

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos



Determinación de la prevalencia de *Clostridium perfringens* en embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de Guatemala

Jorge Luis Rodríguez Peláez

Guatemala

2011

Determinación de la prevalencia de *Clostridium perfringens* en
embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de
Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos



Determinación de la prevalencia de *Clostridium perfringens* en
embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de
Guatemala

Trabajo de investigación presentado para optar al grado académico de Licenciado en
Ingeniería en Ciencias de Alimentos

Guatemala, 2011

Vo. Bo.:

(f) _____

Lic. Víctor Hugo Jiménez

Asesor del Proyecto

Tribunal examinador:

(f) _____

Licda. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f) _____

Licda. Teresita Aguilar de Miranda

(f) _____

Lic. Víctor Hugo Jiménez

Fecha de aprobación: miércoles 25 de mayo del año 2011.

DEDICATORIA

A mis padres, por su ejemplo de amor incondicional

Juan Carlos Rodríguez Peralta

Carmen Esperanza Peláez Pérez

A mis hermanos, mis jóvenes favoritos

Carlos Alberto

Julio Enrique

A mi nana, mi segunda madre

Antonia Virginia Álvarez Chuc

A mis amigos, por su cariño y apoyo

A los profesores de cada etapa de mi formación, por su aporte

A Guatemala y Centroamérica, mi nación

Y principalmente, a Cristo, mi razón de ser

PREFACIO

Este trabajo de investigación fue realizado como proyecto de tesis para optar el autor al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Ciencias de Alimentos por parte de la Universidad del Valle de Guatemala. Al mismo tiempo, se trabajó como un proyecto piloto para la implementación del análisis de microorganismos anaerobios (clostridios) en productos alimenticios (en este caso, embutidos no artesanales) en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS), laboratorio de referencia en Guatemala y el cual buscaba validar el método con el fin de cumplir con los requerimientos del actual Reglamento Técnico Centroamericano pertinente, de reciente entrada en vigencia. Puede decirse, con total honestidad, que por factores económicos (en cuanto a los insumos, reactivos y al número de muestras que era posible adquirir) y de tiempo (en cuanto al plazo disponible para ejecutar el proyecto), este trabajo de investigación tiene un alcance limitado en el tamaño de la muestra de embutidos que abarcó (100 muestras), en relación a la población total de dichos productos en la zona de estudio (Ciudad de Guatemala). Sin embargo, aún con ello, el estudio aquí presentado puede considerarse un primer paso hacia la investigación de ese tipo de agentes patógenos en los productos alimenticios del país, sobre todo en tomando en cuenta que es escasa o nula la investigación previa referente a la temática. Como toda investigación, es susceptible de mejora técnica y logística; en cualquier caso, una base ha sido ya establecida. Agradezco muy sinceramente a todo el personal del LNS, al Lic. Víctor Hugo Jiménez, asesor principal del Proyecto, y muy en especial, a la Licda. Gabriela Oliva del Cid y el equipo de Producción de Medios de Cultivo (PMC) así como a la Licda. Leyla Dabroy de Arrivillaga y el equipo de Microbiología de Alimentos (MIA), pues de no haber sido por su apoyo y sobre todo, por su amistad, este proyecto no habría podido llevarse a cabo y no habría sido la inolvidable experiencia de crecimiento personal que fue; las palabras resultan escasas para agradecerles. ¡Va para ustedes, Equipo!

CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
DEDICATORIA	v
PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE DIAGRAMAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICAS	xi
LISTA DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
<i>Capítulos</i>	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. MARCO TEÓRICO	4
IV. ANTECEDENTES	44
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	60
VI. IMPACTO DEL TEMA	62
VII. DISEÑO	63
VIII. RESULTADOS	64
IX. DISCUSIÓN	67
X. CONCLUSIONES	75
XI. RECOMENDACIONES	76
XII. BIBLIOGRAFÍA	77
XIII. APÉNDICE	83
A. Metodología	83
B. Datos obtenidos y calculados	88
C. Fotografías	103

LISTA DE CUADROS

	<i>Pág.</i>
#1 – Diferencias en los procesos de deterioro según las características del alimento	8
#2 – Actividad de agua mínima para el crecimiento microbiano	10
#3 – Respuesta bacteriana ante el potencial rédox	11
#4 – Aditivos químicos utilizados como conservantes alimenticios	13
#5 – Clostridios patógenos y sus enfermedades humanas asociadas	27
#6 – Toxinas y antígenos solubles del <i>Clostridium perfringens</i>	29
#7 – Medios utilizados para enumerar y confirmar <i>C. perfringens</i> a partir de alimentos y heces	40
#8 – Comparación de características específicas de clostridios reductores de sulfito	41
#9 – Características de los antibióticos utilizados en los medios para enumerar <i>C. perfringens</i> a partir de alimentos y heces	42
#10 – Sumario de <i>Clostridium perfringens</i>	43
#11 – Estudios acerca de <i>Clostridium perfringens</i> llevados a cabo en Costa Rica, C. A.	58

LISTA DE DIAGRAMAS

	<i>Pág.</i>
#1 – Diagrama de flujo de la marcha analítica para <i>Clostridium perfringens</i> según APHA	87

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
#1 – Factores intrínsecos y extrínsecos del crecimiento microbiano en los alimentos	6
#2 – Tinción Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
#3 – Tinción Gram de <i>Salmonella paratyphi</i>	20
#4 – Tinción Gram de <i>Escherichia coli</i>	21
#5 – Tinción Gram de <i>Clostridium botulinum</i>	22
#6 – Tinción Gram de <i>Bacillus cereus</i>	23
#7 – Tinción Gram de <i>Vibrio cholerae</i>	24
#8 – Tinción Gram de <i>Clostridium perfringens</i>	28
#9 – Ciclo celular de <i>Clostridium perfringens</i>	35
#10 – <i>C. perfringens</i> muestra una zona de doble hemólisis en agar sangre	35
#11 – Morfología de las colonias de diferentes cepas de <i>C. perfringens</i> en placas de agar TSC	37
#12 – Agar Shahidi – Ferguson – Perfringens (SFP) y el crecimiento de <i>C. perfringens</i>	39
#13 – Tinción de Gram de <i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124, bacilos Gram Positivo	103
#14 – Crecimiento de una colonia sospechosa en la placa de TSC – EYF de una muestra de chorizo	104
#15 – Tubos de MN inoculados con colonia sospechosa	105
#16 – Tubos de LG inoculados con colonia sospechosa	106
#17 – Tubos de FCC – Salicina inoculados con colonia sospechosa	107
#18 – Tubos de FCC – Rafinosa inoculados con colonia sospechosa	108
#19 – Placas de TSC – EYF de la muestra #39	109

LISTA DE GRÁFICAS

	<i>Pág.</i>
#1 – Primeras diez causas de mortalidad infantil en Guatemala, 2005	48
#2 – Detalle del consumo de embutidos (azul) por región en Guatemala	54
#3 – Categorización y distribución de los embutidos analizados (Cantidad / %)	89
#4 – Porcentaje de muestras con colonias sospechosas por Categoría de Embutido	95
#5 – Muestras con crecimiento de colonias sospechosas en dilución 10^{-2} , por categoría	96
#6 – Porcentaje de muestras, por categoría, respecto de las muestras (14 en total) que presentaron bacilos Gram positivos	101
#7 – Distribución de las muestras con colonias sospechosas por su tipo de empaque y preparación	102

LISTA DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
#1 – Morbilidad informada: Sistema de Información del MSPAS	50
#2 – Casos de ETA en Ciudad de Guatemala, 1993 – 2002	52
#3 – Alimentos más consumidos en Guatemala	54
#4 – Categorización y distribución de los embutidos analizados	88
#5 – Análisis de significancia de la diferencia entre el número de muestras por categoría	88
#6 – Recuento total en placa de TSC – EYF para las 100 muestras analizadas	90
#7 – Muestras que presentaron colonias negras sospechosas en agar TSC – EYF	94
#8 – Porcentaje de muestras con colonias sospechosas por categoría de embutido	95
#9 – Distribución de muestras con crecimiento de colonias sospechosas en dilución 10^{-2}	96
#10 – Colonias picadas por cada muestra para crecimiento en MFT y seguimiento a batería	97
#11 – Resultados de lectura de batería bioquímica para tubos de MFT de colonias sospechosas picadas	98
#12 – Colonias y muestras que presentaron bacilos Gram positivos	100
#13 – Distribución de las muestras con colonias sospechosas por empaque y preparación	101
#14 – Consolidación final de las muestras analizadas en cuanto a su cumplimiento con el RTCA	102

RESUMEN

Con el propósito de determinar la prevalencia de *Clostridium perfringens* en los embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de Guatemala y su correspondiente cumplimiento o incumplimiento con el límite máximo permitido para esa bacteria en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (*Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*), se analizaron 100 muestras de embutidos no artesanales adquiridos en supermercados de la Ciudad Capital, según la metodología para *C. perfringens* indicada en el *Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos* de la American Public Health Association (APHA). Se obtuvo que un 18% de las muestras analizadas presentó crecimiento de colonias sospechosas. Las pruebas de confirmación mediante batería bioquímica comprobaron que ninguna de las colonias sospechosas analizadas (48 en total) resultó positiva para *C. perfringens*. Con lo anterior, la prevalencia de *C. perfringens* en los embutidos analizados fue del 0% (100% de cumplimiento en relación al límite para *C. perfringens* indicado en el RTCA), sugiriendo que, de momento y con las pruebas realizadas, es bajo el riesgo de enfermedad transmitida por alimentos a partir de dicha bacteria en ese tipo de productos alimenticios. Sin embargo, la implementación de la marcha analítica permitió percatarse de una serie de factores prácticos de importante consideración ya que podrían resultar en falsos positivos o negativos al momento de determinar si en efecto la bacteria de estudio (*C. perfringens*) está presente en los alimentos analizados. Estos factores incluyen la selectividad del medio de cultivo, la posibilidad de microbiota contaminante y la probable necesidad de subsecuentes etapas de purificación de colonias sospechosas, entre otros. Todo lo anterior, sumado al requerimiento de un adecuado entrenamiento del personal analista, debe tomarse en cuenta al momento de aplicar el análisis de esta bacteria en embutidos.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, embutidos no artesanales, prevalencia.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema recurrente en los países en vías de desarrollo que año con año tiene implicaciones no en el ámbito sanitario únicamente, sino también en el social, tecnológico, económico, cultural y político. Estas implicaciones se manifiestan en una mayor morbilidad entre la población así como en costos paralelos que significan una pesada carga económica acumulada en términos de pérdida de productividad humana e inversión por medicamentos – hospitalización, con el agregado de contribuir, en ciertos casos, a la perdurabilidad de afecciones crónicas como la desnutrición infantil, de consecuencias aún más graves al largo plazo.

El estudio *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*, publicado en 2009 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), reveló que en Guatemala, las enfermedades transmitidas por alimentos están presentes entre las diez primeras causas de hospitalización en el país, incluyendo las enfermedades diarreicas agudas en el cuarto lugar y el parasitismo intestinal en el décimo lugar. Además, también del mismo estudio, los datos epidemiológicos de morbilidad informada por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social para las enfermedades transmitidas por alimentos, muestran un papel predominante de las diarreas agudas como los cuadros de ETA más comunes, pero para los que rara vez se llega a determinar cuál es el agente etiológico, debiéndose este desconocimiento ya sea a la práctica común de basar el diagnóstico puramente en el cuadro clínico – sintomático, sin recurrir necesariamente a confirmación mediante exámenes de laboratorio o porque se requiere de una inversión no solo monetaria, sino también tecnológica y de formación de personal, para el montaje y desarrollo de los métodos analíticos aplicados a la determinación de la presencia de patógenos específicos.

La anterior situación genera que en Guatemala, a diferencia de Estados Unidos, por mencionar un ejemplo, sea muy difícil al menos de momento, conocer hasta qué punto realmente determinados patógenos responsables de ETA están

impactando la salud de la población y generando una serie de altos costos económicos y laborales; de hecho, de tales costos, cabe destacar que sólo las primeras seis bacterias más dañinas y costosas en los Estados Unidos (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* [no tifoide], *Staphylococcus aureus*), generan anualmente un total estimado de casi 11 millones de casos clínicos de ETA; 4600 muertes y un costo acumulado de \$7.5 miles de millones de dólares. Más específicamente y para fines del presente estudio, según esas mismas fuentes bibliográficas, solo los productos cárnicos de res, cerdo y aves (principalmente pollo) contabilizan cerca de \$6.0 miles de millones de dólares por concepto de ETA. Considerando este último dato, válido sea destacar que *Clostridium perfringens*, patógeno frecuente de ese tipo de alimentos, se ubica entre ese grupo de las bacterias patógenas de mayor incidencia mundial (quinto en Estados Unidos y tercero a nivel mundial), quizá no necesariamente por su gravedad patogénica (aunque sí puede llegar a ser mortal) pero sobre todo, por el número de casos de cuadros diarreicos que genera.

Este estudio tiene como meta primordial contribuir a la reducción del vacío investigativo aún existente en Guatemala acerca de la prevalencia de uno de esos agentes etiológicos que por su importancia a nivel mundial, deberían merecer igual importancia en el país pero que a la fecha, no ha recibido la atención que corresponde: *Clostridium perfringens*. La alta prevalencia de enfermedades diarreicas por ETA entre la población guatemalteca con sus respectivos agentes etiológicos no diagnosticados, impide generar políticas de mejor control de inocuidad para los grupos de alimentos que así lo requieran; la anterior es ya por sí sola, una razón suficiente para realizar este tipo de investigación en Guatemala.

II. OBJETIVOS

A. General

- Determinar el grado de contaminación por *Clostridium perfringens* en una muestra de embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de Guatemala.

B. Específicos

- Cuantificar la presencia de *C. perfringens* en la muestra seleccionada de embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de Guatemala mediante el método avalado por la American Public Health Association (APHA).
- Calcular la prevalencia de *C. perfringens* en los embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad de Guatemala para que la industria y las autoridades sanitarias correspondientes puedan utilizarlos en la toma de decisiones que mejoren la gestión de la inocuidad de este tipo de productos alimenticios.
- Verificar el cumplimiento de los embutidos analizados con el parámetro para *C. perfringens* en embutidos especificado en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (*Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*).
- Estimar, mediante los resultados arrojados del presente estudio, el grado de necesidad de que futuras investigaciones realicen esfuerzos orientados a la detección de la toxina de *C. perfringens* en los embutidos comercializados en el país.

III. MARCO TEÓRICO

A. El ser humano, los alimentos y los microorganismos

El Código de Salud de la República de Guatemala, decreto 90 - 97, en su artículo 124, define *Alimento* como: «...todo producto natural o artificial, simple o compuesto, procesado o no, que se ingiere con el fin de nutrirse o mejorar la nutrición, y los que se ingieran por hábito o placer, aun cuando no sea con fines nutritivos» [10].

Por otra parte, el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española en su 22.^a edición (2001) define *microorganismo* como *microbio* (del griego académico antiguo μικρόβιος; μικρός, *pequeño* y βίος, *vida*), utilizando la palabra como nombre genérico que designa a los seres organizados únicamente visibles al microscopio, por ejemplo: bacterias, levaduras, etc. Textos de microbiología (la ciencia de la vida de los microorganismos) complementan la anterior definición señalando a los microorganismos como los organismos microscópicos constituidos por una sola célula o varias, incluyendo los virus [7] [19] [28].

La relación entre los alimentos, los microorganismos y los seres humanos ha sido larga e interesante. Los alimentos no aportan únicamente un valor nutricional a aquellos seres humanos que los consumen sino que a menudo son también medios ideales para el crecimiento microbiano. Por lo mismo, los microorganismos son de alta importancia para el ser humano en relación con los alimentos que éste consume. De hecho, no pocos de los principales alimentos consumidos por el ser humano se producen o mejoran por la acción microbiana. Los microorganismos pueden utilizarse para transformar materias crudas o frescas en delicias gastronómicas: Productos derivados de la leche como ciertos tipos de queso, mantequilla y yogurt son producidos por fermentaciones microbianas; los pepinillos y el chucrut son alimentos vegetales fermentados; productos cárnicos como ciertas salchichas y patés utilizan asimismo, fermentaciones microbianas; el vinagre de sidra se produce por la acción de una bacteria del ácido láctico y bebidas alcohólicas como vinos, cerveza y otros se producen por procesos de fermentación que utilizan

levaduras. La salsa de soya es otro ejemplo de la acción microbiana aprovechada para la producción de alimentos. Por todo lo anterior, puede decirse que los microorganismos “forman parte” de la alimentación del ser humano y por tanto también, indirectamente, de su cultura y su economía [19] [28].

Sin embargo, para el ser humano, al mismo tiempo en que la relación alimentos – microorganismos le es útil y benéfica puede resultarle también negativa y dañina por cuanto los alimentos, si ciertas circunstancias se dan, pueden convertirse en vehículos para la transmisión de enfermedades. El crecimiento incontrolado y no deseado de microorganismos deteriora grandes cantidades de alimentos, provocando importantes pérdidas económicas y mermando la calidad sensorial y nutricional de los alimentos perjudicados. Asimismo, el consumo de alimentos contaminados con determinados microorganismos o bien, con los subproductos metabólicos que éstos generan, puede producir severas enfermedades como infecciones, intoxicaciones o ambos, en algunos casos, mortales. Por lo anterior, la detección y el control de patógenos así como de microorganismos de deterioro alimenticio son importantes aspectos que considera la microbiología de alimentos. Nótese pues cómo la acción microbiana en los alimentos puede resultar tanto en la preservación y mejora como en el deterioro y toxicidad de los mismos, dependiendo de los microorganismos involucrados así como de las condiciones de procesamiento, almacenamiento y consumo. La contaminación por microorganismos causantes de enfermedad (patógenos) puede darse en cualquier punto de la cadena alimentaria del producto, razón que justifica que la totalidad de pasos secuenciales de dicha cadena sea supervisada y corregida (de ser necesario) para asegurar que esa contaminación sea prevenida efectivamente [19] [28].

Los microorganismos son virtualmente ubicuos en nuestro ambiente, estando presentes en el agua, aire, suelo y también, en los alimentos. Los alimentos frescos, los preparados en su mayoría de veces e incluso, en ocasiones, los alimentos preservados, son todos susceptibles de contaminarse con microorganismos, sea de deterioro o patógenos [19].

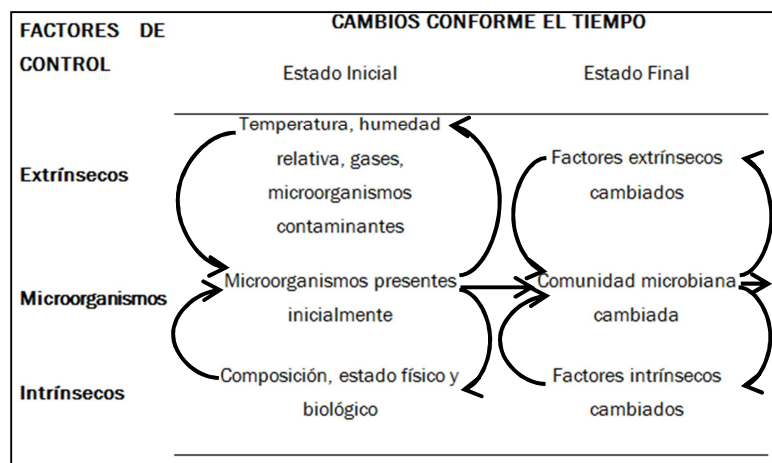
B. Crecimiento microbiano y alteración de los alimentos

Una alta variedad de microorganismos son capaces de habitar y crecer en los alimentos, de hecho estos, por cuanto proveen de nutrientes para seres humanos y para animales, son también ambientes apropiados para el crecimiento de microorganismos. Dicho crecimiento, según el tipo y cantidad de microorganismos, puede ser benéfico o resultar en deterioro y generación de enfermedades. El crecimiento microbiano en un alimento es controlado por factores relacionados con el alimento mismo (factores intrínsecos) o bien, con las condiciones en que el alimento es procesado o el ambiente donde es almacenado (factores extrínsecos) [19] [28].

Los factores intrínsecos o factores relacionados con los alimentos, incluyen, por ejemplo, el pH, el contenido de humedad, la actividad o disponibilidad de agua, el potencial de óxido - reducción, la estructura física del alimento, los nutrientes disponibles y la posible presencia de agentes antimicrobianos naturales. Por otra parte, los factores extrínsecos o factores ambientales incluyen temperatura, humedad relativa, gases (CO_2 , O_2) presentes, y el tipo y número de microorganismos presentes en los alimentos [28].

La Figura 1 muestra la interrelación entre los microorganismos y los factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos así como la progresión de dicha interrelación con el tiempo [19].

- Figura 1: Factores intrínsecos y extrínsecos del crecimiento microbiano en los alimentos -



C. Alteración de los alimentos, factores intrínsecos y factores extrínsecos

Es entendido por alteración de los alimentos el cambio en las características organolépticas (apariencia, olor, sabor, textura) que hace a los alimentos inaceptables para su consumo. Cabe aclarar en este punto que los alimentos alterados no involucran necesariamente un peligro para la salud pero en algunos casos la alteración sí puede ser producida por organismos patógenos. Los alimentos alterados generalmente se consideran no aptos para consumo y por tanto no pueden distribuirse ni consumirse. Por lo mismo, la alteración de los alimentos causa importantes pérdidas económicas a los productores, distribuidores e incluso a los consumidores mismos, por elevación de precios o restricciones de abastecimiento. Las características fisicoquímicas de los alimentos determinan su grado de susceptibilidad a la actividad microbiana. Respecto a la alteración, los alimentos pueden clasificarse en tres categorías principales, a saber [8] [19]:

- Alimentos perecederos (alterables): Como muchos alimentos frescos (carnes, pescado, aves, huevos, leche, la mayoría de frutas y verduras).
- Alimentos semiperecederos (semialterables): Por ejemplo, papas y frutos secos. Permanecen sin alteración bastante tiempo, siempre que se manipulen y almacenen adecuadamente.
- Alimentos no perecederos (estables o no alterables): Tales como la harina, el azúcar o legumbres secas.

D. Factores intrínsecos

La particular **composición de los alimentos** es un factor intrínseco crítico y determinante que influye en alto grado en el crecimiento microbiano ya que los microorganismos necesitan de la presencia de agua, de una fuente de energía, de nitrógeno, vitaminas, factores de crecimiento y minerales para su óptimo desarrollo. Según sea la composición del alimento, así será el tipo de deterioro bacteriano. Por ejemplo, si un alimento está compuesto principalmente por carbohidratos, el deterioro no produce olores significativos. Alimentos como panes, jaleas/mermeladas y algunas frutas presentan primeramente un deterioro causado por crecimiento fúngico. En cambio, si un alimento es rico en proteínas, el deterioro puede, en efecto, producir una amplia variedad de olores desagradables. Estos

procesos se conocen como putrefacción y derivan de la proteólisis y la ruptura anaeróbica de proteínas. La degradación de grasas arruina también los alimentos, causando rancidez y sabores desagradables. La fuente principal de nitrógeno para algunas bacterias son los aminoácidos pero otras utilizan nucleótidos, péptidos o proteínas. Las vitaminas del grupo B son requeridas en cantidades mínimas dado que algunos microorganismos no pueden sintetizarlas [8] [19] [28]. Véase el Cuadro 1 [28].

Cuadro 1 - Diferencias en los procesos de deterioro según las características del alimento

Sustrato	Alimento ejemplo	Reacciones químicas o procesos de deterioro	Productos y efectos comunes del deterioro
Pectina	Frutas	Pectinólisis	Metanol, ácidos urónicos (perdiendo la fruta su estructura y firmeza)
Proteínas	Carne	Proteólisis, desaminación	Aminoácidos, péptidos, aminos, ácido sulfúrico, amoniaco, indol (mal olor, sabor agrio, amargor, etc.)
Carbohidratos	Alimentos almidonados	Hidrólisis, fermentaciones	Ácidos orgánicos, CO ₂ , mezclas de alcoholes (sabor agrio, acidificación)
Lípidos	Mantequilla	Hidrólisis, degradación de ácidos grasos	Glicerol y ácidos grasos mixtos (rancidez, amargor)

Otro factor importante que afecta el crecimiento microbiano en los alimentos es el **pH o acidez**. Los alimentos, según su tipo y composición, diferirán en su pH pero mayoritariamente son neutros o ácidos. Los límites de pH para el crecimiento microbiano difieren con amplitud entre los microorganismos, entre 1 y 11 unidades

de pH. Muchos microorganismos crecen óptimamente alrededor de 7, pero pueden crecer aceptablemente bien entre 5 y 8, sin embargo, como regla general, puede decirse que en condiciones de pH 5 o menor se inhibe el crecimiento de la mayoría de microorganismos alteradores [8] [19] [28].

La **presencia y disponibilidad de agua** también afecta e interviene en la habilidad de los microorganismos de colonizar los alimentos. Los microorganismos necesitan de la presencia de agua en forma disponible para poder crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. La disponibilidad del agua se mide y expresa en términos de la Actividad de Agua (a_w), que es la relación entre la humedad relativa del aire sobre una solución de prueba comparada con la del agua destilada a la misma temperatura. La mayoría de microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen con mayor rapidez a niveles de a_w de 0.995 a 0.980; a valores de a_w inferiores a éstos, la velocidad de crecimiento y la población estacionara disminuye y la fase de latencia aumenta. Mediante la deshidratación y/o secado de un alimento (sea por secado solar, secado con aire caliente, liofilización, deshidratación osmótica, etc.) se da la remoción total o parcial del agua y con esto es posible controlar o eliminar los procesos de deterioro. Por otra parte, aún con un contenido destacable de agua en el alimento, es factible hacerla menos disponible para los microorganismos mediante el agregado de solutos como sal o azúcar (salados: carnes y pescados; dulces: mermeladas, gelatinas y conservas). Cuando grandes cantidades de sal o azúcar son agregadas a un alimento, la mayoría de microorganismos son deshidratados por condiciones de hipertoniá y se les imposibilita crecer. Sin embargo, condiciones adversas como una alta concentración osmótica son apropiadas para el crecimiento de los llamados microorganismos osmofílicos (del griego *osmus*, impulso y *philein*, amor) o bien, relativamente bajos índices de a_w son aún suficientes para los microorganismos xerofílicos (del griego *xerosis*, seco y *philein*, amor), los cuales podrían incluso no crecer en condiciones de mayor actividad de agua. Se incluye a continuación el Cuadro 2, el cual indica la a_w mínima para el crecimiento de algunos microorganismos [8] [19] [27] [28].

Cuadro 2 – Actividad de agua mínima para el crecimiento microbiano

Microorganismos	a _w	Microorganismos	a _w
Mohos		Levaduras	
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.90
<i>Monascus (Xeromyces) bisporus</i>	0.61	<i>Saccharomyces rouxii</i>	0.62
Microorganismos	a _w	Microorganismos	a _w
Bacterias		Bacterias	
<i>Bacillus cereus</i>	0.95	<i>Lactobacillus viridescens</i>	0.95
<i>B. megaterium</i>	0.95	<i>L. plantarum</i>	0.94
<i>B. steaerothermophilus</i>	0.93	<i>Microbacterium sp.</i>	0.94
<i>B. subtilis</i>	0.90	<i>Parococcus halodenitrificans</i>	0.86
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A	0.95	<i>Micrococcus luteus (lysodeikticus)</i>	0.93
<i>C. botulinum</i> tipo B	0.94	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	0.94
<i>C. botulinum</i> tipo E	0.97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.97
<i>C. perfringens</i>	0.95	<i>Salmonella sp.</i>	0.95
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.94	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86
<i>Escherichia coli</i>	0.95	<i>Vibrio costicolus</i>	0.86
<i>Halobacterium halobium</i>	0.75	<i>V. parahaemolyticus</i>	0.94

El **potencial de óxido – reducción (rédox)** es una medida de la actividad de los electrones, está relacionado con el contenido de oxígeno. Es análogo al pH ya que el éste mide la actividad de protones y el potencial rédox mide la de los electrones. El potencial de óxido – reducción de un alimento también influye en la factibilidad el deterioro del mismo. Por ejemplo, cuando productos a base de carne, especialmente caldos, son cocinados, es común que disminuyan sus potenciales de óxido – reducción, constituyéndose en medios ideales para el crecimiento microbiano. Específicamente, los microorganismos presentan diferentes niveles de sensibilidad al potencial de óxido – reducción (rédox) del medio en que se ubiquen. El potencial rédox de un sistema se representa con el símbolo Eh. Los microorganismos aerobios requieren valores positivos de Eh (oxidados) para su desarrollo, es decir, utilizan O₂ como aceptor final de electrones en la respiración. Por tal razón, constituyen una fracción importante de la microbiota cuando el O₂ está disponible como ocurre en la superficie de las carnes y los alimentos almacenados al aire (Ejemplos: *Bacillus*

subtilis deteriorando el pan o *Pseudomonas* produciendo limo en la superficie de las carnes). Los microorganismos anaerobios requieren, en cambio, Eh negativos (reducidos), los cuales están entre los valores de +30 a 250 mV para el género *Clostridium*, por mencionar alguno. El Cuadro 3 muestra la respuesta bacteriana ante el potencial rédox en los alimentos [8] [28].

