	Logaritmo recíproco de la concentración del ión hidrógeno.
p/v	Por ciento peso/volumen
pmol/ml	Picomol(es) por mililitro
%	Por ciento
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
Tris-HCL	Tris-hidroximetil-aminometano

## RESUMEN

Existen numerosos reportes acerca de la calidad microbiológica de la carne molida, la cual por ser un alimento perecedero, es altamente susceptible a ser contaminada por una gran cantidad de microorganismos. *Clostridium perfringens* es una bacteria patógena, anaerobia, formadora de esporas y responsable de diversas enfermedades gastrointestinales como lo es la intoxicación alimentaria, debido a que produce una enterotoxina.

Con el fin de conocer el grado de contaminación por *C. perfringens* de la carne molida en el área metropolitana de Monterrey N. L., se analizaron 48 muestras provenientes de centros comerciales y carnicerías.

Se utilizó la técnica de la fermentación tormentosa utilizando el sistema del número de mas probable, empleando leche con hierro para el aislamiento y la cuenta de la bacteria. De los tubos positivos se procedió al aislamiento del microorganismo utilizando medio selectivo (TSC) y las cepas aisladas se sometieron a pruebas bioquímicas. Encontramos que la técnica de la fermentación tormentosa presentó una correlación del 40% ya que de 45 reacciones positivas, solo se identificaron como *C. perfringens* 18 cepas.

Además se determinó la capacidad de las cepas aisladas para producir la enterotoxina, por medio de una sonda marcada con digoxigenina dirigida contra una región del gen de la enterotoxina. De las 18 cepas aisladas, 3 de ellas contenían dicho gen haciéndolas potencialmente patógenas.

## ABSTRACT

There are numerous reports about the microbial quality of ground meat, and because it is a perishable food, is highly susceptible for microbial contamination.

*C. perfringens* is an anaerobe, spore-forming pathogen bacteria. It is responsible of a diversity of gastrointestinal diseases such as the food poisoning because the production of an enterotoxin.

To determine the microbial quality of ground meat, samples from 48 supermarkets and butcher's shops of Monterrey and its suburb, were analyzed.

The most probable number technique and the stormy fermentation in ironmilk were used for the isolation and enumeration of the bacteria. From positive fermentation tubes, the isolation of the microorganism was done using selective media (TSC), after this, the isolates were subjected to biochemical tests. The stormy fermentation was found to be efficient in only 40%, since 18 out of 45 positive fermentations were identified as *C. perfringens*.

Furthermore the enterotoxigenicity of the isolates was determined by a dot-blot technique using an enterotoxin digoxigenin-labeled DNA probe.

The enterotoxin gene was found in 3 of the 18 isolates, making them potentially able to produce the enterotoxin.

## INTRODUCCIÓN

La carne molida de res es altamente susceptible de ser contaminada por múltiples microorganismos de importancia en la salud, de hecho, se ha reportado que es un vehículo importante en la contaminación de alimentos que han sido causa de envenenamiento alimentario (Hobbs, B. C. 1953).

Según reportes, dentro de los microorganismos mas frecuentes contaminando la carne cruda se encuentra *C. perfringens* (Ali, M. S., *et al*, 1991; Saito, M., 1990). Este microorganismo es una bacteria que normalmente habita en el tracto digestivo de hombres y animales (Miwa N., *et al*, 1997), es anaerobio, probablemente el mas estudiado entre los anaerobios patógenos para humanos, es gram positivo, con forma bacilar, encapsulado, formador de esporas y no móvil (McClane, B. A., 1997).

Desde las décadas de los años 40 y los 50 se reconoció que este microorganismo afectaba tanto a humanos como a animales (McClane, B. A. 1997; M. P., 1997; Yamagishi, T., 1997), y fue desde entonces que se determinó que era el agente etiológico de importantes enfermedades humanas relacionadas con los alimentos, como la intoxicación alimentaria causada principalmente por las cepas tipo A, enteritis necrótica y diarrea crónica humana (Labbé, R., 1989; Doyle, M. P., 1997).

Este microorganismo es de los patógenos mas distribuidos del planeta ya que se ha encontrado prácticamente en todos los suelos y hábitats del mundo en grandes cantidades, y



también como flora intestinal en casi todos los organismos (Labbé, R., 1989 y Meer, R. R., 1997).

Los síntomas observados en la intoxicación alimentaria, se deben al efecto de una enterotoxina (ECP) producida por varias cepas del microorganismo durante el proceso de esporulación (Kokai-Kun, J. F. y B. A. McClane, 1997). Es importante considerar que no todas las cepas tienen la capacidad de producir la enterotoxina (Saito, M., 1989).

La esporulación de la bacteria *in vitro* es algo difícil, ya que influyen muchos factores como la cepa y el medio que se usa (Labbé, R., 1989), por lo que la detección de la enterotoxina puede dificultarse (Kokai-kun, J. F. *et al*, 1994). Debido a lo anterior hemos buscado un método más adecuado para poder determinar el potencial de enterotoxigenicidad de las cepas.

En el presente trabajo analizamos el grado de contaminación por este microorganismo de la carne molida que se expende en el área metropolitana de Monterrey N. L. Además, determinamos cuantas de ellas pudieron ser potencialmente enterotoxigénicas, detectando el gen que codifica para la enterotoxina mediante una técnica de hibridación en colonia.

# ANTECEDENTES

## I GENERALIDADES

Durante los últimos 90 años *C. perfringens* ha sido asociado principalmente con la gangrena gaseosa, sin embargo su primer referencia como agente causal de diarrea crónica ligera fue a finales del siglo XIX (Labbé, R., 1989).

Knox y McDonald en Inglaterra y McLung en E.U. fueron los primeros en asociar a este microorganismo con envenenamiento alimentario en la década de los 40's (Labbé, R., 1989). Sin embargo no fue hasta 1953 cuando Hobbs *et al*, empezaron a estudiar a este microorganismo mas profundamente (Labbé, R., 1989).

