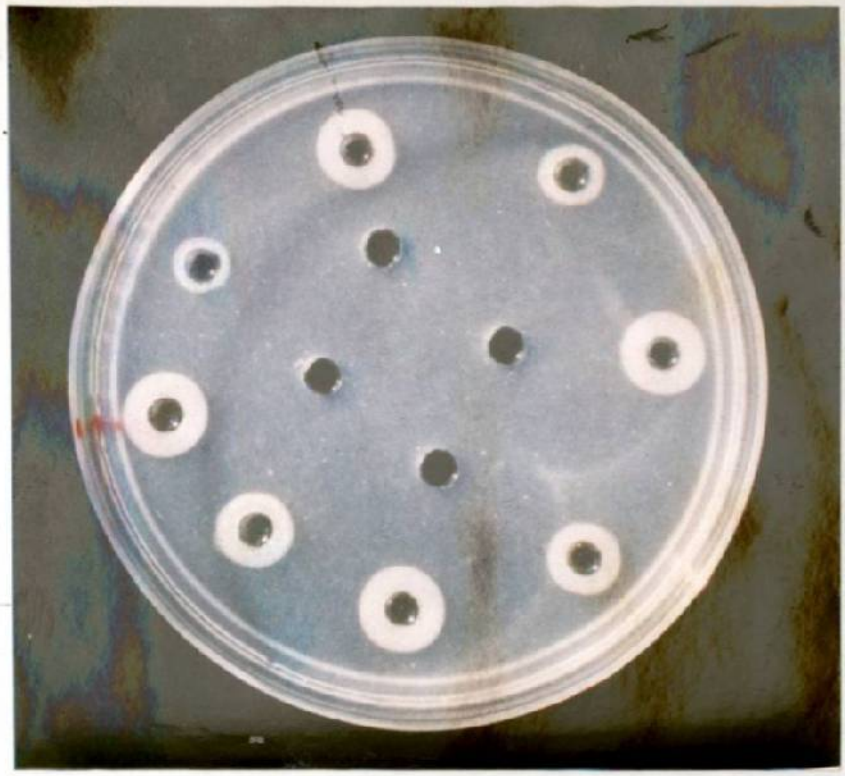


Fig. 21. Halos producidos por la acción de fosfolipasa C en el método modificado de difusión. La cantidad de toxina es proporcional al tamaño del halo observado.

Nuestros resultados indicaron que las células que recibieron el choque térmico mostraron un retraso en la producción de fosfolipasa C. Dicho retraso fue de 3 horas, sin embargo, la cantidad de toxina producida por las células tratadas fue semejante a la obtenida por los controles (Fig. 22).

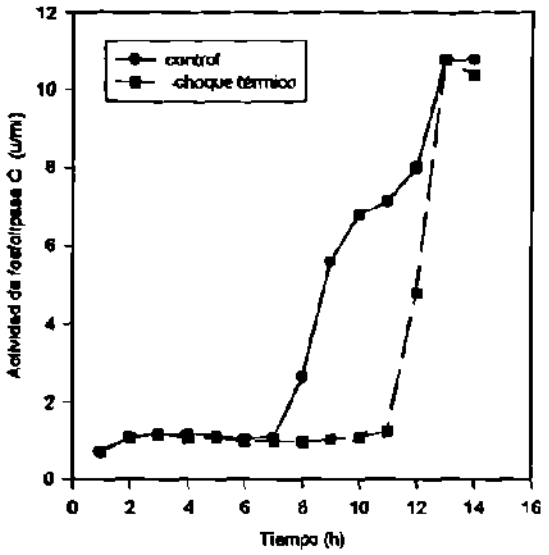


Fig. 22. Producción de fosfolipasa C por *C. perfringens* FD-1041 sometida a un choque térmico de 50°C por 30 min.

EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE LA TERMOTOLERANCIA DE ESPORAS Y CELULAS VEGETATIVAS.

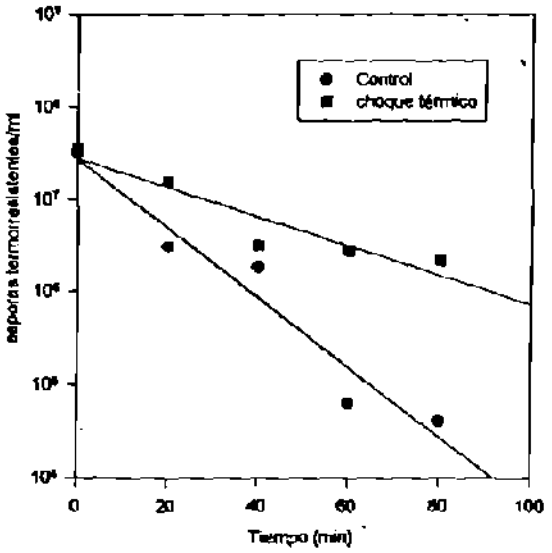
Estos ensayos se realizaron incubando las cepas a 43°C, debido a que, como se ha reportado, la adquisición de termotolerancia tiene implicaciones muy importantes en el control sanitario de alimentos y siendo este microorganismos un patógeno causante de una intoxicación alimentaria, la utilización de esa temperatura de incubación nos puede aproximar a las condiciones en que se pudieran encontrar los alimentos, que son vehículos potenciales de este patógeno.

a) Esporas.

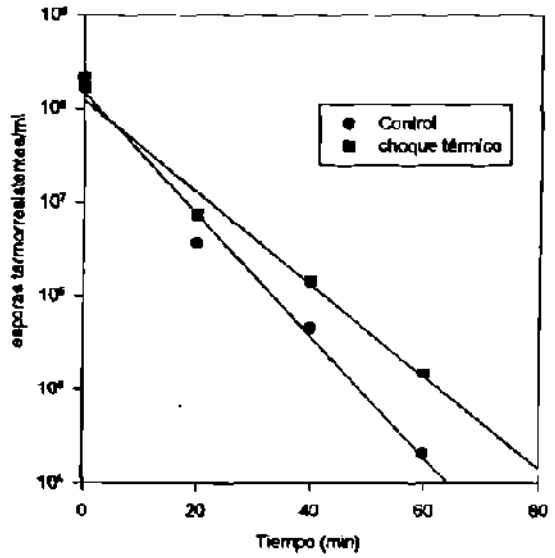
Las esporas obtenidas resultaron de cultivos a los que se les realizó el choque térmico (50°C por 30 min) a la primera (crecimiento vegetativo), segunda o tercera (proceso de esporulación) hora de incubación. Los ensayos de termotolerancia se realizaron a 85°C para la cepa FD-1, mientras que para la cepa FD-1041 se utilizó 95°C, debido a que esta cepa mostró mayor resistencia al calor.

Las curvas de muerte térmica para la cepa FD-1 se encuentran en las figuras 23 y 24. Solo se muestran las curvas de esta cepa, ya que ambas cepas mostraron un comportamiento similar. En estas se observa la sobrevivencia de las esporas tratadas por calor a medida que transcurre el tiempo. En las dos cepas probadas encontramos que las esporas que recibieron el choque térmico a la primera hora de incubación, mostraron mayor resistencia al calor en comparación con los controles. Este efecto fue menos marcado o no se presentó al aplicar el tratamiento a la segunda hora de incubación (Fig. 23). Cuando el choque térmico fue aplicado a la tercera hora de incubación, las esporas resultantes fueron más sensibles que las no tratadas (Fig. 24).

A partir de las curvas obtenidas se determinaron los valores de leatlidad 'D' para los diferentes tratamientos. Estos se encuentran resumidos en la tabla 5. En el caso de la cepa FD-1 encontramos que el choque térmico aplicado a la primera hora elevó casi al doble la tolerancia de las esporas. Cuando el tratamiento fue a la segunda hora, casi no se observó incremento en la termotolerancia, sin embargo, si se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos y controles.



A



B

Fig. 23. Efecto de un choque térmico (50°C por 30 min) aplicado a la primera (A) o segunda (B) hora de incubación de células en esporulación de *C. perfringens* FD-1, sobre la termotolerancia de esporas resultantes.

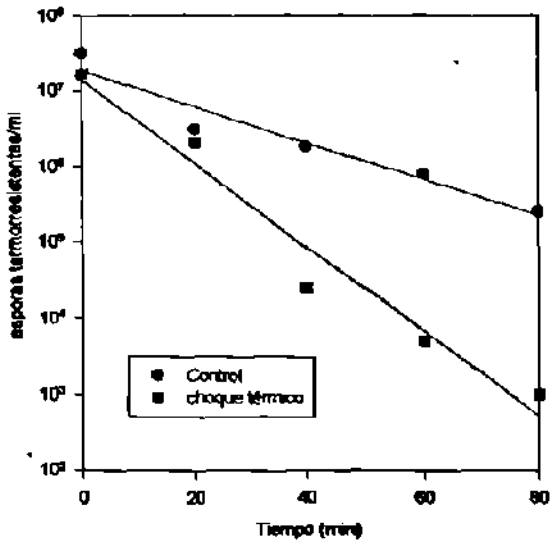


Fig. 24. Efecto de un choque térmico (50°C por 30 min) aplicado a la tercera hora de incubación de células en esporulación de *C. perfringens* FD-1, sobre la termotolerancia de esporas resultantes.

Cuando estudiamos la cepa FD-1041 y el choque térmico se aplicó a la primera hora de incubación, las esporas resultantes fueron casi dos veces mas termotolerantes que los controles. Sin embargo, cuando el tratamiento se aplicó a las 2 horas las esporas tratadas fueron mas sensibles que las que no recibieron el choque. Finalmente, al igual que para la cepa anterior, cuando el tratamiento térmico fue a las 3 horas, las esporas resultantes fueron también más sensibles que las controles

Tabla 5. Efecto de un choque térmico a diferentes tiempos durante la incubación de células de C. perfringens, sobre la termotolerancia de las esporas formadas.

	FD-1 D_{85} (min)		FD-1041 D_{95} (min)	
HORA DE APLICACION CHOQUE TERMICO	CONTROL	CHOQUE TERMICO	CONTROL	CHOQUE TERMICO
1	24	46	55	92
2	24	28	55	38
3	24	20	55	27

b) Células vegetativas.