Cuadro 3 - Respuesta bacteriana ante el potencial rédox

Categoría bacteriana	Ejemplos	Margen rédox de crecimiento
Bacterias aerobias/Mínima presión de oxígeno tolerada: 10 ⁻⁸ atm	<i>Bacillus subtilis</i>	+135 a -110 mV
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+500 a +100 mV
Anaerobios facultativos/Mínima presión de oxígeno tolerada: 10 ⁻¹² atm	<i>Staphylococcus aureus</i>	+180 a 230 mV ^a
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+30 a 200 mV ^b
Bacterias anaerobias	<i>Proteus vulgaris</i>	+150 a 600 mV ^a
	<i>Proteus vulgaris</i>	+90 a 300 mV ^b
	<i>Clostridium paraputrificum</i>	+30 a 550 mV
	<i>Clostridium perfringens</i>	+216 a 230 mV

^a = Potencial rédox determinado con electrodo pulido; ^b = Potencial rédox determinado con electrodo no pulido

La **estructura física de un alimento** también puede afectar el grado de deterioro. Como ejemplo, la molienda y mezclado de los alimentos como la salchicha o las tortas de hamburguesa no solo incrementan el área superficial del alimento y alteran la estructura celular, sino que distribuyen los microorganismos contaminantes en todo el alimento. Lo anterior resulta en un rápido deterioro si este tipo de alimentos no se almacena apropiadamente. Por otra parte, los vegetales y las frutas tienen pieles externas (cáscaras) que las protegen del deterioro. Aun así, algunos microorganismos de deterioro tienen enzimas especializadas que les ayudan a debilitar y penetrar las cubiertas protectoras, especialmente cuando las frutas y vegetales han sido lastimadas mecánicamente [28].

Muchos alimentos pueden tener **sustancias antimicrobianas**, incluyendo complejos inhibidores químicos y enzimáticos. Por ejemplo, las cumarinas encontradas en frutas y vegetales exhiben actividad antimicrobiana. Incluso la leche

de vaca (lacteninas) y los huevos (lisozima) contienen ciertas sustancias de potencial antimicrobiano. Otros muy interesantes ejemplos de alimentos con propiedades antimicrobianas incluyen las salsas picantes, las cuales por su compuesto activo, generalmente capsaicina, presentan propiedades antimicrobianas deseables. De igual forma, las hierbas y las especias a menudo poseen ciertas sustancias inhibitorias del crecimiento microbiano. Ejemplos de lo anterior se encuentran en la canela (aldehído cinámico), el clavo de olor (eugenol), la mostaza, el orégano, el ajo y el perejil (con sus respectivos ingredientes antimicrobianos activos), entre otros. Sin embargo, pese a esto, las especias pueden contener organismos patógenos y de deterioro. Coliformes, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y algunas especies de *Salmonella* han sido encontradas en la mayoría de especias [8] [28].

E. Factores extrínsecos

La **temperatura** y la **humedad relativa** son importantes factores extrínsecos que influyen ampliamente en si un alimento se deteriorará o no. La temperatura afecta la longitud de la fase de latencia, la velocidad de crecimiento, el número final de células, las necesidades nutritivas y la composición química y enzimática de las células. Cabe destacar que no todos los microorganismos crecen a la misma temperatura. De hecho, según la temperatura óptima de crecimiento, pueden distinguirse tres grupos principales: los psicrófilos (crecen entre -5 y 20 °C), los mesófilos (5 °C y 45 °C; la mayoría de bacterias patógenas pertenecen a este grupo) y los termófilos (que viven y se multiplican entre 25 y 75 °C). Por lo general, un proceso térmico en la preparación del alimento mediante calentamiento arriba de 75 °C, combinado con un posterior almacenamiento a baja temperatura, garantizaría una carga microbiana reducida en el alimento pero ello dependerá a su vez de las características propias del alimento así como del tipo y magnitud de su carga microbiana inicial. En lo referente a la humedad relativa, mientras mayor sea ésta (alta humedad relativa), más prontamente se inicia el crecimiento microbiano. Lo anterior cobra particular importancia durante el almacenamiento de los alimentos: Por ejemplo, si un alimento seco (que por su propia baja humedad es menos susceptible al crecimiento microbiano) es almacenado en un ambiente húmedo, la

absorción de humedad puede ocurrir en la superficie del alimento, permitiendo un eventual crecimiento microbiano [8] [15] [19] [28].

Por otra parte, la **atmósfera** en la cual el alimento es conservado también juega un papel importante. Según sea mayor o menor la disponibilidad de oxígeno, así cambia también la microbiota predominante. Por ejemplo, en alimentos enlatados cuyo proceso térmico ha sido deficiente (entendiendo *deficiente* como el hecho de no haber llegado dicho proceso a una temperatura de eliminación efectiva de las bacterias presentes), suele darse el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas o facultativas (patógenas o no) como algunas del género *Clostridium*. Por otra parte, el dióxido de carbono estimula, inhibe, destruye o no tiene efecto alguno sobre los microorganismos, todo lo cual depende de la concentración, de la temperatura de incubación, de la edad de las células microbianas al aplicar CO₂ y de la actividad de agua del alimento. La sensibilidad al CO₂ a nivel de género, especie y cepa es variable, por ejemplo: el CO₂ al 100% destruye totalmente, después de cuatro días de exposición al ambiente, cultivos de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Micrococcus* mientras que no causan efecto alguno sobre *Proteus*, *Clostridium perfringens* y algunos *Lactobacillus* [8] [28].

Debe añadirse a los factores extrínsecos aquellos que son expresamente regulados por el ser humano con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos de deterioro o patógenos. Entre estos factores se incluyen procesos específicos o determinados aditivos que cumplen (o al menos intentan) ese objetivo. Entre estos pueden mencionarse procesos como **enlatado**, **irradiación** o **ahumado**, así como el agregado de aditivos como los que se muestran en el Cuadro 4 [19] [28]:

Sustancia química	Alimentos
Propionato de sodio o calcio	Pan
Benzoato sódico	Bebidas carbonatadas, frutas, zumos de frutas, escabechados, margarina y conservas
Ácido ascórbico	Productos cítricos, queso, escabechados y ensaladas
Dióxido de sulfuro, sulfitos y bisulfitos	Frutas deshidratadas y vegetales, vino
Formaldehído (del proceso de ahumado)	Carne y pescado
Óxidos de etileno y propileno	Espicias, frutas deshidratadas y frutos secos
Nitrito sódico	Jamón y tocino ahumados

F. Alteración y bacterias responsables de la misma en salchichas, mortadelas y embutidos en general

En este tipo de productos, las principales alteraciones son ocasionadas por bacterias y levaduras, estando en un segundo plano los mohos. Los defectos ocasionados por los anteriores microorganismos son, principalmente, el limo, el agriado y el enverdecimiento [8].

En aquellos casos en que la humedad exterior es alta, se favorece el desarrollo del limo o capa mucilaginosa externa debido al crecimiento de microorganismos. Ésta puede ser eliminada fácilmente lavando el alimento con agua caliente. El agriado, por otra parte, es una alteración que se presenta en el interior del embutido y es producida por lactobacilos, estreptococos y otros microorganismos capaces de originar ácidos por descomposición de proteínas y carbohidratos. El enverdecimiento se caracteriza por la formación de un anillo verdoso, el interior verde o una superficie verde en el embutido. Se debe, probablemente, a la producción de peróxido de hidrógeno u otros peróxidos por parte de los microorganismos. Esta alteración se observa más frecuentemente en las salchichas [8].

Entre los diferentes microorganismos que pueden citarse como responsables del deterioro en este tipo de productos están: *Micrococcus candidus*, *Micrococcus thermosphactum*, *Lactobacillus viridescens*, *Leuconostoc* spp y *Bacillus* [8].

G. Alteración de los jamones

El deterioro por agriado se presenta frecuentemente en los jamones, caracterizado por una proteólisis inodora hasta una putrefacción (olor a mercaptanos, aminas, indol, ácido sulfhídrico). Los microorganismos responsables de esta alteración son: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium* y *Serratia*, entre otros. Incluso, se han encontrado algunos jamones alterados por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* [8].

H. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos (ETAA, o simplemente ETA) como aquellos procesos que, según los conocimientos actuales, pueden atribuirse a un alimento específico, a una sustancia que se ha incorporado a éste y a su contaminación a través de los recipientes o bien durante su preparación o distribución. Según esta definición, se incluyen por tanto, las enfermedades de origen microbiano y las causadas por tóxicos de cualquier naturaleza [16].

Benenson, por otra parte, las define como las patologías producidas por la ingestión accidental, incidental o intencional de alimentos o agua, contaminados en cantidades suficientes con agentes físicos, químicos o microbiológicos, debido a la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, transporte, distribución o comercialización de los alimentos y agua (Benenson, 1997: 272 – 273). Cabe destacar que esta particular consideración no incluye las reacciones de hipersensibilidad por ingesta de alimentos [1].

Como puede verse, las ETA pueden ser también por causas físicas y químicas además de microbiológicas. En cuanto a las causas microbiológicas, la anterior definición destaca cómo un fallo en la adecuada descontaminación y conservación de los alimentos puede permitir el crecimiento de patógenos, provocando éstos enfermedades con alta morbilidad y mortalidad [19].

Un brote de ETA ocurre cuando dos o más personas sufren una enfermedad semejante después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos o de laboratorio lo señalan como el origen del malestar, mientras que un caso de ETA se produce cuando una sola persona se ha enfermado después del consumo de alimentos contaminados según lo hayan determinado los estudios epidemiológicos o de laboratorio [8].

Este tipo de enfermedades, según su naturaleza de acción, pueden separarse en dos categorías básicas: *Intoxicación alimentaria* e *infección alimentaria*.

- La **intoxicación alimentaria** es la enfermedad resultante de la ingestión de alimentos que contienen toxinas generadas por microorganismos, animales o que contienen agentes químicos (metales pesados y otros compuestos orgánicos) que se incorporan a ellos sea de modo accidental, incidental o intencional, en cualquier momento desde su producción hasta su consumo. Ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas, por lo general, carecen de olor o sabor. Algunas toxinas pueden estar de forma natural en el alimento como es el caso de ciertos hongos y animales como el pez globo. En el caso de los microorganismos, los que producen estas toxinas no tienen necesariamente que crecer en el hospedador y normalmente no están vivos en el momento en que los alimentos contaminados son ingeridos; sin embargo, como ya fue dicho, la enfermedad se debe a la ingestión y acción de la toxina activa. Ejemplos: Las toxinas producidas por *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*. Las afecciones generadas por las intoxicaciones alimentarias suelen ocurrir poco tiempo después del consumo, dado que las toxinas en mención no requieren de ninguna fase de establecimiento y crecimiento dentro del cuerpo humano [1] [3] [8] [19].
- Las **infecciones alimentarias** son las ETA que resultan de la ingestión de un alimento contaminado con un patógeno, sea bacterias, virus, hongos o parásitos. Ejemplos: Salmonelosis, hepatitis viral tipo A y toxoplasmosis. Además de la ingesta puramente pasiva de toxinas, el alimento puede tener un número suficiente de microorganismos patógenos vivos como para causar infección y enfermedad en el hospedador. La infección alimentaria es una forma relativamente común de enfermedad transmitida por alimentos. Por lo general, una vez dentro del organismo humano, los patógenos suelen multiplicarse dentro del tracto intestinal, irritando la cobertura de los intestinos y causando enfermedad. En ciertos casos, los patógenos producen toxinas dañinas o incluso mortales al momento de su multiplicación en el tracto intestinal humano. Son precisamente estos subproductos tóxicos y no tanto los patógenos en sí los que provocan la enfermedad humana. Un ejemplo es el caso del cólera, causado por *Vibrio cholerae* y la infección

alimentaria por *Clostridium perfringens*, de la cual se amplía más adelante. [1] [3] [8] [19].

En lo referente a las ETA estrictamente provocadas por agentes microbiológicos y/o sus subproductos (omitiendo las ETA de origen químico o físico), el Consejo para la Agricultura, Ciencia y Tecnología de los Estados Unidos (CAST, por sus siglas en inglés), identifica cuatro principales categorías de factores que incrementan el riesgo o severidad de una enfermedad provocada por alimentos, a saber:

- *Factores microbianos*, como el tipo, cepa y cantidad de patógenos o toxinas ingeridos [3].
- *Factores del hospedador*, como edad, tensión nerviosa, salud o el estado del sistema inmunológico del individuo así como higiene personal [3].
- *Factores relacionados con la dieta*, como el consumo de antiácidos y deficiencias nutricionales [3].
- *Otros factores*, como localización geográfica [3].

La mayor parte de las ETA son clasificadas como agudas dado que tienen un rápido efecto dañino y son autolimitadas. Pueden ser moderadas o severas y resultar, según sea el caso, en una muerte prematura. Algunos síntomas agudos comunes de las ETA son los problemas gastrointestinales y vómitos [3] [5].

Numerosas investigaciones señalan que de un 2 a 3% de los casos agudos desarrollan enfermedades secundarias de largo plazo o secuelas crónicas. Éstas pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo e incluyen síndromes reumáticos, cardíacos y neurológicos. Estas enfermedades crónicas pueden afectar a los pacientes por el resto de su vida o causar muerte prematura. Por ejemplo, la artritis reactiva así como el Síndrome de Guillain – Barré (una de las principales causas de

parálisis no neuromuscular en los Estados Unidos) pueden desarrollarse luego de infecciones con *Campylobacter* [3] [19].

De los cuatro tipos de patógenos (bacterias, hongos, parásitos y virus), Bean *et al.* encontraron que cerca del 90% de los casos confirmados de ETA y muertes relacionadas reportadas al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, Georgia, Estados Unidos, (CDC, por sus siglas en inglés) son atribuibles a las bacterias [3].

De acuerdo con la información epidemiológica sobre ETA en las Américas, los riesgos que afronta la inocuidad alimentaria significan una evidente preocupación para la salud pública, que además de afectar las condiciones de salud de la población en general, tienen un impacto directo y concreto en actividades como el turismo y el comercio de alimentos, los cuales se encuentran en expansión. Los países deben realizar esfuerzos para garantizar la inocuidad tanto de los alimentos que son destinados a la exportación, como aquellos que se asignan al consumo interno, con la firme meta de conseguir la equidad de acceso a alimentos sanos y aptos para el consumo. Según investigaciones, el lugar donde más se originan casos de ETA en las Américas es en el hogar del consumidor. Es por eso que el papel de las comunidades y del individuo cobra un valor fundamental en la misión de prevenir las enfermedades que son transmitidas por alimentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha enunciado lo que se conocen como las Cinco Claves para la Inocuidad de los Alimentos cuya puesta en práctica es una accesible manera de evitar las ETA; éstas, en su forma más básica, son [8]:

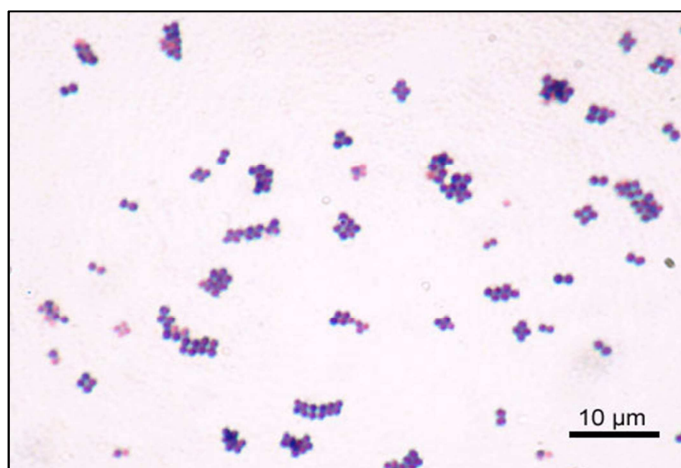
- Conservar la higiene en todo momento de la producción de alimentos.
- Separar los alimentos crudos de los cocinados.
- Cocinar completamente los alimentos.
- Mantener los alimentos a las temperaturas seguras.
- Usar agua potable y materias primas seguras.

I. Principales agentes etiológicos bacterianos causantes de ETA en Centroamérica

- *Intoxicación alimentaria por estafilococos* – Muy común y extendida [1] [14] [19].

Agente etiológico	Exoenterotoxinas A, B, C, D y E de <i>Staphylococcus aureus</i> .
Fuente	Estafilococos de la nariz, piel y lesiones de personas y animales infectados así como de las ubres de las vacas.
Período de incubación o latencia	De 1 a 8 horas, promedio de 2 a 4 horas.
Alimentos implicados	Jamón, productos de carne de res o aves. Es común en productos lácteos, aderezos, jamones, alimentos de repostería, quesos, restos de comida.
Signos y síntomas	Náuseas, vómitos, arcadas, dolores abdominales, diarrea, postración.
Factores que contribuyen	Refrigeración deficiente, mala manipulación del alimento cocido, preparación de alimentos varias horas antes de consumirlos, mala conservación.

– Figura 2: Tinción Gram de *Staphylococcus aureus* –



- *Salmonellosis* - Aunque en ocasiones se le identifica como intoxicación alimentaria, la salmonellosis es más bien una enfermedad gastrointestinal a causa de una infección de la bacteria Gram negativa aeróbica facultativa *Salmonella* spp, transmitida por los alimentos. Los síntomas se manifiestan luego de la colonización del epitelio intestinal por el patógeno [1] [14] [19].

Agente etiológico	Varios serotipos de <i>Salmonella</i> de heces de personas y animales infectados.
Fuente	Tracto intestinal del hombre y otros animales de sangre caliente, aguas residuales.
Período de incubación o latencia	De 6 a 72 horas, promedio de 18 a 36 horas.
Alimentos implicados	Carne de res, aves y sus productos, alimentos que contienen huevo, otros alimentos contaminados por <i>Salmonella</i> .
Signos y síntomas	Dolores abdominales, diarrea, escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos, malestar.
Factores que contribuyen	Refrigeración insuficiente, almacenamiento de los alimentos a temperaturas cálidas (propicia la incubación bacteriana), cocción y recalentamiento inapropiados, preparación de alimentos varias horas antes de servirlos, contaminación cruzada, falta de limpieza de equipos, trabajadores infectados que tocan los alimentos cocidos, obtención de alimentos de fuentes contaminadas.

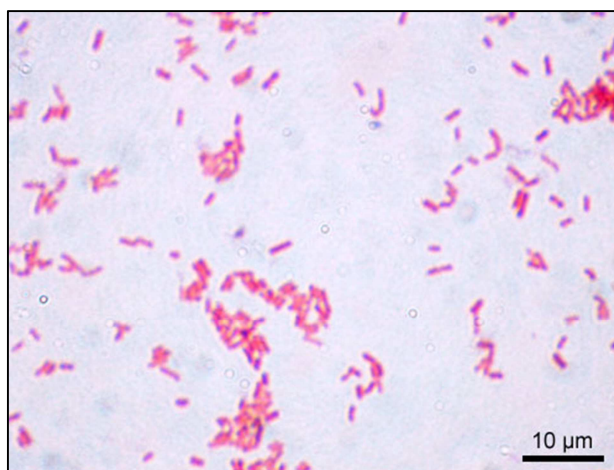
- Figura 3: Tinción Gram de *Salmonella paratyphi* -



- *Cepas patógenas de Escherichia coli* – Distintas cepas de *Escherichia coli* patógenas transmitidas por los alimentos. Cada una de estas cepas actúa primero en el intestino y muchas se distinguen por su capacidad de producir potentes enterotoxinas [1] [19].

Agente etiológico	Cepas enterotoxigénicas o invasoras de <i>E. coli</i>
Fuente	Heces humanas o de animales infectados.
Período de incubación o latencia	De 5 a 48 horas, promedio de 10 a 24 horas.
Alimentos implicados	Diversos alimentos, agua.
Signos y síntomas	Dolores abdominales, diarrea, náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, cefalea, mialgia.
Factores que contribuyen	Trabajadores infectados que tocan los alimentos, refrigeración deficiente, cocción inapropiada, limpieza y desinfección pobres del equipo.

– Figura 4: Tinción Gram de *Escherichia coli* –



- *Intoxicación alimentaria por clostridios* – Tanto *Clostridium botulinum* como *Clostridium perfringens* causan serias intoxicaciones alimentarias. Son bacterias anaeróbicas y esporuladas. Los procesos de envasado y cocinado eliminan los organismos vivos pero pueden no tener efecto sobre las esporas. Bajo condiciones anaeróbicas propicias, las esporas pueden germinar y producir la toxina. Se amplia, por ahora, únicamente lo referente a *Clostridium botulinum*, que si bien no es tan común en la región como lo es *C. perfringens*, sí se ha hecho investigación acerca de su incidencia. Sobre *C. perfringens* se detalla más adelante [1] [14] [19].

Agente etiológico	Exoenterotoxinas A, B, E y F de <i>Clostridium botulinum</i> .
Fuente	Las esporas se encuentran en el suelo y en los animales.
Período de incubación o latencia	De 2 horas a 8 días, promedio de 18 a 36 horas.
Alimentos implicados	Conservas caseras poco ácidas, pescado empacado al vacío, huevos de pescado fermentados, peces y mamíferos marinos.
Signos y síntomas	Vértigo, visión doble o borrosa, sequedad de la boca, dificultad para deglutir, hablar, respirar, debilidad muscular descendente, estreñimiento, dilatación o fijación de las pupilas, parálisis respiratoria. Síntomas gastrointestinales pueden preceder a síntomas neurológicos. Frecuentemente es mortal.
Factores que contribuyen	Elaboración inapropiada de alimentos enlatados y pescado ahumado, fermentaciones no controladas.

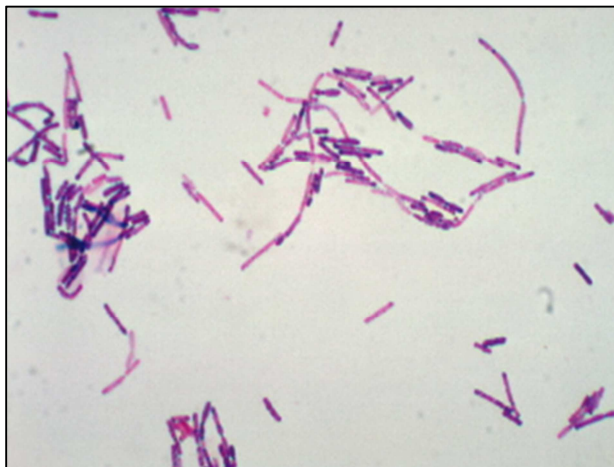
– Figura 5: Tinción Gram de *Clostridium botulinum* –



- *Intoxicación alimentaria por Bacillus cereus* – De semejante patogenia con *C. perfringens* [1] [14] [19].

Agente etiológico	Bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo. El agente etiológico directo lo constituyen las toxinas que genera.
Fuente	Se aísla con facilidad del suelo, cosechas de cereales, vegetación, pelo de animales, agua dulce y sedimentos. Está muy difundido en la naturaleza.
Período de incubación o latencia	De 1 a 5 horas para enfermedad emética y 8 a 16 horas para enfermedad diarreaica.
Alimentos implicados	Su frecuencia es mayor en cremas, postres, productos cárnicos y vegetales, así como en leche y productos lácteos sometidos a UHT. Destaca su elevada presencia en arroz, pastas alimenticias y especias. Al igual que <i>Clostridium perfringens</i> , es común en los productos sometidos a cocción, tratamiento que deja una flora residual de esporas.
Signos y síntomas	En la enfermedad diarreaica se presenta dolor abdominal, calambres, diarrea acuosa profusa y vómitos. Raramente se observa fiebre. La enfermedad emética se manifiesta con náuseas, vómitos y malestar, siendo menos frecuente la aparición de diarrea y dolores abdominales.
Factores que contribuyen	Si no tiene competencia, <i>B. cereus</i> se multiplica muy fácilmente si el alimento se mantiene dentro del rango de temperaturas de crecimiento del organismo, generando la toxina en el alimento (emética) o en el intestino (diarreaica).

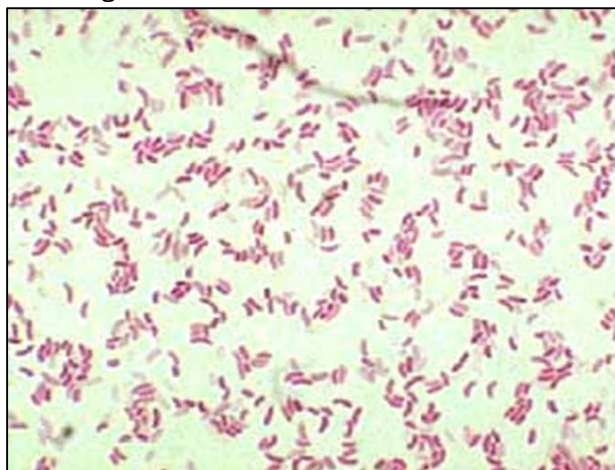
– Figura 6: Tinción Gram de *Bacillus cereus* –



▪ *Infección con Vibrio cholerae* – Generadora del cólera [1] [14] [19].

Agente etiológico	<i>Vibrio cholerae</i> es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo curvo.
Fuente	Se encuentra, muy comúnmente, en fuentes de aguas contaminadas no tratadas. También, en los alimentos (sobre todo mariscos) obtenidos de aguas de fuentes contaminadas.
Período de incubación o latencia	Generalmente, la aparición de la enfermedad es repentina, con períodos de incubación que varían desde las 6 horas hasta los 5 días.
Alimentos implicados	El cólera siempre es asociado con el agua contaminada o con los pescados (y mariscos) provenientes de fuentes de agua contaminada.
Signos y síntomas	El cólera es el nombre de la infección causada por <i>V. cholerae</i> . Los síntomas pueden variar desde una diarrea leve y acuosa hasta una diarrea severa. Calambres abdominales, náuseas, vómito, deshidratación y shock, e inclusive la muerte cuando la pérdida de fluidos y de electrolitos es muy severa. La enfermedad es causada por la ingestión de bacterias viables las cuales se adhieren al intestino delgado y producen la toxina del cólera.
Factores que contribuyen	Las principales causas de la enfermedad son una higiene deficiente, el agua contaminada y el manejo inapropiado de los alimentos. El agua correctamente hervida y la buena higiene pueden prevenir en gran medida las infecciones causadas por <i>V. cholerae</i> .

– Figura 7: Tinción Gram de *Vibrio cholerae* –



J. *Bacilos anaeróbicos, esporulados, Gram – positivos*

Históricamente, el grupo de bacilos anaeróbicos, Gram positivos, capaces de formar esporas fue agrupado en el género *Clostridium*. Este género fue definido por cuatro propiedades básicas, a saber [26]:

- La presencia de endosporas;
- Metabolismo estrictamente anaerobio;
- Inhabilidad para reducir el sulfato a sulfito y,
- Estructura de pared celular Gram positiva.

Aún con este esquema de clasificación tan amplio, algunos miembros del género clínicamente importantes pueden ser clasificados erróneamente. Por ejemplo, las esporas son raramente demostradas en algunas especies (*Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum*), algunas especies son aerotolerantes o pueden crecer en agar expuesto al aire (*Clostridium tertium*, *Clostridium histolyticum*). Además, algunos clostridios son consistentemente Gram negativos (*C. ramosum*, *Clostridium clostridioforme*) e investigaciones recientes demuestran que, de hecho, hay especies específicas que reducen sulfato a sulfito. El método tradicional para clasificar una cepa en el género *Clostridium* estaba basado en una combinación de pruebas diagnósticas, incluyendo, por ejemplo, la demostración de esporas, óptimo crecimiento en condiciones anaerobias, un complejo patrón de reactividad bioquímica y la detección de ácidos grasos volátiles característicos por cromatografía de gas. Con estos métodos han sido definidas 191 especies. Afortunadamente, las especies clínicamente importantes son mucho menos (Cuadro 5). El uso de técnicas de secuenciación genética ha llevado, en la actualidad, a una reorganización de esta colección heterogénea de organismos en un número de grupos que habrán de representar nuevos géneros. Sin embargo, dado que esta reclasificación aún no es oficial ni generalmente aceptada, se utiliza todavía el sistema tradicional de clasificación y taxonomía de *Clostridium* [26].