Desde 1960 el número de envenenamientos a causa de *C. perfringens* ha ido en incremento hasta nuestros días (Labbé, R., 1989). Debido a lo cual, se han derivado una serie de importantes estudios acerca de este potente patógeno.

Todd (1989) reportó un dato muy interesante al estimar que durante el periodo de 1978 a 1982, se presentó en promedio un total de 14,340 casos de brotes ocasionados por alimentos contaminados, y que de estos 6,427 (44.8%) fueron ocasionados por bacterias. Se ha estimado que un total de 1,108 casos fueron causados por *C. perfringens* anualmente en Estados Unidos, ocupando el tercer lugar después de *Salmonella sp.* *Staphilococcus aureus*. *C. perfringens* ha ocupado el tercer lugar como patógeno de alimentos en países industrializados

(Camillot, E. *et al*, 1995). Para su clasificación este microorganismo se divide en 5 tipos toxigénicos, A, B, C, D y E, esto de acuerdo a la producción de 4 toxinas principales que son letales y extracelulares como lo son la  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ , y  $\gamma$  (alfa, beta, épsilon e iota) (Labbé, R., 1989).

Este microorganismo se encuentra altamente distribuido en el ambiente, las cepas tipo A son la más comúnmente encontradas y se ha reportado que son responsables de algunas patologías como envenenamiento alimentario y gangrena gaseosa en humanos y animales. Además, en caballos produce colitis necrozante y enterotoxemia. Los tipos B, C y D ocurren principalmente en el intestino de animales y solo muy ocasionalmente en humanos (Daube, G., 1994; Yamagishi, T., 1997).

*C. perfringens* durante su esporulación, libera una enterotoxina (ECP) la cual es una proteína de 35 kDa, y es la causante de los calambres abdominales y de la diarrea que forman parte de los síntomas típicos de la enfermedad (Collie, R. E. and B. A. McClane, 1997).

En 1997 Meer tipificó cepas aisladas de muestras de colecciones en Estados Unidos de aves, bovinos, caninos, caprinos, ovinos, porcinos y humanos. El encontró que un 95% de los aislados fueron tipo A, de ellos el 12.8% resultó ECP positivo, el restante 5% fueron de los tipos B, C, D y E.

## II ENFERMEDADES CAUSADAS POR *C. perfringens*.

Se ha involucrado a *C. perfringens* como causa de otras enfermedades como las

gastrointestinales veterinarias y humanas, así como también se ha asociado con casos del síndrome de la muerte espontánea infantil (SIDS), (Kokai-kun J. F. and B. A. McClane, 1997).

Estudios recientes han sugerido que esta bacteria puede ser la causa en humanos de enfermedades gastrointestinales no asociadas con alimentos, y además que ha sido la causa de aproximadamente el 10% de todos los casos de diarrea asociados a antibióticos y del 5 al 20% de todos los casos de diarrea no asociados con alimentos (Collie, R. E. y B. A. McClane, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a un envenenamiento alimentario como cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica causada o sospechosamente causada por el consumo de alimento o agua (Eley, A. R., 1996).

En Estados Unidos y Europa, el envenenamiento alimentario debido a *C. perfringens* tipo A, suma cientos de miles de casos y es causa de pérdidas de millones de dólares anualmente (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997).

El envenenamiento alimentario se presenta cuando un individuo consume alimento contaminado con un gran número de células vegetativas de *C. perfringens* enterotoxigénico [ $>10^5$  células/g (Fach, P. and M. R. Popoff., 1997)]. Algunas de estas pueden sobrevivir su paso por el estómago y pasar al intestino, donde se multiplican y posteriormente esporularán (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997). Es durante este periodo cuando se producirá la ECP cuya acción citotóxica en el intestino, será la responsable de la diarrea y los calambres abdominales característicos (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997).

La ECP debe ser considerada como una toxina que actúa sobre la membrana de células de mamíferos y cuyo efecto citotóxico primario es inducir alteraciones moleculares en la permeabilidad de la membrana de células de mamíferos. Estos cambios afectan el equilibrio osmótico que normalmente presentan las células mamíferas, dando lugar a una cascada de eventos que incluyen la inhibición de la síntesis de macromoléculas, daño morfológico y hasta lisis celular. Estas células dañadas deben de considerarse no viables, ya que no hay evidencia de que puedan recuperar su función. Aunque en un principio se pensó que este proceso era dependiente de  $Ca^{+2}$  extracelular, ahora se sabe que esta molécula solo se requiere para el desarrollo de algunos eventos secundarios. La células que fueron alteradas, mueren y mudan de las vellosidades del intestino delgado. Esta descamación produce daño histopatológico y rompe la integridad de las vellosidades del intestino delgado, lo que trae como consecuencia fluido y la pérdida de electrolitos de las células que se manifiesta clínicamente con los síntomas diarreicos. (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997).

Ya que el proceso de esporulación lleva de 8 a 15 h, los síntomas de intoxicación por *C. perfringens* usualmente se presentan hasta 12 h después de la ingestión y estos duran de 12 a 24 h (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997).

La ECP, responsable de la intoxicación alimentaria (IA) fue caracterizada a principios de los años 70's (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997). Estudios posteriores han determinado que es un polipéptido de una sola cadena de 319 aminoácidos, con un peso

molecular de 35 kDa y un punto isoeléctrico de 4.3 (Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane, 1997).

### III ESPORULACIÓN DE *C. perfringens*

La esporulación es un aspecto importante de *C. perfringens* debido a varias razones: a) es un factor importante de clasificación; b) las esporas pueden sobrevivir procesos térmicos, y así acelerar el crecimiento de células vegetativas si se presentan las condiciones adecuadas, y c) durante el proceso de esporulación, se producen grandes cantidades de enterotoxina en el intestino delgado (Labbé, R., 1989).