Al igual que en las esporas, las células vegetativas mostraron una tendencia muy similar, por lo que solo se muestran los resultados obtenidos de la cepa FD-1041, las cuales se encuentran esquematizados en la figura 25 y 26.

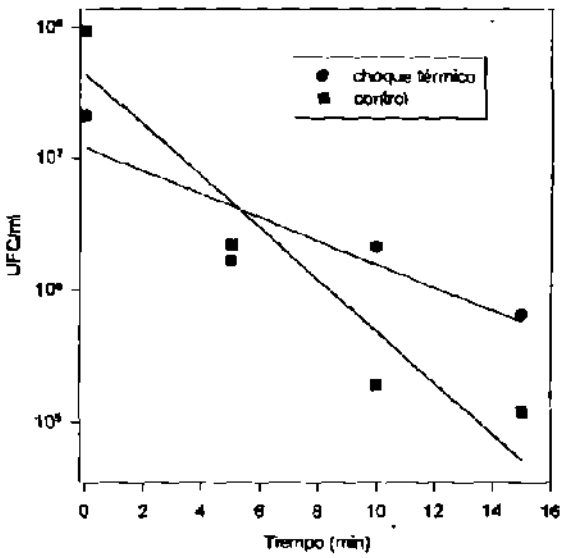
Se encontró que la adquisición de termotolerancia como resultado de un choque térmico previo fue muy notoria para la cepa FD-1, la cual resultó ser 8.5 veces más tolerante que el control. En el caso de la cepa FD-1041, también se observó este efecto, aunque en forma más discreta, ya que las células tratadas fueron 2 veces más resistentes al calor. Los valores D para cada muestra están detallados en la tabla 6.

Tabla 6. Termotolerancia al calor (55°C) de células vegetativas de *C. perfringens* después de que fueron sometidas y no sometidas a un choque térmico previo.

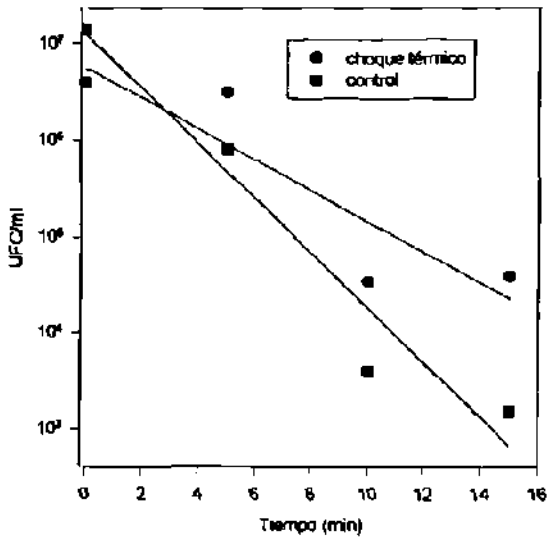
	D_{55} (min)			
	FD-1		FD-1041	
TIEMPO DESPUES DEL CHOQUE TERMICO (h)	CONTROL	CHOQUE TERMICO	CONTROL	CHOQUE TERMICO
0	9	85	5	10
1	10	29	3	6
2	12	23	4	6
3	16	11	7	6

La adquisición de termotolerancia de la cepa FD-1 se mantuvo aún a dos horas posteriores al choque térmico previo, aunque disminuyó con el tiempo. A la tercera hora no se encontró diferencia significativa entre las células con el prechoque y los controles.

En el caso de la cepa FD-1041, la termotolerancia se detectó hasta las 3 horas después del choque térmico previo, aunque a ese tiempo esa era solo 0.6 veces mayor que la de los controles (Tabla 6).

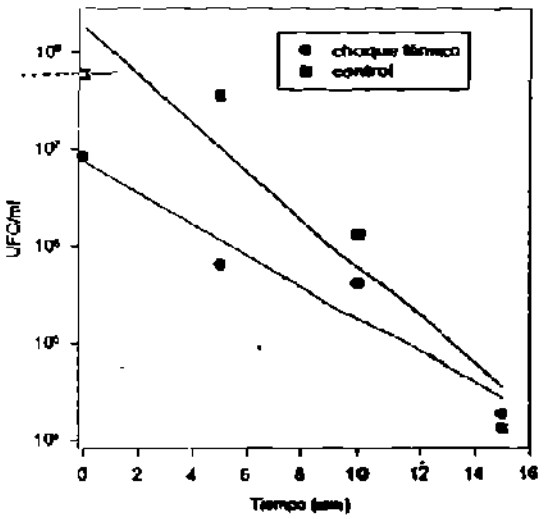


A

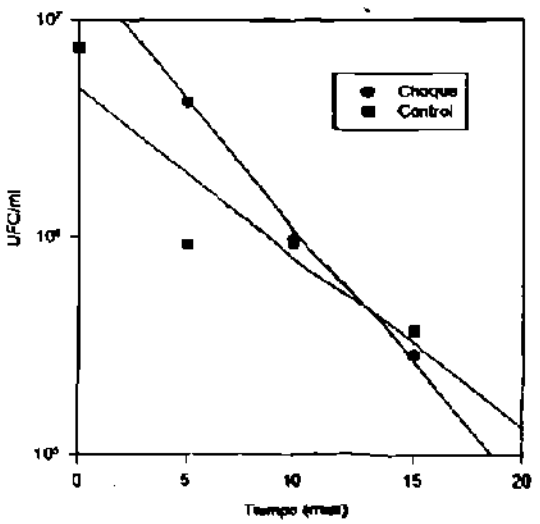


B

Fig. 25. Curvas de muerte térmica a 55°C de células vegetativas de *C. perfringens* FD-1041 después de que fueron sometidas a un choque térmico previo de 50°C por 30 min. El ensayo de termotolerancia se realizó inmediatamente (A) o 1 h después del choque (B).



A



B

Fig. 26. Curvas de muerte térmica a 55°C de células vegetativas de *C. perfringens* FD-1041 después de que fueron sometidas a un choque térmico previo de 50°C por 30 min. El ensayo de termotolerancia se realizó 2 (A) o 3 h (B) después del choque.

EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE EL PATRON DE PROTEINAS

a) CONCENTRACION DE ISOTOPO.

Debido a la gran variabilidad que había en la literatura acerca de las concentraciones de isótopo usadas en experimentos parecidos, se probaron concentraciones iniciando con 12 µCi/ml. Sin embargo, no se detectó incorporación, por lo que se probaron mayores cantidades que incluyeron 20, 50 y 75 µCi/ml, pero que resultaron también con pobre incorporación.

Cuando utilizamos 100 µCi/ml encontramos que las células si incorporaban el isótopo (Fig. 27) y que como era de esperarse, era dependiente del tiempo.

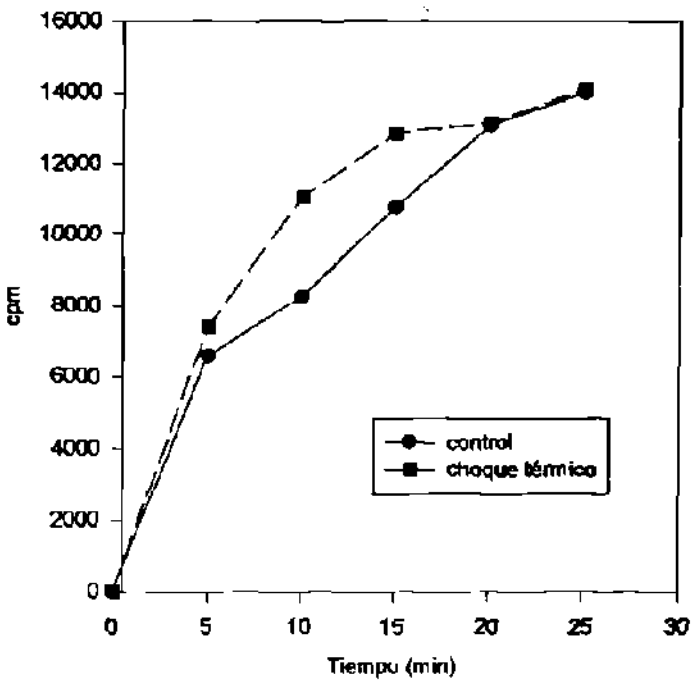


Fig. 27. Curva de incorporación de Trans-S^{35}-label por células de *C. perfringens* durante un choque térmico de 50°C

b) METODO DE ROMPIMIENTO CELULAR.

Una vez que se estandarizó la concentración de isótopo a utilizar, ensayamos los diferentes métodos reportados para el rompimiento de la célula.

Probamos una serie de metodologías, de las cuales solamente el método de Abraham y Rood, y el de Qoronfleh y Streips modificado en nuestro laboratorio fueron los que mostraron resultados positivos. Sin embargo, en el primer método la muestra se diluyó mucho y se dificultaba concentrar debido a la gran cantidad de detergente utilizado. En el segundo método, la muestra proteínica se diluyó menos, además fue posible concentrarla para tener una cantidad adecuada de proteínas en los análisis.

c) ANALISIS DE LOS PERFRILES PROTEINICOS.

i) Células vegetativas.

Se realizó el análisis de las proteínas de las células incubadas a 43°C y sometidas a un choque térmico de 50 o de 52°C por 30 min y de las cultivadas a 37°C con un choque de 50°C por 30 min.

Como se verá mas adelante, los patrones proteínicos variaron dependiendo del método de solubilización celular usado.

Nuestros resultados indicaron que un choque térmico indujo la producción de PCHT en *C. perfringens*. Dicha respuesta fue similar cuando las células se incubaron a 37 o 43°C y recibieron los choque térmicos ya mencionados. Sin embargo, la síntesis de PCHT fue más marcada cuando las células se incubaron a 37°C y recibieron un choque de 50°C que cuando se incubaron a 43°C y se trataron a 50 o 52°C.