Casi todas las especies son anaerobias obligadas pero algunas pocas especies son aerotolerantes y pueden proliferar de mínima forma en el aire con la presión atmosférica. Las especies patógenas producen toxinas solubles, algunas de las cuales son en extremo potentes. Ciertas especies son sacarolíticas y producen

ácido y gas a partir de hidratos de carbono; muchas son proteolíticas. Los clostridios están distribuidos ampliamente en la naturaleza y están presentes en los suelos, agua y aguas residuales así como en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales. La mayoría de los clostridios son saprófitos no dañinos (inocuos) pero algunos son ampliamente reconocidos como patógenos, generando enfermedades de alta severidad. Los clostridios patógenos pueden dividirse en cuatro grandes grupos según el tipo de enfermedades que produzcan [17] [26]:

- Clostridios histotóxicos. típicamente causantes de una variedad de infecciones tisulares, en general, luego de heridas abiertas u otros tipos de lesiones traumáticas.
- Clostridios enterotoxigénicos. Producen infección alimentaria y formas más severas de enfermedad gastrointestinal.
- *Clostridium tetani*, agente causal del tétanos. Produce enfermedad por medio de una potente exotoxina que es elaborada durante la proliferación limitada en los tejidos.
- *Clostridium botulinum*, agente etiológico del botulismo. Éste es resultado de la ingestión de la poderosa exotoxina botulínica formada previamente por el microorganismo en los alimentos contaminados.

Casi todas las infecciones observadas actualmente corresponden a infecciones de la piel y tejidos blandos, intoxicaciones alimentarias, diarrea y colitis asociada al uso de antibióticos. La notable capacidad de los clostridios para causar enfermedades se atribuye a [26]:

- Su habilidad para sobrevivir en condiciones ambientales diversas mediante la formación de esporas;
- Un rápido crecimiento en un ambiente nutricionalmente enriquecido privado de oxígeno y,
- La producción de numerosas toxinas histolíticas, enterotoxinas y neurotoxinas.

Cuadro 5 – Clostridios patógenos y sus enfermedades humanas asociadas^a

Especies	Enfermedad humana	Frecuencia
<i>C. difficile</i>	Diarrea asociada a antibióticos, colitis pseudomembranosa	Frecuente
<i>C. perfringens</i>	Infecciones de los tejidos blandos (celulitis, miositis supurativa, mionecrosis o gangrena gaseosa), infección alimentaria, enteritis necrosante, septicemia	Frecuente
<i>C. septicum</i>	Gangrena gaseosa, septicemia	Infrecuente
<i>C. botulinum</i>	Botulismo	Infrecuente
<i>C. tetani</i>	Tétanos	Infrecuente
<i>C. tertium</i>	Infecciones oportunistas	Infrecuente
<i>C. baratii</i>	Botulismo	Rara
<i>C. butyricum</i>	Botulismo	Rara
<i>C. clostridioforme</i>	Infecciones oportunistas	Rara
<i>C. histolyticum</i>	Gangrena gaseosa	Rara
<i>C. innocuum</i>	Infecciones oportunistas	Rara
<i>C. novyi</i>	Gangrena gaseosa	Rara
<i>C. sordelli</i>	Gangrena gaseosa, síndrome del shock séptico	Rara
<i>C. sporogenes</i>	Infecciones oportunistas	Rara

^a Otras especies de clostridio se han asociado con enfermedad humana, pero lo han hecho fundamentalmente como patógenos oportunistas. Además, algunas especies (por ejemplo, *C. clostridioforme*, *C. innocuum*, *C. ramosum*) se aíslan con frecuencia pero rara vez son asociadas con enfermedad.

K. *Clostridium perfringens*

C. perfringens se cultiva del 60 al 90% de los casos de mionecrosis por clostridios. Existen cinco tipos de *C. perfringens*, A a E, que se diferencian el uno del otro por la producción de cuatro toxinas letales principales. El *C. perfringens*, de tipo A es el microorganismo principalmente responsable de enfermedades en los seres humanos: la mionecrosis por clostridios, las infecciones menos severas de las heridas y una forma común de infección alimentaria. El *C. perfringens* tipo A ha sido encontrado en el tracto intestinal de casi todos los animales en los cuales se ha buscado mediante cultivos, pero es una causa menos común de enfermedad en los animales que en los seres humanos. Por el contrario, los tipos B, C, D y E, que existen también en el tracto intestinal de los animales, genera enfermedad en el ser humano sólo de forma ocasional. Estos tipos producen una variedad de

enfermedades naturales en los animales domésticos y no habitan permanentemente en los suelos, como sí lo hace el tipo A [17] [33].

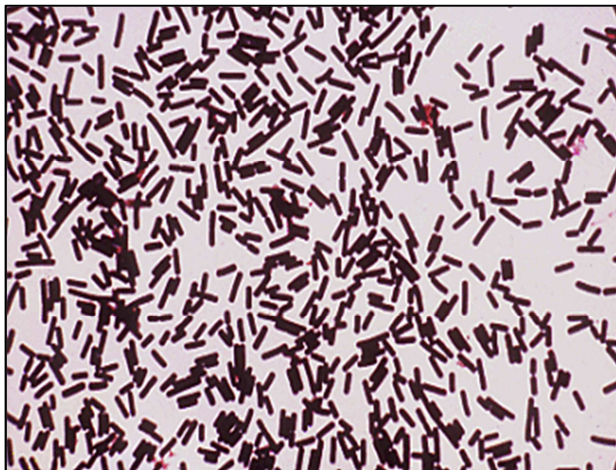
- *Morfología*

El *C. perfringens* es un bacilo fuertemente grampositivo, rectangular y de dimensiones variables (1.3 a 19 μm de longitud y 1 a 1.5 μm de ancho). Los microorganismos tienen un aspecto uniforme. La longitud varía según el estado de proliferación y la composición iónica y nutricional del medio. Las células que proliferan con rapidez pueden tener formas casi cocoides o cúbicas mientras que se observan unas más alargadas en los cultivos más viejos. A diferencia de los otros clostridios patógenos, el *C. perfringens*, es inmóvil pero es característico su rápido desarrollo en los medios de laboratorio. Deben utilizarse medios especiales para demostrar la esporulación [17] [26].

- *Fisiología*

C. perfringens es un microorganismo anaerobio, pero aerotolerante, especialmente cuando se siembra en las placas de agar sangre, y puede sobrevivir e incluso proliferar con tensiones de oxígeno que inhiben a la mayor parte de otros anaerobios (debido a su enzima superóxido dismutasa). Este microorganismo puede proliferar con un pH de 5.5 a 8 y temperatura de 20 a 50 °C. Prolifera generalmente a 37 °C, una temperatura de 45 °C es óptima para muchas cepas [17].

- Figura 8: Tinción Gram de *Clostridium perfringens* -



Cuadro 6 - Toxinas y antígenos solubles del *Clostridium perfringens*

Tipo	Grupo	Enfermedad	Posibles toxinas letales ^a				Antígenos menores ^b				
			α	β	ε	τ	δ	θ	κ	λ	μ
A		Gangrena gaseosa en el ser humano y animales	++	-	-	-	-	++	++	-	++
		Infección alimentaria en el ser humano									
B	1	Disentería en los corderos									
		Enterotoxemia de los potrillos	++	++	++	-	-	++	-	++	++
	2	Enterotoxemia de los ovinos y caprinos (Irán)	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	1	Enterotoxemia de los ovinos	++	++	-	-	++	++	++	-	-
	2	Enterotoxemia de los terneros y corderos (Colorado)	++	++	-	-	-	++	++	-	-
	3	Enterotoxemia de las crías de los cerdos	++	++	-	-	-	++	+	-	+
C		Enteritis necrótica (pig - bel)									
	4	del ser humano (Nueva Guinea)	++	++	-	-	-	++	+	-	++
	5	Enteritis necrótica del ser humano y aves de corral (Alemania) ^c	++	++	-	-	-	-	-	-	-
D		Enterotoxemia de las ovejas, corderos, cabras y bovinos	++	-	++	-	-	++	++	+	++
E		Aislado de ovejas y bovinos; patogenicidad dudosa	++	-	-	++	-	++	++	++	+

++, Producido por la mayoría de las cepas; +, producido por menos del 50% de las cepas; -, no producido.

^a Antígenos letales principalmente responsables de la patogenicidad y la designación del tipo.

^b Menor orden de toxicidad; algunos pueden participar en la patogenicidad.

^c Algunas cepas producen esporas resistentes al calor.

▪ Características de su cultivo

Las colonias superficiales que se producen en agar sangre después de 24 horas de incubación son circulares y lisas, de 2 a 4 mm de diámetro. Aún con ello, a medida que las colonias aumentan de tamaño con la edad, la periferia suele perder

la simetría y las proyecciones observables sugieren el aspecto de una colonia de bacterias con desplazamientos. La morfología de las colonias varía de acuerdo al grado de encapsulación y la transición de colonias de lisas a rugosas [17].

El rápido crecimiento de *C. perfringens* en medios con carne picada a 45 °C puede utilizarse para aislarlo de mezclas de bacterias. A medida que el crecimiento del *C. perfringens* supera la de la mayor parte de los otros microorganismos durante las primeras 4 a 6 horas de incubación, las placas de agar sangre sembradas después de este lapso e incubadas a 37 °C mostrarán un número proporcionalmente mayor de *C. perfringens*. El tratamiento con calor (de 80 a 100 °C) de los cultivos mixtos es una ayuda para el aislamiento de muchas especies de clostridios que esporulan bien pero no es un método aconsejable para *C. perfringens*. Los cultivos de microorganismos aislados de material clínico contienen, generalmente, pocas esporas y la resistencia al calor de éstas parece estar inversamente relacionada con la toxicidad de las formas vegetativas [17].

▪ *Identificación de laboratorio*

El laboratorio desempeña un papel importante de confirmación en el diagnóstico de las infecciones de tejidos blandos por clostridios dado que el tratamiento debe iniciarse inmediatamente. La detección al microscopio de bacilos grampositivos en las muestras clínicas, por lo general en ausencia de leucocitos, puede ser un útil hallazgo dada la característica morfología de estos microorganismos. El cultivo de estas bacterias anaerobias también resulta de relativa sencillez. *C. perfringens* crece generalmente rápido en los tejidos y cultivos, es hemolítico y activo metabólicamente, lo cual permite su rápida identificación en el laboratorio; puede detectarse en los medio de cultivo sencillos tras un período de incubación de un día o menos. En condiciones apropiadas, *C. perfringens* puede dividirse cada 8 o 10 minutos, por lo que su crecimiento en los medios de agar y en los caldos de hemocultivo puede detectarse después de una incubación de sólo unas horas. En los medios con glucosa y carne picada se observa una abundante proliferación con formación de gas, para la cual pueden llevarse a cabo pruebas de toxicidad in vivo con el material sobrenadante de este medio. *C. perfringens* también produce un patrón característico de hemólisis en las placas de agar sangre,

precipitación (opalescencia) en medios con suero o yema de huevo y fermentación “tormentosa” en medios con leche. Después de la incubación durante toda la noche en agar con sangre de conejo, carnero, buey o ser humano, las colonias de casi todas las cepas muestran una característica hemólisis como resultado de una estrecha zona de hemólisis completa provocada por la toxina θ y una zona mucho más amplia de hemólisis incompleta provocada por la toxina α . Este patrón en doble zona de hemólisis puede desaparecer con una incubación más prolongada. El *C. perfringens* produce también un patrón característico de β - hemólisis sinérgica cuando es sembrado al lado de *Streptococcus agalactiae* (prueba CAMP inversa) [17] [26].

Los microorganismos en crecimiento o el líquido sobrenadante de un cultivo de toda la noche producen una densa opalescencia en el suero humano. Esta reacción (reacción de Nagler) es causada por la toxina α (una lecitinasa C) y es inhibida específicamente por la antitoxina para el *C. perfringens*. La opalescencia, producida por la toxina, es observada con mayor facilidad en agar con yema de huevo. Este medio puede inocularse directamente con las muestras de material de las heridas para las evaluaciones de rutina y es de grande ayuda para la identificación de cultivos puros de *C. perfringens* y otros clostridios que producen una lecitinasa (o una lipasa). El *C. perfringens* puede identificarse presuntivamente cubriendo la mitad de una placa de agar yema de huevo con antitoxina contra *C. perfringens*, de modo que los microorganismos queden sembrados en toda la placa y luego del tiempo de incubación, observando la inhibición de la opalescencia en la parte tratada con la antitoxina. Cabe destacar, sin embargo, que esta reacción no es del todo específica para *C. perfringens* debido a que las lecitinasas producidas por *C. bifermentans* o el *C. sordelli* y el *C. baratti* son antigénicamente similares y sufren una inhibición parcial por la antitoxina contra la toxina α del *C. perfringens*. Estos microorganismos pueden diferenciarse por medio de otras pruebas [17].

En los medios con leche casi todas las cepas de *C. perfringens* producen una fermentación “tormentosa”, en la cual la fermentación de la lactosa de la leche genera gran cantidad de ácido, lo cual provoca la coagulación de las proteínas (principalmente caseína). Este coágulo de ácido es alterado y roto posteriormente

por el gran volumen de gas formado a partir de la fermentación. Esta reacción característica en medios con leche es útil para la identificación de *C. perfringens* pero cuando se utiliza sola no es diagnóstica pues también puede ser producida por cierto número de otras especies de clostridios, incluyendo el *C. septicum* [17].

La implicación de *C. perfringens* en una infección alimentaria queda demostrada mediante el aislamiento de más de 10^5 microorganismos por gramo de alimento, o más de 10^6 bacterias por gramo de heces recogidas el primer día siguiente al inicio de la enfermedad. Se han desarrollado pruebas de inmunoanálisis para la detección de la enterotoxina en las muestras fecales pero habitualmente no se emplean cultivos ni inmunoanálisis en los laboratorios clínicos para el diagnóstico de esta infección [17].

- *Estructura antigénica*

Las cepas de *C. perfringens* producen un mínimo de 12 sustancias solubles o toxinas diferentes, todas las cuales son de naturaleza proteica y antigénicas. De los cuatro antígenos letales más importantes, las toxinas α , β , ϵ y ζ , la más destacable es la toxina α , que es producida por los cinco tipos de *C. perfringens*. Todas las toxinas son exotoxinas (Ver Cuadro 6) [17].

Muchas de las otras sustancias solubles o antígenos menores son enzimas con sustratos definidos. No son letales y no deberían denominarse toxinas (como ha sido costumbre en el pasado). Los ejemplos de estas sustancias son la colagenasa (antígeno κ), la desoxorribonucleasa (antígeno ν) y la hialorunidasa (antígeno μ) [17].

Por lo general, la serotipificación con los antígenos somáticos no ha resultado práctica para la mayor subdivisión del *C. perfringens*, si bien existe un gran número de tipos serológicos. No obstante, ha tenido aplicación en estudios epidemiológicos acerca de infección alimentaria, en los cuales se halló una correlación entre los serotipos del *C. perfringens* resistente al calor ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h) de tipo A aislado de las heces de los pacientes y los serotipos de los alimentos involucrados [17].

- *Infección clínica*

Enteritis necrotizante (yeyunitis necrotizante, enteritis necrótica)

La enteritis necrotizante es provocada por las cepas del tipo C del *C. perfringens* y es más severa que la infección alimentaria provocada por el *C. perfringens* del tipo A. Después de un período de incubación de menos de 24 horas, el comienzo sintomático es repentino, con dolor abdominal severo y diarrea; en algunos pacientes se produce pérdida de la mucosa intestinal con hemorragia hacia las heces. La enfermedad puede ser mortal, con colapso circulatorio u obstrucción intestinal y peritonitis. Si bien las cepas que causan la enfermedad fueron consideradas en su momento un nuevo tipo de *C. perfringens*, el tipo F, en la actualidad se las considera una cepa del tipo C atípica que produce esporas resistentes al calor. Además de los casos esporádicos que han reportado epidemias importantes en Nueva Guinea, donde la enfermedad está asociada con la ingestión de carne de cerdo contaminada e inapropiadamente cocida, por lo cual se le llama *pig - bel* (de “barriga de cerdo”). En Nueva Guinea la enfermedad aparece en cuatro formas, cuya gravedad y grado de toxicidad varían pero con una tasa de mortalidad global del 35 al 40%. La toxina β producida por el tipo C de *C. perfringens* es responsable de los síntomas; la administración oportuna de la antitoxina contra el tipo C de *C. perfringens* a los pacientes con enteritis necrotizante, reduce de forma significativa la tasa de mortalidad [17].

Infección alimentaria

Desde que fuera comprobada su asociación con el *C. perfringens* en 1945, se ha reconocido cada vez más frecuentemente una forma leve de infección alimentaria. Los microorganismos generalmente involucrados son las cepas del tipo A que producen esporas resistentes al calor y cantidades mínimas de toxina θ , si bien las cepas el tipo A más típicas también pueden producir la enfermedad. De 8 a 24 horas después de la ingestión del alimento contaminado se desarrolla dolor abdominal agudo y diarrea. Pueden producirse náuseas pero los vómitos son raros o ausentes, al igual que otros signos de infección, como la fiebre y la cefalea. Los síntomas generalmente duran de 12 a 18 horas y la recuperación suele ser completa, con la

excepción de los raros casos de muerte entre los pacientes de edad avanzada y las personas inmunocomprometidas [17].

Los síntomas se atribuyen a la enterotoxina que puede existir en más de una forma bioquímica y que generalmente es sintetizada durante la esporulación del microorganismo; la toxina es termolábil. Las condiciones alcalinas del intestino delgado estimulan la esporulación, la enterotoxina liberada se une a los receptores de la membrana epitelial del intestino delgado en el íleo (principalmente) y en el yeyuno, pero no en el duodeno. La inserción de la toxina en la membrana celular modifica la estructura de la misma y conlleva una alteración de la permeabilidad de la membrana y la pérdida de líquidos e iones, alterando el equilibrio osmótico. Por otra parte, la enterotoxina es también un superantígeno que estimula la actividad de los linfocitos T. Los anticuerpos frente a la enterotoxina (que indican una exposición previa) se encuentran con frecuencia en adultos pero no confieren protección alguna [17] [26].

Este tipo de infección alimentaria es, por lo general, el resultado de la ingestión de alimentos como carne vacuna, carnes blancas y pescados, asados o en estofado, abundantemente contaminados con *C. perfringens*. La contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier momento pues el microorganismo está distribuido con amplitud en el medio ambiente. La carne cruda puede contaminarse en el matadero o por la manipulación durante la preparación o bien, por la exposición a las moscas o el polvo. La conservación de alimentos contaminados por debajo de 60 °C (la temperatura óptima es de 46 °C) hace posible la germinación de las esporas que han sobrevivido al proceso inicial de cocción y su posterior multiplicación hasta llegar a elevadas concentraciones. Por supuesto, el alimento también puede contaminarse después de la cocción. Los clostridios proliferan durante un lento enfriamiento de la carne o alimentos y pueden producir infección alimentaria si estos mismos alimentos se sirven fríos o si son recalentados inadecuadamente; únicamente un rápido enfriamiento después de la preparación de los alimentos después de su preparación evita la síntesis de la enterotoxina. Por otra parte, el recalentamiento de los alimentos a 74 °C destruye la enterotoxina termolábil. Los síntomas únicamente ocurren si la concentración de los

microorganismos llega a $10^6 - 10^7$ células viables por gramo de alimento, de forma que se ingieran $10^8 - 10^9$ bacterias viables. El diagnóstico puede establecerse por aislamiento de una cantidad mayor que la normal de *C. perfringens* en las heces de los pacientes infectados y, de ser posible, de muestras del alimento ingerido. Un diagnóstico más específico es posible por medio del empleo de enzimoimmunoensayo (ELISA) para la detección de la enterotoxina de *C. perfringens* en las heces de las personas afectadas [17] [26].

Tratamiento, prevención y control

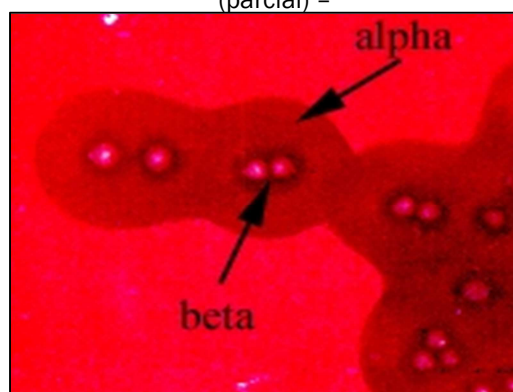
No es necesario el tratamiento antibiótico en las intoxicaciones alimentarias por clostridios pues se trata de un proceso de resolución espontánea (autolimitada, dado que la diarrea elimina las bacterias del tubo digestivo y la microflora intestinal normal se restablece por sí sola) [17] [26].

Figura 9: Ciclo celular de *Clostridium perfringens*: A: Células vegetativas; B: Células esporuladas; C: Esporas liberadas -



- Figura 10: *C. perfringens* muestra una zona de doble hemólisis en agar sangre. Nótese la pequeña área de β hemólisis (lisis completa de los glóbulos rojos), rodeada por una zona mayor de α hemólisis

(parcial) -



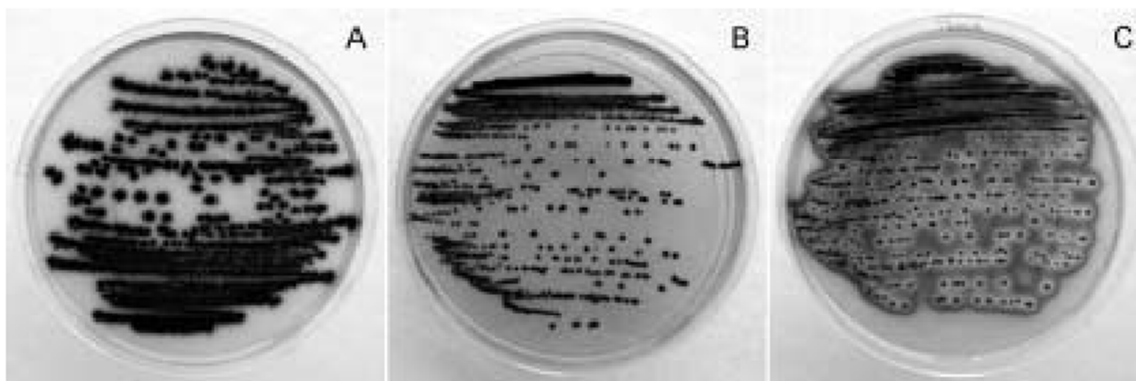
- **Enumeración y confirmación**

Muchos medios y métodos han sido descritos para el aislamiento de *C. perfringens* de alimentos y heces y para identificar a este patógeno. Un procedimiento de enriquecimiento es normalmente innecesario para enumerar a la bacteria en alimentos o heces relacionados con un brote de infección alimentaria debido a que únicamente grandes cantidades de *C. perfringens* podrían causar tales brotes. Sin embargo, el congelamiento o la refrigeración prolongada de las muestras puede reducir el número de células viables, lo cual complica la enumeración directa en medios que implican plaqueado. La adición de glicerol a los alimentos/heces puede reducir el efecto del daño celular debido a almacenamiento frío. Cuando se tienen sospechas de un bajo número de células, se puede hacer uso de medios de enriquecimiento. Estos medios pueden también ser utilizados para las técnicas de número más probable. Sin embargo, este procedimiento es bastante laborioso y aún necesita confirmación posterior. Muchos diferentes medios para plaqueado han sido desarrollados para la enumeración cuantitativa directa de *C. perfringens* a partir de alimentos o heces. Los métodos basados en ADN así como los que implican detección de enterotoxina son utilizados como técnicas cualitativas [6].

En Europa, existen al menos tres diferentes métodos estándar para la enumeración de *C. perfringens* en alimentos o heces. El método más importante está establecido por el Estándar Europeo y autorizado por ISO. En los Estados Unidos, en cambio, los métodos reconocidos son los de BAM (Bacterial Analytical Manual) y de APHA (American Public Health Association). En todo caso, en términos generales, todos los métodos prescriben el uso de agar Triptosa – Sulfito – Cicloserina libre de yema de huevo (TSC – EY free agar) para la enumeración de *C. perfringens* de alimentos. Sin embargo, el medio TSC por sí mismo no es suficiente y se requieren pruebas confirmatorias. La reacción Lactosa – Sulfito (LS) o el uso combinado del medio Movilidad – Nitrato (MN) y el medio Lactosa – Gelatina (LG) pueden ayudar a ese fin. Este método confirmatorio está basado en el conocimiento de que el único Gram positivo, anaerobio, no móvil, que fermenta la lactosa, que licúa la gelatina, que reduce el sulfato a sulfito y el nitrato a nitrito es, precisamente, *C. perfringens* y ninguno otro. Los medios diseñados para la enumeración de

clostridios reductores de sulfito están basados en la reducción de sulfito, el cual precipita como sulfuro de hierro, dando como resultado el crecimiento de colonias negras. Ver Figura 11 [6]:

- Figura 11: Morfología de las colonias de diferentes cepas de *C. perfringens* en placas de agar TSC (37 °C, durante 24 horas) A: WU01147; ATCC 12916; C: 10239 -



La anterior reacción, sin embargo, no se limita a los clostridios únicamente. Otras bacterias como salmonellae, *Proteus*, *Escherichia freundii*, *Citrobacter* sp. y ciertas bacterias del género *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Achromobacter* producen colonias negras también. Por esta situación, ciertos antibióticos se agregan al medio para inhibir el crecimiento de estos organismos sulfito reductores así como otras bacterias anaerobias no reductoras de sulfito pero que podrían complicar el crecimiento de *C. perfringens* [6].

Los diferentes medios compiten entre sí en relación a la habilidad de producir colonias negras, en sus rendimientos y tasas de recuperación y en su selectividad. Muchos artículos han sido publicados comparando diferentes medios de cultivo en cuanto a estas tres propiedades principales. La mayoría de estos medios son semejantes en cuanto a su composición (Agar Shahidi - Ferguson - Perfringens [SFP]; Agar Sulfito - Polimixina - Sulfadiazina [SPS]; TSC; y Triptosa - Sulfito - Neomicina [TSN]): peptonas, extracto de levadura, sulfito de sodio y citrato amonio de hierro, pero utilizan diferentes tipos de antibióticos. Otros medios, en cambio, incorporan componentes adicionales como extracto de hígado, extracto de carne, almidón, soluciones buffer, glucosa, sal, cisteína, piruvato o citrato bismuto. Los medios que han sido utilizados para la enumeración de *C. perfringens* son (en orden

de descripción en la literatura): medio Sulfito – Polimixina – Sulfadiazina (SPS, 1962); medio Triptona – Sulfito – Neomicina (TSN, 1965); medio Shahidi – Ferguson – Perfringens (SFP, 1971; Ver Figura 12); Triptosa – Sulfito – Cicloserina (TSC, 1971); medio Oleandomizina – Polimixina – Sulfadiazina – Perfringens (OPSP, 1973); Sulfito – Cicloserina – Azida (SCA; 1986) y medio Bismuto – Hierro – Sulfito – Cicloserina (BISC, por sus siglas en inglés, 1997) [6].

No obstante lo anterior, ninguno de estos medios soporta por sí solo el crecimiento exclusivo de *C. perfringens*, por lo que las pruebas confirmatorias son requeridas. Estos métodos de confirmación están basados en las características específicas de este microorganismo, como la prueba CAMP – reversa y el método LG – MN, respectivamente. También puede mencionarse la prueba de Nagler, basada en la actividad lecitinasa de *C. perfringens* [6].