Normalmente, inducir la esporulación *in vitro* de *C. perfringens* no es fácil, ya que varía con cada cepa y además con el medio que se utiliza. El medio de carne cocida ha sido muy utilizado, ya que se pueden obtener porcentajes de esporulación hasta en un 90% (Labbé, R., 1989). Sin embargo, separar las células esporulando de este medio resulta imposible, por lo que no se usa para este fin, y al utilizar otros medios normalmente la esporulación es muy pobre. Debido a esto, el detectar la enterotoxina resulta a menudo muy difícil.

### IV DETECCIÓN DE *C. perfringens*

Existen muchos métodos para la determinación de *C. perfringens*. En un estudio para la identificación de *C. perfringens* lecitinasa negativo realizado en Inglaterra por Brett (1994), se empleó agar sangre neomicina, agar sangre columbia y la reacción de Nagler, la cual es

considerada como una prueba serológica ya que se emplean anticuerpos antitoxina A, esta reacción no es muy practicada en los laboratorios, debido a que en la actualidad solo se puede disponer de ella en Estados Unidos y en el Instituto Pasteur en Francia. (Koneman, E. W. *et al*, 1992).

Entre los medios selectivos mas comúnmente empleados para el aislamiento del microorganismo se encuentran los agares sulfito-poliymixina-sulfadiacina (SPF), triptosa-sulfito-neomicina (TSN), Shahidi-Ferguson *perfringens* (SFP) y triptosa-sulfito-cicloserina (TSC). En todos ellos, *C. perfringens* aparece como colonias negras ya que reducen el sulfito a sulfuro el cual es después precipitado como sulfuro ferroso (Emswiler, B. S. *et al*, 1976).

Otros métodos para la diferenciación de *C. perfringens* incluyen la serotipificación, la tipificación de bacteriocinas, determinación de perfiles plasmídicos, zymotipificación, y ribotipificación. Todos estos son métodos que tienen desventajas o inconvenientes, por ejemplo, no siempre están disponibles en los laboratorios microbiológicos, son técnicamente fastidiosos y, además consumen mucho tiempo (Leflon-Guibout V. *et al*, 1997).

La técnica utilizando el sistema del número mas probable (NMP) de la fermentación tormentosa de la leche con hierro (IMMPN del inglés, iron milk most probable number) ha sido utilizada por distintos investigadores en los últimos años. Esta se basa en la capacidad del *C. perfringens* para formar un cuajo en la leche en un tiempo de 16 - 18 h a una temperatura de

45°C (Guzmán, A. M. S. de *et al*, 1989; Abeyta, C. JR. *et al*, 1985; William, D. ST. J, *et al*, 1982).

Miwa (1997), reportó la presencia de *C. perfringens* en contenido intestinal de ganado vacuno, porcino y pollos. El mencionó que es importante la contaminación a partir de la heces de estos animales, ya que en el rastro la carne se puede contaminar en forma cruzada a partir de las heces del animal recién sacrificado. El reportó la presencia de *C. perfringens* enterotoxigénico en contenido intestinal de un 26% de ganado, un 22% de cerdo y un 40% en pollo.

Emswiller, *et al*, en 1977 reportaron, en un estudio realizado en Maryland E.U., que casi un 16% de la carne molida analizada contenía *C. perfringens*.

Bryan (1979) reportó que la carne de res, pavo y el jamón de pueco son los vehículos mas comunes para este microorganismo; también mencionó que el 65% de los brotes infecciosos en el periodo de 1973 - 1977 en Estados Unidos, provinieron de prácticas poco higiénicas de los restaurantes, el 31% de los hogares y el 4% de las plantas procesadoras de alimentos (Bryan, 1979).

En un estudio similar realizado por Fukushima (1987), se determinó la incidencia total de microorganismos de importancia médica. Ellos determinaron que casi un 2% de la carne de puerco y de res, y mas de un 10% en la carne de pollo estaba contaminada con *C. perfringens*. El muestreo se realizó durante los meses de Noviembre a Marzo, sugiriendo que la contaminación por este microorganismo predominaba en el invierno. En contraste a lo



anterior, McClane (1997), mencionó que los envenenamientos alimentarios eran un poco más comunes en los meses de verano.

Ali y Fung en 1991 en un estudio realizado en Kansas determinaron la ocurrencia de la bacteria en carne de res y de pavo. Ellos reportaron que un 54% de carne de res y un 75% de carnes de pavo fueron positivas para la bacteria.

Souza y de Oliveiran (1986) encontraron que un 57% de carne cruda fue positiva para *C. perfringens* y de ella un 7% resultó ser enterotoxigénica.

Aunque los porcentajes positivos para *C. perfringens* de diversos alimentos analizados varían, es importante tomar en cuenta que no todas las cepas que se pueden aislar de *C. perfringens* contienen el gen que codifica para la enterotoxina. Se han realizado estudios como el de Saito (1989), donde se logró aislar cepas productoras de enterotoxina en un 6% de un total de 80 muestras de heces fecales provenientes de manipuladores de alimentos, en un 12% de un total de 41 moluscos, en un 10% de muestras de agua, y en un 2% de muestras fecales de perros.

Otras técnicas más recientes, determinan la enterotoxigenicidad del microorganismo una vez que han sido aislados, y abarcan desde la hibridación del gen enterotoxigénico, métodos de polimorfismo de fragmento de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), electroforesis en campo pulsado (PFGE, del inglés *pulsed-field gel electrophoresis*), hasta la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) (Miwa N. *et al*, 1997).