Utilizando el método de solubilización de Abraham y Rood, se demostró la inducción de al menos 5 proteínas como respuesta al choque térmico (Fig. 28). Los pesos moleculares para estos polipéptidos fueron de 101, 84, 79, 72 y 60 kDa. De estas, 4 (101, 84, 79 y 72 kDa) se produjeron en forma muy aumentada

Fig. 28. Autoradiografía de perfiles proteínicos de *C. perfringens*. Las células fueron incubadas a 37°C y sometidas a 50°C (A), control a 37°C (B). Células incubadas a 43°C y sometidas a un choque térmico de 50°C (C) y 52°C(D), control a 43°C (E). La migración y medidas (en kDa) de los estándares de proteínas se indican en el lado derecho. Las proteínas celulares fueron solubilizadas por el método de Abraham y Rood.

durante el choque térmico. En tanto que la de 60 kDa, mostró una inducción apenas apreciable.

Cuando las células fueron rotas por el método de Qoronfleh y Streips, se observó la inducción de 8 PCHT, cuyos pesos moleculares fueron 101, 84, 79, 72, 60, 37, 27 y 11 kDa (Fig. 29). Al igual que con el método de solubilización anterior las PCHT de 100, 84, 79, 72 kDa se produjeron en cantidades elevadas, en tanto que las otras (de 60, 37, 27 y 11 kDa) se indujeron en menor proporción.

ii) Células en medio de esporulación.

En estos experimentos las células se rompieron mediante el método de Quoronfleh y Streips. Encontramos que cuando el choque térmico se apilcó a la primera hora de incubación se detectaron 3 PCHT cuyos pesos moleculares fueron de 101, 79 y 72 kDa, en tanto que las células que recibieron el choque térmico a la tercera hora, se observaron 2 proteínas especialmente marcadas, la de 101 kDa y la de 84 kDa (Fig. 30).

LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS PCHT.

De acuerdo con el análisis de los patrones proteínicos de las fracciones de envoltura celular, citosol y sobrenadante del cultivo (Fig. 29) encontramos que las PCHT de 101, 84, 79, 72, 60, 27 se localizaron principalmente en la fracción membranal. Las PCHT de 79 y 60 kDa también se encontraron en la región citosólica, donde además se detectó la PCHT de 11 kDa. En el sobrenadante se detectó a la PCHT de 72 kDa y además en cantidades muy pequeñas a las PCHT de 84 y 79 kDa.

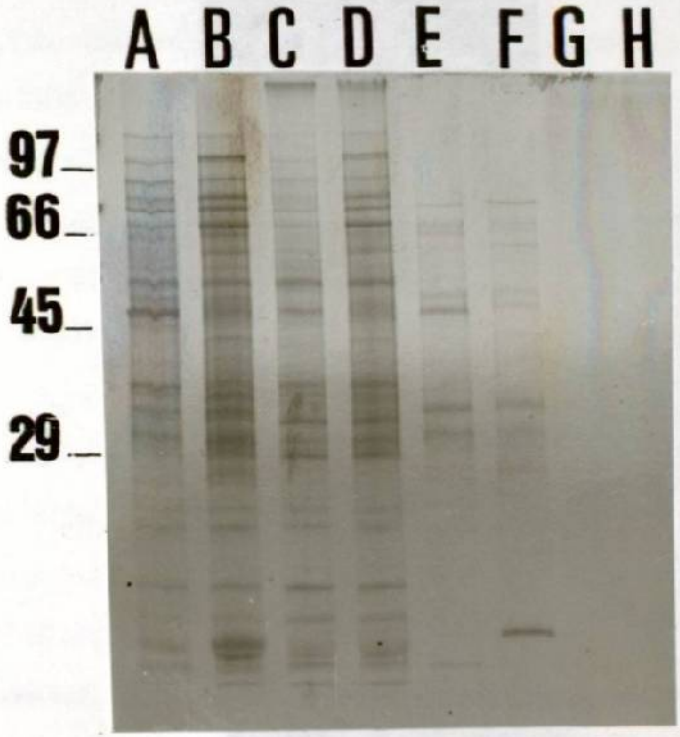


Fig. 29. Autoradiografía de perfiles proteínicos de *C. perfringes* cepa FD-1041. Proteínas totales incubadas a 37°C y sometidas a 50°C(A), control a 37°C(B). Fracción citosólica, control (C) y choque (D), los E y F, la fracción membranal, control (E) y choque (F) y el sobrenadante del control (G) y choque (H). La migración y medidas (en kDa) de los estándares de proteínas están indicados del lado izquierdo.

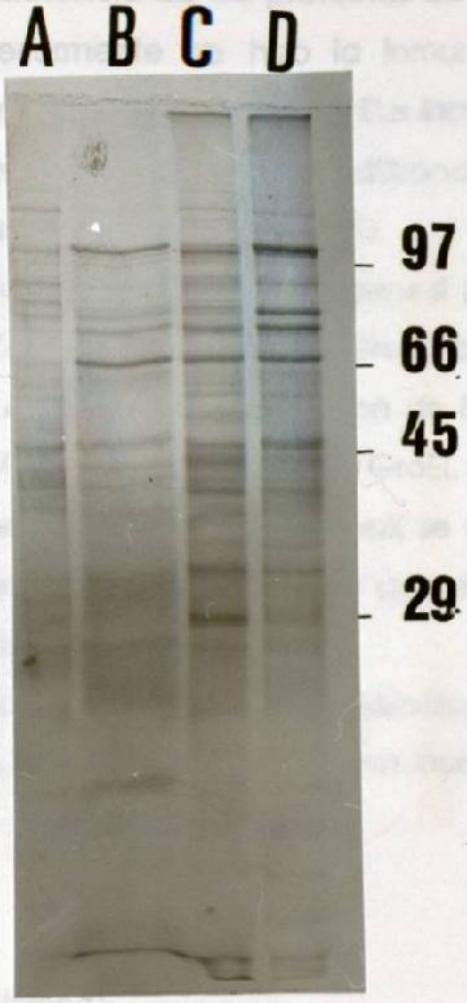


Fig. 30. Autoradiografía de perfiles proteínicos de *C. perfringens* FD-1041cultivada en un medio de esporulación (DS). Las células se incubaron a 43°C y se sometieron a 50°C a la primera (B), y tercera (D) hora de incubación; A y C representan a los controles respectivos. La migración y medidas (en kDa) de los estándares de proteínas están indicados del lado derecho.

DETERMINACION DE HOMOLOGOS DE DnaK y GroEL de *C. perfringens*.

a) Células vegetativas.

Se realizó la electrotransferencia de las proteínas de cultivos sometidos a un choque térmico, y posteriormente se hizo la inmunodetección de los homólogos utilizando suero anti DnaK de *Lactobacillus lactis* y anti GroEL de *E. coli*. Se realizaron experimentos separados utilizando cada suero y posteriormente se hizo una mezcla de ambos (Fig. 31).

Nuestros resultados indicaron que *C. perfringens* si produce homólogos de las proteínas DnaK de *Lactobacillus lactis* y GroEL de *E. coli*. Los pesos moleculares encontrados de estos homólogos fueron de 84 kDa para el caso del homólogo de DnaK y de 60 kDa en el caso de la GroEL (Tabla 7).

Se observó además que el homólogo de DnaK se sintetiza en grandes cantidades durante el periodo estresante, en tanto que el nivel de inducción del homólogo de GroEL es más bajo.

Cuando se estudió la localización de estos homólogos se observó que ambas se encontraban en las 3 fracciones, aunque en mucha mayor cantidad en la envoltura celular.

b) Células en medio de esporulación.

Se observó que en las células a las que se les aplicó el choque térmico a la primera hora de incubación, no se detectaron homólogos contra ninguna de las proteínas mencionadas, sin embargo, cuando el choque térmico se aplicó a la tercera hora encontramos una PCHT de 84 kDa que reaccionó contra la DnaK de *L. lactis*.

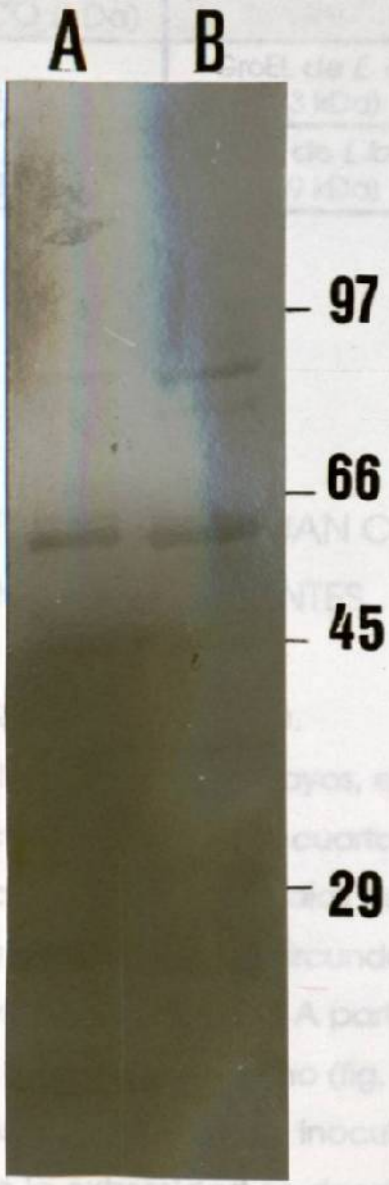


Fig. 31. Detección inmunológica de homólogos de DnaK de *L. lactis* y GroEL de *E. coli* en *C. perfringens* FD-1041. Para esta fotografía se utilizaron proteínas de células sometidas a un choque térmico de 50°C por 30 min (carril B). Control (carril A).

Tabla 7. Identificación inmunológica de homólogos de GroEL de *E. coli* y DnaK de *L. lactis* en *C. perfringens* FD-1041 .

PROTEINAS DE *C. perfringens*	PESO MOLECULAR ESTIMADO (kDa)	IDENTIDAD CON	NIVEL DE INDUCCION
Homólogo de GroEL	60	GroEL de *E. coli* (63 kDa)	+
Homólogo de DnaK	84	DnaK de *L.lactis* (69 kDa)	+++

\+ baja inducción
+++ alta inducción

DETERMINACION DE PCHT QUE ACTUAN COMO ANTIGENOS INMUNODOMINANTES.

a) INDUCCION DE UN CUADRO GANGRENOSO.

A los 3 días de la inoculación de los cobayos, estos mostraron un cuadro diarréico, sin embargo se recuperaron para el cuarto día. Además se observó inflamación en el área de inoculación. A los 7 días de inoculación se presentó una lesión purulenta en el mismo sitio. El área circundante presentaba un color negro y había licuefacción del tejido muscular. A partir de esta lesión se logró el aislamiento y confirmación del microorganismo (fig. 32).