En la actualidad existe también la disponibilidad de métodos que combinan enumeración y confirmación de *C. perfringens* los cuales son más eficientes en términos de tiempo ya que no requieren posterior tiempo de incubación para las pruebas confirmatorias. Un indicador altamente específico de *C. perfringens* es la presencia de actividad ácido fosfatasa. La actividad de esta enzima queda demostrada por la suplementación del medio de cultivo con 4 – metilumbeliferil – fostato (MUP, por sus siglas en inglés), un sustrato enzimático fluorogénico. Las colonias positivas brillarán con luz azul claro cuando reciban luz UV (366 nm). Sin embargo, otros clostridios como *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. sordellii*, *C. butyricum*, *C. baratii*, *C. ramosum*, *C. difficile*, *C. sardinensis*, *C. lituseburensis* y *C. tertium* también dan reacción positiva. Otros métodos están basados en la misma actividad enzimática pero utilizan otras sustancias: sacarosa + fenoltaleindifosfato o 1 – naftil fosfato + diazonio o – dianisidina. El naftil que contiene este reactivo es altamente específico para *C. perfringens* por lo que reacciona en segundos mientras que otros clostridios toman más de tres minutos para mostrar actividad fosfatasa. El medio Yema de Huevo sin Sangre (BCP, por sus siglas en inglés) utiliza la producción de lecitinasa y la habilidad para fermentar inositol. El medio Magnesio – Cicloserina – Polimixina (MCP) utiliza la habilidad para fermentar la sacarosa, la producción de

fosfatasa ácida y la ausencia de β - D - glucosidasa en combinación con polimixina y cicloserina [6].

La mayoría de procedimientos más eficientes están basados en mediciones de conductividad que correlacionan el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en el tiempo con la turbidez. Los tiempos de detección varían desde 1 h a 18 h para 10^8 UFC/mL y 1 UFC/mL, respectivamente. Este método puede no resultar muy útil para análisis cuantitativos pero para propósitos cualitativos sirve como un método rápido presuntivo. Análisis cuantitativos complementarios podrían ser necesarios pero únicamente un porcentaje de las muestras tendría que ser plaqueada en agar, lo cual se traduce en ahorro de tiempo y dinero [6].

Para propósitos epidemiológicos, la enumeración cuantitativa de *C. perfringens* no es suficiente aunque un gran número de células es ya un buen indicador para brotes causados por el organismo. Los brotes de infección alimenticia son provocados por cepas que producen enterotoxina; únicamente un 4.25 - 6% de las cepas de *C. perfringens* poseen la codificación genética para la producción de enterotoxina. La presencia de la enterotoxina en heces o la presencia en alimentos y/o heces de cepas conteniendo los genes para producción de enterotoxina es, por lo tanto, de mucho mayor importancia que el número total de células aisladas de *C. perfringens* [6].

- Figura 12: Agar Shahidi - Ferguson - Perfringens (SFP) y el crecimiento de *C. perfringens* -



Cuadro 7 – Medios utilizados para enumerar y confirmar *C. perfringens* a partir de alimentos y heces

Enriquecimiento	Enumeración	Confirmación
RPM: Fermentación “tormentosa” de leche litmus (un medio especial); polimixina y neomicina.	La selectividad de <i>C. perfringens</i> se basa en la reducción de sulfito a sulfuro, lo cual resulta en colonias negras debido a la precipitación de sulfuro de hierro. Se mencionan las otras características de selectividad y los antibióticos utilizados.	Actividad ácido fosfatasa: MUP o sacarosa/fenoltaleindifosfato + NaOH o fenoltaleindifosfato + NH ₄ OH o 1 - naftil fosfato + diazonio o - dianisidina en amortiguador citrato
PEM: Cicloserina	BISC: Cicloserina	Actividad lecitinasas: Hidrólisis de yema de huevo; neutralizada por antisuero: reacción de Nagler
	MCP: Cicloserina y polimixina	Medio Lactosa: Producción de ácido y gas a partir de lactosa
	Medio OPSP: Oleandomicina, polimixina y sulfadiazina.	Medio Lactosa - Sulfito (LS): Producción de gas a partir de lactosa (Campanas de Durham) + reducción de sulfito a sulfuro, generando un color negro
	Medio SCA: Cicloserina y azida de sodio.	Medio Movilidad: Crecimiento a lo largo de la línea de picada indica un crecimiento no móvil.
	Medio SFP: Actividad lecitinasas; kanamicina y polimixina	Medio Movilidad - Nitrato (MN) + Medio Lactosa - Gelatina (LG): Crecimiento no móvil y reducción de nitrato a nitrito + producción de ácido y gas a partir de lactosa y licuefacción de gelatina
	SPS: Polimixina y sulfadiazina	Prueba CAMP - reversa: Hemólisis de sangre por la acción combinada de actividad β hemolítica de <i>Streptococcus agalactiae</i> y actividad de α - toxina por <i>C. perfringens</i> en placas de agar sangre de carnero, resultando en manchas brillantes en la placa
	TSC: Cicloserina	Fermentación de Carbohidratos: Rafinosa y salicina, generalmente, aunque pueden ser otros.
	TSC + yema de huevo: Actividad lecitinasas y cicloserina	
	TSN: Neomicina	

Cuadro 8 – Comparación de características específicas de clostridios reductores de sulfito

Organismo	L ^a	G	M	N	LG + MN	LS
<i>C. perfringens</i>	+^b	+	-	+⁻	+	+
<i>C. absonum</i>	+	+	-+	+	-	+
<i>C. bifermentans</i>	-	+	+	-	-	-
<i>C. botulinum</i> A y B	-	+	+	-	-	-
<i>C. botulinum</i> E y F	-	+	+	-	-	-
<i>C. butyricum</i>	+	-	+ ⁻	-	-	+
<i>C. cadaveris</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. difficile</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. felsineum</i>	+w	+	d	-	-	+
<i>C. formicaceticum</i>	-	-	+	-	-	-
<i>C. glycolicum</i>	-	-	+ ⁻	-	-	-
<i>C. hastiforme</i>	-	+	+	-+	-	-
<i>C. histolyticum</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. novyi</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. paraperfringens</i>	+w	-	-	d	-	+
<i>C. paraputrificum</i>	+	-	+ ⁻	-+	-	+
<i>C. pasteurianum</i>	-w	-	-+	-	-	-
<i>C. perenne</i>	+w	-	-	d	-	+
<i>C. putrefaciens</i>	-	+	-	-	-	-
<i>C. putrificum</i>	-	+	+	-	-	-
<i>C. ramosum</i>	+	-	-	-	-	+
<i>C. roseum</i>	+	+	-+	-	-	+
<i>C. rubrum</i>	+	-	+	-	-	+
<i>C. sardiniensis</i>	+w	+	+	+ ⁻	-	+
<i>C. scatologenes</i>	-	-	+	-	-	-
<i>C. sordellii</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. sphenoides</i>	+w	-	+	+ ⁻	-	+
<i>C. sporogenes</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. sticklandii</i>	-	-	+	-	-	-
<i>C. subterminale</i>	-	+	+ ⁻	-	-	-
<i>C. tertium</i>	+	-	+	+ ⁻	-	+
<i>C. tetani</i>	-	+	-+	-	-	-

^aL: producción de ácido y gas a partir de lactosa; G: licuefacción de gelatina; M: movilidad; N: reducción de nitrato a nitrito; LG+MN: combinación de L+, G+, M- y N+ (característico de *C. perfringens*); LS: medio lactosa – sulfito; ^b+: reacción positiva para 90 – 100% de las cepas; -: reacción negativa para 90 – 100% de las cepas; +⁻: 61 – 89% de cepas positivas; -⁺: 11 – 39% cepas positivas; d: 40 – 60% cepas positivas; w: reacción débil. Donde dos reacciones son mencionadas, la primera es la más usual y ocurre en 60 – 90% de las cepas.

Cuadro 9 – Características de los antibióticos utilizados en los medios para enumerar *C. perfringens* a partir de alimentos y heces

CICLOSERINA
Inhíbe bacterias Gram positivas, <i>Escherichia coli</i> , algunas pseudomonas y <i>Chlamydia</i> . Es usado como una droga contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Inhíbe completamente el crecimiento del grupo D streptococos, que están comúnmente presentes en alimentos asociados con infección por <i>C. perfringens</i> . No inhíbe el crecimiento de <i>C. paraperfringens</i> (gelatina negativo), <i>C. beijerinckii</i> (nitrato negativo, movilidad positiva), <i>C. sporogenes</i> (móvil, lactosa negativo), <i>C. sordelli</i> , <i>C. bifermentans</i> (ambos lactosa negativos, movilidad positiva), <i>C. botulinum</i> (tipos A, B, E y F, móviles, nitrato negativos, lactosa negativos), <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>Serratia marcescens</i> . La cicloserina reduce la difusión del crecimiento de las colonias negras, definiéndolas más y regulando su tamaño. No reduce el crecimiento de células dañadas pero algunas cepas de <i>C. perfringens</i> son sensibles a la cicloserina.
SULFATO POLIMIXINA B
Es inhibitorio de bacilos Gram negativos (<i>Pseudomona</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> spp.), pero <i>Proteus</i> son resistentes. Los cocos Gram negativos, bacterias Gram positivo, levaduras y hongos son insensibles. Comparado con la cicloserina, la polimixina no reduce la flora acompañante suficientemente: enterococos, stafilococos, bacilos aeróbicos, bacilos Gram negativos como <i>Salmonella</i> , y ciertas especies de <i>Citrobacter</i> todavía crecen aún en presencia de polimixina.
SULFATO KANAMICINA
Es un antibiótico de amplio espectro. Su acción afecta principalmente a las bacterias Gram negativas, como <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella</i> y <i>Acinetobacter</i> . Su acción es limitada ante las bacterias Gram positivas, como los estreptococos y enterococos, pero la kanamicina es efectiva contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , y <i>Mycobacterium</i> .
SULFADIAZINA
Es una sulfonamida. Este grupo de antisépticos es efectivo contra los microorganismos que sintetizan el ácido fólico, compitiendo con el ácido para - aminobenzoico, un ingrediente del extracto de levadura. La sulfadiazina es efectiva tanto para las bacterias Gram positivas como Gram negativas: <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> , y <i>Shigella</i> . La mayoría de <i>Salmonella</i> son resistentes.
OLEANDOMICINA
Tiene una concentración mínima de inhibición para <i>C. perfringens</i> de 16 mg/L, mientras que otros clostridios son inhibidos por concentraciones ≤ 4 mg/L (<i>C. bifermentans</i> , <i>C. cadaveris</i> NCIB 10676, <i>C. clostridioforme</i> , <i>C. sordelli</i> y <i>C. sporogenes</i>) o son más resistentes (<i>C. sphenoides</i> , <i>C. tertium</i> , <i>C. cadaveris</i> P - 1, <i>C. symbiosum</i> , y <i>C. subterminale</i>).
AZIDA DE SODIO
Inhíbe a organismos catalasa positivos, tanto Gram positivos como Gram negativo, aunque los primeros son más susceptibles. Vale notar que algunas cepas de <i>C. perfringens</i> asociadas con infección por alimentos son inhibidas también.

Cuadro 10 – Sumario de *Clostridium perfringens***Fisiología y estructura**

Bacilos Gram positivos, largos, rectangulares.

Forma esporas, pero son raramente vistas en especímenes clínicos o en cultivos.

Se multiplica rápidamente, se observan colonias grandes y extendidas en el primer día de cultivo; produce una “zona doble” de hemólisis en agar sangre (producida por las toxinas α y θ).

Produce numerosas toxinas y enzimas hemolíticas, por lo que ni glóbulos blancos ni plaquetas son vistas en tinciones Gram de especímenes clínicos.

Produce lecitinasa (fosfolipasa C).

Se subdivide en cinco tipos (A a E) sobre la base de la producción de toxinas específicas.

Epidemiología

Ubicuo; presente en el suelo, agua y el tracto intestinal de humanos y animales.

El Tipo A es el responsable de la mayoría de infecciones humanas.

La enfermedad se genera por exposición endógena o exógena.

Enfermedades

Infecciones de los tejidos blandos (diferente gravedad según grado de contaminación de las heridas).

Infección alimentaria debida a productos cárnicos contaminados conservados a temperaturas inferiores a 60 °C, lo que permite el crecimiento de numerosos microorganismos.

Diagnóstico

Formas características en una tinción de Gram de muestras de alimentos.

Crecimiento rápido en diferentes medios de cultivo específicos.

Tratamiento, prevención y control

El tratamiento de la infección alimentaria es sintomático.

IV. ANTECEDENTES

A. Impacto económico y social de las enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema que debe ser abordado en todas sus dimensiones y facetas, a saber: su faceta social, tecnológica, económica, cultural y política. Dado que es un problema persistente en países en vías de desarrollo, las autoridades y organismos de gobierno así como otras instituciones relacionadas, tanto públicas como privadas, deberían dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua con la meta de prevenir o corregir situaciones que puedan resultar dañinas y afectar negativamente la salud de la población. Es necesario evitar y solucionar estos problemas que en la mayoría de los casos se pueden volver endémicos y que indudablemente ejercen una influencia negativa en el desarrollo socioeconómico de la sociedad y un impacto directo sobre la salud general de la población. Las medidas y acciones por tomar han de tener como propósito primordial la contribución a la mejora de la calidad de vida mediante una asistencia continua para la adopción y adaptación de estrategias y tecnologías válidas y culturalmente pertinentes que permitan concienciar, educar y con ello, coadyuvar a la reducción de las ETA y la mejora de la seguridad, calidad nutricional e inocuidad de los alimentos [18].

Y es que, de hecho, la salud y la vida de la población dependen en gran manera de la calidad nutricional de los alimentos que ésta consume a diario, calidad que a su vez depende también de la calidad higiénica, tecnológica y sanitaria a que esos alimentos son sometidos durante toda su cadena productiva, desde el campo hasta la mesa del consumidor. Aunque la falta de higiene y de sanidad en el procesamiento y preparación de alimentos es algo que puede ocurrir en cualquier lugar del mundo, la incidencia y prevalencia de enfermedades causadas por los alimentos mal procesados o deficientemente preparados es un problema grave que se encuentra con más frecuentemente en los países en vías de desarrollo [18].

El problema de las ETA en países en desarrollo comprende diferentes facetas y ello hace que sea menester la identificación de los distintos factores que intervienen para controlarlos y prevenir a los consumidores sobre los riesgos

potenciales a los que se ven expuestos de consumir alimentos mal preparados y procesados, tanto a nivel familiar como comercial, en pequeña, mediana o gran escala, dentro de la totalidad de la cadena alimentaria, desde el origen hasta el consumo final [18].

Para fines de esa prevención mencionada, existen las estrategias para el control de la inocuidad de alimentos (supervisión, programas informativo - educativos, etc.), pero en los países en vías de desarrollo estas estrategias son menos conocidas y puestas en práctica con mayor dificultad. La situación del control sanitario de los alimentos en los países en vías de desarrollo aún dista mucho de llegar a niveles aceptables, sobre todo para el caso de los alimentos popularmente consumidos por la mayoría de la población [18].

La presencia de contaminación alimenticia, sea por intoxicaciones o infecciones bacterianas o parasitarias, o una combinación de ambas, es muy frecuente y afecta sobre todo a grupos sociales de bajos recursos. Estos grupos, frecuentemente por razones económicas, sólo tienen acceso a alimentos de bajo costo y por lo mismo, de calidad e inocuidad si bien no insuficiente, por lo menos, dudosa. Lo anterior puede ocurrir para el caso de los alimentos comercialmente preparados para la venta al público o incluso, a nivel del hogar, debido a las deficientes prácticas utilizadas para prepararlos, manipularlos y consumirlos. Precisamente, es esa falta de conocimientos básicos sobre las buenas prácticas de manufactura así como la escasa disponibilidad de dicha información técnica complementaria, la que repercute negativamente en la manipulación y preparación de los alimentos, tanto a nivel familiar como comercial. La carencia de estos conocimientos técnicos fundamentales sobre la inocuidad por parte de quienes preparan alimentos puede considerarse como uno de los factores que más contribuyen a esa contaminación alimenticia en la que, indirectamente, se ven más afectados los grupos más vulnerables a enfermarse, como son los niños, los ancianos y las personas inmunodeprimidas. Precisamente, en Centroamérica, por mencionar una región específica, es muy común el comercio y consumo de alimentos, bebidas o refrescos preparados, frutas y vegetales frescos, que no siempre son elaborados en forma higiénica y suficientemente sanitaria [18].

Conocer la historia de un alimento desde su origen y producción hasta el momento del consumo (e incluso después) es cada vez más importante. Tan es así que, de hecho, la tendencia actual es dar seguimiento a las rutas que ha transcurrido el alimento desde su origen, las posibles causas de contaminación durante las diferentes etapas de manipulación, procesamiento, almacenamiento, transporte, distribución y exposición de cada alimento hasta que llega finalmente al consumidor. Las modernas técnicas de trazabilidad permiten recuperar la historia del alimento, su utilización y localización, mediante códigos de registro, lo que hace posible también disponer con rapidez de información sobre el alimento a lo largo de toda la cadena alimentaria. Por otra parte, la aplicación de métodos de control sobre la inocuidad de los alimentos son herramientas valiosas y útiles, como es el caso del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), el cual ayuda a controlar los diversos procesos aplicados a los alimentos y se dirige a prevenir o evitar riesgos de enfermedades que pudieran transmitir los alimentos [18].

Sin embargo, sumado a las estrategias de trazabilidad e inocuidad preventiva, también es necesario fortalecer las técnicas analíticas que de hecho, permiten confirmar si determinado agente etiológico está o no en algún alimento del cual se sospecha sea vehículo de alguna ETA. Aunque es claro que las estrategias de prevención son deseables a las de reacción, es evidente que nunca se está del todo exento de que ocurran brotes de ETA y para cuando ocurran, se debe estar preparado para determinar sin lugar a dudas cuál es el agente etiológico causante, de modo que se seleccione la mejor estrategia curativa/correctiva posible [18].

Es necesario, por lo anterior, implementar alternativas de soluciones prácticas (de factible aplicación y fácil interpretación) que habiliten a productores, procesadores, distribuidores y analistas de alimentos (tanto de Laboratorios públicos como privados), a anticiparse y combatir más efectivamente a las principales causas que dan origen a la presencia de enfermedades transmitidas por alimentos. Por ello mismo, un elemento fundamental para conseguir estos objetivos es la promoción de la capacitación en estas áreas tecnológicas combinadas que participan en mayor o menor grado en la cadena alimentaria [18].

El problema de las ETA no se limita únicamente al daño físico que provocan (el cual, sin embargo, puede ser fatal en algunos casos) sino que comprende también el impacto socioeconómico negativo que paralela e implícitamente conllevan. Por ejemplo, una persona enferma, además de significar un peligro como vehículo de contaminación, representa también una baja en el rendimiento de sus actividades productivas, provoca su inasistencia al trabajo o estudio y frena la generación de riqueza y desarrollo, incurriendo en gastos médicos “extra”, sea por los servicios públicos o privados a los que tenga acceso. Todo lo anterior se manifiesta en un claro impacto negativo que afecta sensiblemente, en la suma de muchos individuos, a la economía y capital humano nacionales [18].

B. Enfermedades transmitidas por alimentos en Guatemala

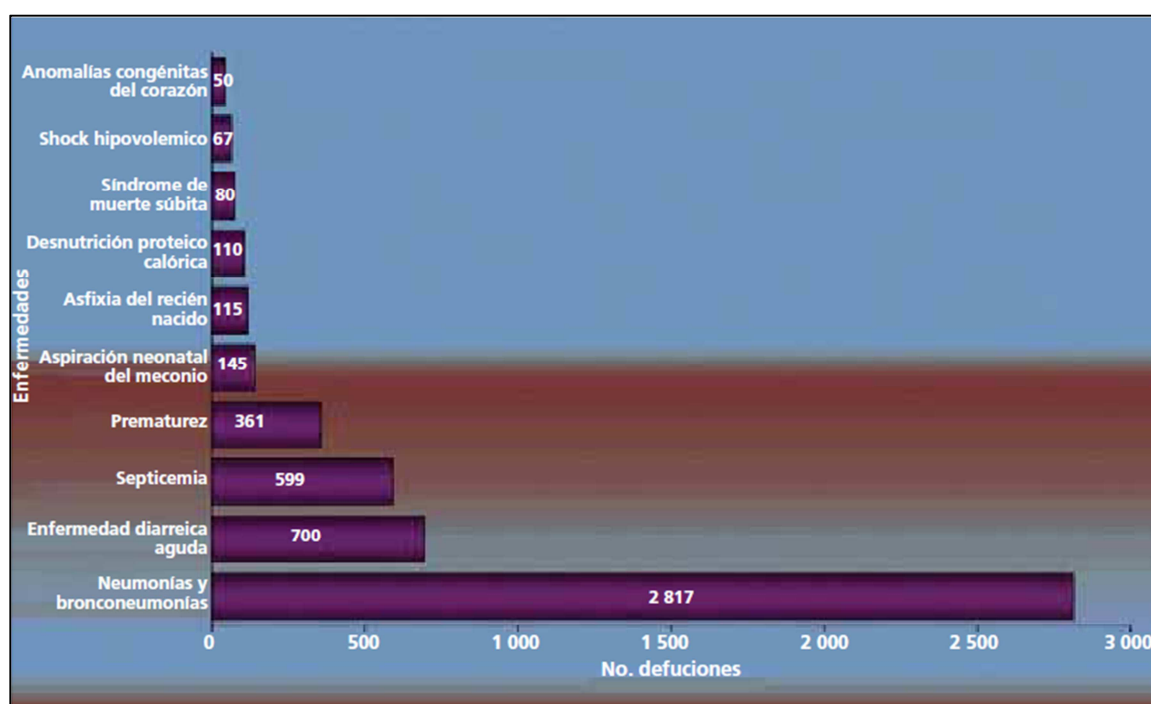
Los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala (MSPAS) están limitados principalmente a la incidencia de diarreas sin detallar el agente etiológico ni el alimento implicado en la transmisión de la enfermedad. Cabe destacar que las diarreas son el segundo problema en importancia como causa de muerte entre lactantes y niños, sólo después de la neumonía. De igual forma, está en la segunda posición entre las enfermedades infecciosas, después de las infecciones respiratorias agudas [18].

Diferentes estudios hechos en la población han identificado los agentes relacionados con los brotes de diarrea pero se han enfocado, principalmente, en el problema de la contaminación del agua. Con este enfoque, se han logrado identificar agentes como notovirus y rotavirus así como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* y *Escherichia coli* enterotoxigénica [18].

Dentro de las gastroenteritis infecciosas, un grupo destacable se debe al consumo de agua contaminada (agua sola o en alimentos) con agentes diarreicos los cuales se originan, por lo general, cuando las lluvias arrastran materias fecales de personas enfermas o animales portadores a las fuentes de agua que abastecen a la población. La principal enfermedad diarreica transmitida por el agua es el cólera, que cuando no es controlada rápidamente, puede causar la muerte o resultar en una sobresaturación de la capacidad de los servicios sociales [18].

La distribución de los casos de diarrea en Guatemala está asociada con factores económicos y sociales así como con el saneamiento ambiental. De igual forma, se relaciona con los índices de pobreza, analfabetismo y desnutrición crónica. En el caso particular de Guatemala, el impacto económico de las ETA es importante pues afecta actividades económicas significativas como el turismo y la exportación de frutas, además de contribuir a un mermado estado de salud y nutrición en algunos segmentos poblacionales [18].

- Gráfica 1: Primeras diez causas de mortalidad infantil en Guatemala, 2005 [18] -



En Guatemala existen dos fuentes oficiales de estadísticas de salud: El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), a través de dependencias como el Departamento de Epidemiología, y el Instituto Nacional de Estadísticas (INE). El INE recibe los datos del MSPAS y del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS). Las dos principales instituciones estatales involucradas en asuntos de salud (MSPAS e IGSS) recolectan y procesan sus datos separadamente [18].

El MSPAS recolecta y procesa información sobre la salud poblacional y ambiental, principalmente mediante el Departamento de Vigilancia Epidemiológica (SIGS/SIAS) y el Departamento de Regulación de los Programas de Salud y Ambiente.

El ente rector de la información general de Guatemala es el Instituto Nacional de Estadística [18].

En el país existe un subregistro de datos que resulta en una baja calidad informativa y estadística. Como ejemplo, para la mortalidad general se estima un subregistro superior al 50% y para las intoxicaciones por plaguicidas se estima que es cercano al 90% [18].

La prestación de servicios de salud se comparte entre el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, las unidades de extensión de cobertura (PSS, ASS), el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) e instituciones privadas. Cabe destacar que el 15% de la población está fuera de cualquier tipo de cobertura [18].

Considerando al grueso de la población, la diabetes mellitus es la primera causa de hospitalización en Guatemala. Las enfermedades transmitidas por alimentos están presentes entre las primeras diez causas, lo cual incluye a las enfermedades diarreicas agudas en el cuarto lugar y al parasitismo intestinal en décimo (ver Gráfica 1). La clasificación de los datos epidemiológicos relacionados con las ETA sigue el código CIE X. En la Tabla 1 se resumen los datos epidemiológicos del MSPAS para los años 2004 a 2006 relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos. Nótese el papel predominante que tienen las diarreas (Código A 09.X), sin información alguna sobre su agente etiológico. Les sigue la amebiasis no especificada (A 06.9) y en tercer lugar, la infección intestinal viral (A 08.4), sin ninguna otra especificación. Lo anterior, de forma lamentable, refleja la práctica común de basar el diagnóstico en el cuadro clínico únicamente, sin confirmación mediante exámenes de laboratorio. Existen laboratorios públicos y privados capaces de realizar dichos exámenes pero son de difícil acceso al estar concentrados en la Ciudad Capital y los enfermos se encuentran en su mayoría en el interior de la República; a lo anterior se suma el factor económico y el desconocimiento [18].

Tabla 1 – Morbilidad informada: Sistema de Información del MSPAS

Códigos CIE X	Diagnóstico	2004	2005	2006	2007	TOTAL
A 00.0	Cólera confirmado	0	0	0	0	0
A 00.8	Muertes por cólera	2	0	0	0	0
A 00.9	Cólera sospechosos	102	14	12	ND	
Totales A 00	Cólera	104	14	12	0	¿?
A 05.0	Intoxicación alimentaria estafilocócica	42	27	103	72	244
A 05.1	Botulismo	1	0	2	0	3
A 05.2	Infección alimentaria (<i>Clostridium perfringens</i>)	1	2	0	0	3
A 05.3	Intoxicación alimentaria (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	0	1	0	0	1
A 05.4	Intoxicación alimentaria (<i>Bacillus cereus</i>)	2	3	3	8	16
A 05.8	Otras intoxicaciones bacterianas alimentarias (ES)	131	220	252	464	1,067
A 05.9	Intoxicación alimentaria bacteriana (NE)	607	1,079	537	0	2,223
Totales A 05	Intoxicaciones alimentarias bacterianas	784	1,332	897	544	3,557
A 06.0	Disentería amebiana	8,608	10,837	10,545	6,511	36,501
A 06.1	Amebiasis intestinal crónica	431	1,042	663	434	2,570
A 06.2	Colitis amebiana no disintérica	80	106	40	44	270
A 06.3	Ameboma intestinal	0	4	0	0	4
A 06.4	Abceso amebiano del hígado	4	152	49	12	217
A 06.5	Abceso amebiano del pulmón y del hígado	0	2	4	0	6
A 06.6	Abceso amebiano del cerebro	13	11	31	20	75
A 06.7	Amebiasis cutánea	86	55	68	52	262
A 06.8	Infección amebiana en otras localizaciones	76	90	187	142	495
A 06.9	Amebiasis no especificada	138,650	171,372	158,425	127,728	596,175
Totales A 06	Amebiasis	147,948	183,671	170,012	134,943	636,575
A 07.0	Balantidiasis	0	4	1	4	9
A 07.1	Giardiasis, lambliasis	13,703	16,679	12,218	9,801	52,401
A 07.2	Criptosporidiosis	0	38	3	31	72
A 07.3	Isosporias	2	0	3	0	5
A 07.8	Otras enfermedades intestinales por protozoa. (ES)	17	109	1	0	127
A 07.9	Enfermedad intestinal por protozoarios (NE)	192	276	213	89	770
Totales A 07	Enfermedades intestinales protozoarios	13,914	17,106	12,439	9,925	53,384
A 08.0	Enteritis debida a rotavirus	10	808	997	0	1,815
A 08.1	Gastroenteropatía aguada debida a Norwalk	0	9	1	34	44
A 08.2	Enteritis debida a adenovirus	0	0	0	3	3
A 08.3	Otras enteritis virales	29	326	499	521	1,375
A 08.4	Infección intestinal viral sin otra especificación	3,294	5,895	6,801	8,407	24,397
A 08.5	Otras infecciones intestinales (ES)	354	683	584	1,384	3,005
A 08.6	Rotavirus sospechoso	0	0	1,126	1	1,127
A 08.X	Muertes por rotavirus	0	0	6	0	6
Totales A 08	Enteritis virales	3,687	7,721	10,014	10,350	31,772
A 09.1	Disentería	10,536	15,503	19,546	0	45,585
A 09.3	Muertes por enfermedades diarreicas agudas	0	0	0	0	0
A 09.9	Disentería	0	0	0	606	606
A 09.X	Diarreas	458,344	399,765	357,317	18	1,215,444
Totales A 09	Diarreas y disentería	468,880	415,268	376,863	624	1,261,635

Nota: ND – No disponible; Fuente: Sistema de Información del MSPAS; ES: Especificado; NE: No especificado.