McClane B. A. (1997) estudió la incidencia de cepas enterotoxigénicas en heces fecales. El reportó casi un 6% de personas aparentemente sanas, cuyas heces contenían a *C. perfringens* enterotoxigénico. Un estudio similar se realizó en Monterrey, N.L. en el que se determinó que el microorganismo se encontraba en un promedio de  $7.4 \times 10^3$  esporas por g de heces fecales de los individuos analizados, incluyendo infantes, adolescentes, adultos y ancianos. De ellos, el 4% fueron portadores del gen enterotoxigénico (Vela M., 1997).

También se han realizado estudios sobre incidencia en especias utilizadas como sazonadores de alimentos, se encontró que mas de un 62% de las muestras analizadas (ajo en polvo, pimienta, comino, orégano y laurel) contenían al microorganismo, y de ellas el 4% poseían el gen que codifica para la enterotoxina (Rodríguez, L., *et al*, 1998).

Últimamente, aislamientos de *C. perfringens* enterotoxigénico han sido asociados con enfermedades gastrointestinales como la diarrea asociada a antibióticos y la diarrea esporádica. Para la identificación de las cepas se han utilizado las técnicas de polimorfismo de fragmento de restricción (RFLP y electroforesis en campo pulsado (PFGE). Se encontró que todas las cepas utilizadas aisladas de intoxicaciones alimentarias poseían un gen de enterotoxina cromosomal (Collie, R., *et al*, 1997).

Aunque la incidencia de cepas enterotoxigénicas encontradas en general puede parecer baja, es importante tomar en cuenta que aún este porcentaje representa un problema latente que puede convertirse en un brote si no se guardan las condiciones higiénicas necesarias en la preparación de los alimentos a fin de tratar de eliminar al máximo este microorganismo.

## HIPÓTESIS

La carne molida que se expende en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León está contaminada con *C. perfringens* enterotoxigénico.

## OBJETIVOS

a) Determinar la frecuencia de *C. perfringens* en muestras de carne molida que se expenden en Monterrey y su área metropolitana.

b) Establecer el porcentaje de cepas aisladas que contienen el gen que codifica para la enterotoxina.

## MATERIAL Y MÉTODO

### CEPAS DE *C. perfringens*.

Se emplearon las cepas de *C. perfringens* FD-1041 y H3 como controles positivos (productoras de enterotoxina), estas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Stanley Harmon del Centro de Control de Enfermedades de E.U.A., y por el Dr. Ronald G. Labbé de la Universidad de Massachusetts, E.U.A., respectivamente. Como control negativo la cepa FD-1 y la ATCC 3624 (no productoras de enterotoxina), proporcionadas por el Dr. Ronald G. Labbé de la Universidad de Massachusetts, E.U.A. Estas cepas se mantuvieron en medio de carne cocida según Robertson (Willis, A. T., 1960), se incubaron a 37°C durante 72 h. y fueron mantenidas en congelación a -20°C realizándose resiembras periódicas cada 8 meses.

### ACTIVACIÓN

Las cepas se activaron inoculando una alícuota del medio de cultivo esporulado de reserva (medio de carne cocida) en tubos con 10 ml de caldo tioglicolato (DIFCO) e inmediatamente después se sometieron a un choque térmico a 75°C por 15 min a fin de estimular la germinación de las esporas, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C por 14 a 16 horas.

## MUESTREO

La carne fue muestreada aleatoriamente en los municipios de Monterrey, San Nicolás, Guadalupe y San Pedro Garza García N.L. De cada muestra se tomó en cuenta su procedencia, ya sea centro comercial o carnicería. Se manejaron 12 muestras por municipio de las cuales 6 fueron colectadas de Centros Comerciales y 6 de Carnicerías.

## ASLAMIENTO

Se utilizó la técnica de número de mas probable (NMP) en sistema de 3 - 3 - 3, empleando medio de leche con hierro. Para esto, se resuspendió de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y se enriquece con sulfato de fierro ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ ) al 0.1% (concentración final).

Se pesaron 20g de la muestra y se licuó en 180 ml de agua peptonada (NaCl 0.85% y Peptona Trypticasa al 0.01%). Los primeros tres tubos del sistema se llenaron con 20 ml del medio de leche al 1.5X y se inocularon con 10 ml de la muestra, los siguientes seis tubos con 10 ml del medio 1X fueron inoculados tres con 1 ml de la muestra y tres con 100  $\mu\text{l}$  de la muestra. Posteriormente los sistemas de NMP se incubaron a 45°C para ser observados al cabo de 16 a 18 horas de incubación. De aquellos que presentaron la fermentación tormentosa típica se inocularon en caldo tioglicolato (DIFCO) y de ahí a medio de conserva (caldo carne cocida) a una temperatura de 37°C por 24 a 48 h, para posteriormente sembrar en placa en agar triptosa sulfito cicloserina (TSC, DIFCO).

## CONFIRMACIÓN de *C. perfringens*.

Apartir de las placas con agar TSC, se aislaron las colonias típicas en medio tioglicolato. Estas cepas fueron sometidas a las pruebas bioquímicas confirmatorias como fermentación de la lactosa, reducción de nitratos a nitritos, producción de sulfuro, gelatinasa y movilidad. Los sistemas bioquímicos fueron incubados a una temperatura de 37°C por 24 horas en anaerobiosis.

Las cepas positivas fueron las que presentaron movilidad negativa, fermentación de la lactosa positiva, reductoras de nitratos y gelatinasa positivas. Estas cepas fueron posteriormente sometidas a una técnica de hibridación en colonia para la determinación del gen de la enterotoxina.

## DETECCIÓN DE *C. perfringens* ENTEROTOXIGÉNICO

Se practicó una prueba de hibridación en colonia para la detección del gen enterotoxigénico empleando una sonda de ADN de 40 pares de bases, mostrando una secuencia como se indica enseguida, 5'ATGCTTAGTAACAATTTAAATCCAATGGTGTTCGAAAATG3'.

El oligonucleótido empleado en este trabajo fue donado por el Dr. Peter Feng de los laboratorios de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA del inglés Food and Drug Administration) en Washington, D.C., E.U.A.