En el caso de conejos, después de la inoculación pudimos detectar inflamación de los ganglios de la extremidad en donde se hizo la inoculación, y para los 7 días se presentó una lesión pequeña en esta región (Fig. 33). Se realizó el aislamiento e identificación de *C. perfringens* de la lesión, tal como se mencionó para el cobayo, corroborando que la lesión fue causada por la bacteria.

Fig. 32. Colonias típicas de *C. perfringens* aisladas de la lesión producida en cobayos después de la inoculación con la bacteria

b) DETERMINACION DE PCHT INMUNODOMINANTES.

Se realizó la inducción de las PCHT mediante la metodología ya mencionada. Posteriormente se rompieron las células y sus proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

La inmunodetección se realizó utilizando los sueros de los animales, tanto cuando no estaban inoculados (suero inicial) como después de la inoculación (suero final).

Fig. 33. Lesión producida por la inoculación de *C. perfringens* FD-1041en la extremidad posterior de un conejo. La fotografía fué tomada a las 2 semanas de la inoculación.

En el análisis de reactividad del suero de cobayo inicial (antes del inoculo con la bacteria) con las proteínas de *C. perfringens*, por medio de la inmunodetección se observó la presencia de bandas teñidas en el papel de nitrocelulosa. Se determinó que los pesos moleculares de dichas proteínas eran 194, 150, 133, 120, 84 y 60 kDa. (fig. 34). Se probó el suero inicial de 3 cobayos diferentes y en todos los casos, los sueros iniciales mostraron el mismo patrón de bandas.

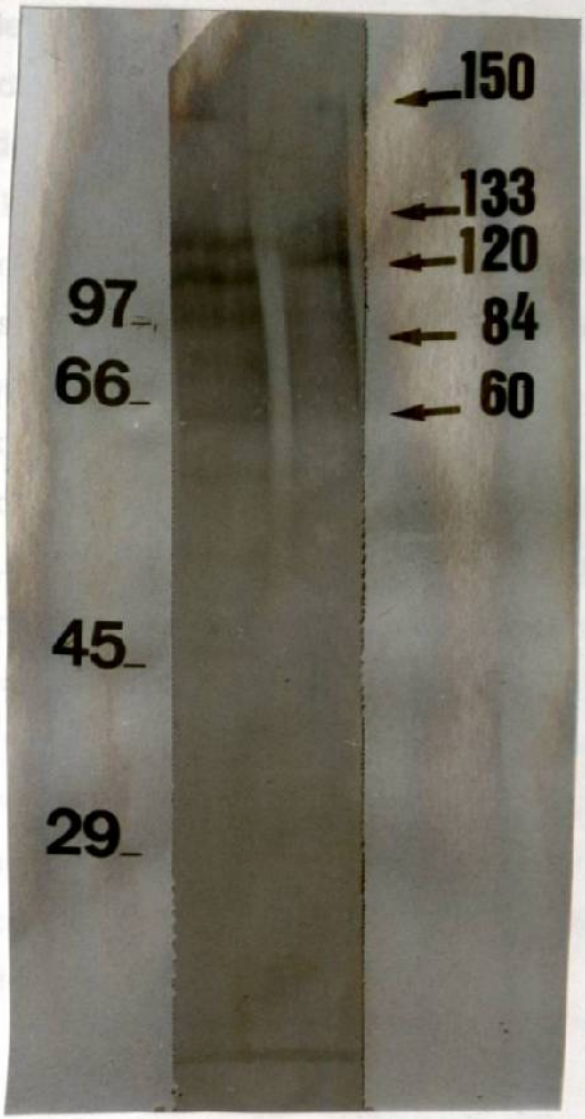


Fig. 34. Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens* utilizando suero de cobayo antes de ser inoculado con la bacteria. Carril (B) son proteínas de células sometidas a un choque térmico y (A) control.

Debido a que todos los cobayos se habían adquirido en el mismo lugar, pensamos que tal vez, en el criadero se habían expuesto al microorganismo anteriormente. Para descartar esa posibilidad se realizaron los experimentos utilizando animales adquiridos en otro criadero. Los resultados que obtuvimos fueron similares en todos los casos.

Para descartar la posibilidad de que esas proteínas se encontraran solo en organismos de la misma especie, los experimentos los realizamos también en conejos. Al probar el suero inicial de conejos obtuvimos resultados similares, en donde se detectaron proteínas con los mismos pesos moleculares de las observadas en los cobayos.

Cuando analizamos la reactividad de los sueros después de presentarse la gangrena se obtuvo una mayor cantidad de bandas y diferencias muy notorias entre los tratamientos (choque térmico) y los controles (Fig. 35 y 36).

Encontramos, tanto en los sueros de los cobayos (Fig. 35), como los de conejos (Fig. 36) una mayor reactividad con las proteínas de *C. perfringens*. En este caso se observaron diferencias entre los patrones de proteínas de la bacteria cuando fue sometida al choque térmico y los del control. Se encontraron 4 bandas (correspondientes a 101, 79, 60 y 37 kDa) cuya síntesis se incrementaba durante el choque térmico.

Fig. 35. Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens* utilizando suero de conejo después de ser inoculado con la bacteria. Carril (A) son proteínas de células sometidas a un choque térmico y (B) control.

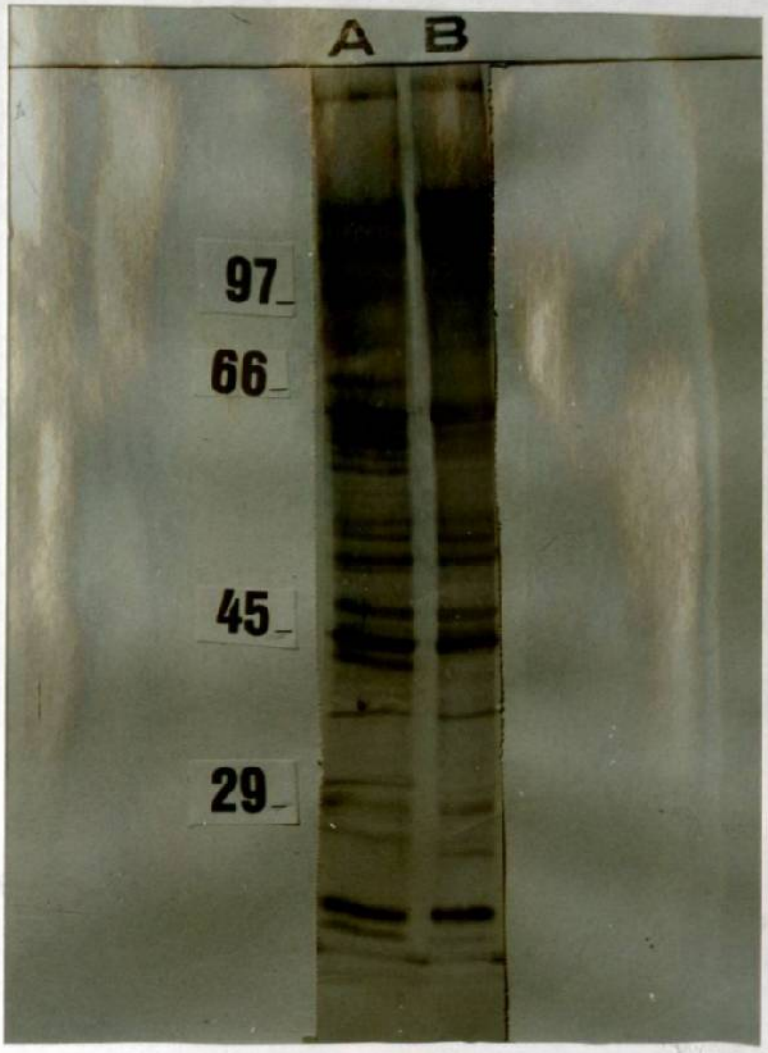


Fig. 36. Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens* utilizando suero de cobayo después de ser inoculado con la bacteria. Carril (B) son proteínas de células sometidas a un choque térmico y (A) control.

Fig. 37. Localización subcelular de PCHT inmunodominantes de *C. perfringens* FD-1041. Proteínas de la región citosólica sin tratamiento (A) y con el choque térmico (B); de la envoltura celular sin tratamiento (C) y con choque térmico (D) ; sobrenadantes del cultivo sin tratamiento (E) y con choque térmico (F).

Cuando analizamos la localización subcelular de dichos antígenos inmunodominantes, encontramos que la de 101 kDa se localizó en membranas. Las PCHT de 60 y 79 se localizaron tanto en membrana, como en citosol y en el sobrenadante. La PCHT de 37 kDa se localizó solo en citosol (Fig. 37).

DISCUSION

Esta investigación fue realizada utilizando dos temperaturas de incubación, ya que ambas las consideramos de gran importancia, una de ellas, la óptima del microorganismo, es decir 43°C y la otra, del cuerpo humano (37°C), lugar donde la bacteria causa una serie de patologías ya mencionadas.

En este trabajo encontramos que un choque térmico provoca una serie de alteraciones en este microorganismo. Estos cambios se presentaron en muchos niveles: desde alteraciones en el crecimiento, en la producción de factores de patogenicidad, en la capacidad de sobrevivencia, y en la producción de proteínas y de antígenos inmunodominantes.

Durante los experimentos para la determinación de las condiciones idóneas del choque térmico encontramos que cuando las células vegetativas se incubaban a 43°C y el choque térmico era de 50° o 52°C por 30 min, se presentaba una disminución en la viabilidad celular, sin embargo, tiempo después la población se incrementaba hasta alcanzar niveles semejantes a los del control. Esto mismo se observó cuando las células se incubaron a 37°C y recibieron un choque térmico de 50°C por 30 min.

En el caso de las células cultivadas en medio de esporulación, se obtenía también una disminución del crecimiento inmediatamente después del choque térmico y posteriormente las células se recuperaban. Este experimento se realizó debido a que se ha reportado que el medio en donde se encuentren las células puede influir en la respuesta al choque (Gage, D.J. y F.C. Neidhardt, 1993), sin embargo la respuesta de crecimiento observada fue similar al de las células vegetativas.