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala tiene como dependencias el Departamento de Regulación y Control de Alimentos y el Laboratorio Nacional de Salud. El Departamento en mención tiene a su cargo la emisión de

permisos de operación a las plantas de procesamiento de alimentos, la vigilancia de éstas así como la extensión de registros sanitarios para alimentos procesados y los permisos de importación y exportación de los mismos. El Laboratorio Nacional, por su parte, es el laboratorio nacional de referencia y está bien equipado para realizar análisis de alimentos, agua y productos farmacéuticos pero no comparte los resultados de sus análisis. El Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPAAZ), en el marco del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos mantuvo un registro de los casos de ETA para el período de 1993 a 2002. Esos datos cubren únicamente la Ciudad de Guatemala y predominan en ellos los casos de diarrea aguda; ocasionalmente especifica el agente etiológico o el alimento implicado en su transmisión. Ver Tabla 2 [18].

C. Investigaciones sobre Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Guatemala

La mayoría de los estudios de ETA en el país se han enfocado en el problema de la contaminación del agua y de ellos fue posible identificar agentes virales como notovirus y rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica, entre otros. Son ejemplos los estudios llevados a cabo por Luján *et al.* (2002); Crump *et al.* (2007); y Chapin *et al.* (2005), así como un estudio de mayor duración (Herwarldt *et al.*, 2000) que fue realizado para darle seguimiento a un grupo de voluntarios del Cuerpo de Paz de los Estados Unidos de América [18]. Los participantes conservaron registros de dos años de la ingesta de alimentos y bebidas así como de su estado de salud, en especial durante episodios diarreicos. Se encontró un promedio de siete episodios de diarrea por participante con duración media de cuatro días cada uno. Los episodios fueron relacionados con agua de diferentes fuentes y alimentos preparados por otras personas pero en especial, con helados y bebidas servidas con hielo. Por otra parte, estudiantes universitarios de Guatemala (San Carlos y Del Valle de Guatemala) han trabajado sus respectivas tesis de graduación acerca de algunas ETA y ciertos factores relacionados con su transmisión. Las investigaciones se han enfocado en el estudio de algunos agentes etiológicos específicos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Vibrio* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria* sp., entre otros. Los

principales alimentos o lugares de preparación y/o servicio de alimentos incluyen plantas de producción, cafeterías en Universidades, producto congelado para exportación, quesos, refacciones escolares, comida de consumo popular (ventas callejeras en mercados) y servicios de alimentación de instituciones públicas [18].

Tabla 2 – Casos de ETA en Ciudad de Guatemala, 1993 – 2002

Alimento	Enfermedad	Agente etiológico	Local	Fallecidos	Enfermos
Queso	Intoxicación estafilocócica	<i>Staphylococcus aureus</i>	No especificado	0	1
Kukito	Colibacilosis	<i>Escherichia coli</i>	No especificado	0	1
Leche en polvo	No especificada	No especificado	No especificado	0	1
No especificado	No especificada	No especificado	Vivienda	0	10
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	6
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	11
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	4678
No especificado	Cólera	No especificado	No especificado	0	417
No especificado	No especificada	No especificado	Vivienda	0	2
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	8
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	17
No especificado	Cólera	No especificado	No especificado	1	83
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	6978
No especificado	No especificada	No especificado	Vivienda	0	7
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	1
Agua	Hepatitis	No especificado	No especificado	0	24
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	7769
No especificado	Cólera	No especificado	No especificado	2	67
No especificado	No especificada	No especificado	Vivienda	0	1
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	1
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	48
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	5845
No especificado	Cólera	No especificado	No especificado	2	94
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	2
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	2834
No especificado	Cólera	No especificado	No especificado	2	262
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	13
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	2356
No especificado	Cólera	No especificado	No especificado	2	322
No especificado	Intoxicación alimentaria	No especificado	Vivienda	0	6
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	18
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	70
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	9570
Agua	Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	No especificado	4	92
No especificado	Intoxicación alimentaria	No especificado	Vivienda	0	18
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	8
Agua	Hepatitis	No especificado	Vivienda	0	52
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	8476
Agua	Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	No especificado	1	63
No especificado	Intoxicación alimentaria	No especificado	No especificado	0	1
No especificado	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Vivienda	0	3
Agua	Hepatitis	No especificado	No especificado	0	27
No especificado	Diarrea aguda	No especificado	No especificado	0	2648
Agua	Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	No especificado	2	61

Fuente. Recopilado por el Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las ETA [18]

El impacto económico de las ETA en Guatemala afecta de forma directa a tres sectores de alta importancia económica: el turismo, la exportación de frutas y hortalizas y como factor causante de desnutrición crónica entre la población afectada por ésta; de hecho, esta población es especialmente vulnerable a enfermedades diarreicas. Según las estadísticas de notificación obligatoria de enfermedades, las ETA por agua y alimentos se manifiestan en primer lugar, por las diarreas, seguidas por amebiasis; luego se ubican las enfermedades intestinales causadas por protozoarios, enteritis virales, hepatitis A e intoxicaciones alimentarias bacterianas. Los datos son generados a partir del mero diagnóstico clínico, sin identificación del agente causal [18].

Existen datos escasos acerca de brotes y sus agentes causales (una investigación de un brote de gastroenteritis en una maquiladora en Villa Nueva, Guatemala, en el año 2000, constituye un ejemplo relativamente reciente) [9] [18].

D. Consumo de embutidos en Guatemala

Las migraciones internas, una participación más activa de la mujer en el mundo laboral, la globalización de mercados, el hogar lejos del sitio de trabajo y la implementación de una jornada única de trabajo han cambiado en mucho los modelos de consumo de alimentos en Guatemala. En el año 2000 se realizó una encuesta sobre ingresos y gastos familiares en los que se recabó información sobre los alimentos consumidos en el país. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

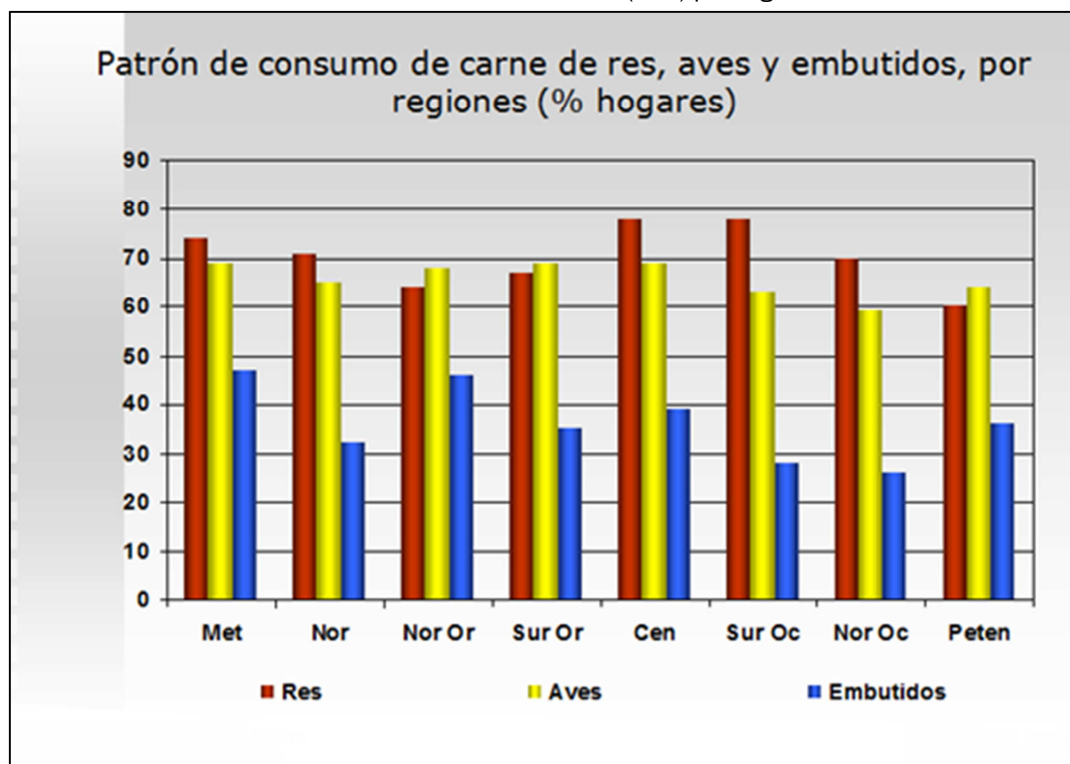
Según la encuesta en mención, los embutidos (Salchicha, jamón y similares) son consumidos por un 23% de la población. Por otra parte, la investigación realizada por Menchú [20] a inicios de la década de 2000, acerca de los patrones de consumo del habitante guatemalteco, caracterizó cada región del país según su porcentaje de consumo de determinados rubros de alimentos [18]. La Gráfica 2 muestra los resultados de Menchú para el consumo de embutidos por región en el país.

Tabla 3 – Alimentos más consumidos en Guatemala

Alimento	% Uso	Alimento	% Uso
Huevos de gallina	81	Cítricos	30
Tomate	81	Carne de res con hueso	29
Pan dulce	80	Zanahoria	28
Azúcar	78	Leche fluida	24
Frijoles en grano	77	Sopas deshidratadas	24
Arroz	63	Hierbas frescas, condimento	23
Cebolla y similares	62	Helados y similares	23
Gaseosas	55	Salchicha, jamón y similares	23
Carne de pollo	55	Concentrado para bebidas	23
Pan francés común	54	Hojas – ensaladas	23
Café molido y similares	52	Galletas de todo tipo	22
Pastas	52	Crema	22
Papas	50	Desayunos	21
Carne de res sin hueso	46	Especias	20
Consomé deshidratado	46	Confites	20
Maíz blanco	45	Tamales de toda clase	19
Almuerzos	44	Frutas tropicales jugosas	19
Sal de mesa – cocina	38	Aguacate y similares	18
Tortillas y similares	38	Hortalizas – Ensaladas	17
Aceites vegetales	38	Refacciones	17
Snacks sintéticos	37	Cenas	17
Güisquil, güicoy	36	Margarina	17
Bananos y plátanos	34	Otras verduras	16
Hierbas frescas	33	Chile dulce	15
Queso	32	Jugos de frutas y similares	15

Fuente: Encuesta nacional sobre ingresos y gastos familiares del 2000. ENIGFAM.

– Gráfica 2: Detalle del consumo de embutidos (azul) por región en Guatemala –



Indistintamente de los valores porcentuales de consumo de embutidos que se consideren, nótese que, como mínimo, este tipo de productos es consumido por cerca de una cuarta parte de la población.

El Instituto Nacional de Estadística publica cada cierto tiempo la Hoja de Balance de Alimentos para Guatemala (HBA), habiéndose hecho por última vez en 2008. En dicha Hoja se consideran los principales grupos alimenticios de consumo de la población guatemalteca. En el caso de los embutidos, la HBA de ese año (2008) revela que existe un aproximado de Alimento Neto Disponible por Año (cantidad neta de alimento que está disponible para consumo humano en el país) de 33, 699 Toneladas Métricas de embutidos, lo cual corresponde a un Suministro por Habitante (resultado de dividir el alimento neto disponible entre el número de habitantes del año de referencia – población a medio año; constituye un promedio de disponibilidad o de consumo aparente per cápita. Se expresa en kg/año y g/día) de 2.5 kg de embutidos/año o 6.8 g de embutidos/día (21 calorías/día a partir de embutidos) [12].

E. *Clostridium perfringens* en Guatemala y Centroamérica

En Guatemala la investigación de *Clostridium perfringens* ha sido escasa aunque existen referencias del microorganismo en algunas tesis universitarias e investigaciones de brotes de parte del MSPAS. En tales documentos se comenta que la bacteria *podría* estar presente en los alimentos analizados o ser causante del brote estudiado pero todo en términos de posibilidad sugerida, sin llegar a análisis para potencial confirmación [9] [15].

Aún con lo anterior, en el país existe al menos una empresa de productos químico – farmacéuticos que distribuye antitoxinas de *C. perfringens* aunque no se logró determinar a quiénes lo ofrecen ni cuál sea su demanda [25]. Por otra parte, Guatemala no es ajeno a legislación pertinente a *C. perfringens*, si bien su conocimiento, divulgación y aplicación en los últimos años fueron más bien escasos. De hecho, la Norma COGUANOR NGO 34 125 H26 CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS: *Análisis microbiológico, recuento de Clostridium perfringens*, publicada en agosto de 1983 es la base directa de la Norma Centroamericana ICAITI del mismo nombre que

entró en vigencia en septiembre de ese mismo año [11]. Consultando con autoridades del Laboratorio Nacional de Salud (laboratorio de referencia) se concluyó que tal norma no se aplica como obligatoria para la producción de productos cárnicos desde hace unas dos décadas y no fue sino hasta la reciente aprobación de nueva legislación centroamericana (Reglamento Técnico) que comienza a mencionarse más formalmente la necesidad de analizar los productos cárnicos para ese tipo de microorganismos. Las normas mencionadas se adjuntan en el Apéndice del presente documento [11] [22].

A nivel Centroamérica, por otra parte, la investigación de *C. perfringens* en alimentos ha sido más constante que en Guatemala. Por ejemplo, en El Salvador, en 1997, Erazo *et al*, determinaron la calidad microbiológica de muestras de mortadela, salchicha, jamón y salami, no empacadas al vacío, comercializadas en los supermercados de San Salvador. El análisis se hizo conforme a la metodología indicada en el BAM de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (USA/FDA, por sus siglas en inglés). Los estudios incluían la determinación de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales así como parámetros patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella* sp. Los resultados demostraron una deficiente calidad microbiológica de las muestras analizadas, lo cual indica que los productos han sido elaborados, manipulados, almacenados y comercializados en condiciones inadecuadas de higiene y constituyen un riesgo potencial para la salud de los consumidores dado que los valores máximos mostraron un alto grado de contaminación. También en 1997 y siempre en El Salvador, De León y Rosales determinaron la calidad microbiológica de las sopas deshidratadas de mayor consumo en el área de San Salvador por medio del recuento total de hongos y levaduras, de bacterias mesófilas aerobias, de *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli* y presencia de *Salmonella* sp. Todas las muestras estudiadas (50) mostraron recuentos significativos de bacterias mesófilas aerobias, incluyendo algunas de ellas que sobrepasaron el límite establecido. Otras muestras resultaron contaminadas con coliformes totales pero ninguna sobrepasó el límite establecido. Cuatro muestras

resultaron contaminadas con *Escherichia coli*, pero solo una de ellas tuvo una lectura de 23 UFC/g superando el límite de 10 UFC/g [18].

En el caso de Honduras, se encontró la investigación de un brote de gastroenteritis de origen alimentario por *Clostridium perfringens* tipo A en un comedor institucional. El estudio fue realizado en 1991. El menú consistió en ensaladas de papa con carne en cubitos (salpicón) y ensalada de frutas. De las 53 personas en riesgo encuestadas, 27 (51%) desarrollaron la enfermedad, presentando cólicos abdominales, diarrea, náuseas. El recuento de *C. perfringens* en un trozo de carne (2.5 – 3.0 kg) del mismo lote fue de 3.4×10^4 . Se determinó que el principal factor determinante del brote fue el enfriamiento inadecuado de los cortes luego de su cocción incompleta, circunstancia que posibilitó la activación de las esporas del microorganismo y su posterior multiplicación [21].

Finalmente, es Costa Rica el país del Istmo que más investigación ha realizado acerca de *C. perfringens* aunque no necesariamente involucrando a múltiples investigadores sino a un grupo reducido de éstos que ha dado un seguimiento progresivo a investigaciones previas. El Cuadro 12 presenta un resumen consolidado de las principales investigaciones llevadas a cabo en Costa Rica para análisis de *C. perfringens*. El enfoque investigativo ha sido diverso, abarcando aspectos clínicos, alimentarios y nosocomiales. Es destacable la existencia de un Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia en la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (Ver Cuadro 12). Pese al indudable avance investigativo de carácter académico que tiene Costa Rica para *C. perfringens* en la región, siendo líder indiscutible en la misma, no fue sino hasta hace pocos años (2008) cuando aún se perfeccionaba su normativa nacional para embutidos y productos cárnicos, en la cual se definía cuál sería el límite aceptable de *C. perfringens* según el tipo de producto cárnico y la institución oficial encargada de su análisis. La posterior entrada en vigencia (2009) del Reglamento Técnico Centroamericano pertinente en la materia, vino a superponerse a esa normativa nacional costarricense, demandando una adaptación a los parámetros allí indicados y la implementación del análisis del microorganismo para la industria.

Cuadro 11 – Estudios acerca de *Clostridium perfringens* llevados a cabo en Costa Rica, C. A.

	Etiología anaerobia de la diarrea nosocomial asociada a antibióticos en adultos mayores.
1.	Rodríguez – Cavallini, Evelyn; <i>et al.</i> <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium difficile</i> como agentes etiológicos de diarrea en adultos mayores hospitalizados y su respuesta a los antibióticos comúnmente usados [30].
	<i>C. perfringens</i> y <i>C. difficile</i> como agentes etiológicos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos en niños costarricenses.
2.	Ruiz – Corella, Max A.; <i>et al.</i> El estudio buscó determinar el papel sinérgico de ambos clostridios en la generación de diarreas en niños, población altamente susceptible de infección nosocomial [31].
	Brotos de diarrea e intoxicaciones transmitidas por alimentos en Costa Rica, 2005.
3.	Bolaños – Acuña, Hilda María; <i>et al.</i> Análisis de la información disponible en el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología del INCIENSA (CNRB), de los brotes de diarrea e intoxicaciones alimentarias ocurridos en 2005. <i>C. perfringens</i> afectó a 54 pacientes confirmados ese año [2].
	Aislados de <i>Clostridium perfringens</i> recuperados de pacientes costarricenses con diarrea asociada a antibióticos son principalmente enterotoxina – negativos y susceptibles a antimicrobianos de primera elección.
4.	Camacho, Natassia; <i>et al.</i> Determinación de la prevalencia de <i>C. perfringens</i> enterotoxigénico entre adultos con diarrea asociada a antibióticos en un hospital de Costa Rica [4].
	Presencia de <i>Clostridium perfringens</i> en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica.
5.	Gutiérrez, Andrea; <i>et al.</i> El objetivo fue evaluar los servicios de alimentación pública que utilizan baños de maría para mantener calientes preparaciones a base de carne, con el fin de establecer la presencia de <i>C. perfringens</i> en carne cocinada de res [13].
	<i>Clostridium perfringens</i> en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica.
6.	Rodríguez, Evelyn; María del Mar Gamboa y Pablo Vargas. Se buscó establecer el riesgo de contraer una toxiinfección alimentaria por ingestión de carne contaminada con <i>C. perfringens</i> . Se analizaron 8 plantas procesadoras de carne en Costa Rica [29].
	Intoxicación alimentaria por <i>Clostridium perfringens</i> en el Centro Penitenciario de Atención Institucional de San José. Estudio de cohorte retrospectivo.
7.	Wong – McClure, Roy; Armando Silva – Solórzano y Xiomara Badilla – Vargas. Se analizó un brote diarreico en un centro penitenciario de San José, en 2003, determinado el agente etiológico (<i>C. perfringens</i>) y el alimento contaminado [34].
	Estudio inhibitorio de <i>Clostridium perfringens</i> sobre <i>Clostridium botulinum</i> en muestras de suelo.
8.	Monge – Izaguirre, Mario y Evelyn Rodríguez – Cavallini. Se estudió el posible efecto inhibitorio que cepas de <i>C. perfringens</i> obtenidas del suelo costarricense podrían tener en el aislamiento de <i>C. botulinum</i> o la producción de su toxina a partir de muestras de suelo [23].
	Determinación de <i>Clostridium perfringens</i> en embutidos de carne de cerdo del Área Metropolitana de Costa Rica.
9.	Morera, Jessica; Evelyn Rodríguez y María del Mar Gamboa. Se aisló <i>C. perfringens</i> en muestras de embutidos de carne de cerdo (chorizo, salchichón y mortadela) obtenidos de cinco plantas procesadoras del área metropolitana de Costa Rica [24].

El estudio #9 del listado anterior, de Morera, Rodríguez y Gamboa, es de naturaleza semejante al presente en este documento, principalmente por la determinación cuantitativa de *Clostridium perfringens* en embutidos de plantas industriales (no artesanales). De 75 muestras analizadas (25 de chorizo, 25 de salchichón y 25 de mortadela), un 45% (34 muestras en total) confirmó tener *C. perfringens* (24 muestras de chorizo, 3 salchichones y 7 mortadelas). El estudio utilizó agar Sulfito – Polimixina – Sulfadiazina (SPS) como medio para el crecimiento de colonias presuntivas de *C. perfringens*. En principio, sólo las colonias negras que crecieran serían sospechosas pero habiendo picado también colonias blancas, se comprobó que algunas de las colonias negras no eran *C. perfringens* mientras que algunas de las blancas sí lo eran. La confirmación bioquímica de las colonias sospechosas se realizó mediante una batería de pruebas que incluía Movilidad – Nitrato, Lactosa – Gelatina y fermentación de carbohidratos (lactosa y salicina). Del total de muestras analizadas (75), 11 (15%) confirmaron tener *C. perfringens* con un recuento mayor a 10^2 , con lo cual superaron el límite máximo permitido por la normativa centroamericana actual. Se prosiguió con el análisis de las colonias confirmadas como *C. perfringens* para saber cuáles eran enterotoxigénicas; se encontró que un 8% de las colonias confirmadas eran enterotoxigénicas, lo cual concuerda con las referencias bibliográficas que aproximan ese porcentaje a un 5%. El estudio concluye señalando que los embutidos también, y no sólo las carnes no procesadas, como tradicionalmente se consideraba, son potenciales vehículos de riesgo por transmisión de *C. perfringens*.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son una de las principales causas de enfermedad entre la población guatemalteca. Específicamente, las ETA producidas por agentes bacterianos siguen representando un porcentaje importante en la morbilidad informada del país. Sin embargo, aún existen graves vacíos informativos por cuanto no suele determinarse con detalle el agente etiológico bacteriano específico que genera la enfermedad. *Clostridium perfringens* es uno de esos agentes de los cuales se desconoce su prevalencia y su morbilidad asociada.

Encontrándose Guatemala actualmente como Estado ratificador de los diferentes Reglamentos Técnicos Centroamericanos que empiezan a entrar en vigencia en el marco de la Unión Aduanera Centroamericana y de otros importantes acuerdos comerciales internacionales, es imperativa su pronta adecuación tecnológica, legislativa y analítica a tales reglamentos así como el efectivo cumplimiento de los mismos. Uno de esos reglamentos técnicos cuya implementación y cumplimiento resultan indispensable es el recientemente aprobado RTCA 67.05.50:08 *Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*, por cuanto es precisamente la industria alimenticia uno de los pilares de la economía guatemalteca, tanto en cuanto a importaciones y sobre todo, en cuanto a exportaciones. El reglamento en mención señala con claridad a *Clostridium perfringens* como un agente etiológico de Clase A (Alto riesgo) en productos cárnicos y sus derivados, pero en el país, al día de hoy, el análisis para esa bacteria en tal tipo de productos alimenticios no es practicado rutinariamente por entidades públicas ni privadas. En el contexto mencionado y siendo la de los productos cárnicos (carne, embutidos, etc.) una de las subindustrias más importantes de la industria alimentaria guatemalteca, su rezago en términos analíticos y sanitarios pondría en riesgo no solo su participación económica sino aún más importante, la salud de sus consumidores finales.

El hecho de desconocer la prevalencia de esta bacteria coloca a Guatemala (autoridades sanitarias, productores, consumidores, público en general) en una

situación de incertidumbre en cuanto a la inocuidad de sus productos cárnicos con respecto a este parámetro. Además, pese a que en el país han sido pocos los casos informados y confirmados de infección alimentaria por *C. perfringens* en cárnicos (según estadísticas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social), es imposible aceptar tales estadísticas como definitivas, sobre todo cuando hay tantos casos no informados de diarrea transmitida por alimentos o cuando, los que sí lo son, nunca llegan a determinar el agente etiológico específico causante. En el caso muy particular de *C. perfringens*, el desconocimiento y/o no aplicación de los métodos analíticos indicados para su determinación y cuantificación de parte de las autoridades sanitarias y de los productores, impide conocer con certeza cuál y qué tanta es la responsabilidad de los productos cárnicos guatemaltecos como vehículos de transmisión de la bacteria referida. La necesidad de aliviar la incertidumbre de la prevalencia de la bacteria en los productos cárnicos producidos en el país cobra aún más importancia cuando se toma en cuenta que este tipo de alimentos es consumido por al menos una cuarta parte de la población nacional.

No existen, pues, datos de la prevalencia de *C. perfringens* en alimentos en Guatemala y por todo lo anteriormente mencionado, la realización de estudios orientados a ello es importante porque permitiría determinar si existe o no contaminación por *C. perfringens* en los productos cárnicos comercializados en el país y éstos podrían descartarse o incluirse, según los resultados, como posibles vehículos de transmisión de la bacteria, con la respectiva toma de decisiones acerca de medidas correctivas sanitarias y productivas que fuera pertinente aplicar por parte de autoridades y productores.

VI. IMPACTO DEL TEMA

Puede decirse que este estudio es un primer esfuerzo para comenzar la investigación de *Clostridium perfringens* en los productos cárnicos del país. Los resultados esperados, concretamente orientados, en este caso, al análisis cuantitativo, puede contribuir de manera significativa a etapas básicas para el proceso de determinación de la prevalencia de *Clostridium perfringens* en embutidos no artesanales comercializados en Guatemala. Por lo anterior, su potencial de beneficio es destacable. El estudio podría ser tomado en cuenta por cualquier grupo poblacional involucrado y contemplarse como una primera medida de referencia para este tipo de productos cárnicos en el país.

VII. DISEÑO

A. Hipótesis

Un 15% de los embutidos no artesanales comercializados en Ciudad de Guatemala no cumplen con el límite establecido por el RTCA 67.04.50:08 para el recuento de *C. perfringens*.

B. Materiales y métodos

La investigación se realizó con el apoyo (en formación, materiales y equipo) del Laboratorio Nacional de Salud (LNS) y sus Áreas de Producción de Medios de Cultivo (PMC) y Microbiología de Alimentos (MIA).

El Universo de estudio son todos los embutidos no artesanales comercializados y consumidos en Ciudad de Guatemala. La adquisición y muestreo de los embutidos no artesanales (elaborados por empresas registradas en el Departamento de Regulación y Control de Alimentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social – DRCA/MSPAS) fue realizado por el analista/investigador, recolectando muestras de embutidos varios (salchichas, jamones, salami, chorizos, paté, etc.; el muestreo fue aleatorio en cuanto al tipo de embutido) estrictamente en supermercados de las diferentes zonas de la Ciudad Capital; por razones monetarias, el tamaño del muestreo se limitó a cien (100) muestras.

Se adquirieron unidades de empaque (tal y como las adquiere el consumidor: un paquete de chorizos, uno de jamones, etc.) de cada producto y se conservaron en refrigeración hasta el momento de su examen bacteriológico, procurando guardar la cadena de frío mediante el uso de hielera y cápsulas de hielo en gel. Los embutidos frescos se obtuvieron tal y como se venden al consumidor. Las muestras obtenidas fueron llevadas todas inmediatamente al Laboratorio Nacional de Salud, en donde se registraron, ingresaron y clasificaron en el Área de MIA, para su posterior análisis. El método de análisis empleado fue el descrito por la American Public Health Association (APHA, por sus siglas en inglés) para *Clostridium perfringens* en el capítulo 34 de su Compendio de Métodos para la Examinación Microbiológica de Alimentos, en su cuarta edición. Ver Diagrama de Flujo en el Apéndice A.

VIII. RESULTADOS

Todas las Tablas y Gráficas que a continuación se refieren pueden consultarse en el Apéndice B (Datos calculados) del presente documento.