#### a) Marcaje de la sonda

Se utilizó una sonda de ADN marcada con digoxigenina, la cual se unió al extremo 3' del oligonucleótido.

#### b) Tratamiento de las membranas para la fijación de las cepas

Las muestras, las cuales se encontraban en medio de carne cocida, fueron inoculadas en caldo tioglicolato e incubadas a 37°C por un periodo de 16 - 18 h.

Se montó un sistema empleando una cámara de Dot-Blot (Minifold y Schleicher & Schuell Keene, NH) con una membrana de un poro de 0.45  $\mu$  (Micron MSI Westboro, MA); siguiendo un patrón establecido previamente, y después de aplicar vacío empleando una bomba (Welch directorr 8910) se adicionaron 50  $\mu$ l de los cultivos. Se esperó a que se adhirieran y secaran por un espacio de 30 - 60 min.

Después de que las muestras fueron secadas, la membrana se colocó en una cama de papel filtro impregnado con solución desnaturalizadora (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M en agua destilada y SDS 0.1%) por espacio de 15 min. Posteriormente se pasó de la misma forma a una solución neutralizadora (Tris-HCl 1.0 M, pH 7.5 con NaCl 1.5 M) por 8 min. Enseguida la membrana se saturó con un amortiguador de citratos 2X (0.3 M, pH 7 con NaCl 3 M).

El ADN se fijó a la membrana cuando esta se llevó a una temperatura de 120°C por espacio de 15 min, la membrana se mantuvo húmeda con amortiguador de citratos. Con la solución de lavado (Solución amortiguadora de citratos 3X, con SDS 0.1%) se eliminaron



posibles restos celulares de la membrana, dicha solución se dejó por espacio de 2 h en agitación a temperatura ambiente.

### **c) Hibridación**

La membrana se colocó en un recipiente que contenía 20 ml de solución de prehibridación [Solución amortiguadora de citratos 5X con reactivo de bloqueo para la hibridación de ácidos nucleicos (Genius, Boehringer Mannheim, 1995) al 1% (p/v), N-lauroilsarcosina al 0.2% y SDS al 0.2%] y, se dejó en agitación en baño de agua a una temperatura de 68°C por espacio de 2 h.

Después las membranas se colocaron en solución de hibridación (2 pmol/ml del oligonucleótido marcado con digoxigenina en 20 ml de la solución de prehibridación ya descrita anteriormente) y se incubaron en baño de agua a 56°C por 6 h.

Posteriormente la membrana fue sometida a lavados de astringencia con el propósito de eliminar el excedente del oligonucleótido no adherido, primero se lavó con una solución de lavado 2X (amortiguador de citratos 2X con SDS 1%) a temperatura ambiente, en agitación y por un espacio de 5 min, y enseguida se lavó con una solución de lavado 0.5X (amortiguador de citratos 5X y SDS 0.1%) a 56°C en baño de agua y con agitación.

### **d) Detección**

Después de los lavados de astringencia, la membrana se equilibró en una solución

amortiguadora a temperatura ambiente por 1 min [(Ácido maléico 0.1M, pH 7.5 con NaCl 0.15M y Tween 20, 0.3% (p/v)].

Enseguida, la membrana fue colocada en solución de bloqueo [reactivo de bloqueo para la hibridación de ácidos nucleicos (Genius, Boehringer Mannheim, 1995) al 1% (p/v) disuelto en solución amortiguadora de ácido maléico 0.1M] por un espacio de 45 min a temperatura ambiente. La membrana fue colocada en solución con el conjugado anti - dig - fosfatasa alcalina [6 µl de anti-dig (Boehringer Mannheim) en 30 ml de la solución de bloqueo anteriormente descrita] por espacio de 60 min en agitación constante a temperatura ambiente.

Se lavaron las membranas en solución amortiguadora de lavado [Ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM; pH 7.5; Tween 20 3% (v/v)] por dos periodos de 15 min en agitación a temperatura ambiente, con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo.

Posteriormente se equilibró la membrana en amortiguador de detección (Tris-HCl 0.1M, pH 9.5 con NaCl 0.1M ) por 2 min, después de transcurrido este tiempo se agregó 10 ml de la solución generadora de color [45 µl de nitroazul de tetrazolio y 35 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (Genius, Boehringer Mannheim, 1995) en 10 ml de la solución anteriormente descrita.

Las membranas se incubaron en oscuridad en un recipiente sellado, sin agitación por 10 h aproximadamente hasta la observación de color pardo en las reacciones positivas. La reacción se detuvo al sumergir la membrana en agua bidestilada.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de las cuentas de NMP se sometieron a un análisis de varianza de una sola vía ( $\alpha= 0.05$ ), para determinar si existían diferencias significativas en el grado de contaminación del total de las carnes analizadas.

## RESULTADOS

### a) Aislamiento de *C. perfringens*.

De acuerdo con la técnica de la fermentación tormentosa se tomaron como positivas aquellas muestras que tuvieron la capacidad de fermentar la leche formando un cuajo entre las 16 y 18 h de incubación a 45°C (Fig 1). Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 1.

Encontramos que se detectó la prueba positiva para la totalidad de las muestras procedentes de Monterrey y San Nicolás. El municipio de Guadalupe presentó una muestra negativa procedente de un centro comercial. De igual manera, San Pedro presentó dos muestras negativas para la fermentación típica. Ambas muestras fueron colectadas de carnicerías.

Tabla 1. Porcentaje de muestras positivas para *C. perfringens* mediante la técnica del número mas probable.

MUNICIPIO	% DE MUESTRAS POSITIVAS
MONTERREY	100
SAN NICOLAS	100
GUADALUPE	91
SAN PEDRO	83

**b) Confirmación de *C. perfringens*.**

Apartir los tubos positivos se realizó el aislamiento del microorganismo tal como se especificó en la metodología. Encontramos que no todas las muestras positivas para la fermentación tormentosa fueron capaces de desarrollar colonias negras en medio TSC (tabla 2). Este valor varió entre el 25 y el 50%.