Se ha sugerido que la disminución del crecimiento observada se puede deber, por un lado a la muerte de algunas células, y por el otro, a una

reducción del nivel de síntesis de proteínas normales en las células sobrevivientes (Morimoto, R.I *et al.*, 1990). Se sabe que durante este intervalo se sintetizan casi exclusivamente las PCHT, y aunque estas tienen una gran cantidad de funciones, tanto en condiciones normales como en época de estés, no se ha reportado que ellas sean suficientes para dar inicio a ciclos celulares nuevos. De todas las PCHT caracterizadas solamente a la DnaK se ha involucrado en la iniciación de la síntesis de DNA (Hupp, T.R., *et al.*, 1990).

Debido a las enfermedades que causa este organismo, consideramos de gran importancia estudiar el efecto de este estrés sobre algunos factores de patogenicidad como son las esporas y las toxinas más importantes.

Cuando estudiamos el efecto de un choque térmico sobre la esporulación de la bacteria encontramos resultados muy interesantes. Observamos que un choque térmico aplicado en las primeras horas de incubación provocaba un retraso en la aparición de esporas, o una disminución en su número. Cuando el choque térmico se dio en tiempos posteriores no se observó efecto alguno en las células sometidas al tratamiento térmico.

Se ha establecido que el proceso de esporulación consiste en una secuencia de etapas (específicamente 7), en donde los primeros estadios son reversibles, pero a partir del estadio 3 el proceso se vuelve irreversible (Moat, A.G. y J.W. Foster, 1988). Es probable que durante las primeras horas en que aplicamos el choque térmico el proceso de esporulación no se había iniciado o se encontraba en algún estadio reversible ya que así se ha reportado en la literatura, además que en observaciones al microscopio electónico no se observó ningún indicio de esporulación, por lo que suponemos que el tratamiento térmico provocó un retraso en la aparición de esporas. Cuando el tratamiento fue en horas posteriores (cuando presumiblemente el proceso de esporulación ya se había iniciado en la mayoría de las células) no detectamos ningún efecto cuando lo comparamos con el control.

En nuestro trabajo incluimos el estudio del efecto de un choque térmico sobre la producción de dos de las toxinas más importantes de bacteria que causan problemas en humanos: la enterotoxina y la fosfolipasa C. La primera es la responsable de una serie de patologías a nivel intestinal, de las cuales la intoxicación alimentaria es la más frecuente (Labbé, R.G., 1991) y la fosfolipasa C una de las principales responsables de los daños celulares provocados en la gangrena gaseosa (Malloy, R. *et al.*, 1976).

Cuando estudiamos el efecto de los tratamientos térmicos sobre la producción de enterotoxina encontramos que este era dependiente de la hora en que se aplicaba dicho tratamiento. Por un lado, cuando el choque térmico se aplicó a la primera hora de incubación se produjo un retraso en la aparición de esta toxina, sin embargo, no se detectó alteración en la cantidad final producida.

Desde hace tiempo se ha establecido una relación muy estrecha entre el proceso de esporulación y la producción de enterotoxina, incluso se ha establecido que la enterotoxina es el producto de uno de los genes específicos de la esporulación (Duncan, C.L., *et al.*, 1972). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con esa aseveración, debido a que tanto el proceso de esporulación como el de la producción de enterotoxina se retrasaron cuando el choque térmico se aplicó en las primeras horas de incubación. Además, cuando el choque térmico se aplicó a la tercera hora, la producción de enterotoxina no se retrasó, sin embargo, la cantidad de esta fue menor que la producida por las células control. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en la esporulación, observamos que también la cantidad de esporas se diminuyó en este tiempo.

Pensamos que el efecto de retraso observado tanto en la esporulación como en la producción de enterotoxina se puede deber a 1) que el choque térmico provocó que la célula disminuyera su tasa de multiplicación durante el periodo de estrés, 2) que durante la condición de estrés la síntesis de proteínas

se vio afectada, o 3) que el choque térmico hubiera provocado algun daño celular. Posteriormente cuando el tratamiento estresante cesó, la maquinaria biosintética volvió a la normalidad, o la síntesis de proteínas se reactivó o la reparación de la célula se completó, sin embargo, esto trajo como consecuencia un retraso en el proceso global.

Para estudiar el efecto de un choque térmico sobre la producción de fosfolipasa C utilizamos dos medios de cultivo, entre ellos el caldo con tioglicolato. Sin embargo no se detectó actividad de fosfolipasa durante el cultivo. Esto es comprensible ya que se ha reportado que la síntesis de esta toxina se ve disminuida grandemente en medios que contengan grandes cantidades de carbohidratos (mayor de 0.5%), y que el tioglicolato de sodio también inhibe su producción (Smith, L.D. y B.L. Williams, 1975). Ambos compuestos son constituyentes de este medio de cultivo.

Otro medio utilizado, el infusión de cerebro y corazón produjo buenos resultados. En este observamos que un choque térmico también influye en la producción de esta toxina ocasionando un retraso en su aparición, sin embargo la cantidad de ella no se vio afectada. Suponemos que quizá este efecto se deba a las mismas causas descritas anteriormente.

El proceso de adquisición de termotolerancia tiene un impacto muy grande en el control sanitario de alimentos. Se ha observado que choque térmico provoca resistencia a temperaturas normalmente letales para las células. Muchos de los procesos de control sanitario utilizan la temperatura y durante su preparación el alimento recibió un choque térmico, esto pudiera conferirle resistencia a los procesos de control a que se someterá posteriormente (Iandolo, J.J. y Z.J. Orda, 1966). Tomando en cuenta que *C perfringens* es un patógeno de alimentos, el estudio de aquellos factores que pudieran favorecer la sobrevivencia de la bacteria resultaba muy interesante. En este trabajo encontramos que en células tanto vegetativas como en los primeros estadíos de la esporulación, un choque térmico inducía la adquisición

de termotolerancia de las células o las esporas. Además que en células vegetativas esta tolerancia al calor se mantenía alrededor de 2 h. Estos hallazgos son importantes si tomamos en cuenta que el calor es el principal factor de control microbiano en alimentos.

Al estudiar la síntesis de proteínas durante el choque térmico, fue necesario estandarizar una serie de metodologías. La mayoría de los investigadores ha utilizado para este tipo de experimentos, a la S^{35}-metionina como el marcador de polipéptidos. Nosotros pensamos que las utilización de una mezcla de aminoácidos (S^{35}-metionina y S^{35}-cisteina 85:15) nos daría una señal más fuerte, ya que serían dos los aminoácidos que podrían ser integrados en las proteínas al competir con los existentes en el medio de cultivo. La concentración de isótopo utilizada por otros investigadores en experimentos similares ha sido muy variable, por lo que fue necesario determinar la cantidad adecuada en nuestro caso. La concentración que utilizamos (100µCi/ml) fue alta en comparación con la mayoría de los reportes. Creemos que eso se debió a que el microorganismo se encontraba creciendo en un medio muy rico (caldo con tioglicolato), el cual contienía grandes cantidades de peptonas, por lo que los aminoácidos marcados tuvieron que competir con los del medio.

Posteriormente fue necesario encontrar un método adecuado para lograr el rompimiento y solubilización celular. Está reportado que esta bacteria requiere de tratamientos severos para lograr su lisis (Labbé, R.G., 1992). De los 6 métodos ensayados, solo 2 produjeron resultados satisfactorios.

Cuando estudiamos los perfiles de proteínas en células vegetativas encontramos que había diferencias en la cantidad de PCHT dependiendo del método de rompimiento utilizado. Cuando se utilizó el método de Abraham y Rood solo se pudo detectar con claridad la presencia de 5 PCHT, 4 de las cuales se sintetizaban en grandes cantidades y una en forma escasa. Sin embargo utilizando el método de Quoronfleh y Streips fue posible detectar 8

PCHT,. Aquí también se observaron las mismas proteínas que en el método anterior, pero además otras 3 que se sintetizaron en bajas concentraciones. Esta diferencia pensamos que se debió a que al utilizar el método de Abraham y Rood se diluyó mucho la muestra y no fue posible concentrarla debido a la gran cantidad de detergente y lisozima, en tanto que con el otro método la muestra si se concentró, por lo que las proteínas que se encontraban en muy bajas concentraciones, pudieron ser detectadas. Además probablemente se pudo producir algún tipo de daño de las proteínas por alguno de los componentes del método de Abraham, por lo que estas proteínas se desnaturalizaron y no pudieron ser detectadas.

Una característica interesante es que el número de las PCHT inducidas fue similar cuando el choque fue de 43° a 50° o 52°C, que cuando fue de 37° a 50°C; sin embargo la síntesis fue mayor en esta última. Pensamos que eso ocurrió debido a que las condiciones estresantes fueron más severas, por lo que la respuesta fue mayor.

Cuando estudiamos la localización subcelular de estas PCHT encontramos que se ubican principalmente en la envoltura celular (6 PCHT), en menos proporción en citosol (2PCHT) y en sobrenadante (3 PCHT). Esto concuerda con varios reportes que indican que muchas PCHT se encuentran ligadas a membrana y algunas han sido relacionadas con exportación de proteínas (Schlesinger, M.J., 1988).

Cuando la respuesta al choque térmico se estudió en células en esporulación encontramos una menor cantidad de PCHT. Cuando el tratamiento térmico se aplicó a la primera hora de incubación, en donde presumiblemente solo había células vegetativas, pudimos detectar 3 PCHT cuyos pesos moleculares correspondieron a 3 de las principales producidas en el crecimiento vegetativo.

Por otra parte cuando el choque térmico se efectuó a las 3 horas de incubación, es decir cuando la mayoría de las células ya habían iniciado el

proceso de esporulación, solo se detectaron 2 proteínas, una de las cuales se encontró cuando el choque fue a la primera hora. Estos experimentos podrían apoyar los trabajos realizados por Todd *et al* (1985) con *B. subtilis.* Ellos establecieron que la respuesta al choque térmico se incrementaba en los estadios tempranos de la esporulación, pero al parecer no jugaban un papel muy importante durante el proceso en sí.