- *Recolección de muestras:* Todas las muestras fueron adquiridas directamente por el analista/investigador y elegidas aleatoriamente, sin seguir ningún criterio en específico para su selección. Sin embargo, se procuró comprar siempre en diferentes supermercados de la Ciudad Capital (todos con condiciones semejantes de almacenamiento en frío de los embutidos mediante góndolas refrigeradas) y conseguir embutidos de todas las marcas locales posibles, aun cuando no todas ofrecían la misma gama y variedad de tipos de embutido. Todas las muestras fueron adquiridas 24 horas antes de su análisis y llevadas directa e inmediatamente del supermercado al Laboratorio Nacional de Salud haciendo uso de una hielera con baterías de hielo en gel. Aunque todas las muestras tenían un nombre en particular, según lo definiera el productor y/o su composición, se clasificó cada muestra en una de siete categorías generales (Ver Tabla 4): Jamón (Abreviatura: J; 19 muestras), Chorizo (Abreviatura: C; 16 muestras), Embutidos Madurados (M; 14 muestras), Varios (V; 14 muestras), Salchicha (S; 13 muestras), Longaniza (L; 12 muestras) y Embutidos con carne de Aves (A; 12 muestras). La Gráfica 3 presenta la distribución de las muestras según categoría y la Tabla 5 analiza la significancia de la diferencia entre el número de muestras por categoría. Si bien se trabajó únicamente con siete categorías y sus respectivos valores de número de muestras, sólo para fines de análisis e interpretación, se asumió una distribución normal de dichos datos y se obtuvieron los valores estadísticos de media y desviación estándar; se encontró que la diferencia entre el número de muestras por categoría no era significativa para un nivel de significancia del 95%.
- *Recuentos:* La Tabla 6 presenta los recuentos totales por muestra para colonias negras sospechosas en agar TSC – EYF, para las diluciones 1:10 y 1:100 (ó 10^{-1} y 10^{-2} , respectivamente). Del recuento directo de colonias negras sospechosas en placa (por duplicado), se obtuvo un promedio de UFC/g, por dilución, para cada

muestra (en azul). La Tabla 7, por su parte, presenta el resumen de las 18 muestras que presentaron colonias negras sospechosas; destaca la muestra #39, con un recuento promedio de $7.0 * 10^2$ UFC/g. Como complemento a lo anterior, la Tabla 8 presenta el número (cantidad) y porcentaje de muestras, por categoría, que resultaron positivas para colonias sospechosas (Ver también, Gráfica 4). En general, las categorías Longaniza (41.7%) y Chorizo (37.5%) presentaron los mayores porcentajes de muestras con colonias sospechosas en relación al número total de muestras por categoría. Ahora, dado que el RTCA 67.04.50:08 define un límite máximo permitido para *Clostridium perfringens* de 10^2 UFC/g de alimento (en este caso, por gramo de embutido), la Tabla 9 presenta el detalle de cuántas muestras, por categoría y en total, presentaron colonias sospechosas en la dilución 1:100. Una única muestra, correspondiente a la muestra #39 y (categoría Chorizo), presentó crecimiento en esa dilución límite. La Gráfica 5 muestra esta distribución.

- **Confirmación:** La evaluación de las muestras en cuanto a su cumplimiento con el RTCA 67.04.50:08 hacía que únicamente las muestras con un crecimiento de colonias sospechosas en la dilución 10^{-2} tuvieran que continuar la marcha analítica para confirmación (una única muestra debería haber proseguido, la #39 antes mencionada). Sin embargo, para fines del estudio y de la implementación del método, todas las muestras con crecimiento de colonias sospechosas continuaron hacia la marcha de confirmación. Se seleccionaron aleatoriamente 5 colonias sospechosas de las muestras cuyas cajas de Petri de agar TSC – EYF presentaran 5 colonias sospechosas o más, y la totalidad de las colonias sospechosas para el caso de las muestras que tuvieran menos de 5 colonias sospechosas en sus respectivas cajas de TSC – EYF. La Tabla 10 presenta a todas las muestras con crecimiento de colonias sospechosas, el número de colonias sospechosas disponibles entre sus 4 placas de agar TSC – EYF (2 por cada dilución) y el número de colonias seleccionadas para continuación de la marcha de confirmación. Cada una de las colonias seleccionadas por cada muestra fue identificada con una vocal de la “a” a la “e” y picada con asa en punta a un tubo de MFT de cuyo crecimiento se continuaría a la batería de pruebas bioquímicas. Las colonias picadas que no presentaron crecimiento en MFT, no continuaron la

batería bioquímica (como ocurrió para las muestras #20, #53 y #54, también en Tabla 10).

- Para las colonias que sí manifestaron crecimiento en MFT, la Tabla 11 presenta los resultados de la batería bioquímica MN – LG – FCC aplicada a cada una de esas colonias. De la lectura e interpretación de la combinación de positivos y negativos que cada colonia tuvo para cada prueba, fue posible confirmar que, en efecto, ninguna colonia (y consecuentemente, ninguna muestra) era de *Clostridium perfringens*. La lectura de los frotos Gram de cada colonia, también en Tabla 11, confirmó la presencia o ausencia, en mayor o menor grado, de los bacilos Gram positivos que eran de esperar en caso de haber *C. perfringens* o, al menos, algún clostridio. La Tabla 12 reúne la información del número de colonias que presentaron bacilos Gram positivos, por categoría de embutido (Ver Gráfica 6).
- La Tabla 13 presenta la agrupación de las muestras sospechosas en relación a su tipo de empaque (sea al vacío o no) y a su preparación (con tratamiento de pre – cocción o no). Se observó una distribución 50% – 50% entre embutidos empacados al vacío y los empacados sin vacío, mientras que porcentajes de 61.1% y 38.9% para los embutidos con pre – cocción y los embutidos sin pre – cocción, respectivamente; los anteriores porcentajes permitieron conjeturar acerca de cuán importantes eran esos factores en términos del crecimiento de colonias sospechosas.
- Finalmente, la Tabla 14 consolida la información de las cien muestras analizadas en relación al número de muestras con crecimiento de colonias sospechosas, muestras con crecimiento de colonias sospechosas en la dilución 10^{-2} y número de muestras con presencia confirmada de *C. perfringens*. Ninguna (0%) de las cien muestras analizadas confirmó la presencia de *C. perfringens*. Consecuentemente, ninguna de las muestras (0%) resultó en incumplimiento del RTCA 67.04.50:08 en relación a su límite indicado para *C. perfringens* en ese tipo de productos alimenticios.

IX. DISCUSIÓN

“Un 15% de los embutidos no artesanales comercializados en Ciudad de Guatemala no cumplen con el límite establecido por el RTCA 67.04.50:08 para el recuento de *C. perfringens*”, es la hipótesis de este estudio y cuya comprobación confirma su rechazo con base en los resultados de los análisis realizados a las cien muestras de embutidos no artesanales comercializados en la Ciudad.

Respecto al mecanismo de recolección de esas cien muestras, se considera indispensable mencionarlo y ampliarlo en este espacio, pese a que podría considerarse más pertinente en la sección de Metodología de este documento. La selección de muestras fue al azar y su categorización se realizó posteriormente, al momento de analizar los datos. Se procuró obtener muestras de todas las marcas posibles, exceptuando algunas marcas importadas que, debido a su alto precio, quedaron fuera de consideración. Sin embargo, ese hecho no se visualizó como un error de muestreo dado que puede suponerse válidamente que tales embutidos caros son los menos adquiridos por el grueso de consumidores de ese tipo de productos (precios cercanos a los Q100.00 por poco menos de 1 lb). A raíz de la compra de embutidos según variedad de marcas, se observó que no todas las marcas ofrecen la misma variedad y tipo de embutidos. De tal cuenta, algunas marcas ofrecen sólo jamones; otras, jamones, longanizas y salchichas, unas más agregan patés y embutidos madurados, etc. Dado que por razones de discreción y ética investigativa no era factible para este estudio divulgar con detalle qué marcas y cuáles de sus productos distintivos (es decir, aquellos que ninguna otra marca tiene, lo cual favorece su identificación) fueron adquiridos, no era posible realizar agrupaciones según marca (con la misma cantidad de embutidos por marca) o incluso, según tipo detallado y específico de producto (paté de pavo, lomo relleno con especias, u otros), lo cual habría redundado en una categorización excesivamente minuciosa que, de todos modos, para ciertos productos, habría considerado a muy pocas marcas fabricantes de los mismos por cuanto, como ya fue dicho, no todas las marcas ofrecían los mismos productos. Por ello, se quiso evitar crear, por ejemplo, una categoría “Patés” en la que sólo entraran dos marcas

comerciales. Con todos esos factores en mención, se consideró oportuno realizar una compra al azar y una categorización posterior más abierta según qué tipo general de embutidos se consiguieran: “Longaniza con especias” de una marca, “Longaniza criolla” de otra, etc. fueron agrupadas todas como “Longaniza” y así se hizo para todas las demás categorías cuántas muestras se hubieran conseguido de cada tipo de embutido, exceptuando algunos embutidos muy específicos que fueron agrupados en una categoría mixta denominada “Varios”. Siendo que se utilizó este mecanismo de categorización post - recolección, se consideró necesario analizar qué tan homogénea o heterogénea había sido la recolección en cuanto a número de muestras por categoría. Obviando algunas consideraciones estadísticas como el hecho de que sólo se estaba trabajando con siete (7) categorías y sus respectivos valores de cantidad de muestras, el análisis a un grado de significancia del 95% suponiendo una distribución normal de esos mismos valores, comprobó que no existía una diferencia significativa entre la cantidad de muestras que se obtuvieron para cada categoría. La media del número de muestras por categoría fue de 14.3 muestras \approx 14 muestras y el promedio de la diferencia entre la cantidad de cada muestra y el valor promedio fue de 1.8 muestras, es decir, aproximadamente 2 muestras, valor que fue considerado aceptable. Tal y como ya se señalaba en la sección de Resultados, la categoría con más muestras fue Jamón (J) con 19 y las que menos, Longaniza (L) y Embutidos con carne de Ave (A), con 12 muestras ambas.

En cuanto al crecimiento en placa de colonias sospechosas (colonias negras), un recuento de 0 UFC/g que alguna muestra pudiera haber presentado (en la Tabla 6 del Apéndice B) no implicaba necesariamente que no hubiera crecido “nada” en esas mismas placas. De hecho, en muchos casos (no se contabilizó con detalle cuántas muestras reflejaron esta situación), tanto las dos placas de la primera dilución (10^{-1}) como las de la segunda (10^{-2}) presentaron colonias blanquecinas en medio de la bicapa de agar e incluso, algunas otras (aunque más raramente), presentaron el crecimiento de lo que parecería ser un hongo superficial. Cabe aclarar que en todo tiempo, para cada una de las 14 corridas analíticas de plaqueado que se efectuaron, siempre se realizó este proceso delante de un mechero y con

controles de ambiente, cuidando no contaminar en ningún momento la muestra y/o el agar, sea por contacto o por secreciones bucales. De lo anterior, puede concluirse que ese crecimiento “extra” se debe principalmente a la flora anaerobia (y de otro tipo) que las muestras traen de por sí pero que, tentativamente, se descarta que sean clostridios por cuanto no presentaron crecimiento como colonias negras. En ese sentido, se debe ser claro en que esas colonias blanquecinas son sólo tentativamente no clostridios ya que, como se ampliará más adelante, no toda colonia negra en el agar utilizado (TSC – EYF) comprobó ser de hecho una colonia de clostridios o, lo que es más, ni siquiera una colonia en sí sino algún tipo de contaminante.

En relación a las muestras con presencia de colonias sospechosas, fueron 18 (un 18%) y de éstas, 17 presentaron colonias sospechosas únicamente en la dilución 10^{-1} . Para estas 17 muestras, el promedio es de <15 UFC/g, lo cual queda por debajo del límite máximo permitido especificado por el RTCA 67.04.50:08 (10^2 UFC/g). Una única muestra, la #39, presentó un crecimiento de colonias sospechosas que con un promedio de 700 UFC/g, superó el límite mencionado. Esta muestra estaba empacada al vacío y era un chorizo tipo argentino (no pre – cocido, e. d., sin proceso térmico previo) para realizar asados o barbacoas. El crecimiento de colonias sospechosas para esa muestra fue notoriamente mayor que el de cualquier otra (Ver fotografías en Apéndice C); se conjetura que, entre otras cosas, pudo deberse a la contaminación inicial de la materia prima que el productor utilizó. En un sentido estricto, únicamente la muestra #39 debió haber seguido hacia el análisis de confirmación de *Clostridium perfringens* y el cumplimiento del parámetro del RTCA, sin embargo, es imposible separar la investigación realizada del hecho práctico de que se buscaba implementar esta metodología de análisis en el LNS. De tal cuenta, con eso en perspectiva, se decidió confirmar cualquier colonia sospechosa de cualquier muestra con el fin de poner en práctica la marcha completa que especifica el procedimiento. El análisis de porcentaje de muestras con colonias sospechosas por categoría de embutido permitió observar que las categorías Longaniza (con un 41.7%) y Chorizo (con un 37.5%) fueron las que más muestras sospechosas presentaron en relación a su total de muestras, seguidos de Madurados con un

21.4%; en otras palabras, de un total de 100 muestras de longanizas, por ejemplo, un 42%, aproximadamente, debería presentar colonias sospechosas (aunque no necesariamente fuera del límite del RTCA). La categoría Salchicha no presentó ninguna muestra con colonia sospechosa lo cual, *a priori*, la coloca como la categoría con menos presencia de colonias sospechosas.

En cuanto a las colonias sospechosas en la dilución 10^{-2} , la categoría Chorizo fue la única con crecimiento en ese rango, con un 6.3% de sus muestras (una muestra de dieciséis totales); el porcentaje es considerado bajo y hablaría de que la gran mayoría de muestras analizadas de chorizo presentarían, de tener, sólo crecimiento en la primera dilución, lo que los ubicaría dentro de los límites aceptables; todas las demás categorías, al menos a partir de los resultados obtenidos, también estarían dentro de esos mismos límites de aceptabilidad.

El seguimiento de la marcha analítica de confirmación permitió percatarse de importantes factores prácticos para tomar en cuenta. Al momento de picar (con asa en punta) las colonias para hacer su respectivo pase de enriquecimiento en MFT, en algunos casos la colonia no fue “perforada” o “destruida” con la picada (como debería ocurrir) sino más bien, “empujada” o “desplazada” dentro del agar, con lo cual se demostraba que la supuesta colonia negra era alguna especie de sal, especia u otro contaminante dentro de la muestra mas no una colonia. Igualmente, pese a ello, el pase se hacía sólo para fines de observación y, en algunos casos, (como para algunas de las colonias picadas de las muestras #20, #53 y #54), ningún crecimiento era observable en el tubo de MFT, con lo cual dicho tubo era descartado de pasar a confirmación mediante pruebas bioquímicas. En otros casos, sin embargo, aun cuando fueron picadas o empujados esos contaminantes (que no eran colonias), sí se observó crecimiento en MFT. La razón para ello, se estima, fue que en el proceso de desplazar al contaminante en el intento de picarlo, era inevitable “arrastrar” alguna de las colonias blanquecinas que circundaban al objeto negro (no todas las muestras presentaron tales colonias blancas pero algunas sí los presentaban en cantidades considerables), y eran precisamente esas colonias arrastradas las que terminaban creciendo en el MFT. Debe recordarse que eran

igualmente anaerobios y por ello, si estaban presentes en la anaerobia bicapa de agar, podían crecer también en el MFT.

El efecto del arrastre mencionado fue más evidente al momento de la comprobación bioquímica mediante la prueba MN - LG - FCC y el análisis de tinción de Gram. La lectura e interpretación se muestra en la Tabla 11 y, en resumen, ninguna de las colonias demostró, según su correspondiente combinación de resultados, ser *Clostridium perfringens*. No obstante, esos mismos resultados, analizados paralelamente con la lectura de los frotos Gram, ofrecen una situación que demanda una observación cuidadosa: Hubo casos de colonias “empujadas” (contaminantes) que por el efecto de arrastre antes mencionado sí crecieron en MFT, resultaron negativos para *C. perfringens* según prueba de batería y cuyo frote Gram revelaba la presencia de una amplia variedad de bacterias (Cocos y bacilos Gram negativos, cocos y bacilos Gram positivos, levaduras, etc.), sin embargo, también hubo casos de colonias negras claramente definidas, sin presencia de mayor cantidad de contaminantes en placa que, también dieron negativo para prueba de batería y cuyo frote Gram demostró, igualmente, cierto grado de contaminación o, al menos, presencia de otros tipos de bacteria que, en principio, debieron ser únicamente bacilos Gram positivo (Las colonias picadas de la muestra #39, las cuales se hicieron en duplicado, presentan esta misma situación pese a la enorme cantidad de colonias negras claramente definidas que sí presentó esta muestra).

La situación en mención parecería indicar que el agar TSC - EYF permite que no sólo clostridios resulten en colonias negras sospechosas sino también otros organismos anaerobios; eso significaría que el medio no es lo suficientemente selectivo, que da falsos sospechosos o que se requieren adicionales etapas de purificación de los cultivos. Sin embargo, pese a todo ello, debe tomarse muy en cuenta que los frotos Gram podrían ser malinterpretados en su lectura, sobre todo en consideración de que el género *Clostridium* es conocido por ser “Gram - variable”, lo cual quiere decir que aún cultivos puros de clostridios podrían lucir mixtos al microscopio (con células claramente Gram positivas pero con otras aparentemente Gram negativas), sobre todo porque ese género tiene paredes celulares especialmente sensibles a la ruptura durante la división celular, lo cual

provoca la tinción Gram negativa de ciertas células que han perdido grosor en su capa de peptidoglicano. En total, 32 de 48 colonias picadas (66.7%) mostraron bacilos Gram positivos en su lectura de tinción de Gram aunque no necesariamente como las células de mayor presencia en el frote.

Por todo lo anterior, el enfoque pasó a centrarse en aquellas colonias cuya tinción de Gram presentara *predominantemente*, bacilos Gram positivos (mostrados en celdas celestes en la Tabla 11). En total, únicamente 8 colonias cumplieron con esta condición, siendo el 16.7% de las 48 colonias analizadas; de ese modo, puede decirse que únicamente la sexta parte de las colonias sospechosas presentarían una preponderancia de bacilos Gram positivos aunque no precisamente resultarán en una comprobación de que son *Clostridium perfringens*. En cuanto a cuál categoría presentó más presencia de bacilos Gram positivo, se observó que de 14 muestras con colonias de bacilos Gram positivos, 6 fueron de la categoría Chorizo (42.9%) y 3 de la categoría Longaniza (21.4%), lo cual es coherente con el hecho antes mencionado de que fueron precisamente esas categorías las que tuvieron los mayores porcentajes para crecimiento de colonias sospechosas. Todo esto puede explicarse en el hecho de que la composición propia de este tipo de productos suele ser más heterogénea que para un jamón o una salchicha (por mencionar ejemplos específicos), combinando no sólo un tipo de carne sino a veces varios además de especias, vegetales, aditivos, etc. y eso mismo podría incrementar la posibilidad de contar con contaminación microbiológica. Además, la Tabla 13 indica que son precisamente los Chorizos y Longanizas las que menos proceso térmico llevan en su elaboración en comparación con otras categorías.

Sin embargo, en relación a los procesos térmicos, dicha tabla señala también, en aparente contradicción, que la mayoría de muestras sospechosas son aquellas que llevaron algún proceso de pre - cocción (61.1%). Según pudo constatarse mediante investigación bibliográfica, no todos los embutidos con proceso de pre - cocción (sobre todo en el caso de embutidos madurados: salami, pepperoni y semejantes) llegan necesariamente a temperaturas de 75 °C sino se quedan sobre los 60 - 65 °C dado que no es el objetivo eliminar toda la flora propia del producto siendo que esa misma flora le da sus particulares características de sabor obtenidos

durante la maduración. Por otra parte, para el caso de los embutidos como mortadela, chorizos y longanizas con pre – cocción que sí presentaron colonias sospechosas, mediante comunicación personal con una profesional de una empresa productora nacional [35], pudo constatar que dichos procesos térmicos llegan a un mínimo de 72 °C, temperatura que sí es para la reducción (mas no plena eliminación) de la carga microbiana presente. De hecho, esos mismos procesos térmicos de pre – cocción podrían ser los que propicien que algunos clostridios presentes, al verse sometidos a estrés, esporulen y sea así como sobrevivan dentro del ambiente anaerobio propio de la embutición del producto. La excepción a lo anterior, según los resultados, parecería ser la categoría Salchichas e incluso, Jamones (sus placas de agar TSC – EYF, en general, no presentaron crecimiento anaerobio). Por lo tanto, según lo observado, si bien para el caso de embutidos frescos de composición mixta la no realización de un proceso de pre – cocción parecería favorecer la permanencia de flora contaminante, tal factor (el proceso térmico) parecería ser indistinto como factor determinante de si habrá o no contaminación, sobre todo tomando en cuenta que la mayoría de muestras sospechosas (61.1%) fueron aquellas que sí recibieron algún proceso de pre – cocción. Además, las características del empaque (con vacío o sin vacío) parecieran ser igualmente indistintas para la presencia de potencial contaminación microbiológica anaerobia (50% de muestras sospechosas con empaque al vacío y 50% de muestras sospechosas sin empaque al vacío), sobre todo porque, tal y como se mencionaba previamente, los embutidos, por cuanto en su mayoría son enfundados, ofrecen en sí mismos las condiciones anaerobias requeridas por ese tipo de organismos.

En cuanto al grado de cumplimiento de los embutidos analizados con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (*Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*), puede concluirse que ninguna muestras presentó crecimiento de *Clostridium perfringens*. Con lo anterior, la prevalencia de *C. perfringens* en los embutidos no artesanales comercializados en Ciudad de Guatemala pareciera ser baja y no significar un riesgo para el consumidor. Además, en línea con uno de los objetivos del presente estudio, los resultados ahora

obtenidos parecieran sugerir que es igualmente baja la necesidad de analizar embutidos para encontrar en ellos la enterotoxina de *C. perfringens*.

Esta investigación debería pues, tomarse como un primer esfuerzo o un propedéutico de la investigación de anaerobios en los embutidos producidos/comercializados en el país. La implementación de la marcha analítica empleada es trabajosa en sí misma y requiere no sólo de reactivos muy específicos sino a veces de alto costo, además de la capacitación del personal (que implica también una inversión) que se haga cargo de la misma. Por tanto, la aplicación del análisis de *C. perfringens* en alimentos debería hacerse sobre la base de una comprensión clara de lo que puede esperarse obtener así como de lo que para él debe invertirse. En todo caso, aún con lo trabajoso y hasta caro que podría resultar el proceso, la implementación de este tipo de análisis sigue siendo necesaria en los laboratorios nacionales (máxime en el caso de un laboratorio de referencia nacional como lo es el LNS) con el fin de corroborar que la inocuidad de los alimentos producidos se mantenga y el consumidor final no sufra las consecuencias de los alimentos contaminados con microorganismos productores de ETA.

X. CONCLUSIONES

- (1) Según los resultados obtenidos, la prevalencia de *Clostridium perfringens* en embutidos no artesanales comercializados en Ciudad de Guatemala es del 0% y aunque no puede extrapolarse el resultado a la población total de los embutidos comercializados en esa zona, sugiere que la presencia de esa bacteria en este tipo de productos es baja y no significa un riesgo para la salud de los consumidores.
- (2) Los embutidos no artesanales producidos/comercializados en el país cumplen con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (*Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*) en cuanto al parámetro para *C. perfringens* indicado en dicha norma. Sin embargo, es necesario seguir monitoreando este tipo de productos para dicho patógeno así como para otros posibles. La dosis infectiva mínima (DIM) para la infección generada por *C. perfringens* es de 10^6 UFC/g de alimento; estos resultados colocan a los embutidos analizados muy por debajo de la DIM.
- (3) Según los resultados, por el momento, la necesidad de implementar el análisis de enterotoxina de *C. perfringens* en los embutidos no artesanales de la zona de estudio pareciera ser baja, dada la escasa prevalencia de la bacteria en esos productos.
- (4) Longanizas y chorizos no cocidos (con vacío o sin vacío) son las categorías de embutidos en los cuales podría esperarse más presencia de potencial contaminación microbiológica por clostridios. En embutidos como salchichas o jamones es poco probable.

XI. RECOMENDACIONES

- (1) En consideración a la aplicación práctica que la metodología tendrá en el Laboratorio Nacional de Salud, para lo cual deben tomarse en cuenta tanto tiempos de trabajo como el costo de los materiales, se sugiere, de acuerdo con los resultados obtenidos, trabajar únicamente con una dilución (10^{-2}), en duplicado. Eso reduciría la cantidad de medio de cultivo (TSC – EYF) que deba prepararse. Por la misma razón, para los medios de la batería bioquímica, se recomienda elaborarlos exclusivamente cuando y en las cantidades que se necesiten, es decir, cuando exista crecimiento de colonias sospechosas en las placas de la dilución mencionada.
- (2) Realizar un estudio semejante llevando a cabo una etapa adicional de purificación mediante resiembra en TSC – EYF entre el pase a MFT y la batería bioquímica, con el fin de confirmar el grado de selectividad del medio de cultivo, lo cual podría ser una causa de error importante mediante falsos sospechosos, falsos negativos, etc.
- (3) Realizar pruebas utilizando otras cepas control de *Clostridium perfringens* (otros ATCC®) para comparar las propiedades de crecimiento y reactividad bioquímica con el fin de asegurar la homogeneidad y constancia en los resultados de las cepas control y descartar la posibilidad de cualquier variante que pudiera conducir a interpretaciones erróneas de los resultados de colonias aisladas a partir de muestras de alimentos.
- (4) Realizar una determinación de la prevalencia de *C. perfringens* en embutidos artesanales de mercados locales con el fin de comprobar qué tanto más probable es encontrar la bacteria en este tipo de embutidos que, en principio, tienen muchos menos controles sanitarios que los embutidos no artesanales.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Benenson, A. 1997. *Intoxicaciones alimentarias. Manual para el control de las enfermedades transmisibles*. 16ta. edición.
- [2] Bolaños – Acuña, Hilda María; et al. 2007. *Brotos de diarrea e intoxicaciones transmitidas por alimentos en Costa Rica, 2005*. Acta Médica Costarricense. Costa Rica, C. A. Vol. 49, (4): 205 – 209.
- [3] Buzby, Jean C.; et al. 1996. *Bacterial foodborne disease: Medical costs and productivity losses*. Economic Research Service/USDA. Agricultural Economic Report No. 747. EEUU.
<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/34242/1/CAT10828139.pdf>
- [4] Camacho, Natassia; et al. 2008. *Isolates of Clostridium perfringens recovered from Costa Rican patients with antibiotic – associated diarrhea are mostly enterotoxin – negative and susceptible to first – choice antimicrobials*. Journal of Medical Microbiology. Gran Bretaña. Vol. 57: 343 – 347.
- [5] Colombia. 2007. Secretaría de Salud de Bogotá, Laboratorio de Salud Pública. *Vigilancia del ambiente y el consumo. Microbiología de alimentos, ETA*. Colombia, Alcaldía Mayor de Bogotá. 12 páginas.
<http://190.25.230.149:8080/dspace/bitstream/123456789/201/1/VIGILANCIA%20DEL%20AMBIENTE%20Y%20EL%20CONSUMO%20MICROBIOLOGIA%20DE%20ALIMENTOS.pdf>

- [6] De Jong, A. E. I. 2003. *Clostridium perfringens: spores & cells, media & modeling*. Wageningen University, Wageningen, Países Bajos. TESIS. 136 páginas.
- [7] *Diccionario de la Real Academia Española*. 2001. Vigésimo segunda edición.
- [8] Durán Ramírez, Felipe (Editor). 2007. *Manual del ingeniero en alimentos*. Grupo Latino, Ltda. Colombia. 483 páginas.
- [9] Gobern, Lorena, Dra. et al. 2000. *Brote de gastroenteritis. Fábrica SAEA TEXPIA*. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Villa Nueva, Guatemala. 10 páginas.
<http://cedoc.cies.edu.ni/digitaliza/t79/seccionb4.pdf>
- [10] Guatemala. 1997. *Código de Salud de la República de Guatemala, Decreto 90 – 97 del Congreso de la República. Libro II, Título I, Capítulo V, Sección I, Artículo 124. Definición de Alimento*. Guatemala, Congreso de la República. 7 páginas.
- [11] Guatemala. 1983. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). *Norma COGUANOR NGO 34 125 h26 CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS: Análisis microbiológico, recuento de Clostridium perfringens*. Guatemala, Ministerio de Economía. 11 páginas.
- [12] Guatemala. 2008. Sistema Estadístico Nacional. *Hoja de Balance de Alimentos (HBA)*. Guatemala, Instituto Nacional de Estadística. 25 páginas.