**Tabla 2. Porcentaje de muestras de *C. perfringens* confirmadas bioquímicamente.**

<b>MUNICIPIO</b>	<b>% DE MUESTRAS CONFIRMADAS</b>
MONTERREY	50
SAN NICOLAS	25
GUADALUPE	33
SAN PEDRO	42

**c) Detección del gen que codifica para la enterotoxina.**

Se obtuvieron un total de 18 aislados de *C. perfringens* a partir de las muestras de carne analizadas. Estas muestras fueron sometidas a una prueba de hibridación utilizando una sonda de DNA dirigida contra el gen de la enterotoxina. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 3. Observamos que las muestras enterotoxigénicas provenían de Monterrey, San Nicolas y San Pedro. En los aislados de Guadalupe no encontramos cepas enterotoxigénicas. En los tres casos de los cuales se lograron aislar cepas enterotoxigénicas los establecimientos de donde se adquirieron las muestras fueron centros comerciales.

Tabla 3. Cepas de *C. perfringens* que contienen el gen que codifica para la enterotoxina y su procedencia.

MUNICIPIO	PROCEDENCIA	MUESTRAS ENTEROTOXIGÉNICAS
MONTERREY	c. comercial	1
SAN NICOLAS	c. comercial	1
GUADALUPE	c. comercial	0
SAN PEDRO	c. comercial	1

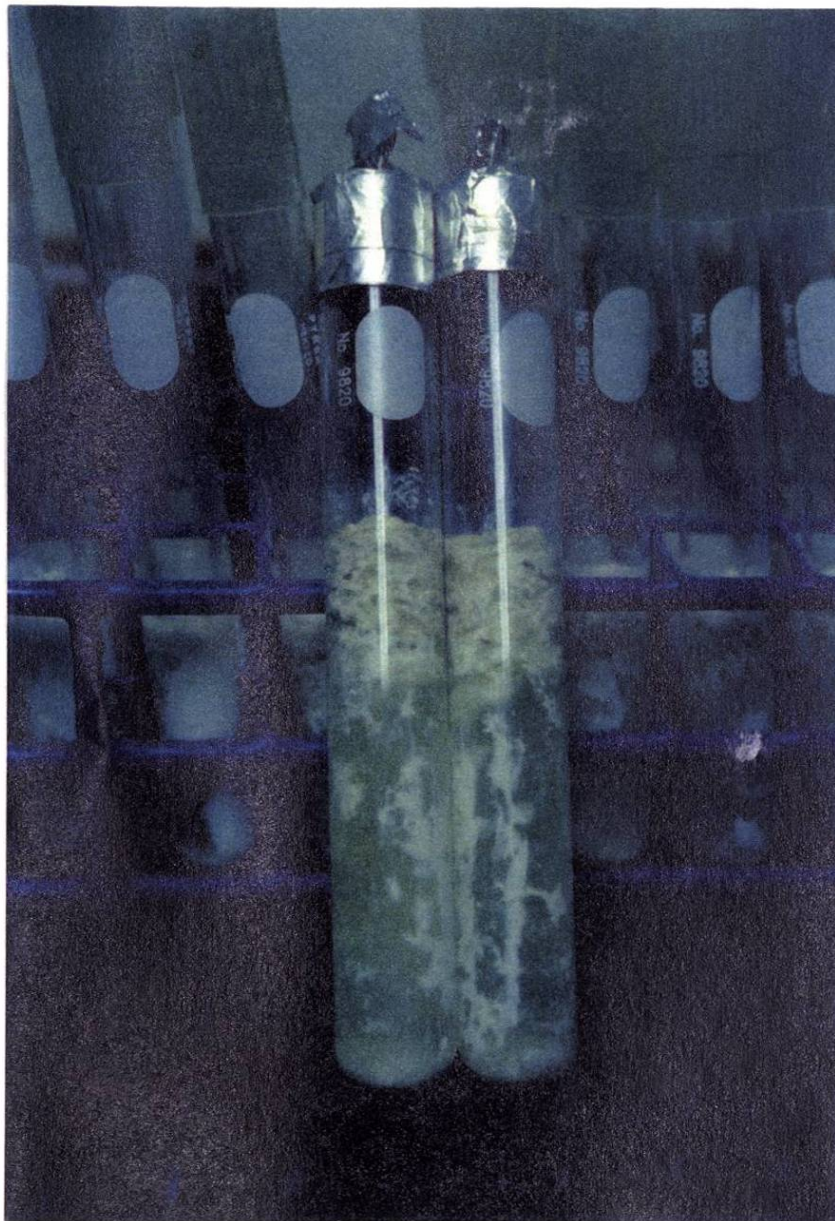


Fig. 1. Fermentación tormentosa característica de *Clostridium perfringens*.

El análisis estadístico que se practicó fue un Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía. No encontramos diferencia significativa entre el total de muestras analizadas, es decir, que la población era homogénea, por lo que no se corrigió el número original de muestras.

El análisis estadístico empleado se practicó sobre el número mas probable, ya que fue la técnica usada para el conteo de células por gramo.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó la presencia de *C. perfringens* en muestras de carne molida compradas en el área metropolitana de Monterrey N. L. Se decidió utilizar la técnica del número mas probable para realizar la cuenta de este microorganismo, debido a que varios grupos de investigadores la han probado con buenos resultados (William D. St. J. *et al*, 1982; Abeyta A. Jr. *et al*, 1985; Guzmán A. M. S *et al*, 1989).

Uno de ellos fué Abeyta (1985) quién inoculó alimentos con la bacteria. Posteriormente realizó la cuenta de estos empleando tres métodos, con el fin de probar su efectividad, el agar Shahidi-Ferguson-Perfrngens (SFP), Triptosa-Sulfito-Cicloserina (TSC) y la técnica de la fermentación tormentosa mediante el número mas probable (NMP). El no encontró diferencia significativa al utilizar los tres métodos.