Debido a la gran importancia de las PCHT GroEL y DnaK, pensamos que la búsqueda de sus homólogos en *C. perfringens* sería de gran interés. Cuando realizamos nuestros ensayos, tanto en el caso de DnaK como de GroEL, detectamos varias proteínas homólogas, sin embargo, una se sintetizaba principalmente. Establecimos que el homólogo principal de la DnaK de *L. lactis* mostró un peso molecular de 84 kDa. Además encontramos que el homólogo principal de GroEL de *E. coli* fue de 60 kDa.

Algunos autores han reportado la presencia de varios homólogos de estas proteínas de diferente peso molecular y localización en la célula (Lerna, M.W. y A. Brown, 1995; Engel, J.N. *et al.*, 1990; Wallington, E.J .y P.A. Lund, 1994; etc). Se ha sugerido que estas proteínas pueden ser un producto degradado o una forma modificada (Engel, J.N., *et al.*, 1990). Otros autores han sugerido que puede ocurrir una asociación funcional de estas proteínas o a la existencia de epítiopes conservados en varias proteínas, los cuales son reconocidos por el antisuero (Boutibonnes, P. *et al.*, 1993).

Cuando analizamos la presencia de estos homólogos en células en esporulación, encontramos que solo el homólogo de DnaK de *L. lactis* se detectó en los cultivos a los que se les aplicó el choque térmico a las 3 h. Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Tood *et al* (1985) quienes detectaron la presencia de la PCHT DnaK solamente en los estadíos tardíos del proceso de esporulación.

Cuando estudiamos la localización subcelular de estos homólogos establecimos que se encuentran principalmente en membrana, lo cual

concuerda con la localización reportada por algunos autores para estos homólogos (Lema, M.W. y A. Brown, 1995; Bukau, B., *et al.*, 1993).

Muchos grupos de investigadores están buscando PCHT inmunogénicas comunes en organismos patógenos que difieran de las del hombre a fin de elaborar la "Vacuna del futuro". Para el análisis de las PCHT inmunodominantes de *C. perfringens* en un cuadro de gangrena gaseosa primero indujimos la enfermedad en conejos y cobayos. Esta se presentó alrededor de una semana después de la inoculación, produciéndose un cuadro local

Se obtuvo suero dos semanas después de la inoculación, ya que se ha reportado que a este tiempo, la respuesta inmune está compuesta principalmente por IgG (Rose, N.R., *et al.*, 1986).

La inmunodetección de las PCHT arrojó resultados inesperados debido a que los sueros iniciales de los cobayos (no inoculados) mostraron reactividad en contra de algunas proteínas de *C. perfringens,* aunque aparentemente nunca habían estado en contacto con la bacteria. Para descartar algún problema de contaminación que tuviera el criadero en donde adquirimos a los animales, analizamos cobayos de otros lugares y encontramos la misma respuesta anterior. Otra posibilidad que nos explicara los resultados obtenidos estaba en el conjugado utilizado. Pensamos que posiblemente el proceso de purificación de este reactivo no había sido muy bueno, por lo que se podían dar reacciones inespecíficas.

Para descartar esta posibilidad realizamos los experimentos utilizando conejos. Sorprendentemente cuando el análisis lo realizamos usando el animal nunca inoculado y utilizando otro conjugado específico para este animal, encontramos las mismas proteínas que obtuvimos cuando analizábamos a los cobayos no inoculados. De acuerdo a todo esto podemos suponer que existen reacciones inespecíficas al probar esta técnica.

Por otra parte, cuando analizamos suero de animales enfermos encontramos patrones de proteínas diferentes a los de los animales sanos y a

los controles. Se observó que *C. perfringens* produce al menos 3 PCHT que pueden actuar como antígenos inmunodominantes, 3 de las cuales se localizan en la envoltura celular y una en citosol.

Se ha reportado que las principales PCHT inmunogénicas pertenecen a la familia de los 60, 70 o 90 kDa. Sin embargo, en *Mycobacterium tuberculosis* se han encontrado algunas PCHT de bajo peso molecular que son inmunodominantes (Jaattela, M. y D. Wissing, 1992). Las proteínas inmunodominantes encontradas tuvieron un peso molecular de 101, 79, 60 y 37 kDa. Nuestros resultados concordaron con esto, ya que fue posible encontrar PCHT de la familia de los 70 y 60 kDa y de bajo peso molecular (37 kDa).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos aceptamos la hipótesis propuesta, ya que se determinó que *C. perfringens* responde a un choque térmico induciendo la síntesis de PCHT, provocando alteraciones en la producción de fosfolipasa C y enterotoxina y produciendo tolerancia al calor.

De acuerdo a las condiciones en que realizamos los experimentos concluimos que:

1.- Los choques térmicos de 43° a 50° o 52°C y de 37° a 50°C provocan un daño subletal en la célula.

2.- Un choque térmico aplicado en las primeras horas de incubación provoca la disminución y el retraso en la aparición de esporas.

3.- Un choque térmico aplicado en las primeras horas de incubacón provoca el retraso y la disminución de enterotoxina.

4.- Un choque térmico produce un retraso en la detección de actividad de fosfolipasa C.

5.- Un choque térmico aplicado en las primeras horas de incubación provoca la producción de esporas más termotolerantes.

6.- Las células vegetativas adquirieron tolerancia al calor como resultado de un choque térmico. Este efecto se mantuvo al menos por 2 h.

7.- Las células vegetativas de *C. perfringens* responden a un choque térmico mediante la inducción de 8 PCHT (101, 84, 79, 72, 60, 37, 27 y 11 kDa), la mayoría de las cuales se localizan en la envoltura celular.

8.- Las células en un medio de esporulación producen las PCHT de 101, 84, 79 y 72 kDa como respuesta al choque térmico.

9.- Las células vegetativas de *C. perfringens* producen un homólogo de GroEL de *E. coli* con un peso molecular de 60 kDa. El homólogo de la DnaK de *L. lactis* tiene un peso molecular de 84 kDa. Ambas se localizan principalmente en la envoltura celular.

10.- Solo se detectó el homólogo de la PCHT DnaK en las células en esporulación.

11.- Al inducir un cuadro de gangrena gaseosa se identificaron 4 PCHT inmunodominantes cuyos pesos moleculares fueron 101, 79, 60 y 37 kDa.

PERSPECTIVAS SOBRE FUTURAS INVESTIGACIONES EN EL TEMA

a) Se sabe que el calor es un método rutinario en el control sanitario de los alimentos. En este trabajo se demostró que tanto las células vegetativas como esporas al ser sometidas a un choque térmico subletal adquieren termotolerancia. Sería interesante determinar si este mismo efecto se produce también en los alimentos, en donde pueden influir otros factores, tales como cantidad de agua, naturaleza y composición del alimento y flora microbiana existente.

b) En algunos microorganismos se ha demostrado que un choque térmico provoca adquisición de tolerancia a otras condiciones estresantes, tales como salinidad y acidéz, entre otras, llamándosele a este efecto "respuesta cruzada". Tomando en cuenta que *C. perfringens* es un patógeno que puede estar sometido constantemente a esas condiciones de estrés, sería de interés determinar si ese efecto ocurre en este microorganismo a fin de entender más sobre la patogénesis de la bacteria.

c) Para producir la intoxicacion alimentaria, la bacteria en el alimento debe sobrevir la exposición al aire, asi como al entorno ácido del estómago, para después llegar al intestino donde produce la enterotoxina y causa la enfermedad. Pensamos que sería de mucha importancia caracterizar la respuesta al choque ácido, así como al choque aeróbico a fin de entender como es que el microorganismo sobrevive en estos ambientes.

d) Ya que en este trabajo se determinó que *C. perfringens* responde a un choque térmico induciendo la síntesis de PCHT, sería interesante purificar y secuenciar dichas proteínas y así poder determinar si existe homología funcional con las PCHT producidas por otros microorganismos. Así también sería importante la identificación de los factores que regulan la síntesis de estas PCHT a fin de entender mejor esta respuesta.

e) En este trabajo se indujo un cuadro gangrenoso en conejos y cobayos y determinamos que *C. perfringens* produce 4 PCHT inmunodominantes, sin embargo, consideramos que sería importante determinar si estas mismas PCHT son producidas en humanos enfermos de gangrena gaseosa. Por otra parte, el establecer si estas proteínas confieren inmunidad contra la infección por la bacteria, podría dar herramientas valiosas para el control de las enfermedades que produce.

LITERATURA CITADA

Abraham, J.L. and J.I. Rood. 1985. Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 161: 636-640

Arnosti, D.N., V.L. Singer and M.J. Chamberlin. 1986. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 168: 1243-1249

Auffray, Y., X. Gansel, B. Thammavogs and P. Boutibonnes. 1992. Heat shock-induced protein synthesis in *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. Curr. Microbiol. 24: 281-284

Auffray, Y., E. Lecesne, A. Hartke and P. Boutibonnes. 1995. Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. Curr. Microbiol. 30: 87-91

Bardwell, J.C.A. and E.A. Craig. 1984. Mayor heat shock gene of *Drosophilla* y the *Escherichia coli* inducible *dnaK* gene are homologous. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 848-852

Begonia, G.B. and M.L. Salin. 1991. Elevation of superoxide dismutase in *Halobacterium halobium* by heat shock. J. Bacteriol. 173: 5582

Berg, G.R., W.E. Inniss and J.J. Heikkila. 1987. Stress proteins and thermotolerance in psychrotrophic yeasts from arctic environments. Can. J. Microbiol. 33: 383-389

Blondin, P.A., R.J. Kirby and S.R. Barnum. 1993. The heat shock response and acquired thermotolerance in three strains of Cyanobacteria. Curr. Microbiol. 26: 79-84

Borriello, S.P., P.E. Barclay, A.R. Welch, M.F. Stringer, G.N. Watson, R.N. Williams, D.V. Seal and K. Sullens. 1985. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. J. Med. Microbiol. 20: 363-366

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

Bosch, T.C.G., S.M. Krylow, R. Bodeh and E. Steeler. 1988. Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenwata* but absent in *Hydra oligactis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 7927-7931

Boutibonnes, P., V. Bisson, B. Thammavongs, A. Hartke, J.M. Panoff, A. Benachour and Y. Auffray. 1995. Induction of thermotolerance by chemical agents in *Lacotococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. Int. J. Food. Microbiol. 25: 83-94