- [13] Gutiérrez, Andrea; et al. 1999. *Presencia de Clostridium perfringens en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 49, (3): 275 – 278.
- [14] Hernández Herrero; et al. 2003. *La seguridad alimentaria en el mundo*. Observatori de la Seguretat Alimentaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Fundación Eroski. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/08/19/7902.php>
- [15] Jeréz Galicia, Luis Francisco. 2006. *Evaluación y mejoramiento de la calidad microbiológica de crema fresca a base de leche no pasteurizada, elaborada artesanalmente y comercializada en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. TESIS. 96 páginas.
- [16] Jiménez López, María Teresa; Cristina Martín Martín. 2004. *Vigilancia epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por agua y alimentos en Castilla y León (I) (Años 1987 a 2003)*. Boletín Epidemiológico de Castilla y León. Junta de Castilla y León, España. Vol. 20, (3): 13 – 20.
- [17] Joklik, Wolfgang K.; et al. 1995. *Microbiología Zinsser*. 20ma. edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1696 páginas.
- [18] Kopper, Gisella; et al. Cadmo Rosell, Editor. 2009. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Informe Técnico sobre

Ingeniería Agrícola y Alimentaria. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
<http://www.fao.org/docrep/011/i0480s/i0480s00.htm>

- [19] Madigan, Michael T.; John M. Martinko y Jack Parker. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ma. edición. PEARSON EDUCACIÓN, S. A. Madrid, España. 1096 páginas.
- [20] Menchú, María Teresa. 2001. *El consumo de alimentos en Guatemala*. INCAP.
- [21] Michanie, Silvia; et al. 1991. *Brote de gastroenteritis por Clostridium perfringens en un comedor institucional*. Revista Médica Hondureña. Honduras, C. A. Vol. 59 (2): 1 - 9.
- [22] Ministerios de Economía de Centroamérica. 2009. *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*.
- [23] Monge - Izaguirre y Evelyn Rodríguez - Cavallini. 1999. *Efecto inhibitorio de Clostridium perfringens sobre Clostridium botulinum en muestras de suelo*. Revista Biomed. México. Vol. 10, (4): 209 - 215.
- [24] Morera, Jessica; Evelyn Rodríguez y María del Mar Gamboa. 1999. *Determinación de Clostridium perfringens en embutidos de carne de cerdo del Área Metropolitana de Costa Rica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 49, (3): 279 - 282.

- [25] Multi - Químicos, S. A. 2005. *Productos PLASMATEC: Antitoxinas Clostridium perfringens*. Guatemala, C. A. <http://www.multi-quimicos.com/plasmatec01.html>
- [26] Murray, Rosenthal, Pfaller. 2005. *Medical microbiology*. 5ta. edición. Elsevier - Mosby. EEUU. 963 páginas.
- [27] Paltrinieri, F. Figueroa, L. Rojas. 1993. *Procesamiento de frutas y hortalizas mediante métodos artesanales y de pequeña escala*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/docrep/x5062s/x5062S08.htm>
- [28] Prescott, Lansing M., John P. Harley y Donald A. Klein. 2005. *Microbiology*. 6ta. edición. McGraw - Hill. Nueva York, EEUU.
- [29] Rodríguez, Evelyn; María del Mar Gamboa y Pablo Vargas. 2002. *Clostridium perfringens en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 52, (2): 155 - 159.
- [30] Rodríguez - Cavallini, Evelyn; et al. 2010. *Etiología anaerobia de la diarrea nosocomial asociada a antibióticos en adultos mayores*. Revista Biomed. México. Vol. 21, (1): 13 - 20.
- [31] Ruiz - Corella, Max A.; et al. 2007. *Clostridium perfringens y Clostridium difficile como agentes etiológicos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos en niños costarricenses*. Revista Biomed. México. Vol. 18, (2): 81 - 87.

- [32] Stephenson Ojea, Mónica Lorraine, Ingra. 2011. Comunicación personal con la profesional en Ciencias de Alimentos, quien laboró en una empresa nacional productora de embutidos.
- [33] Walker, Stuart. 2000. *Microbiología*. McGraw – Hill. México. 532 páginas.
- [34] Wong – McClure, Roy; Armando Silva – Solórzano y Xiomara Badilla – Vargas. 2004. *Intoxicación alimentaria por Clostridium perfringens en el Centro Penitenciario de Atención Institucional de San José. Estudio de cohorte retrospectivo*. Acta Médica Costarricense. Costa Rica, C. A. Vol. 46, (2): 78 – 83.

XIII. APÉNDICE

A. Metodología

Equipo e instrumentos

- Aislamiento y cuantificación
 - Incubadora de aire 35 – 37 °C.
 - Contenedores anaeróbicos o incubadora anaeróbica, con equipo y materiales para obtener condiciones anaeróbicas.
 - Contador de colonias.
 - Digestor automático.
 - Mezclador Vórtex.

Reactivos especiales y medios

- Aislamiento y cuantificación
 - Medio Fluido Tioglicolato (MFT).
 - Medio Movilidad – Nitrato (MN).
 - Medio Lactosa – Gelatina (LG).
 - Medio de Fermentación de Carbohidratos para Clostridios (FCC).
 - Diluyente peptona al 0.1% en agua desmineralizada (AP).
 - Agar Triptosa – Sulfito – Cicloserina Sin Yema de Huevo (TSC – EYF, por sus siglas en inglés).

Controles recomendados

Utilizar siempre, para los medios de cuantificación selectivo – diferenciales, una cepa control del organismo, para validar el funcionamiento del medio y para cuando nunca han sido observadas colonias típicas de *C. perfringens* en el medio de cultivo. Se utilizará, como control, la cepa *Clostridium perfringens* ATCC® 13124.

Ejecución

1. Pesar 20 g de muestra en bolsa estéril.
2. Homogenizar por 2 minutos en el digestor los 20 g de muestra pesados previamente, con el volumen correspondiente de peptona al 0.1% (180 mL) para obtener una dilución 1:10.
3. Preparar una serie de diluciones decimales (hasta 10^{-2}), utilizando blancos de peptona al 0.1% en tubos de ensayo.
4. Utilizar TSC – EYF como medio de cultivo. Hacer duplicados de siembra por vertido para cada dilución, utilizando 1 mL de dilución en 15 mL del agar y una vez solidificada esta primera capa, agregar 15 mL más del agar para elaborar la segunda capa (tapa).
5. Incubar las placas orientadas hacia arriba y anaeróbicamente por 18 a 24 horas a 35 – 37 °C.
6. Seleccionar las placas que contengan, preferentemente, de 20 a 200 colonias negras. Contar todas las colonias negras y calcular el número promedio de colonias en las placas de duplicado.

Confirmación de C. perfringens

7. Seleccionar cinco colonias negras representativas del agar TSC – EYF e inocularlas en tubos de MFT, con el fin de obtener cultivos enriquecidos y más abundantes con los cuales hacer las pruebas de batería subsecuentes. Incubar el MFT de 18 a 20 horas a 35 °C.

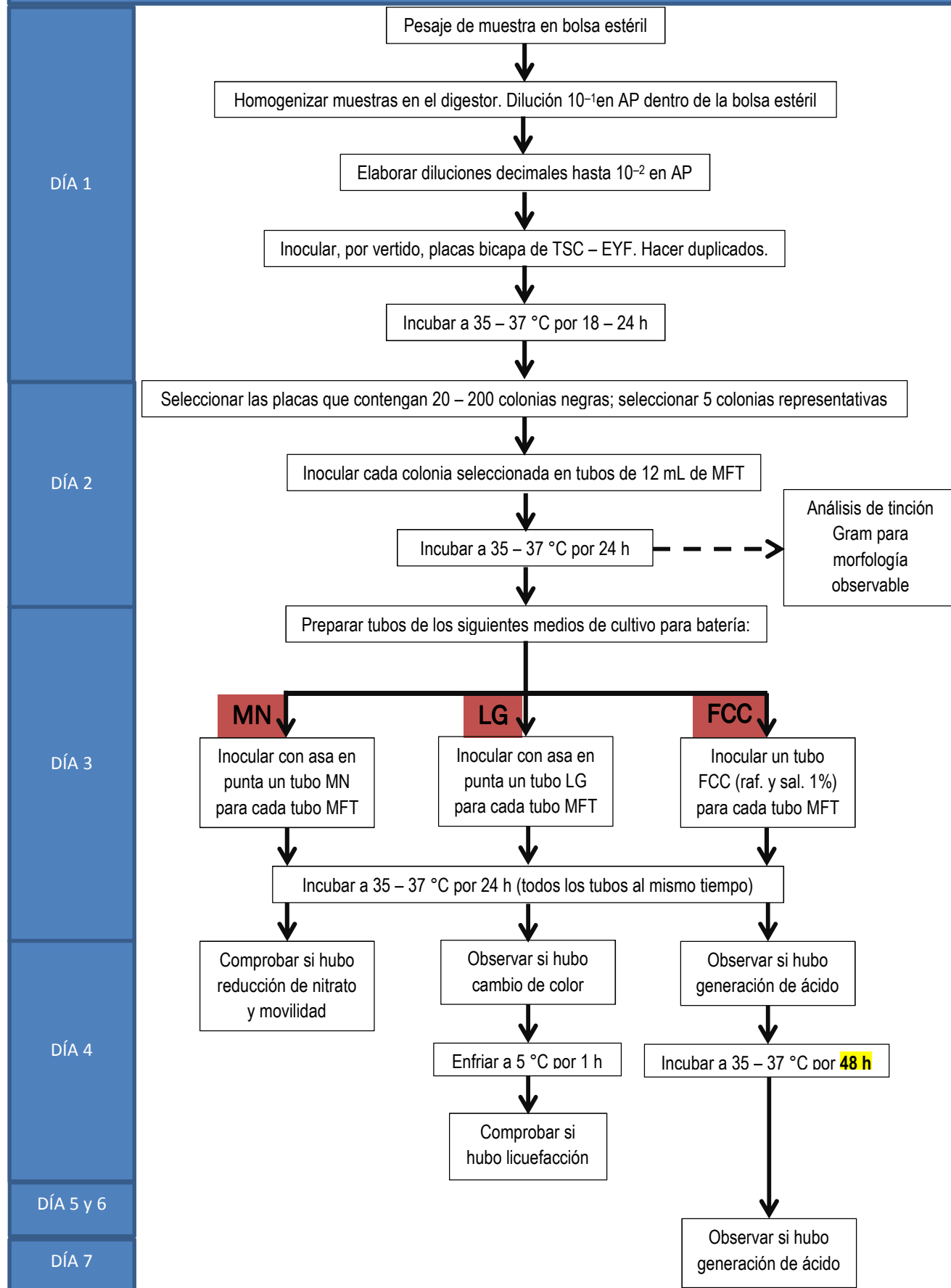
8. Prueba Movilidad – Nitrato (MN): Inocular cada MFT en un tubo de medio MN. Incubar a 35 – 37 °C por 24. Verificar la movilidad. Dado que *Clostridium perfringens* es no móvil, su crecimiento debería ocurrir sólo en la línea de inoculación (de picada). Comprobar la reducción de nitrato a nitrito agregando 0.3 mL de ácido sulfanílico al 0.8% en ácido acético 5 N y 0.3 mL de α naftilamina al 0.5% en ácido acético 5 N. Un color rojo o naranja indica una reducción de nitrato a nitrito. Si ningún color se genera, comprobar si hay nitrato residual añadiendo polvo de zinc. Una prueba negativa (no color violeta) después de agregar zinc en polvo indica que el nitrato fue completamente reducido. Una prueba positiva después de agregar el zinc en polvo indica que el organismo no puede reducir nitrato.
9. Medio Lactosa – Gelatina (LG): Inocular cada tubo de MFT también en tubos de LG. Incubar a 35 – 37 °C por 24 a 44 horas. La fermentación de la lactosa es indicada por la formación de burbujas de gas y un cambio de color en el medio, de rojo a amarillo. La gelatina es usualmente licuada por *C. perfringens* en un plazo de 24 a 44 horas.
10. Medio de Fermentación de Carbohidratos para Clostridios (FCC): Inocular, por cada tubo de MFT, un tubo de medio FCC conteniendo salicina al 1% y otro tubo conteniendo rafinosa al 1%. Incubar cada medio inoculado a 35 – 37 °C durante 24 horas y verificar la producción de ácido añadiendo 5 gotas de azul de bromotimol al 0.04% y observando si hay o no cambio de color (de azul – verde a amarillo si hay ácido generado). *C. perfringens* no fermenta la salicina en 24 horas pero otros clostridios sí lo hacen. *C. perfringens* fermenta la rafinosa en un plazo de 3 días, a diferencia de otros clostridios.
11. Hacer tinción de Gram a cada tubo incubado de MFT y observar al microscopio.
12. Interpretación de Datos: Los cultivos obtenidos de colonias negras sospechosas de ser *C. perfringens* en el medio TSC - EYF son confirmados

como *C. perfringens* si son no móviles, reducen nitrato, fermentan lactosa, licúan gelatina en 24 horas como mínimo y producen ácido a partir de rafinosa. Calcular el número de *C. perfringens* viable por gramo de muestra de alimento como sigue: Multiplicar el recuento presuntivo de la placa por el recíproco de la dilución y luego por la razón de las colonias confirmadas como *Clostridium perfringens* respecto del total de colonias analizadas. Reportar como recuento total de *C. perfringens* (UFC/g de alimento).

Análisis de resultados

Con los resultados de recuento de colonias de *C. perfringens* de las 100 muestras analizadas, se determinará cuántas presentaron un recuento mayor a 10^2 UFC/g de alimento, de modo que pueda establecerse el porcentaje de muestras que sí cumplen y las que no cumplen, con el límite indicado por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para *C. perfringens*.

Aislamiento y cuantificación de *Clostridium perfringens* según el *Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos*, 2001, 4ta. Edición, Capítulo 34 de la American Public Health Association (APHA)



B. Datos obtenidos y calculados

Tabla 4 – Categorización y distribución de los embutidos analizados

Embutido	Cantidad %	Categoría de Embutido (ABREVIATURA)	Cantidad / %
· Jamón	19	· Jamón (J)	19
· Chorizo	16	· Chorizo (C)	16
· Salchicha	13	· Embutidos MADURADOS (M)	14
· Longaniza	12	· VARIOS (V)	14
· (MADURADOS) Salami	11	· Salchicha (S)	13
· (AVES) Jamón Pavo	7	· Longaniza (L)	12
· (VARIOS) Mortadela	5	· Embutidos AVES (A)	12
· (VARIOS) Paté	3		
· (VARIOS) Tocino	3		
· (AVES) Salchicha Pollo	2		
· (MADURADOS) Pepperoni	2		
· (VARIOS) Carne prensada	2		
· (AVES) Jamón Pollo	1		
· (AVES) Salchicha Pavo	1		
· (AVES) Longaniza Pollo	1		
· (MADURADOS) Lomo canadiense	1		
· (VARIOS) Lomo relleno	1		
TOTAL	100	TOTAL	100

Tabla 5 – Análisis de significancia de la diferencia entre el número de muestras por categoría

Categoría de Embutido (I)	Cantidad de muestras (II)	Promedio (MEDIA) (III)	Diferencia respecto a III ^a (IV)	%Diferencia respecto a la III ^b (V)	Desviación estándar (DESVEST) (VI)	Diferencia entre número de muestras a nivel de significancia del 95% (VII)
J	19		4.7	33		NS
C	16		1.7	12		NS
M	14		0.3	2		NS
V	14	14.3	0.3	2	2.5	NS
S	13		1.3	9		NS
L	12		2.3	16		NS
A	12		2.3	16		NS
	TOTAL	TOTAL	PROMEDIO	PROMEDIO	S = La diferencia respecto a la media SI es significativa; NS = La diferencia respecto a la media NO es significativa	
	100	100	1.8	12.9%		

^a **IV** presenta la diferencia, en valor absoluto, entre la cantidad de muestras de cada categoría y el promedio de cantidad de muestras (14.3 muestras).

^b **V** presenta el porcentaje de diferencia o desviación entre la cantidad de muestras de cada categoría y el promedio de cantidad de muestras (14.3 muestras mediante la siguiente relación: $\%Diferencia = 100 * \frac{|Cantidad\ de\ muestra - promedio|}{promedio} = 100 * \frac{IV}{III}$

- Gráfica 3: Categorización y distribución de los embutidos analizados (Cantidad / %) -

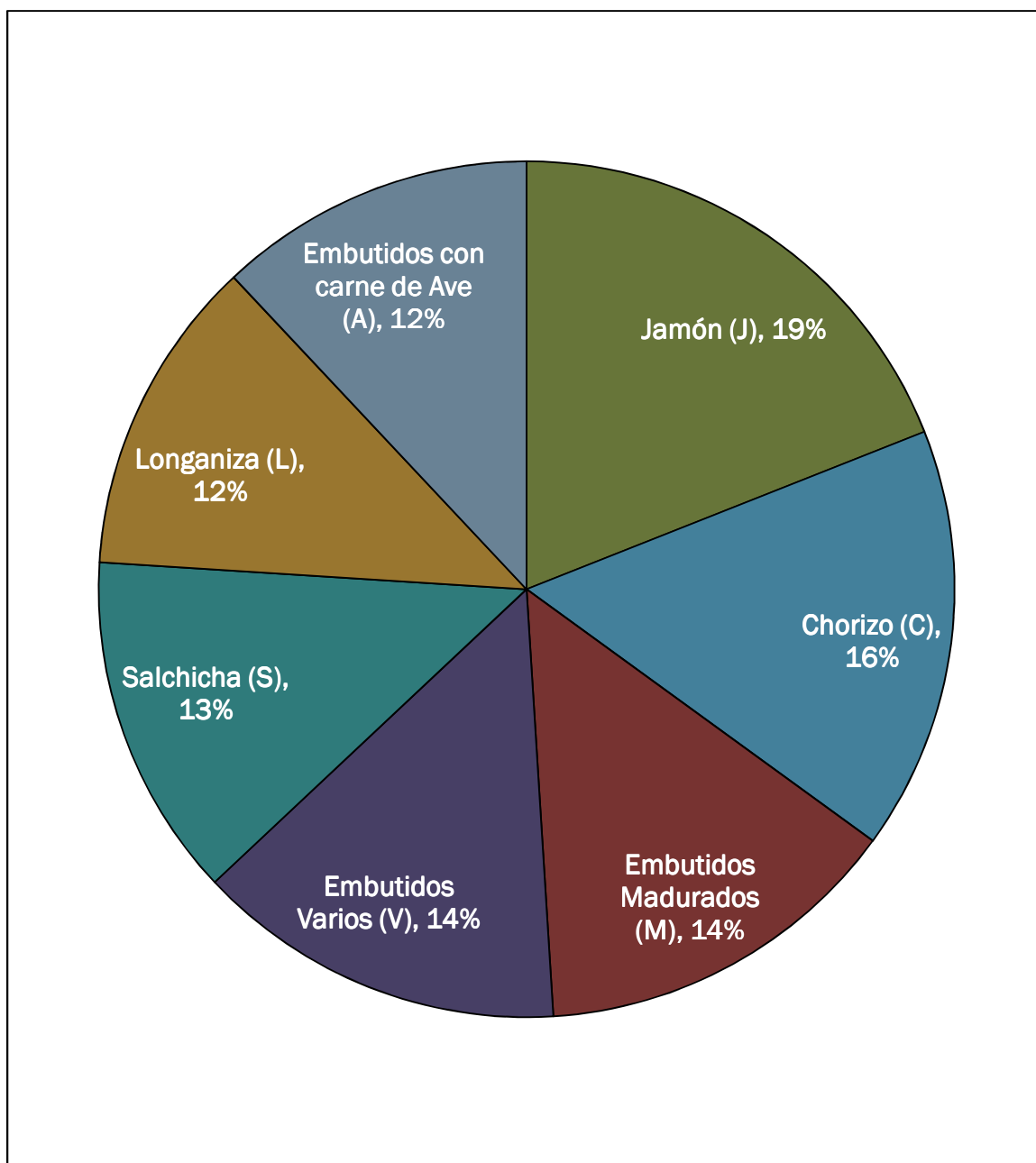


Tabla 6 - Recuento total en placa de TSC - EYF (duplicado y promedio [en azul] por dilución; UFC/g)

Muestra	Tipo de muestra	Recuento total en placa (UFC/g)			
		1ra. Dilución (-1)		2da. Dilución (-2)	
#1	Salami	0	0	0	0
		0		0	
#2	Mortadela	0	0	0	0
		0		0	
#3	Salami	0	0	0	0
		0		0	
#4	Longaniza	0	0	0	0
		0		0	
#5	Longaniza	0	0	0	0
		0		0	
#6	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#7	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#8	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#9	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#10	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#11	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#12	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#13	Longaniza	1.0 * 10	0	0	0
		5		0	
#14	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#15	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#16	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#17	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#18	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#19	Salami	0	0	0	0
		0		0	
#20	Jamón	2.0 * 10	0	0	0
		10		0	
#21	Longaniza	6.0 * 10	0	0	0
		30		0	
#22	Mortadela	3.0 * 10	2.0 * 10	0	0
		25		0	

Continuación Tabla 6...

Muestra	Tipo de muestra	Recuento total en placa (UFC/g)			
		1ra. Dilución (-1)		2da. Dilución (-2)	
#23	Salami	1.0 * 10	0	0	0
			5		0
#24	Salami	0	0	0	0
			0		0
#25	Salami	0	0	0	0
			0		0
#26	Pepperoni	2.0 * 10	2.0 * 10	0	0
			20		0
#27	Salami	3.0 * 10	0	0	0
			15		0
#28	Salchicha Pollo	0	0	0	0
			0		0
#29	Chorizo	4.0 * 10	4.0 * 10	0	0
			40		0
#30	Salchicha	0	0	0	0
			0		0
#31	Salami	0	0	0	0
			0		0
#32	Carne prensada	0	0	0	0
			0		0
#33	Lomo relleno	0	0	0	0
			0		0
#34	Chorizo	0	0	0	0
			0		0
#35	Chorizo	0	0	0	0
			0		0
#36	Jamón Pavo	0	0	0	0
			0		0
#37	Chorizo	1.0 * 10	0	0	0
			5		0
#38	Salchicha	0	0	0	0
			0		0
#39	Chorizo	6.7 * 10 ²	7.4 * 10 ²	7.0 * 10 ²	7.0 * 10 ²
			705		700
#40	Salchicha	0	0	0	0
			0		0
#41	Longaniza	0	0	0	0
			0		0
#42	Jamón	0	0	0	0
			0		0
#43	Salchicha	0	0	0	0
			0		0
#44	Salchicha Pollo	0	0	0	0

Continuación Tabla 6...

Muestra	Tipo de muestra	Recuento total en placa (UFC/g)			
		1ra. Dilución (-1)		2da. Dilución (-2)	
#66	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#67	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#68	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#69	Salchicha Pavo	0	0	0	0
		0		0	
#70	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#71	Chorizo	2.0 * 10	1.0 * 10	0	0
		15		0	
#72	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#73	Chorizo	2.0 * 10	1.0 * 10	0	0
		15		0	
#74	Longaniza	1.0 * 10	0	0	0
		5		0	
#75	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#76	Jamón Pavo	0	0	0	0
		0		0	
#77	Mortadela	0	0	0	0
		0		0	
#78	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#79	Salami	0	0	0	0
		0		0	
#80	Jamón Pavo	0	0	0	0
		0		0	
#81	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#82	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#83	Longaniza	1.0 * 10	0	0	0
		5		0	
#84	Longaniza	0	0	0	0
		0		0	
#85	Paté	0	0	0	0
		0		0	
#86	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#87	Longaniza	0	0	0	0

Continuación Tabla 6...

Muestra	Tipo de muestra	Recuento total en placa (UFC/g)			
		1ra. Dilución (-1)		2da. Dilución (-2)	
		0		0	
#88	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#89	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#90	Longaniza	0	0	0	0
		0		0	
#91	Lomo canadiense	0	0	0	0
		0		0	
#92	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#93	Tocino	0	0	0	0
		0		0	
#94	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#95	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#96	Chorizo	0	0	0	0
		0		0	
#97	Tocino	0	0	0	0
		0		0	
#98	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	
#99	Jamón	0	0	0	0
		0		0	
#100	Salchicha	0	0	0	0
		0		0	

Tabla 7 - Muestras que presentaron colonias negras sospechosas en agar TSC - EYF (antes de MFT)

Muestra	Tipo de embutido (CATEGORÍA) ^a	10 ⁻¹ Promedio UFC/g	10 ⁻² Promedio UFC/g	Muestra	Tipo de embutido (CATEGORÍA)	10 ⁻¹ Promedio UFC/g	10 ⁻² Promedio UFC/g
#13	Longaniza (L)	5	0	#39	Chorizo (C)	705	700
#20	Jamón (J)	10	0	#53	Chorizo (C)	10	0
#21	Longaniza (L)	30	0	#54	Jam. Pavo (A)	5	0
#22	Mortadela (V)	25	0	#56	Longaniza (L)	10	0
#23	Salami (M)	5	0	#65	Mortadela (V)	5	0
#26	Pepperoni (M)	20	0	#71	Chorizo (C)	15	0
#27	Salami (M)	15	0	#73	Chorizo (C)	15	0
#29	Chorizo (C)	40	0	#74	Longaniza (L)	5	0
#37	Chorizo (C)	5	0	#83	Longaniza (L)	5	0

^a En paréntesis () se indica la abreviatura de la categoría a la que pertenece el tipo de embutido, ver Tabla 4.

Tabla 8 – Porcentaje de muestras con colonias sospechosas por categoría de embutido

Categoría de Embutido	Cantidad de muestras por Categoría ^a	Cantidad de muestras con y sin colonias sospechosas		% de muestras con colonias sospechosas/Categoría		
		Sin colonias sospechosas	Con colonias sospechosas	%	% sin colonias sospechosas	% con colonias sospechosas
· Jamón (J)	19	18	1	%J	94.7%	5.3%
· Chorizo (C)	16	10	6	%C	62.5%	37.5%
· Madurados (M)	14	11	3	%M	78.6%	21.4%
· Varios (V)	14	12	2	%V	85.7%	14.3%
· Salchicha (S)	13	13	0	%S	100%	0.0%
· Longaniza (L)	12	7	5	%L	58.3%	41.7%
· Aves (A)	12	11	1	%A	91.7%	8.3%
Parcial	100	82	18	MEDIA		18.4%
TOTAL	100	100				

^a Dado que se trabajó con 100 muestras, la cantidad de muestras por categoría corresponde al mismo valor en porcentaje.