William en 1982 mencionó que la capacidad selectiva del medio de leche con hierro, radicaba solamente en la capacidad de *C. perfringens* para crecer rápidamente a 45°C y que la fermentación tormentosa se presentara al cabo de 18 h. Esta fermentación típica se basaba en la formación de un cuajo como resultado de la acidez del medio. Este investigador trabajando con muestras de lodo, agua y suelo, realizó una comparación entre la efectividad de medios selectivos y la fermentación tormentosa y encontró resultados muy similares al comparar las técnicas entre sí, concluyendo que no existió diferencia significativa entre ellos.



En nuestro trabajo encontramos que todas las muestras colectadas en Monterrey y San Nicolás fueron positivas en la fermentación tormentosa. Esto no ocurrió con las muestras de Guadalupe y de San Pedro en donde algunas resultaron negativas a esta reacción fermentativa. Esto nos indicó que los datos obtenidos no se podían considerar reales, ya que como se especificó en la tabla 2, únicamente del 25 al 50% de los aislados se identificaron como *C. perfringens*. Lo anterior pudiera ser debido a varias causas, probablemente a que exista algún otro microorganismo que tenga la capacidad de presentar la fermentación tormentosa típica de *C. perfringens*.

De hecho Guzmán (1989) en un estudio donde analizó muestras de chorizo, mencionó que otros microorganismos como *Bacillus* y *Escherichia coli* podrían producir una reacción similar a la fermentación tormentosa.

Con todo esto podemos considerar que aunado a esta técnica, se deben realizar pruebas confirmatorias para eliminar la posibilidad de falsos positivos.

A partir de las muestras positivas obtenidas, se sembraron alícuotas en agar selectivo para poder tener colonias puras y aisladas. Se decidió emplear el medio TSC ya que existían reportes donde este medio mostró mejores resultados en cuanto a recuperación de cepas dañadas (Harmon S. M. *et al*, 1971; Emswiler, *et al*, 1977).

En este medio, *C. perfringens* aparece como colonia negra ya que el microorganismo es capaz de reducir el sulfato a sulfuro, el cual precipita como sulfato de fierro (Emswiler B. S. *et al*, 1977). De las muestras positivas se tomaron 2 a 3 colonias representativas y se realizaron

pruebas bioquímicas, y posteriormente, solo se conservó una de ellas. Del total de las fermentaciones positivas (45), el 40% correspondió a *C. perfringens*. D muestreo original (48), solo 18 de ellas (37.5%) resultaron ser *C. perfringens*. De ellas 9 muestras fueron adquiridas en centros comerciales y 9 en carnicerías, es decir, que en ambos casos el microorganismo se aisló de una manera similar.

Se ha reportado que la contaminación de la carne con microorganismos como *C. perfringens* puede tomar lugar durante la manufactura, en la tienda o cocina, de manos, utensilios, molinos, básculas, tablas para picar, ropas, etc. (Hobbs B. C., 1953). Y si ésta es almacenada a temperaturas no lo suficientemente bajas, se pudiera incrementar aún mas la multiplicación bacteriana. Ya que se sabe que *C. perfringens* puede crecer muy bien aún a temperaturas bajas dentro del rango de 15 a 6°C y a esta última es donde se detiene su multiplicación (McClane B. A. 1997).

El alto grado de contaminación se puede facilitar, ya que como se ha mencionado, este microorganismo se encuentra distribuido muy ampliamente. Se ha reportado en especias (Rodríguez, L. *et al*, 1998), heces fecales (Vela M, *et al*, 1997), agua, fango, suelo, etc. (William D. St. J. and M. M. Wekell, 1982). Debido a esto, fácilmente se puede presentar la contaminación cruzada, desde el momento del sacrificio de los animales donde los canales pueden contaminarse con las heces fecales, en donde se encuentra este microorganismo (Miwa N. *et al*, 1997).

Aunque existe una normativa que especifica la calidad sanitaria de la carne molida y carne molida moldeada (La Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA1-1993), en ella solo se indica un límite máximo para microorganismos mesofílicos aerobios, para *Salmonella* sp. y *S. aureus*. Sin embargo no se incluye a *C. perfringens*. Consideramos que en base a todo lo que se a indicado con respecto a la importancia de este microorganismo, y los resultados obtenidos, *C. perfringens* debería ser incluido en alguna normativa y determinar sus límites permitidos.

Sin embargo, aun con el aislamiento del microorganismo, se ha mencionado que no se puede asegurar que esta bacteria sea la causa de una intoxicación alimentaria ya que se ha reportado que solo el 6% de las cepas contienen el gen que codifica para la enterotoxina (Fach P. and M. R. Popoff. 1997).

Una gran ventaja de la utilización de metodologías moleculares para detectar cepas toxigenicas radica en que no se requiere la esporulación de la bacteria. Y es necesaria para la producción y detección de la enterotoxina (Kokai-kun, J. F., *et al*).

La presencia del gen que codifica para la enterotoxina se determinó empleando una sonda de ADN marcada con digoxigenina, la cual estuvo dirigida contra una región de dicho gen.

Del total de las 18 cepas aisladas, 3 resultaron portar el gen de la enterotoxina, lo cual representó un 17% y todas las cepas (3) que contenían el gen que codificaba para la enterotoxina provinieron de centros comerciales (tabla 3).

Con todo lo anterior, podemos decir que la hipótesis fué aceptada, ya que la carne molida que se expende en el área metropolitana de Monterrey, esta contaminada con *C. perfringens* enterotoxigénico.