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

Brown, T.J., J. Jardine and C.A. Ison. 1993. Antibodies directed against *Haemophilus ducrey* heat shock proteins. Microbiol. Pathog. 15: 131-139

Bukau, B., P. Reilly, J. McCarty and G.C. Walker. 1993. Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. J. Gen Microbiol. 139: 95-99

Bunning, V.K., R.G. Crawford, J.T. Tierney and J.T. Peeler. 1990. Thermotholerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3216-3219

Centers for Disease Control. Foodborne disease outbreaks, 5 year suamry, 1983-1987. *In* CDC Surveillance Summaries, March 1990. MMWR 1990. 39(SS-1): 15-57

Cohen, I.R. 1991. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. Annu. Rev. Immunol. 9: 567-589

Conway de Macario, E. and J.L. Macario. 1994. Heat-shock response in Archaea. Tib. Tech. 12: 512-518

Craven, S.E., I. Blankenship and J.L. Donel. 1981. Relationship of sporulation, enterotoxin formation and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type A in cooked chicken. Appl. Environ. Microbiol. 41: 1184-1187

De Pieri, L.A. and I.K. Ludlow. 1992. Relationship between *Bacillus sphaericus* spore heat resistance and sporulation temperature. Lett. Appl. Microbiol. 14:121-124

Dean, D.O. and R. James. 1991. Identification of a gene, closely linked to DnaK, which is required for high-temperature growth of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 137: 1271-1277

Duncan, C.L. and D.H. Strong. 1969. Experimental production of diarrhoea in rabbits with *Clostridium perfringens.* Can J. Microbiol. 15: 765-770

Engel, J.N., J. Pollack, E. Perara and D. Ganem. 1990. Heat shock response of murine *Chlamydia trachomatis.* J. Bacteriol. 172: 6959-6972

Ensgraber, M. and M. Loos. 1992. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. Infect. Immun. 60: 3072-3078

Eschweiler, B., B. Bohrmann, B. Gerstenecker, E. Schiltz and M. Kist. 1993. In situ localization of the 60 K protein of *Helicobacter pylori,* which belongs to the family of heat shock proteins, by immuno-electron microscopy. Zbl. Bakt. 280: 73-85

Etoa, F.X. and L. Michielis. 1988. Heat-induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. Lett. Appl. Microbiol. 6: 43-45

Farber, J.M. and B.E. Brown. 1990. Effect of a prior heat shock an heat resistence of *Listeria monocytogenes* in meat. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1584-1587

Farr, S.B. and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella thipimurium.* Microbiol. Rev. 55: 561-572

Freese, E.B., N. Vasantha and E. Freese. 1979. Induction of sporulation in developmental mutants of *Bacillus subtilis.* Mol. Gen. Genet. 170: 67-68

Frieben, W. and C.L. Duncan. 1975. Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. Eur. J. Biochem. 39: 393-401

Gage, D.J. and F.C. Neidhardt. 1993. Modulation of the heat shock response by one-carbon metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175: 1961-1970

García-Alvarado, J.S., R.G. Labbé and M.A. Rodríguez. 1992. Sporulation and enterotoxin production of *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43C. Appl. Environ. Microbiol. 58:1411-1414

Garcia-Alvarado, J.S., M.A. Rodriguez and R.G. Labbe. 1992. Influence elevated temperature on starch hydrolysis by enterotoxin positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbial. 58: 326-330

Gerhardt, P. and R.E. Marquis. 1989. Spore thetmoresistence mechanisms, p. 17-50. *In* Smith, I., R. Slepecky and P. Setlow (Ed). Regulation of procaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Goldner, S.B., M. Solberg, S. Jones and L.S. Post. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 52: 407-412

Granum, P.E. and O. Harbitz. 1984. A circular-dichroism study of the enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. J. Food. Biochem. 9: 137-146

Guglielmi, G. , P. Mazodier, C.J. Thompson and J. Davies. 1991. A survey of the heat shock response in four Streptomyces species reveals two GroEL-like genes and three GroEL-like proteins in *Streptomyces albus*. J. Bacteriol. 3: 7374-7381

Hames, B.D. 1981. An introductionto polyacrylamide gel electrophoresis, p. 1-91. *In* Hames, B.D. and D. Rickwood (Ed). Gel electrophoresis of proteins. IRL Press. Oxford. Washington, D.C.

Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N.Y. pp. 636-652

Hatheway, C.L. 1990. Toxigenic clostridia. Clin. Microbiol. Rev. 3: 66-98

Hatheway, C.L., D.N. Whaley and V.R. Dowell. 1980. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. Food Technol. 34(4): 77-79

Hemmingsen, S.M., C. Woolford, S.M. van der Vies, K. Tilly, D.T. Dennis, C.P. Georgopoulos, R.W. Hendrix and R.J. Ellis. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 33: 330-334

Heredia, N.L., R.G. Labbe, M.A. Rodriguez, and J.S. Garcia-Alvarado. 1991. Growth, sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A in the presence of bile salts. FEMS Microbiol. Lett. 84: 15-22

Heredia, N.L., J.S. García-Alavardo and R.G. Labbé. 1994. Improved rapid method for production and purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Microbiol. Methods. 20: 87-91

Herendeen, S.L., R.A. VanBogelen and F.C. Neidhahrdt. 1979. Levels of majors proteins of *E. coli* during growth at different temperatures. J. Bacteriol. 139: 185-194

Heyde, M. and R. Portailer. 1990. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 69: 19-22

Hoeninger, J.F., P.E. Stuart and S.C. Holt. 1968. Cytology of spore formation in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 96(5): 1818-1834

Holland, K.T., J.S. Knapp and J.G. Shoesmith. 1987. Anaerobic bacteria. Chapman and Hall Publishers, New York. pp. 154-158

Humphrey, T.J., N.P. Richardson, A.H.L. Gawler and M.J. Allen. 1991. Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4: the influence of prior exposure to alkaline conditions. Lett. Appl. Microbiol. 12: 258-260

Hupp, T.R., J.D. Keasling, S. Cooper and J.M. Kaguni. 1994. Synthesis of DnaK protein during the division cycle of *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 145: 99-109

Iandolo, J.J. and Z.J. Ordal. 1966. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 91: 134-142

Jaattela, M. and D. Wissing. 1992. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. Ann. Med. 24: 249-258

Jolivet-Reynaud, C., H. Moreau and J.E. Alouf. 1988. Assay methods for alpha toxin from *Clostridium perfringens*: Phospholipase C, p. 293-298. *In* Harshman, S.

(Ed). Methods in Enzynology. Volume 165, Microbial Toxins: Tools in Enzymology. Academic Press, Inc. San Diego, California

Khandekar, S.S., B.M. Bettencourt, K.C. Kelley and M.A. Recny.-1993. A simple and rapid method for the purification of GroEL, an *Escherichia coli* homolog of the heat shock protein 60 family of molecular chaperinins. Prot. Expression and Purification. 4: 580-584

Kaufman, S.H., B. Schoel, A. Wand-Wurttenburger, U. Steinhoff, M.E. Munk and T. Koga. 1990. T-cells, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 155: 125-141

Khoury, P.H., S.J. Lombardi and R.A. Slepecky. 1987. Perturbation of the heat resistence of bacterial spores by sporulation temperature and ethanol. Curr. Microbiol. 15: 15-18

Khoury, P.H., M.W. Qoronfleh, U.N. Streips and R.A. Slepecky. 1990. Altered heat resistance in spores and vegetative cells of a mutant from *Bacillus subtilis*. Curr. Microbiol. 21: 249-253

Koishi, M., N. Hosokawa, M. Sato, A. Nakai, K. Hirayoshi, M. Hiraoka, M. Abe and K. Nagata. 1992. Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. Jpn. J. Cancer Res. 83: 1216-1222

Kostyal, D.A., M. Farrell, A. McCabe, Z. Mei and W. Firshein. 1989. Replication of an RK2 miniplasmid derivative *in vitro* by a DNA/membrane complex extracted from *Escherichia coli*: involvement of the *dnaK* but not *dnaK* host proteins and

association of these and plasmid-encoded proteins with inner membrane. Plasmid 21: 226-237

Krug, E.L. and C. Kent. 1984. Phospholipase C from *Clostridium perfringens*. Preparation and characterization of homogeneous enzyme. Arch Biochem. Biophys. 231: 400-410

Kumate, J. and A. Isibasi. 1986. Pediatric diarrhoeal diseases: a global perspective. Pediatric Infect. Dis. 5: S 21

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

Labbé, R.G. 1991. *Clostridium perfringens*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 711-718

Labbé, R.G. and C.L. Duncan. 1977. Evidence for stable messenger ribonucleic acid during sporulation and enterotoxin synthesis by *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol. 129: 843-848

Labbé, R.G. and L.L. Nolan. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. Infect. Immun. 34: 50-54

Labbé, R.G. and L.L. Nolan. 1987. Inhibition of macromolecular synthesis by caffeine in *Clostridium perfringens*. Can. J. Microbiol. 33: 589-592

Larson, H.E. and S.P. Borriello. 1988. Infectious diarrhoea due to *Clostridium perfringens*. J. Infec. Dis. 157: 390-391

Laszlo, A. 1988. The relationship of heat shock proteins, thermotolerance, and protein synthesis. Exp. Cell. Res. 178: 401-414

Lechowich, R.V. and Z.J. Ordal. 1962. The influence of the sporulation temperature on the heat resistence and chemical composition of bacterial spores. Can. J. Microbiol. 8: 287-291

Lema, M.W. and A. Brown. 1995. *Legionella pneumophila* has two 60-kilodalton heat-shock proteins. Curr. Microbiol. 31: 332-335

Li, G.C. and Z. Werb. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 3218-3222

Lin, J., G. Adams and T.A. Ficht. 1992. Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. Infect. Immun. 60: 2425-2431

Lopes Gomes, S., M.E. Juliani, J.C.C. Maia and L.M. Silva. 1986. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 168: 923-930

Mackey, B.M and C.M. Derrick. 1986. Elevation of the heat resistence of *Salmonella thypimurium* by sublethal heat shock. Lett. Appl. Bacteriol. 61: 389-393