- Gráfica 4: Porcentaje de muestras con colonias sospechosas por categoría de embutido -

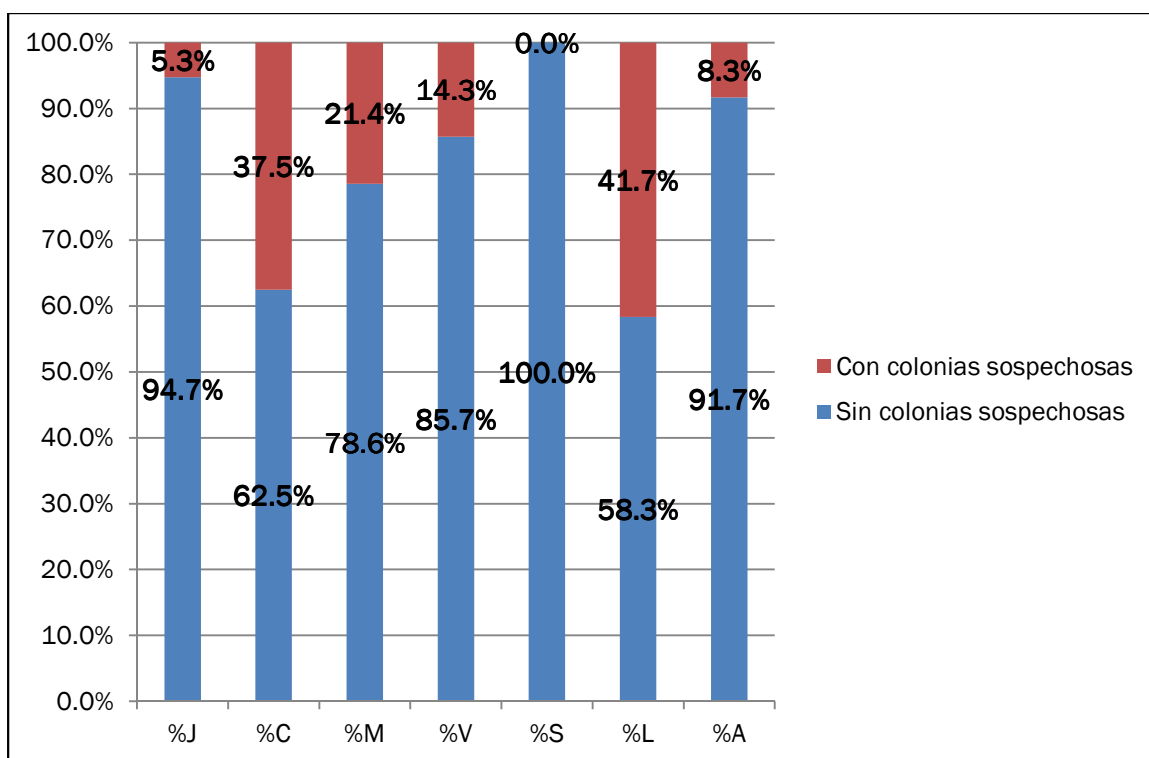
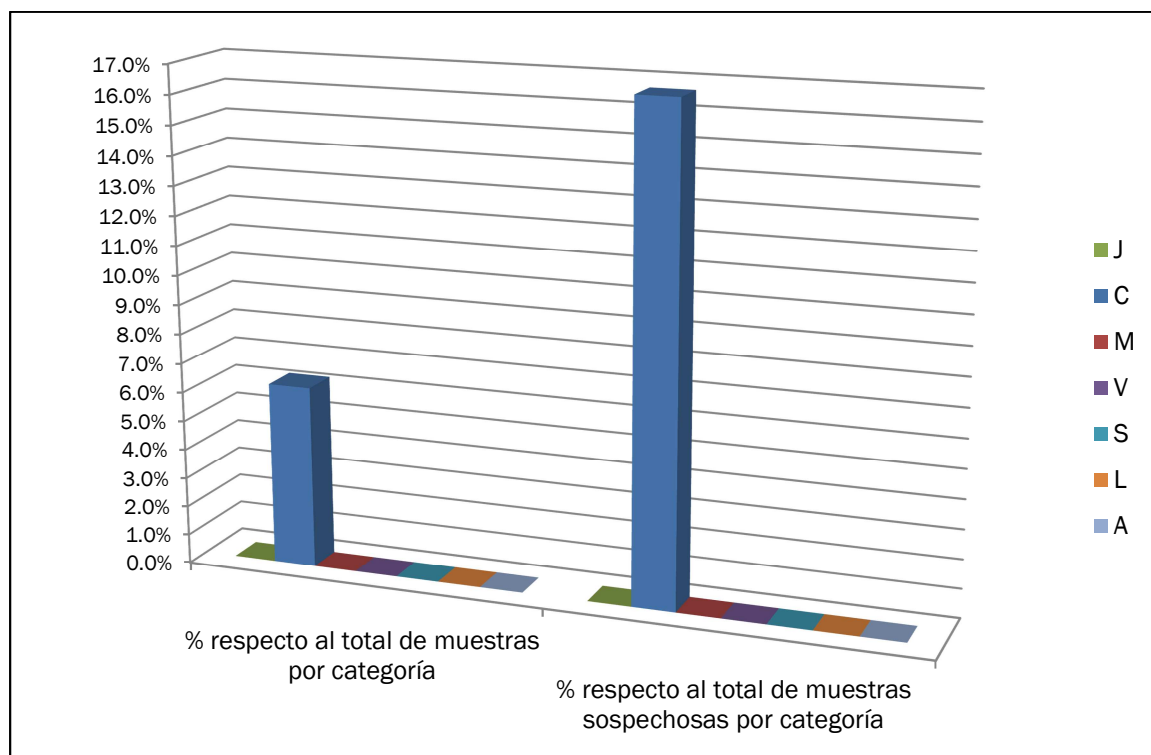


Tabla 9 - Distribución de muestras con crecimiento de colonias sospechosas en dilución 10^{-2}

Categoría de embutido (I)	Cantidad de muestras por categoría (II)	Cantidad de muestras con colonias sospechosas (III)	Cantidad de muestras con un recuento en 10^2 (IV)	% de muestras con recuento 10^2 , respecto a II (V)	% de muestras con recuento 10^2 , respecto a III (VI)
J	19	1	0	0.0%	0.0%
C	16	6	1	6.3%	16.7%
M	14	3	0	0.0%	0.0%
V	14	2	0	0.0%	0.0%
S	13	0	0	0.0%	-
L	12	5	0	0.0%	0.0%
A	12	1	0	0.0%	0.0%
	TOTAL	TOTAL	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
	100	18	0.14	0.9%	2.4%

- Gráfica 5: Muestras con crecimiento de colonias sospechosas en dilución 10^{-2} , por categoría -

Muestra	Colonias disponib.	Colonias picadas	Colonias que continúan a batería ^a					Observaciones
			a	b	c	d	e	
#13	1	1	*					
#20	2	2	*	*				Sólo una colonia creció en MFT
#21	6	5	*	*	*	*	*	
#22	5	5	*	*	*	*	*	
#23	1	1	*					
#26	4	4	*	*	*	*		
#27	3	3	*	*	*			
#29	8	5	*	*	*	*	*	
#37	1	1	*					
#39A	155	5	*	*	*	*	*	
#39B	10	5	*	*	*	*	*	
#53	2	2	*					Sólo una colonia creció en MFT
#54	1	1	*					No hubo crecimiento en MFT
#56	2	2	*	*				
#65	1	1	*					
#71	3	3	*	*	*			
#73	3	3	*	*	*			
#74	1	1	*					
#83	1	1	*					

^a Mediante un recuadro marcado con gris - asterisco (*) se representa cuántas colonias (y su respectiva identificación) fueron picadas por muestra sospechosa

Tabla 11 – Resultados de lectura de batería bioquímica para tubos de MFT de colonias sospechosas picadas: **Ver guía de lectura al final de esta tabla, en la página.** En azul se destacan las colonias con bacilos Gram positivos y en celda celeste, las que presentaron, predominantemente, bacilos Gram positivos en sus respectivas tinciones de Gram

Muestr. (CAT.)	Colonia	MN		LG			FCC – SAL		FCC – RAF		C. <i>perfringens</i>	Tinciones de Gram
		M	N	A	G	LIC.	A	G	A	G		
	Cepa Control <i>C. perfringens</i> ATCC® 13124	-	+	+	+	+	-	-	+	+	SÍ	Bacilos Gram positivos
13 (L)	a	+	+	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos eventuales
20 (J)	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos y cocos Gram negativos, bacilos Gram positivos, hifas
21 (L)	a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos y cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos
	b	+	+	-	-	-	-	+	+	-	NO	Bacilos y cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos
	c	+	+	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos
	d	+	+	-	-	-	-	-	+	-	NO	Bacilos y cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos
	e	+	+	+	+	-	-	-	+	+	NO	Bacilos Gram negativos y bacilos y cocos Gram positivos
22 (V)	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Estreptococos Gram positivos y bacilos Gram positivos eventuales
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos y cocos Gram positivos
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Estreptococos Gram positivos
	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram positivos y bacilos Gram negativos eventuales
	e	-	-	+	+	-	-	-	-	-	NO	Cocos Gram positivos
23 (M)	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Cocos Gram positivos
26 (M)	a	-	+	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram positivos y cocos Gram positivos eventuales
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos
	c	-	-	+	+	+	+	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram positivos
	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram positivos y diplococos Gram positivos

Continuación Tabla 11...

Muestr. (CAT.)	Colonia	MN		LG			FCC – SAL		FCC – RAF		C. <i>perfringens</i>	Tinciones de Gram
		M	N	Á	G	LIC.	Á	G	Á	G		
27 (M)	a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos y cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos y levaduras event.
	b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos y cocos Gram positivos
	c	-	-	+	+	-	+	-	-	-	NO	Bacilos y cocos Gram positivo, levaduras
29 (C)	a	-	-	-	-	+	+	-	+	+	NO	Bacilos y cocos Gram positivo
	b	+	+	+	+	+	+	-	-	+	NO	Bacilos y cocos Gram positivo, hifas
	c	-	-	-	-	-	+	-	+	-	NO	Bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos eventuales
	d	-	-	+	-	-	+	-	+	-	NO	Cocos, diplococos, estreptococos y bacilos Gram positivo
	e	+	+	+	+	+	+	-	-	-	NO	Cocos Gram positivo
37 (C)	a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Cocos, estreptococos y bacilos Gram positivos
39A (C)	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Cocos Gram positivos y bacilos cortos Gram positivos
	b	-	-	+	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos y cocos Gram positivos
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos
	d	+	+	+	+	-	+	-	+	-	NO	Bacilos Gram negativos y bacilos Gram positivos eventuales
	e	+	+	+	+	-	+	-	+	+	NO	Bacilos Gram negativos y bacilos cortos Gram positivos
39B (C)	a	-	+	+	+	+	+	-	+	-	NO	Cocos Gram positivos
	b	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos Gram negativos
	c	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Cocos Gram positivos
	d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos
	e	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram negativos
53 (C)	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram negativos

Continuación Tabla 11...

Muestr. (CAT.)	Colonia	MN		LG			FCC - SAL		FCC - RAF		C. <i>perfringens</i>	Tinciones de Gram
		M	N	Á	G	LIC.	Á	G	Á	G		
56 (L)	a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NO	Bacilos cortos Gram negativos
	b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos cortos Gram negativos y levaduras
65 (V)	a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NO	Bacilos Gram negativos y bacilos Gram positivos eventuales
71 (C)	a	-	-	+	-	-	+	-	+	-	NO	Cocos Gram positivos
	b	-	-	+	-	-	+	-	+	-	NO	Bacilos cortos Gram negativos
	c	-	-	-	-	-	+	-	+	-	NO	Bacilos cortos Gram positivos
73 (C)	a	-	-	+	-	+	+	-	+	-	NO	Cocos Gram positivos
	b	-	-	+	-	+	+	-	-	-	NO	Cocos y bacilos Gram negativos
	c	-	-	+	-	-	+	-	+	-	NO	Bacilos Gram positivos y levaduras eventuales
74 (L)	a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NO	Bacilos Gram positivos y levaduras eventuales
83 (A)	a	+	+	+	+	-	+	+	-	+	NO	Estreptococos Gram positivos y bacilos Gram negativos eventuales

MN/ Movilidad M: (+) Turbidez en el medio, (-) Crecimiento sólo en la línea de picada; **Reducción de nitrato** N: (+) Generación de color rojo por reducción de nitrato, (-) Sin reducción de nitrato, no generación de color rojo; **LG/ Producción de ácido** Á: (+) Cambio de color del medio, de rojo a amarillo, (-) Medio conserva su color rojo; **Producción de gas** G: (+) Generación de burbujas de gas, (-) Sin generación de burbujas de gas; **Licuefacción de gelatina** L: (+) El medio no solidifica al enfriarlo a 5 °C por 1 h, (-) El medio solidifica al enfriarlo a 5 °C por 1 h; **FCC - SAL y FCC - RAF/ Producción de ácido** A: (+) Generación de color amarillo - verde al agregar azul de bromotimol al 0.04%, (-) Sin cambio de color al agregar azul de bromotimol al 0.04%; **Producción de gas** G: (+) Presencia de burbujas de gas en campana de Durham, (-) Sin presencia de burbujas en campana de Durham. Una prueba de batería se lee como positiva para *C. perfringens* si es negativa para movilidad, positiva para reducción de nitrato (**MN**), positiva para fermentación de lactosa (producción de gas y cambio de color) y positiva para licuefacción de la gelatina (**LG**), no hay fermentación de salicina a las 24 h (**FCC - SAL**) y sí hay fermentación de rafinosa en un lapso de 72 h (**FCC - RAF**)

Tabla 12 - Colonias y muestras que presentaron bacilos Gram positivos

Cantidad total de colonias picadas (I)	Cantidad de colonias que presentaron bacilos Gram positivos (II)	Cantidad de colonias que presentaron PREDOMINANTEMENTE, bacilos Gram positivos (III)	Total de muestras con bacilos Gram positivos (IV)	Cantidad/% de muestras con bacilos Gram positivos por categoría, respecto a IV (V)	
48	32	8	14	L:	3/21.4%
Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje		J:	1/7.1%
100%	66.7% (2/3), respecto a I	16.7% (1/6) respecto a I; 25.0% (1/4) respecto a II		V:	2/14.3%
				M:	2/14.3%
				C:	6/42.9%

- Gráfica 6: Porcentaje de muestras, por categoría, respecto de las muestras (14 en total) que presentaron bacilos Gram positivos -

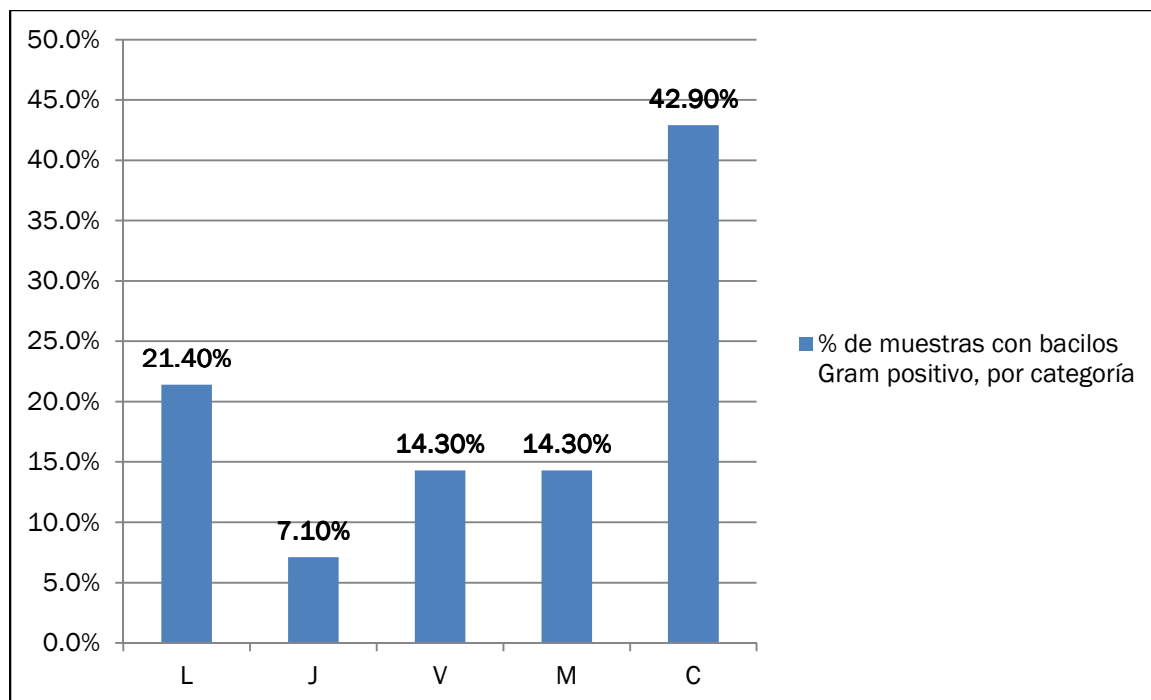


Tabla 13 - Distribución de las muestras con colonias sospechosas por empaque y preparación

Muestra (Categoría)	Empaque		Preparación	
	CON vacío	SIN vacío	CON pre - cocción	SIN pre - cocción
#13 (L)		*		*
#20 (J)	*		*	
#21 (L)		*		*
#22 (V)		*	*	
#23 (M)	*		*	
#26 (M)	*		*	
#27 (M)	*		*	
#29 (C)		*		*
#37 (C)		*		*
#39 (C)	*			*
#53 (C)		*	*	
#54 (A)	*		*	
#56 (L)		*	*	
#65 (V)	*		*	
#71 (C)		*	*	
#73 (C)	*			*
#74 (L)	*		*	
#83 (L)		*		*
Total	9	9	11	7
Porcentaje	50.0%	50.0%	61.1%	38.9%

- Gráfica 7: Distribución de las muestras con colonias sospechosas por su tipo de empaque y preparación-

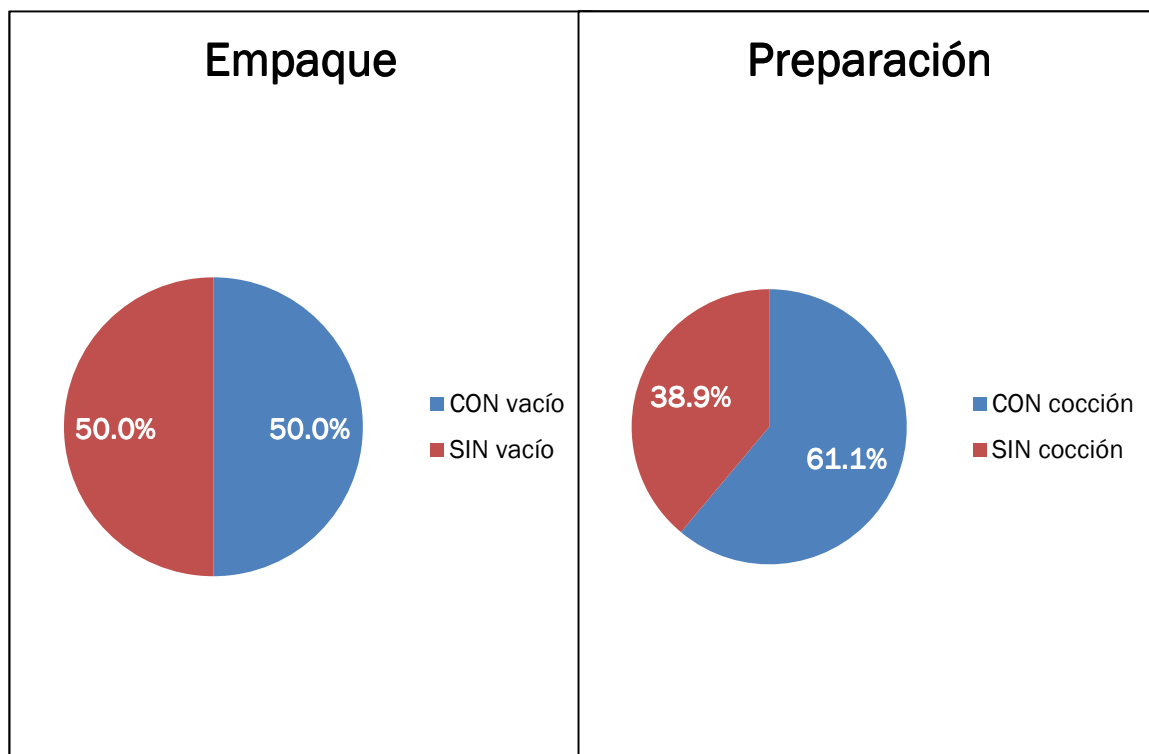


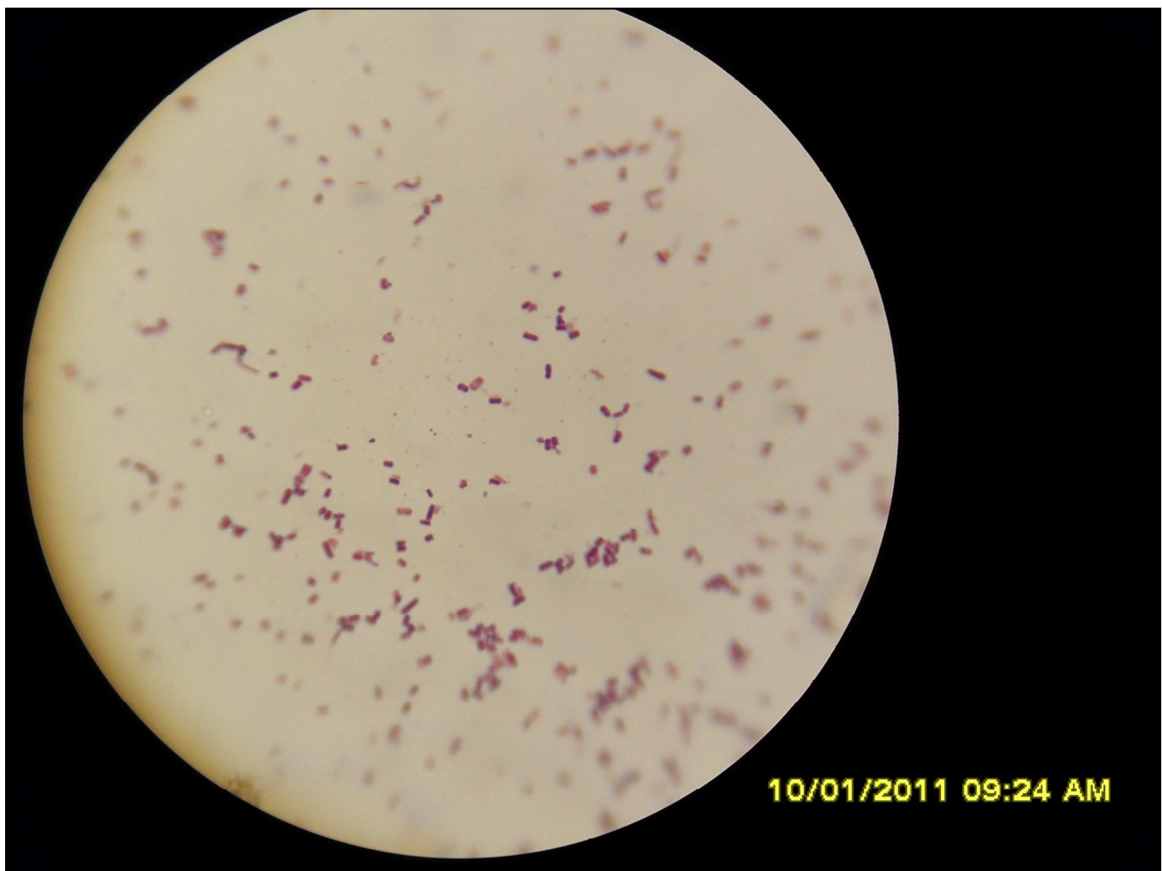
Tabla 14 - Consolidación final de las muestras analizadas en cuanto a su cumplimiento con el RTCA

Total de muestras analizadas	Muestras con crecimiento sospechoso		Muestras con crecimiento sospechoso en 10^2 UFC/g		Muestras confirmadas para <i>C. perfringens</i>		Muestras que incumplen con RTCA 67.04.50:08 ^a	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
100	18	18.0%	1	1.0%	0	0.0%	0	0.0%

^a Respecto al límite especificado para *C. perfringens* en el Grupo 8, subgrupos 8.2 y 8.3, de dicho Reglamento (Ver adjunto).

C. Fotografías

- Figura 13: Tinción de Gram de *Clostridium perfringens* ATCC® 13124, bacilos Gram Positivo -



- Figura 14: Crecimiento de una colonia sospechosa en la placa de TSC - EYF de una muestra de chorizo -



- Figura 15: Tubos de MN inoculados con colonia sospechosa (previamente enriquecida en MFT) de una muestra. Nótese la reacción de coloración rojiza que indica la efectiva reducción de nitrato. El tubo del extremo derecho era el control positivo de *C. perfringens* ATCC® 13124 pero aún no había sido inoculado (también daba positivo para reducción de nitrato). Los dos primeros tubos de la izquierda no están inoculados tampoco -



- Figura 16: Tubos de LG inoculados con colonia sospechosa (previamente enriquecida en MFT) de una muestra. Nótese que la reacción de cambio de color de rojo a amarillo es mucho menos evidente que para el control positivo de *C. perfringens* ATCC® 13124 (en el extremo derecho). Los dos primeros tubos de la izquierda no están inoculados tampoco y muestran el color original del medio -



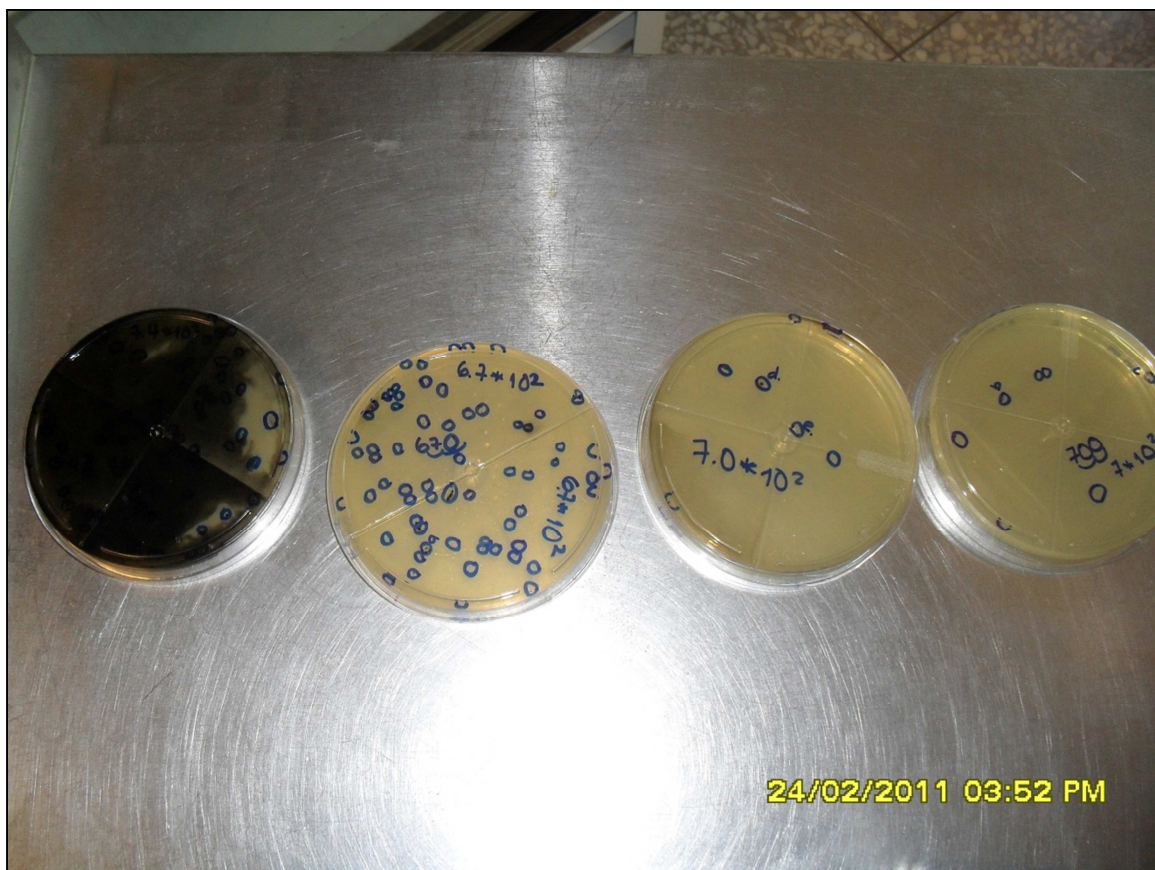
- Figura 17: Tubos de FCC - Salicina mostrando generación de ácido (cambio de color del azul de bromotimol 0.04% de azul - verde a amarillo) en el caso de las colonias sospechosas de una muestra; el cambio de color las descarta como *C. perfringens* (el tubo de FCC - Salicina del control positivo *C. perfringens* ATCC® 13124 no fermentó la salicina). Los dos primeros tubos de la izquierda no están inoculados -



- Figura 18: Tubos de FCC - Rafinosa mostrando la no generación de ácido (cambio de color del azul de bromotimol 0.04% de azul - verde a amarillo) en el caso de las colonias sospechosas de una muestra; la no fermentación las descarta como *C. perfringens* (el tubo de FCC - Rafinosa del control positivo *C. perfringens* ATCC® 13124 no fue inoculada adecuadamente y por ello tampoco fermentó el carbohidrato. Posteriores controles sí presentaron la reacción esperada). Los dos primeros tubos de la izquierda no están inoculados -



- Figura 19: Placas de TSC - EYF de la muestra #39, las dos de la izquierda son las correspondientes a su primera dilución (1:10) y las dos de la derecha, a su segunda dilución (1:100). Nótese la superficie negra (por excesiva dispersión y crecimiento) en la placa del extremo izquierdo -



NOTA IMPORTANTE

Adjunto en el Disco Compacto se encontrarán la Norma COGUANOR NGO 34 125 H26 *Análisis microbiológico. Recuento de Clostridium perfringens* así como el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 *Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos.*