## CONCLUSIONES

- 1) *C. perfringens* se aisló de un 37.5% del total de las muestras analizadas.
- 2) El aislamiento del microorganismo a partir de la carne molida fue similar tanto en centros comerciales como en carnicerías.
- 3) Se encontraron 3 cepas enterotoxigénicas (17%) de un total de 18 cepas aisladas.

## LITERATURA CITADA

Abeyta, A. JR., M. M. Wekell and J. T. Peeler. 1985. Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. J. Food Sci. 50(6):1732 - 1735.

Ali, M. S., D.Y. C. Fung. 1991. Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. J. Food Safety 11: 197 - 203.

Brett, M. M. 1994. Outbreaks of food-poisoning associates with lecithinase-negative *Clostridium perfringens* J. Med. Microbiol 41:405 - 407.

Bryan, F. L. 1980. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. J. Food Protect. 43: 140 - 150.

Carnillot, E., B. Saint-Joanis, G. Daube, S. Katayama, P. E. Granum, B Canard and S. T. Cole. 1995. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. Mol. Microbiol. 15(4): 639 - 647.

Collie, R. E., McClane, B. A. 1998. Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 36 (1): 30 - 36.

Daube, G., B. China, P. Simon, K. Havalala and J. Mainil. 1994. Typing of *Clostridium perfringens* by *in vitro* amplification of toxin genes. *J. Appl. Bacteriol.* 77:650 - 655.

de Souza, T. L., J. C. de Oliveira. 1986. *Clostridium perfringens* enterotoxigénico em carne moída bovina no Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.* 17 (4): 356 - 363.

McClane, B. A. 1997. *Clostridium perfringens*. In Doyle M. P., L. R. Beuchat and T. J. Montville. (Ed.). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press Washington D.C. p.p. 305 - 326.

Eisgruber, H., M. Widemann and A. Stolle. 1996. Plasmid profiling for strain differentiation and characterization of *Clostridium perfringens* isolates. *J. Vet. Med.* 43:137 - 146.

Eley, A. R. 1996. Introduction. In Eley R. E. (Ed.), *Microbial Food Poisoning*. 2nd edition. Shampman and Hall. London, UK. p.p. 1 -7.

Emswiler, B. S., C. J. Pierson, and A. W. Kotula. 1977. Comparative study of two methods for detection of *Clostridium perfringens* in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 735 - 737.

Fach, P. and M. R. Popoff. 1997. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4232 - 4236.

Fukushima, H., K. Hoshina, R. Nakamura, and Y. Ito. 1987. Raw beef, pork and chicken in Japan contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, and *Clostridium perfringens* - a comparative study. *Zbl. Bakt. Hyg. B* 184: 60 - 70.

Guzmán, A. M. S. de, B. Micalizzi, C. E. Torres, and D. F. Jiménez. 1989. Incidence of *Clostridium perfringens* in fresh Sausages in Argentina. *J. Food Prot.* 53: 173 - 175.

Harmon, S. M., D. A. Kautter and J. T. Peeler. 1971. Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 22(4):688 - 692.

Hobbs, B. C. and R. J. Gilbert. 1953. *Food poisoning and Food Hygiene*. 4th edition. B & A. Constable Limited Edinburgh. Great Britain. p.p. 51 - 59.



Kokai-Kun, J. F. and B. A. McClane. 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin. In Rood J. I., M. A. McClane, J. G. Songer and R. W. Titbal. (Ed.). The Clostridia Molecular Biology and Pathogenesis. Academic Press. California. USA p.p. 325 - 344.

Kokai-kun, J. F., J. G. Songer, J. R. Czeczulin, F. Chen and B. A. McClane. 1994. Comparison of western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. J. Clin. Microbiol. 32(10):2533 - 2539.

Koneman, E. W., S. D. Allen; V. R. Dowel; W. M. Janda; H. M. Sommers and W. C. Winn. 1992. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. 3er edición. Editorial Médica Panamericana. p.p. 514.

Labbé, R. G. 1989. *Clostridium perfringens*. In Doyle, M.P. (Ed.). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York Basel. p.p. 191 - 234.

Leflon-Guibout, V., J. L. Pons, B. Heym and M. H. and Nicolas-Chanoine, M. H. 1997. Typing of *Clostridium perfringens* strains by use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) system in comparison with zymotyping. *Anaerobe*. 3:245 - 250.

Meer, R. R., and J. G. Songer. 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.* 58 (7): 702 - 705.

Miwa, N., T. Nishina, S. Kubo and H. Honda. 1997. Most probable number of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 59(7): 557 - 560.

Notherwood, T., M. Binns, H. Townsend, J. L. N. Wood, J. A. Mumford and N. Chanter. 1998. The *Clostridium perfringens* enterotoxin from equine isolates; its characterization, sequence role in foal diarrhoea. *Epidemiol. Infect.* 120:193 - 200.

Rodriguez-Romo, L. A., N. L. Heredia, R. G. Labbé and J. S. García-Alvarado. 1998. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in spices used in México by dot blotting using a DNA probe. *J. Food Protect.* 61(2):201 - 204.

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

Todd, E. C. D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J. Food Prot.* 52:595 - 601.

Van Damme-Jongsten, M., J. Rodhouse, R. J. Gilbert and S. Notermans. 1990. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolates from outbreaks of food poisons. J. Clin. Microbiol. 28(1):131 - 133.

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

Vela, F. M. M. 1997. Detección de *Clostridium perfringens* enterotoxigénico y no enterotoxigénico en heces fecales de una población Mexicana utilizando una sonda de ADN. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México p.p. 38 - 39.

William, D. St. J., J. R. Matches and M. M. Wekell. 1982. Use of iron milk medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65(5): 1129 - 1133.

Willis, A. T. 1960. Anaerobic bacteriology in clinical medicine, Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. London.

Yamagashi, T., K. Sugitan, K. Tanishima and S. Nakamura. 1997. Polymerase chain reaction test for differentiation of five toxin types of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Immunol. 63(4):295 - 299.