Mackey, B.M and C.M. Derrick. 1987. The effect of prior heat shock on the thermoresistence of *Salmonella thompson* in foods. Lett. Appl. Microbiol. 5: 115-118

Matches, J.R., J. Liston and D. Curran. 1974. *Clostridium perfringens* in the environment. Appl. Microbiol. 28: 655-660

Mazodier, P., G. Guglielmi, J. Davies and C.J. Thompson. 1991.Characterization of the groEl-like genes in *Streptomyces albus*. J. Bacteriol. 173: 7382-7386

McClane, B.A., P.C. Hanna and A.P. Wnek. 1988. Mini-rewiev. *Clostridium perfringens* enterotoxin. Microbial Pathogenesis. 4: 317-323

McDonel, J.L. 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* type A, B, C, D, and E, *p. 477-517. In* Dorner, F. and H. Drews (Ed). Pharmacology of bacterial toxins. Oxford: Pergamon Press, London

Meduski, J.W. and P. Hochstein. 1976. Hot-cold hemolysis:The role of positively charged membrane phospholipids. Experientia 28: 565-566

Mendelstman, J., K. McQuillen and I. Dawes (Eds). 1980. Biochemistry of bacterial growth. 3th Ed. John Wiley & Sons, Baltimore. pp. 355-378

Mitani, T., J.E. Henize and E. Freese. 1977. Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin. Biochem. Biophis. Res. Commun. 77: 1118-1125

Moat, A.G. and J.W. Foster. 1988. Microbial physiology. 2th Edition. John Wiley & Sons, Baltimore. pp. 597

Mollby, R., T. Holme, C.E. Nord, C.J. Smith and T. Wadstrom. 1976. Production of phospholipase C (alpha toxin), hemolysins and lethal toxins by *Clostridium perfringens* types A to D. J. Gen microbiol. 96: 137-144

Morange, M., B. Hévin and R.M. Fauve. 1993. Differential heat-shock protein synthesis and response to stress in three avirulent and virulent *Listeria* species. Res. Immunol. 144: 667-677

Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Georgopoulos. 1990. The stress response, funtion of the proteins and perspectives, p. 1-59. *In* Morimoto, R.I., A. Tessieres and C. Georgopoulos (Ed). Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 1-59

Murrel. T.G.C., B.G. Ingham, J.R. Moss and W.B. Taylor. 1987. A hypotesis concerning *Clostridium perfringens* type A enterotoxin (CPE) and sudden infant death syndrome (SIDS). Med. Hypothesis 22: 401-405

Naik, H.S. and C.L. Duncan. 1977b. Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counterimmunoelectrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 34: 125-128

Neidhardt, F.C. and R.A. VanBogelen. 1987. Heat shock response. *In* Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Magasanik and H.E. Umbarger (Ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.

Palter, K.B., M. Watanabe, L. Stinson, A.P. Mahowald and E.A. Craig. 1986. Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp 70 cognate proteins. Mol. Cell. Biol. 6: 1187-1203

Piggot, P.J. and J.G. Coote. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. Bacteriol. Rev. 40: 908-962

Piper, P.W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 11: 339-356

Qoronfleh, M.W. and U.N. Streips. 1987. Initial subcellular localization of heat-shock proteins in *Bacillus subtillis*. FEMS Microbiol. Lett. 43: 373-377.

Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia 18: 571-573

Robinson, J. and M. Messer. 1969. *Clostridium perfringens* food poisoning Texas. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 18: 20

Rose, N.R., H. Friedman and J.L. Fahey. 1986. Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Rosenthal, L.J., S.E. Martin, M.W. Pariza and J.J. Iandolo. 1972. Ribosome synthesis in thermally shocked cells of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 109: 243-249

Roy, R.J., F.F. Busta and D.R. Thompson. 1981. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* after growth at several constant and linearly rising temperatures. J. Food Sci. 46: 1586-1591

Ryu, S. and R.G. Labbé. 1989. Coat and enterotoxin-related proteins in *Clostridium perfringens* spores. J. Gen. Microbiol. 135: 3109-3118

Sacks, L.E. 1980. Influence of papaverine and purine derivates on sporulation of *Clostridium perfringens*. Abst. Am. Soc. Microbiol. pp. 105

Sakurai, J., S. Ochi and H. Tanaka. 1993. Evidence for coupling of *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis to stimulated phosphatidic acid formation in rabbit erythocytes. Infect. Immun. 61: 3711-3718

Sanchez, Y. and S.L. Lindquist. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. Science 248:1112-1115

Sato, H., J. Chiba and Y. Sato. 1989. Monoclonal antibodies against alpha toxin of *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. 59: 173-176

Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins. Bacterial. Rev. 33: 48-71

Sedlák, M., V. Vinter, J. Adamec and J. Chaloupka. 1992. Heat shock during sporulation increases thermotolerance of spores. Folia Microbiol. 38: 83-134

Shandera, W.X., C. O. Tacket and P.A. Blake. 1983. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. J. Infect. Dis. 147: 167-171

Sharp, J..C:M., P.W. Collier, G.I. Forbes and T.W. Hill. 1988. Survellance programme for the control of foodborne infection and intoxications in Europe: the first 6 years' experience in Scotland, 1980-85. Bulletin of the World Heath Organization 66: 471-480

Skjelkvale, R. and T. Uemura. 1977. Experimental diarrhoea in human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. 43: 281-286

Smith, B.J. and M.P. Yaffe. 1991. Uncoupling thermotolerance from the induction of heat shock proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 11091-11094

Smith, L.D. and B.L. Williams. 1984. The pathogenic anaerobic bacteria, 3rd ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill.

Smyth, C. J. and J.P. Arbuthnott. 1974. Properties of *Clostridium perfringens* (*welchii*) type A alpha-toxin (phospholipase C) purified by electrofocusing. J. Med. Microbiol. 7: 41-66

Spencer, S.A., E.S. Broughton, S. Hamid and D.B. Young. 1994. Immunoblot studies in the differential diagnosis of porcine brucellosis: an immunodominant 62 kDa protein is related to the mycobacterial 65 kDa heat shock protein (HSP-65). Vet. Microbiol. 39: 47-60

Stamm, L.V., F.C. Gherardini, P.E. Parrish and C.R. Moomaw. 1991. Heat shock proteins in Spirochetes. Infect. Immun. 59: 1572-1575

Sterne, M. and G.H. Warrack. 1964. The types of *Clostridium perfringens*. J. Pathol. Bacteriol. 88: 279-283

Stevens, D.L., K.A. Maier, B.M. Laine and J.E. Mitten. 1987. Comparison of Clindamycin, rifampin, tetracycline, metronidazole and penicillin for efficacy in prevention of experimental gas gangrene due to *Clostridium perfringens*. J. Infect. Dis. 155: 220-228

Strnadová, M., B. Vechet and J. Chaloupka. 1990. Elevated content of hsp 70 does not induce tolerance of sporulation to higher temperature. Folia Microbiol. 35: 130-137

Subjeck, J.R., T. Shyy, J. Shenand and R. Johnson. 1993. Association between the mammalian 110,000 dalton heat ahock protein and nucleoli. J. Cell. Bial. 97: 1389-1395

Sugahara, T., T. Takahashi, S. Yamaya and A. Ohsaka. 1977. Vascular permeability increase by α-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. Toxicon 15: 81-87

Sutton, R.G.A. and B.C. Hobbs. 1965. Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. A report of five recent outbreaks. J. Hyg. Camb. 66: 135-138

Swartz, M.N. 1985. Bacilos esporulados anaerobios: Clostridium, p. 579-588 *In* Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen and H.S. Ginsberg (Ed). Tratado de Microbiología. Tercera Edición. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España.

Takata, T., S.N. Wai, A. Takade, Y. Sawae, J. Ono and K. Amako. 1995. The purification of a GroEL-like stress protein from aerobically adapted *Campylobacter jejuni*. Microbiol. Immunol. 39(9): 639-645

Teixeira, P., H. Castro and R. Kirby. 1994. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. Lett. Appl. Microbiol. 18: 218-221

Tissieres, A., H.K. Mitchell and U. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. **84**: 389-398

Tood, E.C.D. 1978. Foodborne diseases in six countries- A comparison. J. Food. Protect. **41**: 559-563

Tood, J.A., J.P. Hubbard, A.A. Travers and D.J. Ellar. 1985. Heat-shock proteins growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. FEBS Lett. **188**: 209-214

Trent, J.D., J. Osipiuk and T. Pinkau. 1990. Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaebacterium *Sulfolobus sp.* strain B12. J. Bacteriol. 172: 1478-1484

VanBologen, R., M.A. Acton and F.C. Neidhardt. 1987. Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. Genes and Develop. 1: 525-531

Varela, P. and C.A. Jerez. 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Lett. 98: 149-154

Wallington, E.J. and P.A. Lund. 1994. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (cpn60) genes. Microbiology. 140: 113-122

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

Wnek, A. and B.A. McClane. 1989. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. Infect. Immun. 57: 574-581

Wrigley, D.M. 1990. Phospholipase C production and *Clostridium perfringens* growth in soy meal/ground beef mixtures. J. Food Safety. 10:295-306

Wu, Y.L., L.H. Lee, D.M. Rollins and W.M. Ching. 1994. Heat shock- and alkaline pH-induced protein of *Campylobacter jejuni*: characterization and immunological properties. Infect. Immun. 62: 4256-4260

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

Yokota, K., Y. Hirai, M. Haque, S. Hayashi, H. Isōgai, T. Sugiyama, E. Nagamachi, Y. Tsukada, N. Fujii and K. Oguma. 1994. Heat shock protein produced by *Helicobacter pylori*. Microbiol. Immunol. 38: 403-405

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

Young, D.B. 1992. Heat shock proteins: immunity and autoimmunity. Curr. Opinion Immun. 4: 396-400

Young, D.B. and T.R. Garbe. 1991. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. 59(9): 3086-3093

Zeilstra-Ryalls, J., O. Fayet, and C. Georgopoulos. 1991. The universally conserved GroE (Hsp 60) chaperonins. Annu. Rev. Microbiol. 45: 301-325

Zylicz, M., J. Nieradko and K. Taylor. 1983. *Escherichia coli dnaJ-* and *dnaK*-gene products: synthesis in minicells and membrane affinity. Biochem. Biophis. Res. Comm. 110: 176-180